

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Aislamiento de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en aguas residuales provenientes de dos industrias lácteas

José Sebastián Almagro Sánchez

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Aislamiento de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en
aguas residuales provenientes de dos industrias lácteas**

José Sebastián Almagro Sánchez

Nombre del profesor, Título académico

Sonia Zapata Mena, PhD

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: José Sebastián Almagro Sánchez

Código: 00130043

Cédula de identidad: 1718089194

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a Sonia Zapata Mena por su apoyo y tutoría en el transcurso de este estudio y sobretodo por brindarme la oportunidad de desarrollar y continuar con el proyecto a pesar de las dificultades que se presentaron en el mismo. En especial, agradezco a Rosita Bayas por su tutoría, su conocimiento y su paciencia que fueron de gran ayuda para la elaboración del presente proyecto y mi formación dentro del mismo. Gracias a Juan Mosquera por facilitar el acceso al laboratorio de Enseñanza y el uso equipos para la ejecución del proyecto. Agradezco, a David Valencia por su ayuda en la inducción del uso del microscopio de fluorescencia y por el préstamo del mismo. Finalmente, gracias a Melanie Ruales por su generosa colaboración de los reactivos para las tinciones, importantes para la investigación. Muchas gracias a todos que de alguna manera colaboraron con el proyecto.

RESUMEN

La industria láctea produce grandes cantidades de aguas residuales que son fuente de carbono y pueden promover la producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) por parte de bacterias autóctonas. Los PHAs forman parte del grupo de los biopoliésteres que son sintetizados intracelularmente por algunas bacterias y almacenados en forma de gránulos intracelulares como reserva de carbono y energía. Éstos presentan propiedades fisicoquímicas similares al plástico con la ventaja de ser biodegradables. En este estudio, se determinó la presencia de bacterias productoras de PHAs en aguas residuales provenientes de dos industrias lácteas. Para esto, se utilizó el medio minimal M9 más sales para aislar microorganismos que crezcan en condiciones mínimas de nutrientes. Posteriormente, la presencia de gránulos de PHAs en las colonias aisladas se evidenció mediante tinción con Sudán Negro y Rojo de Nilo. Las colonias que presentaron gránulos sugerentes de PHAs fueron identificadas mediante la secuenciación del gen *ARNr 16S*. Se identificó 5 consorcios microbianos productores de PHAs que pertenecen a los géneros, *Bacillus* y *Pseudomonas*. Algunas especies de los mencionados géneros bacterianos han sido previamente identificados como productores de PHAs. Estas bacterias, por un lado, promueven la reducción de materia orgánica y por otro lado, la producción de polímeros precursores de bioplástico; lo cual, representa una alternativa sustentable para la disminución de la contaminación ambiental por el plástico proveniente de combustibles fósiles.

Palabras clave: Polihidroxialcanoatos, bioplástico, bacterias, gen *ARNr 16S*, aguas residuales lácteas, gránulos intracelulares.

ABSTRACT

The dairy industry produces large amounts of wastewater that is a carbon source and can promote the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by indigenous bacteria. PHAs are part of the group of biopolyesters that are synthesized intracellularly by some bacteria and stored as intracellular granules as a carbon and energy reserve. The biopolyesters have physicochemical properties similar to plastic with the advantage of being biodegradable. In this study, the presence of PHA-producing bacteria was determined in wastewater from two dairy industries. For this, the minimal medium M9 plus salts was used to isolate microorganisms that grow under minimal nutrient conditions. Subsequently, the presence of PHAs granules in the isolated colonies was evidenced by Sudan Black and Nile Red stains. The colonies that presented granules suggestive of PHAs were identified by sequencing the *16S rRNA* gene. As a result, five bacterial consortia were isolated belonging to the genus *Bacillus* and *Pseudomonas*. Some species of these genera have been previously-identified as PHAs producers. These bacteria promote the reduction of organic matter and the production of bioplastic precursor polymers, which represents a sustainable alternative for reducing environmental contamination by plastic from fossil fuels.

Key words: Polyhydroxyalkanoates, bioplastic, bacteria, *16S rRNA* gene, dairy wastewater, intracellular granules.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	11
MÉTODOS.....	17
Colección de muestras	17
Aislamiento de microorganismos productores de polihidroxialcanoatos (PHAs).....	17
Identificación de microorganismos productores de polihidroxialcanoatos (PHAs).....	18
<i>Identificación de gránulos intracelulares</i>	18
<i>Identificación molecular</i>	20
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN.....	25
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
TABLAS.....	41
FIGURAS	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aislamiento de microorganismos productores de polihidroxialcanoatos presentes en aguas residuales de dos industrias lácteas.....	41
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía óptica (1000X) de gránulos de polihidroxicanoatos (PHAs) teñidos con Sudán Negro.....	42
Figura 2. Microscopía de fluorescencia (1000X) de gránulos de polihidroxicanoatos (PHAs) teñidas con Rojo de Nilo.....	43
Figura 3. Visualización de los productos de PCR del gen <i>ARNr 16S</i> en gel de agarosa al 1,5 %.....	44
Figura 4. BLAST de la secuencia de 1386 pb de <i>Bacillus</i> obtenida de la muestra A de aguas residuales lácteas.....	45
Figura 5. BLAST de la secuencia de 550 pb de <i>Pseudomonas</i> obtenida de la muestra A de aguas residuales lácteas.....	46

INTRODUCCIÓN

El plástico, uno de los productos más usados mundialmente, puede ser producido de diferentes fuentes de las cuales las materias primas usadas son de origen fósil como el petróleo crudo (PlasticsEurope, 2019). El plástico de origen fósil es uno de los productos accesible comparando con otras alternativas sustentables, el mismo es usado ampliamente en la industria global gracias a sus características: inoxidables, ligeros, inocuos, insolubles, termoestables y moldeables (PlasticsEurope, 2016). Alrededor del 50 % de los residuos producidos en el mundo son plásticos de un solo uso en donde la producción mundial es de alrededor de 450 millones de toneladas (ONU, 2018). Del total de residuos generados por el plástico solamente un 9 % es reciclado eficientemente (Moreira, 2018).

El plástico de un solo uso que generalmente es desechado puede tardar hasta 100 años en biodegradarse y cuando es incinerado genera gases como benceno y estireno (Moreira, 2018; Kasper, 2017), convirtiéndose en el principal elemento contaminante ambiental. Para el 2050, se estima que la cantidad de plástico desechado cubrirá el doble del área del tamaño de Francia y será una de las principales causas de pérdida de biodiversidad (ONU, 2018), causando un impacto negativo para el medio ambiente. La creciente demanda del consumo de plásticos de un solo uso promueve la producción de nuevos materiales biodegradables que sustituyan a los plásticos convencionales, incrementando así la protección del medio ambiente y el desarrollo sustentable (Urtuvia, Villegas, González, & Seeger, 2014).

En las últimas décadas, la producción de bioplásticos se ha considerado como una alternativa sustentable para el uso del plástico convencional (Amaro, Rosa, Comi, & Iacumin, 2018; Andler & Barrera, 2013). Una opción de bioplásticos son los polihidroxicanoatos (PHAs) debido a su biodegradabilidad y propiedades fisicoquímicas (Amaro et al., 2018; Urtuvia et al., 2014). Los PHAs se caracterizan por ser biocompatibles, insolubles en agua,

termoestables, gran elasticidad, entre otras características (Koller et al., 2012). En promedio se estima que el 85 % de los PHAs producidos se degradan alrededor de 52 días (Viteri, 2018; Reddy, Ghai, & Kalia, 2003).

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopolímeros sintetizados por microorganismos como bacterias, arqueas y algas en respuesta a una limitación o desbalance en su medio de uno o varios micronutrientes como oxígeno, nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio, hierro o potasio y en un exceso de carbono (Lemos & Cordoba, 2015; Valero, Ortegón, & Uscategui, 2013). Los microorganismos productores de PHAs suelen ser autóctonos y proporciona una mayor supervivencia al estrés ambiental (Bello, 2007). Estos microorganismos acumulan PHAs en gránulos dentro del citoplasma como reserva de carbono y energía para el funcionamiento de sus procesos metabólicos esenciales (Urtuvia et al., 2014; Laxmana, Sanjeevani, & Anusha, 2013). Los PHAs han sido identificados en bacterias Gram negativas y positivas como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ralstonia*, *Staphylococcus*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Rhodobacter* y *Azotobacter* (González, Meza, Reynoso, & Córdova, 2013; Chen, 2009).

La tasa de producción de polihidroxicanoatos (PHAs) difiere dependiendo del género, el nutriente limitante y de la velocidad de crecimiento (Bello, 2007). Alrededor de 150 monómeros de PHAs han sido reportados; sin embargo, los monómeros más comunes son 3-hidroxiбутирато (3HB) y 3-hidroxiуалерато (3HV) (Urtuvia et al., 2014). De todos los grupos de PHAs, el compuesto poli3-hidroxiбутирато (PHB) tiene propiedades físicas muy similares al polipropileno (Reddy et al., 2003). La síntesis de PHAs inicia con la producción de Acetil-CoA que es catalizada a 3-hidroxiбутирил-CoA mediante la acción de la enzima Acetoacetyl-CoA reductasa. La molécula 3-hidroxiбутирил-CoA es sintetizada mediante la enzima PHA sintasa codificada por el gen *phaC* para dar como producto 3-hidroxiбутирато (3HB) que constituye la base química para formar las diferentes formas de PHAs (Blanco, 2010). Por otro lado, si los nutrientes esenciales decrecen en el medio y la fuente de carbono es insuficiente los

microorganismos usan el 3-hidroxi-butarato (3HB) para la producción de energía mediante la acción de la enzima despolimerasa (PHAz) (Koller et al., 2013). La producción de PHAs cesa cuando alcanza una acumulación entre el 80 % y 90 % del peso seco celular del microorganismo. Por tanto, la disponibilidad de los sustratos y la acción de la enzima PHA sintasa tienen restricciones físicas para acumular PHAs dentro de los microorganismos (Lemos & Cordoba, 2015).

El alcance de los polihidroxi-alcanoatos (PHAs) es amplio y puede ser usado en muchas aplicaciones. Entre las aplicaciones de los PHAs se destaca su uso en la industria alimenticia a través de la fabricación de material de empaque y sustitutos de recipientes de botellas plásticas, servilletas, bolsas y otros productos de un solo uso (Koller et al., 2013); en la industria médica como sustitutos de jeringas, lubricantes para guantes desechables y en el uso de bioimplantes (González et al., 2013); y en la industria agrícola para la fabricación de macetas y contenedores de pesticidas (Andler & Barrera, 2013).

Desde su descubrimiento en 1980 en *Bacillus* se han desarrollado varias técnicas de identificación fenotípica y molecular para aislar bacterias productoras de polihidroxi-alcanoatos (PHAs). Debido a la característica lipídica de los PHAs, por la presencia de un grupo éster, se usa una combinación de colorantes de naturaleza lipofílica como el Sudán Negro (Schlegel, Lafferty, & Krauss, 1970), Rojo de Nilo (Gorenflo, Steinbüchel, Marose, Rieseberg, & Scheper, 1999; Spiekermann, Rehm, Kalscheuer, Baumeister, & Steinbüchel, 1999) y/o Azul de Nilo (Ostle & Holt, 1982) para la detección de gránulos de PHAs en bacterias productoras. Con estos métodos los gránulos de PHAs se tiñen y se observan bajo un microscopio de contraste de fase o fluorescente. La detección con la tinción de Sudán Negro se basa en una coloración lipofílica donde se tiñen todos los cuerpos lípidos como grasas neutras y esteroides presentes en el citoplasma (Jiménez, Guadalupe, & Noriega, 2017), por tanto, no es específico de los PHAs. Mientras que, el Rojo de Nilo es un colorante con la característica de ser

liposoluble y fluorescente a determinadas longitudes de onda. El Rojo del Nilo es más específico que el Sudán Negro para la detección de PHAs debido a que el colorante se solubiliza en conjunto con los biopolímeros de las células vivas (Corradini & McClements, 2017; Neissa, Aukema, Gralnick, & Wackett, 2011; Spiekermann et al., 1999).

Para la identificación molecular de las bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) se ha desarrollado métodos de detección como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Lane & Benton, 2015; Sheu, Wang, & Lee, 2000; Solaiman, Ashby, & Foglia, 2000). Para lo cual, se han desarrollado marcadores para la amplificación del gen *phaC* que codifica la enzima sintasa y/o de los genes *phaA* (β -Ketotiolasa), *phaB* (Acetoacetyl-CoA reductasa) y *PHA polimerasa*, que participan en la biosíntesis de PHAs (Montenegro, Delabary, Silva, Andreote, & Lima, 2017; Shamala, Chandrashekar, Vijayendra, & Kshama, 2003; Sheu et al., 2000; Solaiman et al., 2000).

Las bacterias autóctonas pueden utilizar los desechos de industrias lácteas, de aceites, y la agroindustria como materia prima para producir polihidroxicanoatos (PHAs). Estos residuos industriales se caracterizan por ser potenciales fuentes de azúcares, ácidos grasos y carbono (Reddy et al., 2003). En particular, la industria láctea produce mundialmente alrededor de 852 toneladas de suero líquido que son desechados sin tratamiento junto con las aguas residuales (FAO, 2020). En el Ecuador, el ministerio de agricultura y ganadería (MAG) estimó que la producción de leche fue de aproximadamente 5 millones de litros en donde el 50 % de los residuos no fueron tratados adecuadamente en el 2019 (MAG, 2019) debido a que su tratamiento es costoso y complicado. Un total aproximado de 80 a 150 mil metros cúbicos por día de aguas residuales constituidas principalmente por suero líquido son producidas por la industria lácteas (Luque, 2018), representando alrededor del 85 a 95 % del volumen de la leche (FAO, 2018). La industria láctea genera residuos con altas concentraciones de lactosa aumentando exponencialmente la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y la demanda

química de oxígeno de (DQO) en el medio generando una disminución del oxígeno disuelto, responsable de pérdida de biodiversidad acuática (Santamaría, Álvarez, Santamaría, & Zamora, 2015). Por tanto, estos desechos sin tratamiento previo ricos en materia orgánica y con una disminución del oxígeno disuelto son canalizados a ríos, océanos y lagos, causando un impacto negativo en la biodiversidad acuática (Calero, 2017; Santamaría et al., 2015).

El suero lácteo presente en las aguas residuales se caracteriza por ser rico en carbono, principal fuente para la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) por parte de las bacterias. El aprovechamiento de aguas residuales lácteas ricas en carbono para aislar microorganismos productores PHAs reduciría el costo de producción de los mismos (Koller et al., 2012) así como el costo de la gestión de residuos (Andler & Barrera, 2013; Valero et al., 2013). Estudios en la región, usan el suero de leche u otros subproductos lácteos como materia prima para aislar bacterias productoras de PHAs (González et al., 2013). En ese tipo de ambientes se han reportado la presencia de *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Lactococcus* como bacterias productoras de PHAs (Cardona, Mora, & Marín, 2013).

En el Ecuador, los estudios relacionados con la identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoato (PHAs) son escasos. Los estudios se han enfocado en muestras de suelo y de aguas termales para aislar este tipo de bacterias (Balseca, 2019; Llumigusín, 2018). En estos estudios se reporta a *Citrobacter freundii* y *Bacillus licheniformis* como responsables de producir PHAs obtenidas de muestras de suelo y aguas termales, respectivamente (Balseca, 2019; Llumigusín, 2018). Sin embargo, en el país hasta el momento no existe estudios relacionados con la presencia de bacterias productoras de PHAs en aguas residuales de la industria láctea de ahí la importancia de identificar bacterias productoras de PHAs de aguas residuales provenientes de industrias lácteas locales.

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar bacterias autóctonas productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en aguas residuales provenientes de dos industrias lácteas de la provincia de Pichincha.

MÉTODOS

Colección de muestras

Las muestras de aguas residuales fueron colectadas de dos industrias lácteas de la provincia de Pichincha. En total se colectó tres muestras de aguas residuales en recipientes estériles: una muestra de la industria A y dos muestras provenientes de industria B. De la industria A se colectó un galón de agua residual sin tratamiento previo antes de ser desechada (Muestras A). Mientras que, de la industria B se colectó dos muestras de 500 ml de agua residual: a) muestra proveniente de agua residual que no ha sido sometida a tratamiento previo (Muestra B) y b) muestra de agua residual que ha tenido tratamiento previo antes de ser eliminada (Muestra C). Las muestras fueron llevadas inmediatamente al Instituto de Microbiología USFQ y conservadas a temperatura ambiente hasta el momento de su procesamiento.

Aislamiento de microorganismos productores de polihidroxicanoatos (PHAs)

Para el aislamiento de colonias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) se realizó con un medio de sales minerales modificado (Nygaard, Yashchuk, & Hermida, 2019; Llumigusín, 2018). Los medios minimales, líquido y sólido, para el aislamiento de PHAs contienen principalmente medio M9 (Sigma-Aldrich), que es un medio mínimo de crecimiento microbiano, y otras sales minerales. Para esto, se preparó 500 ml de solución del medio M9 5X (pH 7.4) de acuerdo a las indicaciones del fabricante; en 500 ml de agua destilada se colocó 28,2 gramos de medio M9, la solución se autoclavó por 15 minutos a 121 °C. A continuación, se preparó el medio minimal 1X, para lo cual se tomó 100 ml de la solución del medio M9 5X y se colocó en 400 ml de agua destilada autoclavada. Al medio M9 1X estéril se agregó los siguientes elementos: 500 µl de MgSO₄ (1mM), 500 µl de CaCl₂ (100 µM), 500 µl de FeSO₄ * 7 H₂O (3 µM) y 500 µl del suplemento *Trace Metal Mix A5 with Co* (Sigma-Aldrich). Para

mantener la esterilidad del medio M9 1X, las soluciones de las diferentes sales que no son autoclavadas se les añade con filtros de 0.2 μM (Merck). El suplemento *Trace Metal Mix A5 with Co* (Sigma-Aldrich) contiene cinco elementos traza: H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

El medio sólido se lo preparó de la siguiente manera: a 500 ml del medio minimal 1X se agregó Bacto Agar al 1,5 % y se autoclavó por 15 minutos a 121 °C. Después, al medio autoclavado se agregó los siguientes elementos: 500 μl de MgSO_4 (1mM), 500 μl de CaCl_2 (100 μM), 500 μl de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 μM) y 500 μl del suplemento *Trace Metal Mix A5 with Co* (Sigma-Aldrich).

Las tres muestras de aguas residuales colectadas se cultivaron en medio minimal líquido 1X (medio M9 más sales). Para determinar en qué condiciones crecerían las bacterias, cada muestra se sembró en tres diferentes diluciones 1:10, 1:20 y 1:50. En la dilución 1:10 se colocó 90 ml de medio minimal 1X con 10 ml de muestra, para la dilución 1:20 se colocó 80 ml de medio minimal 1X con 20 ml de muestra y para la dilución 1:50 se agregó 50 ml de medio minimal 1X con 50 ml de muestra. Las diferentes diluciones se incubaron en baño maría a 36 °C con agitación por 72 horas en condiciones aerobias. Posteriormente, todas las muestras que presentaron crecimiento en el medio líquido fueron inoculadas en medio minimal sólido 1,5 % e incubadas a 36 °C durante 72 horas en condiciones aerobias. Para mantener un cultivo puro, las colonias que crecieron fueron aisladas e inoculadas en un nuevo medio minimal sólido 1,5 % y conservadas a temperatura ambiente para posteriores análisis.

Identificación de microorganismos productores de polihidroxicanoatos (PHAs)

Identificación de gránulos intracelulares.

Las colonias que crecieron en el medio sólido se las clasificó de acuerdo a sus características morfológicas, para lo cual se tomó en consideración su forma, tamaño (grande

o pequeño) y color (transparentes o cremas). Para clasificar a las colonias por su forma se usó la tinción Gram, las colonias se observaron en microscopio óptico (Olympus CX23) con un aumento de 1000X.

Para la identificación de los gránulos intracelulares se realizó dos tinciones, Sudán negro y Rojo de Nilo (Salinas, Muñiz, & Delgado, 2014; Spiekermann et al., 1999). Para la tinción Sudán Negro, de una colonia aislada se preparó un frotis en donde se colocó tres gotas de la solución de Súdán Negro (0,3 % p/v en etanol al 70 %), se dejó reposar 10 minutos hasta que el etanol se evapore, se retiró el exceso con un papel filtro e inmediatamente el frotis se sumergió en xileno durante 15 segundos y se dejó secar por cinco minutos. Finalmente, el frotis se sumergió en safranina (0.5 % p/v en agua destilada) durante 1 minuto, se escurrió el exceso y se lavó con agua destilada. Las muestras se observaron en el microscopio óptico (Leica DM500) con un aumento de 1000X. Los resultados fueron documentados mediante fotos. Las bacterias que presentaban gránulos intracelulares sugerentes de PHAs tienen una coloración negra.

Para la tinción con Rojo de Nilo, una colonia aislada del medio sólido se inoculó en 30 ml de medio minimal 1X (medio M9 más sales) y se incubó a 36 °C por 72 horas. Del crecimiento se tomó 100 µl y se colocó en un tubo eppendorf adicionalmente se agregó 100 µl de solución de Rojo de Nilo (2 µg/ml + DMSO), la solución se agitó en vórtex por 1 minuto y se incubó a 55 °C por 30 minutos. Al tubo eppendorf se lo cubrió con papel aluminio para proteger la solución de la luz directa. Las muestras preparadas se visualizaron a una longitud de onda de 550 nm para la excitación y de 560 nm para la emisión de fluorescencia en microscopio de fluorescencia (Olympus BX50) con un aumento de 1000X. Los resultados fueron registrados mediante fotos. Las bacterias que presentaban gránulos intracelulares sugerentes de PHAs tienen una fluorescencia de color rojo.

Identificación molecular.

Las colonias sugerentes de la presencia de polihidroxicanoatos (PHAs) se seleccionaron para la extracción de ADN. El material genético se obtuvo mediante el método de ebullición (Martínez, 2018); para lo cual, una colonia se colocó en 300 µl de agua destilada estéril, la misma que se sometió a ebullición por 10 minutos. El material genético se almacenó a -20 °C hasta el momento de su amplificación.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se amplificó el gen *ARNr 16S*, para lo cual se usó los *primers* universales 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Chen, et al., 2015). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 µl, la misma que contenía buffer de PCR *GoTaq* 1X (Promega), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (2 mM), cada *primer* (10 µM), *Taq* ADN polimerasa (1U/µl) y ADN (20 ng). Las condiciones del PCR fueron las siguientes: una denaturación inicial a 94 °C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 minuto, *annealing* a 55 °C por 30 segundos y extensión 72 °C por 40 segundos, seguidos de una extensión final a 72 °C por 8 minutos. Los productos de PCR fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. Los resultados fueron documentados mediante el sistema computacional de ImageLab software (Biorad).

Los productos de PCR se enviaron a secuenciar a Macrogen, Corea. Las muestras fueron secuenciadas mediante el método de Sanger para los dos *primers forward* y *reverse*. Para obtener la secuencia consenso, las secuencias obtenidas de los dos *primers* fueron alineadas para su edición y limpieza con los programas pregap4 y Gap4 (Staden, 1996). Las identidades de las secuencias obtenidas fueron identificadas mediante una comparación con las secuencias disponibles en la base del *GenBank* usando la herramienta BLAST (Altschul, Gish, Miller,

Myers, & Lipman, 1990). La identidad de las secuencias fue evaluada tomando en consideración el porcentaje de identidad.

RESULTADOS

Como resultado de la inoculación de las tres muestras en diferentes diluciones, se observó crecimiento de microorganismos tanto en el medio líquido como en el medio sólido. Sin embargo, un mayor crecimiento y aislamiento de colonias se observó en la dilución 1:20 tanto en el medio líquido como sólido (Tabla 1). En total, se aislaron cinco colonias de la dilución 1:20 de las muestras de aguas residuales obtenidas de las plantas de tratamiento de dos industrias lácteas. Las colonias se nombraron del 1 al 5. Dos colonias grandes de color crema se obtuvieron de la muestra A (Colonias 1 y 2). Las dos colonias son bacilos, Gram negativo y Gram positivo. De la muestra B creció una colonia pequeña e incolora con morfología de coco Gram positivo (Colonia 3); mientras que, de la muestra C crecieron dos colonias pequeñas: una colonia transparente y otra de color crema que son bacilos, Gram negativo y Gram positivo (Colonia 4 y 5).

Como resultado de las dos tinciones, todas las colonias analizadas presentaron inclusiones intracelulares sugestivas a gránulos de polihidroxicanoatos (PHAs). En todas las muestras se observan inclusiones relativamente circulares de color negro en el interior de las células mediante la tinción con Sudán Negro (Figura 1); mientras que, las inclusiones intracelulares teñidas con Rojo de Nilo se indican como puntos circulares de color rojo intenso y medio intenso fluorescentes (Figura 2).

Como resultado de la amplificación del gen *ARNr 16S*, de las cinco colonias se obtuvo una banda alrededor de 1500 pb (Figura 3). A nivel de secuenciación, no fue posible la identificación molecular de las colonias 3, 4 y 5, obtenidas de las muestras B y C. Las tres secuencias presentan más de dos lecturas a nivel de secuenciamiento por lo que la colonia puede tener una o más cepas. Por otro lado, para las dos colonias aisladas de la muestra A (colonias 1 y 2) se obtuvieron secuencias de 1386 pb y de 550 pb las mismas que fueron

identificadas sólo a nivel de género como *Bacillus* y *Pseudomonas*, respectivamente. Las dos secuencias presentaban un alto nivel de identidad con varias secuencias del género respectivo (Figura 4 y 5).

A continuación se detalla la secuencia consenso obtenida de la colonia 1 de la muestra A identificada como *Bacillus*:

```
GGTTACCCACCGACTTCGGGTGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTG
TACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGA
TTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAATGGTTTTA
TGGGATTCGCTTAACCTCGCGGTCTCGCAGCCCTTTGTACCATCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCT
CCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAG
ATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTG
ACGACAACCATGCACCACCTGTCATCCTGTCCCCGAAGGGGAACGCCCTATCTC
TAGGGTTGTCAGGAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATT
AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGC
CTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGCTGCAGCACTAAAG
GGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGT
ATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAA
AGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACAC
GTGGAATTCCACTCTTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCC
CCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGGAACCGCCTGCGCGCGCTTT
ACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGC
ACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGGCAGTTACTC
CGGTACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGTTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACT
CACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTG
```

CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCCTCTC
 AGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATG
 CGCCGCGGGCCCATCTGTAAGTGATAGCCGAAACCATCTTTCAGCTTTCCTCAT
 GTGAGGGAAAGAATTATCCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCT
 TACAGGCAGGTTGCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTGACTTCAGGGAGCA
 AGCTCCCATCT

Secuencia consenso obtenida de la colonia 2 de la muestra A identificada como
Pseudomonas:

ATGAAGGGAGCTTGCTCCCTGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGA
 ATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACGCATACG
 TCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAG
 GTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACT
 GGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC
 GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATG
 CCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAG
 GGCATTAACCTAATACGTTAGTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCT
 AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
 ACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGG
 GCTCAACC

DISCUSIÓN

Los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* se encontraron en las aguas residuales de una industria láctea de la provincia de Pichincha, Ecuador. Varias especies de *Bacillus* y *Pseudomonas* aisladas de diferentes fuentes han sido ampliamente identificadas como productores de gránulos de polihidroxialcanoatos (PHAs) (Mohapatra et al., 2017; Gumel, Annuar, & Heidelberg, 2012; Obruca, Marova, Melusova, & Mravcová, 2011; Kourmentza, Ntaikou, Kornaros, & Lyberatos, 2009). Similar, en otros estudios se reporta la presencia de *Pseudomonas* y *Bacillus* en aguas residuales lácteas (Yadav, Puranik, Fairuze, & Prabha, 2019; Cardona et al., 2013). Las aguas residuales se caracterizan por proporcionar el ambiente adecuado para la proliferación de bacterias productoras de PHAs. En particular, las bacterias de aguas residuales lácteas acumulan PHAs a partir de lactosa que es la principal fuente de carbono.

Las especies del género *Bacillus* productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) se caracterizan por tener una alta tasa de crecimiento en condiciones limitadas (Zaki, 2018; Cardona et al., 2013). Por el contrario, las especies de *Pseudomonas* son versátiles a la tolerancia en varios sustratos residuales, sin embargo, no son tan eficientes al momento de sintetizar PHAs sus valores de producción son bajos en comparación con otros géneros bacterianos (Mozejko, Szacherska, & Marciniak, 2019; Gumel et al., 2012; Silva, Silva, Pradella, Pereira, & Gomez, 2009). *Bacillus* por su capacidad hidrolítica facilita el metabolismo de sustratos crudos de bajo costo y alto rendimiento de producción de PHAs (Mohapatra et al., 2017). Las especies de los dos géneros son ampliamente usadas para la síntesis y producción de PHAs por lo que tienen un gran potencial biotecnológico (Keshavarz & Roy, 2010).

Dentro del género *Bacillus*, se destaca la especie *B. subtilis* que tiene una gran capacidad de producir 40,6 % de gránulos de en relación con su peso en seco (Singh, Patel, & Kalia, 2009). Otras especies importantes son *B. megaterium* que produce alrededor de 2,80 g de PHA por litro de medio de cultivo (Cardozo et al., 2016; Obruca et al, 2011) y *B. thurigiensis* capaz de formar polímeros de PHA hasta un 40 % del total del peso seco de la célula (Shivakumar, 2011). Mientras que, dentro del género *Pseudomonas*, la especie *P. hidrogenovora* es capaz de sintetizar 1,27 g de gránulos de PHA por litro de medio de cultivo (Koller et al., 2008) y *P. aeruginosa* con una capacidad de producir 0,005g /L por hora de PHAs (Amaro et al., 2018). Sin embargo, estudios relacionados con la producción *in vitro* de PHAs indican que las especies de *Pseudomonas* tienden a acumular grandes cantidades de gránulos de PHAs cuando se usa aguas residuales lácteas como fuente de carbono (Chandrika et al., 2020; Young, Kastner, & May, 1994).

En el presente estudio, no se pudo llegar a determinar a nivel de especie de las colonias aisladas de las aguas residuales lácteas. Esto es porque para la identificación molecular se utilizó un solo marcador, el gen *ARNr 16S*, y porque la región secuenciada fue demasiado corta. Este marcador es ampliamente usado en otros estudios para identificación molecular a nivel de género o especie (Moya, 2017; Rodicio & Mendoza, 2014; Bou et al., 2011). Sin embargo, este marcador no es específico para diferenciar especies del género *Bacillus* ya que para la identificación de especies del mencionado género se deben usar otros marcadores adicionales como los genes *gyrA* o el gen de la enzima endoglucanasa (Ashe, Maji, Sen, Mohanty, & Maiti, 2013). El gen *gyrA* ayuda a diferenciar especies muy cercanas de *Bacillus* como *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis* y *B. subtilis*; mientras que, el gen de la enzima endoglucanasa permite diferenciar a *B. subtilis* de otros *Bacillus* (Chun & Sook, 2010). Por otro lado, la identificación de *Pseudomonas* fue basada en una secuencia consenso pequeña. Una secuencia consenso completa o más larga ayudaría a determinar la identidad a nivel de especie (Moya,

2017). Sin embargo, para la identificación de especies de *Pseudomonas* se puede utilizar marcadores adicionales como son los genes *gyrB*, *rpoB* y *rpoD* (Matthijs et al., 2012; Holmes, 2004).

Las colonias aisladas de las aguas residuales lácteas que no se pudieron identificar mediante secuenciamiento probablemente se deba a que pueden tratarse de cepas que viven como consorcio. Las cepas que viven en consorcio no se las puede aislar por métodos tradicionales, por tanto, el secuenciamiento de Sanger no es útil para identificar este tipo de cepas. Estudios han reportado la presencia de especies bacterianas productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) que viven en consorcio (Sabapathy et al., 2020; Koller et al., 2013). Un estudio reporta un consorcio bacteriano conformado por *Bacillus firmus* y *Lactobacillus delbrueckii*. Dentro del consorcio *B. firmus* tiene la capacidad de acumular gránulos de PHAs en grandes concentraciones; mientras que, *L. delbrueckii* proporciona la síntesis de ácido acético a partir de sustratos complejos (Shalin, Sindhu, Pandey, Faraco, & Binod, 2016). Por otro lado, otro estudio indica la presencia de consorcios conformados por especies de *Pseudomonas* aisladas de aguas municipales (Kourmentza et al., 2009).

La presencia de diversidad de microorganismos derivados de agua residuales lácteas coexistiendo en consorcios es alta (Centeno, Quitana, & Fuentes, 2019). Identificar la presencia de consorcios conformados por especies productoras de PHAs es relevante debido que el conjunto de estas bacterias metabolizan sustratos complejos y producen PHAs en mayor cantidad en comparación a bacterias aisladas (Shalin et al., 2016). Para la identificación de las especies que se encuentran en consorcios bacterianos se utiliza secuenciamiento de nueva generación. Una de las técnicas más utilizadas es la metagenómica de la región 16S de organismos cultivables y no cultivables (Izquierdo, 2015), permitiendo de esta forma analizar e identificar varias especies productoras de PHAs presentes dentro de un consorcio.

Las tinciones con Sudán Negro y Rojo de Nilo permitieron la identificación de gránulos sugestivos de polihidroxicanoatos (PHAs). Sin embargo, comparando los resultados con los dos métodos de tinción, se observó resultados favorables aquellos obtenidos con la tinción de Rojo de Nilo que con la tinción de Sudán Negro. Las tinciones con Sudán Negro y Rojo de Nilo son ampliamente usadas como pruebas discriminatorias de microorganismos productores de PHAs a pesar de las limitaciones que puedan tener los dos métodos debido a su naturaleza lipofílica (Walter, 2020; Romero, Guerra, & Pardo, 2016; Mesquita, et al., 2015; Legat, Gruber, Zangger, Wanner, & Stan-Lotter, 2010; Shamala et al., 2003). Aunque la tinción por Sudán Negro es una técnica barata y fácil de proceder, el colorante es inespecífico por lo que puede teñir otros cuerpos lipídicos como triacilgliceroles y otros esteroides presentes en las células (Romero et al., 2016; Shamala et al., 2003), promoviendo dificultad en identificar los gránulos de PHAs causando falsos positivos. Los resultados de fluorescencia mostraron que la tinción con Rojo de Nilo fue más eficiente con una mayor afinidad hacia los gránulos sugestivos de PHAs. Aunque la tinción de Rojo de Nilo puede generar uniones inespecíficas a los componentes celulares (Legat et al., 2010), este colorante tiene una mayor especificidad para detección de gránulos citoplasmáticos de PHAs que el colorante Sudán Negro (Legat et al., 2010).

Las tinciones ayudan a identificar colonias sugerentes de producción polihidroxicanoatos (PHAs), sin embargo, no son confirmatorias. Los métodos moleculares apoyan a los análisis para confirmar la presencia de microorganismos productores de PHAs. En particular, el análisis molecular permite evidenciar los genes responsables que codifican las enzimas que participan en la biosíntesis de los PHAs (Montenegro et al., 2017). Para facilitar el análisis, se han desarrollado marcadores específicos para la amplificación e identificación de regiones específicas del gen que codifica la enzima PHA sintasa. En el presente estudio, no fue posible la identificación molecular de los genes que participan en la síntesis de PHAs. Para

la detección molecular de los gránulos de PHAs se recomienda usar los marcadores diseñados exclusivamente para *Pseudomonas* y *Bacillus* (Shamala et al., 2003; Solaiman et al., 2000), géneros identificados en el presente estudio.

El presente estudio constituye una línea base para seguir con las investigaciones de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) aisladas de aguas residuales lácteas. Los resultados del presente estudio tienen impacto a nivel de conservación y sustentabilidad. En primer lugar, el estudio muestra que el uso aguas residuales de las industrias lácteas representan una fuente para la obtención de bacterias productoras de PHAs. Las aguas residuales de la industria láctea constituyen fuentes principales de carbono para el aislamiento de este tipo de bacterias. Por tanto, su uso se convierte en una alternativa sustentable de depuración de aguas residuales lácteas que son altamente contaminantes. Por otro lado, al identificar las bacterias productoras de PHAs se obtiene una fuente de producción de biopolímeros biodegradables que constituyen una alternativa al uso de plásticos de origen fósil (Navas, 2012). Por tanto, el presente estudio constituye una línea base para la investigación de los microorganismos autóctonos presentes en aguas residuales de industrias lácteas locales que pueden ser aislados para producir productos derivados de PHAs que sustituyan efectivamente a plásticos petroquímicos de un solo uso.

Finalmente, el estudio presentó algunas limitaciones, una de ellas fue el reducido número de muestras provenientes de dos industrias lácteas. Por otra parte, la mayoría de aislados no pudieron ser identificadas mediante el secuenciamiento del gen *ARNr 16S*. Tomando en consideración lo antes mencionado, se sugiere muestrear aguas residuales de varias industrias lácteas para obtener una mayor diversidad de microorganismos productores de PHAs. Además, debido a la presencia de consorcios bacterianos se sugiere el empleo de técnicas de secuenciamiento masivo del marcador genético del gen *ARNr 16S* (metagenómica) junto con

la detección de los genes que participan en la biosíntesis de los PHAs con los marcadores diseñados para *Bacillus* y *Pseudomonas*.

CONCLUSIONES

Se identificó consorcios microbianos productores de polihidroxicanoatos (PHAs) en aguas residuales de dos industrias lácteas, identificados como *Bacillus* y *Pseudomonas* los cuales han sido previamente relacionados con la producción de bioplástico.

Las tinciones con Sudán Negro y Rojo de Nilo permitieron la identificación de gránulos sugestivos de polihidroxicanoatos (PHAs) en las bacterias asociadas debido a la afinidad de los colorantes con la naturaleza lipofílica de estos gránulos.

Las bacterias productoras de PHAs obtenidas de aguas residuales pueden ser utilizadas para la producción de polímeros precursores de bioplástico, lo cual representa una alternativa sustentable para la disminución de la contaminación ambiental por el plástico proveniente de combustibles fósiles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410.
- Amaro, T., Rosa, F., Comi, G., & Iacumin, L. (2018). Prospects for the use of whey for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 992-1000.
- Andler, R., & Barrera, A. (2013). Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. *Ingengerare*, *27*, 29-36.
- Ashe, S., Maji, U., Sen, R., Mohanty, S., & Maiti, N. (2013). Specific oligonucleotide primers for detection of endoglucanase positive *Bacillus subtilis* by PCR. *3 Biotech*, *4*(5), 461–465.
- Balseca, P. (2019). *Determinación de la producción de polihidroxicanoatos (PHA's) a partir de una cepa de Bacillus licheniformis de la fuente geotermal en Guapán-Ecuador, usando diferentes fuentes de carbono bajo condiciones de laboratorio* (Tesis de pregrado). Universidad De Las Fuerzas Armadas, Ecuador.
- Bello, G. (2007). Selección de bacterias productoras de Poli-hidroxibutirato. *ICIDCA*, *21*(2), 10-18.
- Blanco, K. (2010). *Detección de gránulos de polihidroxicanoatos en la cepa USBA 355 Tistlia consotensis* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *29*(8), 601–608.
- Calero, R. (2017). *Obtención de polihidroxicanoatos a partir del suero lácteo por cultivos microbianos mixtos* (Tesis doctoral). Universidad de la Coruña, España.

- Cardona, A., Mora, A., Marín, M. (2013). Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 66(2), 7129-7140.
- Cardozo, J., Martínez, A., Pérez, M., & Londoño, G. (2016). Production and characterization of polyhydroxyalkanoates and native microorganisms synthesized from fatty waste. *International Journal of Polymer Science*, 20(16), 1–12.
- Centeno, L., Quitana, A., & Fuentes, F. (2019). Effect of a microbial consortium on the effectiveness of wastewater treatment, Trujillo, Peru. *Arnaldoa*, 26(1), 433-446.
- Chandrika, P., Devaraj, S., Meixner, K., Anburajan, P., Kathirvel, P., Ravikumar, Y. (2020). Recent developments in polyhydroxyalkanoates (PHAs) production in the past decade – A Review. *Bioresource Technology*, 20(1), 123-132.
- Chen, G. (2009). Plastics Completely Synthesized by Bacteria: polyhydroxyalkanoates. *Plastics from Bacteria*, 14, 17–37.
- Chen, Y., Lee, C., Lin, Y., Yin, K., Ho, C., & Liu, T. (2015). Obtaining long *16S rDNA* sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*, 16(18), 10-13.
- Chun, J., & Sook, K. (2010). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(2), 123-127.
- Corradini, M., & McClements, J. (2017). Food. *Encyclopedia of Analytical Science*, 8(2), 50-57.
- Moreira, S. (5 de Junio de 2018). ONU: sólo 9 por ciento del plástico usado en el mundo se recicla. *El País*. Recuperado el 20 de Abril de 2020, de <https://www.efe.com/efe/espana/sociedad/la-onu-advierte-de-que-solo-el-9-del-plastico-usado-en-mundo-se-recicla/10004-3638488>

- FAO. (30 de Junio de 2018). *Milk Facts* . Recuperado el 5 de Abril de 2020, de <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/es/c/273893/>
- FAO. (2020). Overview of global dairy market developments in 2019. *Dairy market review, 1*, 1-11.
- González, Y., Meza, J., Reynoso, O., & Córdova, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental, 29*(1), 77-115.
- Gorenflo, V., Steinbüchel, A., Marose, S., Rieseberg, M., & Scheper, T. (1999). Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Applied Microbiology and Biotechnology, 51*(6), 765–772.
- Gumel, A., Anuar, M., & Heidelberg, T. (2012). Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Copolymers Produced by *Pseudomonas putida* Bet001 Isolated from Palm Oil Mill Effluent. *PLOS ONE, 7*(9), 1-8.
- Holmes, D. (2004). Comparison of *16S rRNA*, *nifD*, *recA*, *gyrB*, *rpoB* and *fusA* genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology, 54*(5), 1591–1599.
- Izquierdo, P. (2015). *Comparación de estrategias metagenómicas en muestras ambientales de biofilms* (Tesis de pregrado). Universitat Politècnica de València, España.
- Jiménez, S., Guadalupe, B., & Noriega, L. (2017). Identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos en muestras de agua del río Cata en el estado de Guanajuato. *Ciencia, 3*(2), 2033-2037.
- Kasper, M. (2017). *Residuos plásticos y su impacto ambiental*. Berlin: Deutsche Welle.
- Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology, 13*(3), 321–326.

- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E., Horvat, P., & Brauneegg, G. (2008). Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource Technology*, *99*(11), 4854–4863.
- Koller, M., Salerno, A., Muhr, A., Reiterer, A., Chiellini, E., Casella, S., & Brauneegg, G. (2012). Whey Lactose as a Raw Material for Microbial Production of Biodegradable Polyesters. *Polyester, I*, 19-60.
- Koller, M., Salerno, A., Muhr, A., Reiterer, A., & Brauneegg, G. (2013). Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers and plastics from renewable resources. *Mater Technol*, *46*, 23-30.
- Kourmentza, C., Ntaikou, I., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Production of PHAs from mixed and pure cultures of *Pseudomonas* sp. using short-chain fatty acids as carbon source under nitrogen limitation. *Desalination*, *248*(3), 723–732.
- Lane, E., & Benton, M. (2015). Detection of the enzymatically-active polyhydroxyalkanoate synthase subunit gene, *phaC*, in cyanobacteria via colony PCR. *Molecular and Cellular Probes*, *29*(6), 454–460.
- Laxmana, R., Sanjeevani, V., & Anusha, G. (2013). Study of Bio-plastics As Green & Sustainable Alternative to Plastics. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, *3*(5), 83-89.
- Legat, A., Gruber, C., Zangger, K., Wanner, G., & Stan-Lotter, H. (2010). Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(3), 1119–1127.
- Lemos, A., & Cordoba, A. (2015). Polihidroxiálcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, *79*, 83-95.

- Llumigusín, D. (2018). *Caracterización de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA) utilizando azúcares presentes en residuos agroindustriales* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Luque, A. (2018). *La gestión de residuos de las industrias lácteas: el caso de Ecuador* (Tesis de maestría). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.
- MAG. (1 de Enero de 2019). *Leche*. Recuperado el 5 de Abril de 2020, de <https://www.agricultura.gob.ec>
- Martínez, C. (2018). *Aislamiento y análisis independiente de cultivo de comunidades productoras de polihidroxicanoatos y degradadoras de n-hexadecano en tapetes microbianos de Guerrero Negro, México* (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Bolivia.
- Matthijs, S., Coorevits, A., Gebrekidan, T., Tricot, C., Wauven, C. V., Pirnay, J., & Cornelis, P. (2013). Evaluation of *oprI* and *oprL* genes as molecular markers for the genus *Pseudomonas* and their use in studying the biodiversity of a small Belgian River. *Research in Microbiology*, 164(3), 254–261.
- Mesquita, D., Amaral, A., Leal, C., Oehmen, A., Reis, M., & Ferreira, E. (2015). Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Analytica Chimica Acta*, 86(5), 8–15.
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C., & Samantaray, D. (2017). *Bacillus* and biopolymer: prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12(1), 206–213.
- Montenegro, E., Delabary, G., Silva, M., Andreote, F., & Lima, A. (2017). Molecular diagnostic for prospecting polyhydroxyalkanoate-producing bacteria. *Bioengineering*, 4(4), 52-62.

- Moya, A. (2017). Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia*, 30(5), 305-311.
- Mozejko, J., Szacherska, K., & Marciniak, P. (2019). *Pseudomonas* Species as producers of eco-friendly polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*, 1, 1-16.
- Navas, J. (2012). Aprovechamiento Industrial de Lactosuero Mediante Procesos Fermentativos. *Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 6, 69-83.
- Neissa, P., Aukema, K., Gralnick, J., & Wackett, L. (2011). Nile Red detection of bacterial hydrocarbons and ketones in a high-throughput format. *mBio*, 2(4), 1-5.
- Nygaard, D., Yashchuk, O., & Hermida, B. (2019). Evaluation of culture medium on poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* ATCC 17697: application of the response surface methodology. *Heliyon*, 5(3), 1374- 1392.
- Obruca, S., Marova, I., Melusova, S., & Mravcová, L. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Annals of Microbiology*, 61(4), 947-953.
- ONU. (2018). Plásticos de un solo uso: Una hoja de ruta para la sostenibilidad. IETC.
- Ostle, A., & Holt, J. (1982). Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Applied and environmental microbiology*, 44(1), 238-241.
- PlasticsEurope. (2016). *Plastics – the Facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Recuperado el 4 de Abril de 2019, de http://www.plasticseurope.org/documents/document/20161014113313-plastics_the_facts_2016_final_version.pdf
- PlasticsEurope. (2019). *Plastics – the Facts 2019. An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Recuperado el 28 de Abril de 2019, de <https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>

- Reddy, C., Ghai, R., & Kalia, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresource Technology*, *87*(2), 137–146.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del *ARNr 16S*: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *22*(4), 238–245.
- Romero, L., Guerra, G., & Pardo, J. (2016). Cuerpos lipídicos: Organelos metabólicamente activos. *Revista de Educación Bioquímica*, *35*(4), 115-124.
- Sabapathy, P., Devaraj, S., Meixner, K., Anburajan, P., Kathirvel, P., Ravikumar, Y., & Qi, X. (2020). Recent developments in polyhydroxyalkanoates (PHAs) production in the past decade – A review. *Bioresource Technology*, *12*(3), 1-58.
- Salinas, A., Muñiz, V., & Delgado, F. (2014). Aislamiento e Identificación de Bacterias Potencialmente Productoras de Biopolímeros en suelos de la Zona Norte de Colima. *Academia Journals*, *6*(4), 1481-1485.
- Santamaría, E. J., Álvarez, F., Díaz, E. S., & Zamora, M. (2015). Caracterización de los parámetros de calidad del agua para disminuir la contaminación durante el procesamiento de lácteos. *Agroindustrial Science*, *5*(1), 13-26.
- Schlegel, H., Lafferty, R., & Krauss, I. (1970). The isolation of mutants not accumulating poly-B-hydroxybutyric acid. *Archiv for Mikrobiologie*, *71*(3), 283–294.
- Shalin, T., Sindhu, R., Pandey, A., Faraco, V., & Binod, P. (2016). Production of poly-3-hydroxybutyrate from mixed culture. *Biología*, *71*(7), 736-742.
- Shamala, T., Chandrashekar, A., Vijayendra, S., & Kshama, L. (2003). Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus spp.* using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Microbiology*, *94*(3), 369–374.

- Sheu, D., Wang, Y., & Lee, C. (2000). Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology*, *146*(8), 2019–2025.
- Shivakumar, S. (2011). Production of Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from lactose and whey by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Research Journal of Biotechnology*, *6*, 12-18.
- Silva, S., Silva, L., Pradella, J., Pereira, E., & Gomez, J. (2009). PHAMCL biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of Biotechnology*, *143*(2), 111–118.
- Singh, M., Patel, S., & Kalia, V. (2009). *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*, *8*(1), 38-49.
- Solaiman, D., Ashby, R., & Foglia, T. (2000). Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *53*(6), 690-694.
- Spiekermann, P., Rehm, B., Kalscheuer, R., Baumeister, D., & Steinbüchel, A. (1999). A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. *Archives of Microbiology*, *171*(2), 73–80.
- Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, *5*(3), 233.
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., & Seeger, M. (2014). Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, *70*, 208-213.
- Valero, M., Ortigón, Y., & Uscategui, Y. (2013). Biopolímeros: avances y perspectivas. *Dyna*, *80*(181), 171-180.
- Viteri, A. (2018). *Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones* (Tesis de, maestría). Universidad Nacional de Educación a Distancia, España.

- Walter, O. (2020). *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*. Amsterdam: Elsevier.
- Yadav, K., Puranik, D, Fairuze, M., & Prabha, R. (2019). Enumeration of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Producing Bacteria from Dairy Sewage Samples. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, 18(4), 1-4.
- Young, F., Kastner, J., & May, S. (1994). Microbial Production of Poly-beta-Hydroxybutyric Acid from d-Xylose and Lactose by *Pseudomonas cepacia*. *Applied and environmental microbiology*, 60(11), 4195–4198.
- Zaki, N. (2018). Biodegradable plastic production by *Bacillus spp.* isolated from agricultural wastes and genetic analysis of PHA synthesis. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 29, 67-74.

TABLAS

Tabla 1. Aislamiento de microorganismos productores de polihidroxicanoatos presentes en aguas residuales de dos industrias lácteas. Presencia (+) y ausencia (-) de colonias en medio minimal M9 más sales.

Identificación	Cultivo líquido			Cultivo sólido		
	1:10	1:20	1:50	1:10	1:20	1:50
Muestra A	-	+	+	-	+	+
Muestra A (duplicado)	-	+	-	-	+	-
Muestra B	+	+	+	+	+	+
Muestra C	+	+	-	+	+	-

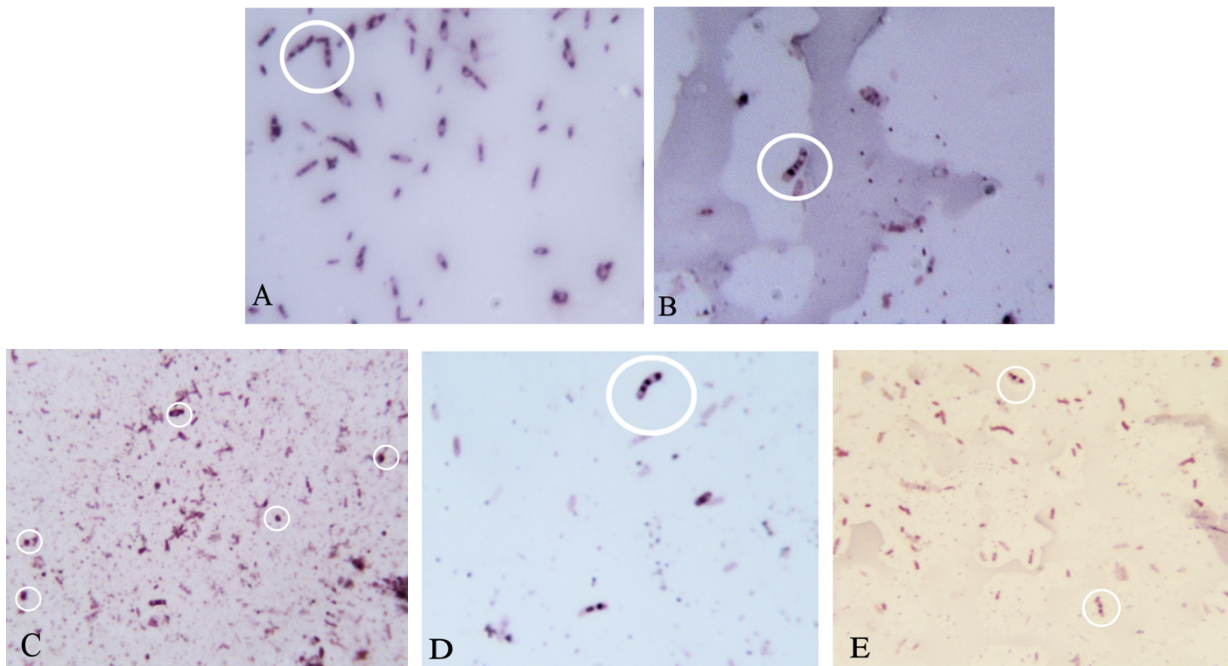
FIGURAS

Figura 1. Microscopía óptica (1000X) de gránulos de polihidroxialcanoatos (PHAs) teñidos con Sudán Negro. En la imagen se visualiza la tinción con Sudán Negro de los gránulos de las colonias aisladas de aguas residuales de dos industrias lácteas. A) corresponde a la colonia 1 aislada de la muestra A; B) corresponde a la colonia 2 aislada de la muestra A; C) colonia 3 aislada de la muestra B; y D) colonias 4 aislada de la muestra C; y E) colonias 5 aislada de la muestra C.

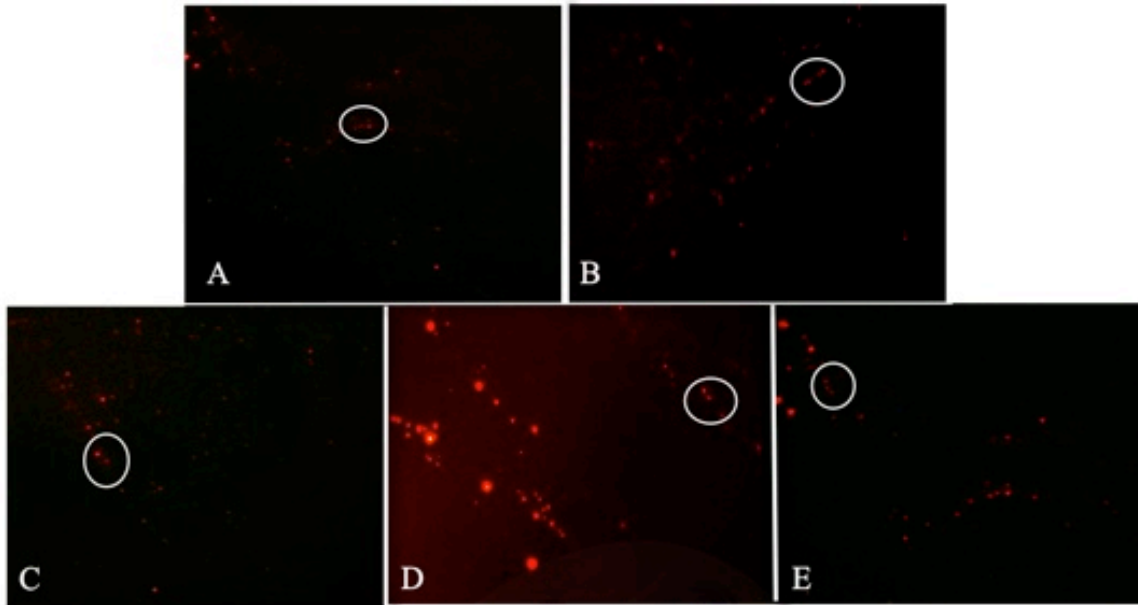


Figura 2. Microscopía de fluorescencia (1000X) de gránulos de polihidroxicanoatos (PHAs) teñidas con Rojo de Nilo. En la imagen se visualiza la tinción con Rojo de Nilo de los gránulos de las colonias aisladas de aguas residuales de dos industrias lácteas. A) corresponde a la colonia 1 aislada de la muestra A; B) corresponde a la colonia 2 aislada de la muestra A; C) colonia 3 aislada de la muestra B; C) colonia 4 aislada de la muestra C; y E) colonia 5 aislada de la muestra C.

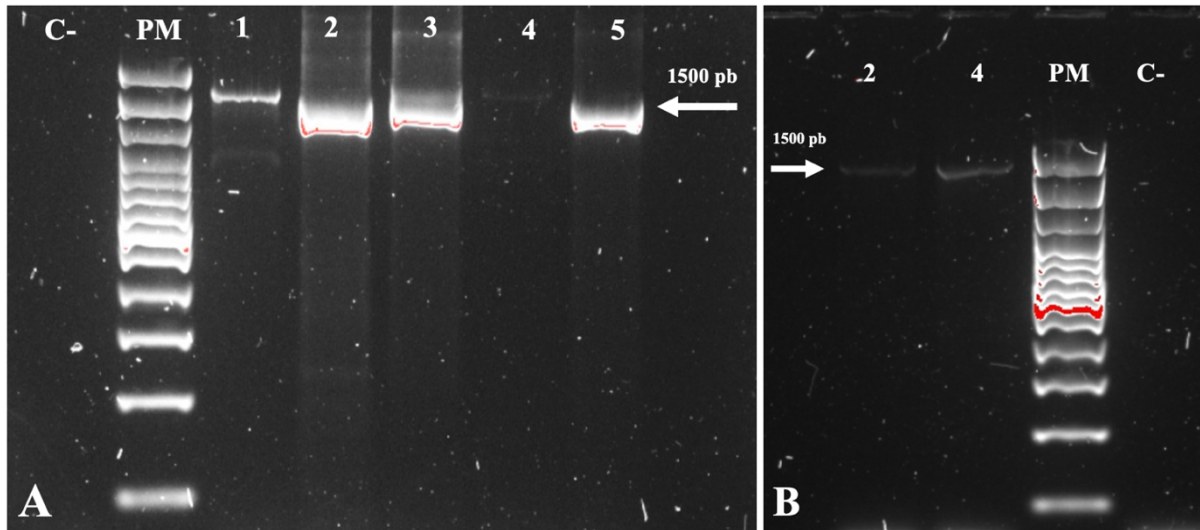


Figura 3. Visualización de los productos de PCR del gen *ARNs 16S* en gel de agarosa al 1,5 %. En la imagen se visualiza los productos de PCR de alrededor 1500 pb de las colonias aisladas de aguas residuales de dos industrias lácteas. A) se indica la amplificación de las cinco colonias nombradas del 1-5 y B) muestra la amplificación de las colonias 2 y 4.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Bacillus firmus strain ER21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1815514649 MT124546.1
Bacillus oceanisediminis strain SJ32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1811915600 MT103052.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain S19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1787125705 MN859994.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain WS2-TSB-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1704727001 MN179773.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain WS2-TSB-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1704726998 MN179770.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain WS2-TSB-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1704726997 MN179769.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain WS2-R2A-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1704726991 MN179763.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain W2-R2A-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1704726988 MN179760.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain S2-AOM-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1704726922 MN179694.1
Bacillus subtilis subsp. stercoris strain EGI204 16S ribosomal RNA gene, partial sequenc	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1776837015 MN704470.1
Bacillus oceanisediminis strain EGI203 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1776837014 MN704469.1
Bacillus oceanisediminis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2665	2665	100%	0.0	100.00%	gij1769158554 MN606212.1

Figura 4. BLAST de la secuencia de 1386 pb de *Bacillus* obtenida de la muestra A de aguas residuales lácteas. En la figura se indica varias especies de *Bacillus* que son idénticas con la secuencia obtenida en el presente estudio con un porcentaje de identidad del 100 %.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Pseudomonas mendocina strain NSYSU, complete genome	1056	4224	100%	0.0	100.00%	gij1196016007 CP011508.1
Pseudomonas sp. DSWY01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1526434892 MK248116.1
Pseudomonas sp. strain R34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158924 MH773396.1
Pseudomonas sp. strain R33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158923 MH773395.1
Pseudomonas sp. strain R32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158922 MH773394.1
Pseudomonas sp. strain R31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158921 MH773393.1
Pseudomonas sp. strain R30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158920 MH773392.1
Pseudomonas sp. strain R29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158919 MH773391.1
Pseudomonas sp. strain A333 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158850 MH773322.1
Pseudomonas sp. strain A332 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158849 MH773321.1
Pseudomonas sp. strain A331 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158848 MH773320.1
Pseudomonas sp. strain A330 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1056	1056	100%	0.0	100.00%	gij1452158847 MH773319.1

Figura 5. BLAST de la secuencia de 550 pb de *Pseudomonas* obtenida de la muestra A de aguas residuales lácteas. En la figura se indica varias especies de *Pseudomonas* que son idénticas con la secuencia obtenida en el presente estudio con un porcentaje de identidad del 100 %.