

Adaptación de consorcios microbianos nativos presentes en lodos de depuradora para acumular polihidroxicanoatos (PHA's)

Daina Yuliana Cortes Lasso; Angie Valeria Contreras Roa;
Judith Elena Camacho Kurmen; Carolina Guzmán Luna^a 

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Facultad de ciencias de la salud.
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá D.C, Colombia.

^acguzmal@unicolmayor.edu.co

Fecha recepción: marzo 14 de 2024

Fecha aceptación: julio 23 de 2024

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHA's) son poliésteres naturales biodegradables y biocompatibles sintetizados por una amplia gama de bacterias como reserva de carbono y su composición química varía de acuerdo con el sustrato utilizado, la ruta metabólica usada por el microorganismo y la enzima PHA-sintasa. Teniendo en cuenta los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), la economía circular y la reutilización de agua residual, el propósito de esta investigación es describir, mediante la revisión de literatura científica, aspectos relacionados con la adaptación y selección de consorcios microbianos nativos que permiten obtener una alta acumulación de PHA's a partir de lodos de depuradoras de agua residual. La producción de estos polímeros está condicionada a la formulación del medio de cultivo para favorecer el incremento de la biomasa y posteriormente su acumulación. Para esto se han descrito estrategias de alimentación microbiana iniciando con un medio enriquecido en nutrientes, seguido de una fase de formación de productos en un medio limitado, proceso conocido como *feast and famine*, el cual es una estrategia utilizada en la actualidad. Los consorcios microbianos mixtos provenientes de depuradoras son promisorios para la producción de PHA's a partir de ácidos grasos volátiles utilizando la estrategia de *feast and famine*.

Palabras clave: Lodos de aguas residuales domésticas; PHA's; Estrategias de alimentación; Consorcios microbianos nativos; Ácidos grasos volátiles.

Adaptation of native microbial consortia, present in sewage sludge for polyhydroxyalkanoates (PHA's) accumulation

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA's) are biodegradable and biocompatible natural polyesters synthesized by a wide range of bacteria as a carbon reserve and their chemical composition varies according to the substrate used, the metabolic route used by the microorganism and the PHA-synthase enzyme. Considering the Sustainable Development Goals (SDG), the circular economy and the reuse of wastewater, the purpose of this research is to describe, through the review of scientific literature, aspects related to the adaptation and selection of native microbial consortia that achieve a high accumulation of PHAs from wastewater treatment plant sludge. The production of these polymers is conditioned to the formulation of the culture medium to favor the increase in biomass and subsequently its accumulation. For this, microbial feeding strategies have been described, starting with a nutrient-enriched medium, followed by a product formation phase in a limited medium, a process known as feast and famine, which is a strategy currently used. Mixed microbial consortia from wastewater treatment plants are promising to produce PHAs from volatile fatty acids using the feast and famine strategy

Keywords: Domestic sewage sludge; PHA's; Feeding strategies; Native microbial consortia; Volatile fatty acids.

Adaptação de consórcios microbianos nativos presentes em lodo de esgoto para acúmulo de polihidroxialcanoatos (PHA's)

Resumo

Os polihidroxialcanoatos (PHA's) são poliésteres naturais biodegradáveis e biocompatíveis sintetizados por uma ampla gama de bactérias como reserva de carbono e sua composição química varia de acordo com o substrato utilizado, a rota metabólica utilizada pelo microrganismo e a enzima PHA-sintase. Considerando os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), a economia circular e o reaproveitamento de águas residuais, o objetivo desta pesquisa é descrever, por meio da revisão da literatura científica, aspectos relacionados à adaptação e seleção de consórcios microbianos nativos que alcançam um elevado acúmulo de PHAs provenientes de lamas de estações de tratamento de águas residuais. A produção destes polímeros está condicionada à formulação do meio de cultura para favorecer o aumento da biomassa e posteriormente o seu acúmulo. Para isso, foram descritas estratégias de alimentação microbiana, começando com um meio enriquecido com nutrientes, seguido de uma fase de formação de produto em meio limitado, processo conhecido como festa e fome, que é uma estratégia utilizada atualmente. Consórcios microbianos mistos de estações de tratamento de águas residuais são promissores para produzir PHAs a partir de ácidos graxos voláteis usando a estratégia de festa e fome.

Palavras-chave: Lodo de esgoto doméstico; PHA's; Estratégias alimentares; Consórcios microbianos nativos; Ácidos graxos voláteis.

Introducción

El plástico contribuye de diversas formas a la sociedad, sin embargo, su contaminación en los diferentes ecosistemas genera un riesgo para los humanos, el ambiente y la salud animal. Por tanto, se han propuesto estrategias para reutilizar, reciclar, reorientar y diversificarlo, teniendo en cuenta las políticas de cada país.

Desde el punto de vista normativo, la Unión Europea está trabajando para alcanzar emisiones netas cero para 2050 y aborda la crisis medioambiental y de sostenibilidad analizando la producción, el uso y disposición del plástico [1]. Por su parte, Colombia mediante la Ley 2232 de 2022 establece la eliminación de 21 productos plásticos de un solo uso, los cuales se dejarán de producir y comercializar desde el 7 de julio de 2024, iniciando con ocho productos y llegando al 2030 con la eliminación total de 21 productos plásticos [2].

Teniendo como referencia los datos globales publicados por la organización *Plastic Europe*, de las 400,3 toneladas métricas producidas en el año 2022, el 90,5 % derivan de recursos fósiles seguido de un 8,9 % de plásticos reciclados mecánicamente (post consumo) y por debajo del 1% se encuentran otras alternativas, entre ellas los plásticos de base biológica (ver [Figura 1](#)) [3]. De forma general los plásticos de base biológica están constituidos por polímeros naturales

que pueden formar parte en la formulación del plástico convencional o pueden ser obtenidos por fermentaciones microbianas. Entre ellos están la celulosa, almidones, maíz y caña de azúcar, los cuales pueden ser biodegradables (se transforman en CO₂ y agua) o compostables (que generan un abono), dependiendo de su estructura química mas que de su origen.

Se han propuesto diversas clasificaciones que se encuentran a continuación y en la [Figura 2](#), donde se mencionan principales compuestos de interés comercial (presentados con sus siglas en inglés) [3,4]:

- Plásticos de base biológica o plásticos con base biológica parcial no biodegradables: polietileno - PE; polipropileno - PP; tereftalato de polietileno - PET (de uso inmediato o *drop ins*) y polímeros de base biológica con rendimiento técnico como el tereftalato de polimetileno - PTT o elastómero de poliéster termoplástico TPC-ET.
- Plásticos de base biológica que son biodegradables (ácido poliláctico - PLA; polihidroxicanoatos -PHA; polibutileno succinato - PBS)
- Plásticos basados en recursos fósiles que son biodegradables como el tereftalato de adipato de polibutileno - PBAT; policaprolactona - PCL y polivinil alcohol - PVA.

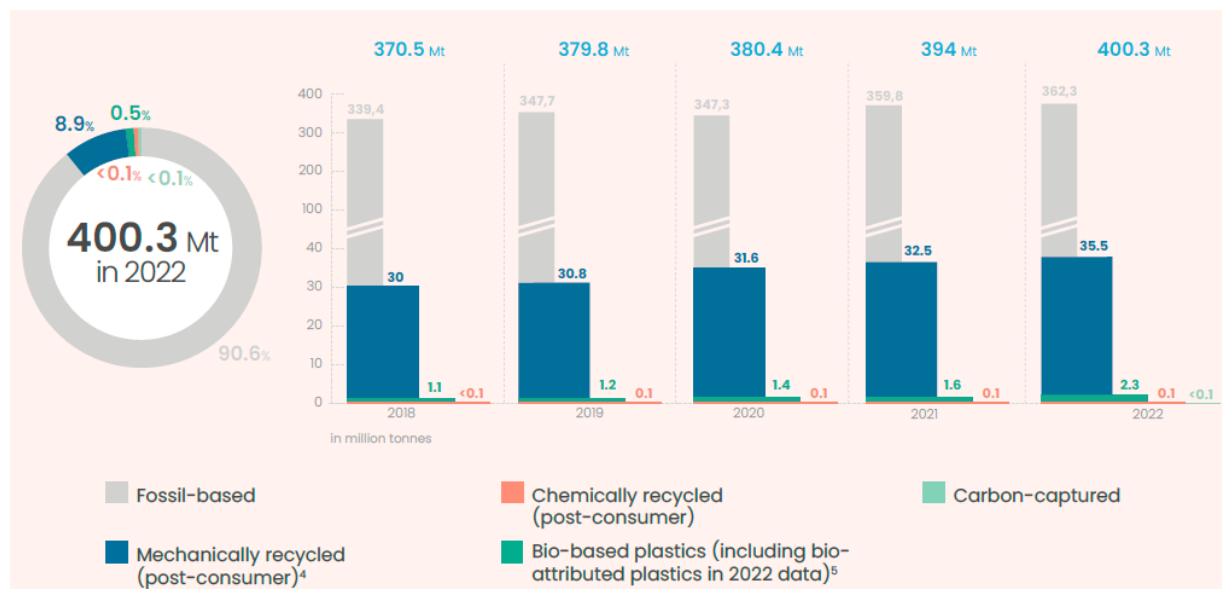


Figura 1. Producción global de plásticos

Fuente: *Plastic Europe* [3].

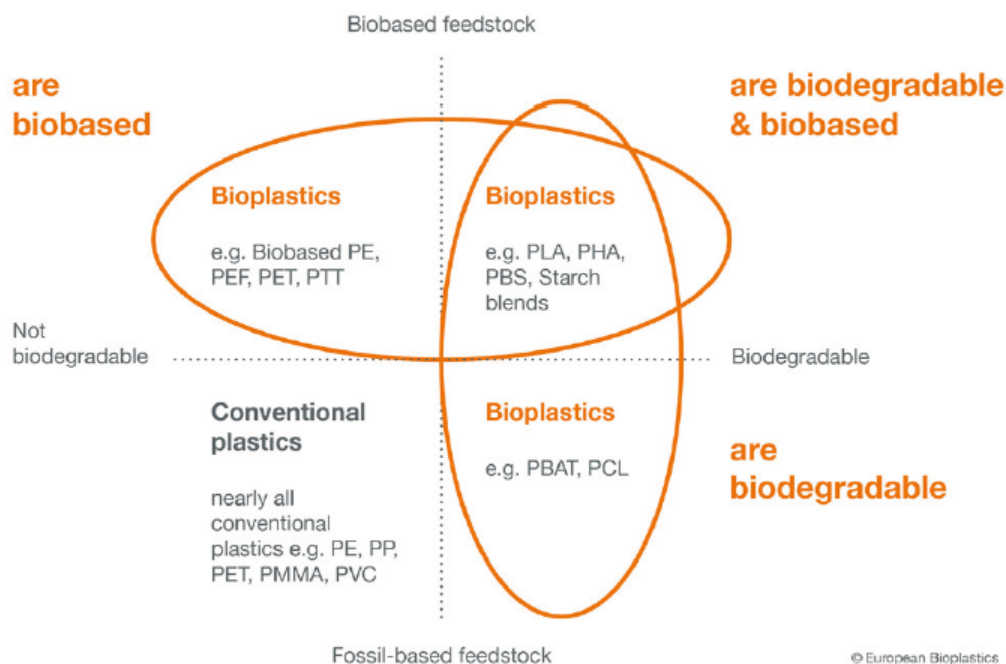


Figura 2. Materias primas para producción de plásticos y bioplásticos.

Fuente: European bioplastics [3].

En cuanto a la mitigación del impacto ambiental, los PHA’s presentan una mayor biodegradabilidad por hidrolasas y despolimerasas de origen microbiano [5] y está relacionada con su composición química, la longitud de la cadena y su cristalinidad, así como condiciones ambientales de temperatura, pH, humedad y contenido de oxígeno.

Una característica que permite su aplicación en el campo clínico (ingeniería de tejidos, portadores de fármacos e implantes, dada su baja respuesta inflamatoria y toxicidad) y en la industria alimenticia es su alta biocompatibilidad. En la [Tabla 1](#) se encuentran algunas compañías productoras de PHA a escala piloto e industrial.

Tabla 1. Compañías productoras de PHA a escala laboratorio e industrial y costos de producción.

Fabricantes	PHA y nombre comercial	Microorganismo (biocatalizador)	Capacidad de producción (Ton/año)	Precio/kg (€)
Bio-On. Italia https://www.bio-on.com/en/	PHB, esferas de PHBV (minerv®-PHA)	<i>Cupriavidus necator</i>	10000	–
Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. Japón https://www.mgctrading.co.jp/en/products/recycled_materials_and_bioplastics.html	Biogreen®, PHB	–	10000	2,5 a 3,0
Biomatera. Canadá http://www.biomatera.com/	Resinas de PHA	Bacterias aisladas de suelo, no patogénicas y no transgénicas	–	–
BluePHA. China https://www.bluepha.bio/	PHBVHx, PHV, P3HP3HB, P3HP4HB, P3HP personalizadas y síntesis de P4HB	Cepas microbianas desarrolladas por vía sintética y con herramientas biológicas	–	–

Fabricantes	PHA y nombre comercial	Microorganismo (biocatalizador)	Capacidad de producción (Ton/año)	Precio/kg (€)
PHB Industrial Company, Brasil https://www.materialdatacenter.com/ms/es/Biocycle/PHB+Industrial+Brasil+S%252EA/6264	PHB, PHBV Biocycle®	<i>Alcaligenes sp</i>	3000	–
Danimer Scientific, USA https://danimerscientific.com/pha-beginning-of-life/	mcl-PHA, PHB-H, (Nodax® PHA)	–	–	–
Kaneka Corporation, Japan https://www.kaneka.co.jp/en/business/material/nbd_001.html	PHB-PHHx (AONILEX®)	<i>Ralstonia eutropha</i>	3500	–
Biomer Inc. (Germany) https://www.biomer.de/IndexE.htm	PHBV and PHB Biomer®	<i>Alcaligenes latus</i>	50	3,0 a 5,0
Newlight Technologies LLC, USA https://www.newtrient.com/catalog/newlight-technologies-aircarbon/	Resinas de PHA	<i>Biocatalizador Newlight's 9X</i>	–	–
Tianan Biologic, Ningbo, China http://en.tianan-enmat.com/	PHBV, PHBV + Ecoflex blend Enmat®	<i>Ralstonia eutropha</i>	10000	3,26
PolyFerm, Canada https://www.polyfermcanada.com/	mcl-PHA (VersaMer™ PHA)	<i>Cepa microbiana salvaje</i>	–	–
Shenzhen Ecomann Biotechnology Co. Ltda. China http://ecomann.sx-gear.com/	Pellets, resinas microesferas de PHA (AmBio®)	–	5000	–
SIRIM Bioplastics Pilot Plant. Malasia https://www.sirim.my/sirim-ibrc/Pages/IBRCServices/biotechnology-and-others.aspx	PHA	–	2000	–

Fuente: Kumar *et al.* [6]. Modificado por las autoras.

A pesar de sus ventajas, esta tecnología requiere altos costos asociados con el proceso de fermentación, la fuente de carbono, las eficiencias y productividad de PHA's, así como el proceso de extracción, purificación, formulación y comercialización (*downstream*).

Una forma significativa de reducir costos es la selección de la fuente de carbono, la cual representa más del 50% del costo general [7]. Es por esto

por lo que se han evaluado residuos orgánicos, aceites, glicerol, agua residual y lodos, entre otros haciendo necesario realizar una caracterización fisicoquímica para determinar la necesidad de un pretratamiento [8], así como la identificación del potencial de la biota presente para identificar si son acumuladoras de PHA's. En la Tabla 2 se observan algunos ejemplos de pretratamiento de residuos de diferentes actividades industriales

Tabla 2. Tecnologías de pretratamiento de residuos para la producción de PHAs.

Cepa bacteriana	Sustrato	Pre-tratamiento	Suplemento adicional	Tamaño del fermentador (L)	Rendimiento de PHA	Referencia
No especifica	Lodos activados de agua residual	Hidrólisis, fermentación anaerobia, filtración y dilución	Medio sintético incluyendo AGVs	70	0,17 (g PHA/g COD)	Jia <i>et al.</i> (2014)
No especifica	Agua residual doméstica + fracción orgánica RSU	Fermentación y separación sólido(líquido)	–	10	0,22 (mg COD/mg COD)	Basset <i>et al.</i> (2016)

Cepa bacteriana	Sustrato	Pre-tratamiento	Suplemento adicional	Tamaño del fermentador (L)	Rendimiento de PHA	Referencia
<i>Corynebacterium hydrocarboxydansy</i> y <i>Bacillus megaterium</i>	Ácidos carboxílicos (de efluentes de fermentación de glicerol proveniente de la manufactura de propanodiol)	Fermentación anaeróbica	Medio sintético	10	0,227 g/L at 28 h	Pan <i>et al.</i> (2016)
<i>Plasticumulans acidivorans</i>	Agua residual proveniente de empresas productoras de barras de dulces	Fermentación anaerobia	Solución de nutrientes que incluye nitrógeno 3 M (en forma de urea), fosfato (0,3 M), MgSO ₄ (0,3 M), K ₂ SO ₄ y elementos trazas. Aliltiurea para controlar la nitrificación	200	0,90 gPHA/gSSV (a escala laboratorio)	Tamis <i>et al.</i> (2014)
<i>Pandoraea sp.</i>	Glicerol crudo	–	Medio sintético con ácido propiónico y ácido hexanóico		0,19 g/g (3HV)	de Paula <i>et al.</i> (2017)
No específica	Lodos activados de agua residual	–	Medio sintético con elementos trazas	0,11	5,2 g/L ambiente microaerofílico	Amulya <i>et al.</i> (2016)
<i>Pseudomonas sp.</i>	Lodo activado de aguas residual de almazara y sintética	Dilución, digestión anaerobia, centrifugación, filtración, ajuste de pH y esterilización	Medio sintético con elementos trazas. Buffer de fosfato salino. Acetato, propionato y butirato como precursores	2,4	"64,4% g PHA/g materia seca 0,68 g PHA/g AGVs cultivo enriquecido y agua sintética"	Kourtmentza <i>et al.</i> (2015)

Fuente: Kumar *et al.* [6]. Modificado por las autoras.

El uso de residuos para obtener metabolitos de interés industrial favorece el modelo económico sostenible de economía circular, ayuda a mitigar el cambio climático, reducir la huella de carbono, así como la generación de gases de efecto invernadero.

Las plantas depuradoras de agua residual generan diariamente un alto volumen de lodos, asociados al tratamiento y estabilización de la materia orgánica, los cuales representan por un lado costos asociados a su disposición y por el otro una alternativa de biorrefinería. Entre ellas, energía

sustentable, plásticos reciclables, polímeros de base biológica, minerales esenciales y compuestos químicos amigables con el ambiente [9].

En esta revisión se describirán aspectos relevantes asociados con el estudio de bacterias nativas presentes agua residual y lodos de depuradora y su selección para aumentar su biomasa y la acumulación intracelular de polihidroxialcanoatos (PHA's) de forma intracelular, condicionada con la fuente nutricional, la estrategia de alimentación y parámetros fisicoquímicos de monitoreo.

Metodología

El análisis documental de esta investigación contempló la búsqueda en portales de bases de datos, gestores de referencia, revistas y editoriales con acceso institucional, publicadas en inglés y castellano, sin distinción de país y con una ventana de observación desde 2013 hasta la fecha.

Los tópicos de interés fueron la identificación, selección de un consorcio microbiano nativo con potencial para producir y acumular bioplásticos del tipo polihidroxialcanoatos (PHA's), provenientes de lodos de agua residual de origen doméstico.

En los términos de inclusión contemplados están las siguientes y sus combinaciones en inglés y en castellano:

- Lodos de aguas residuales domésticas, PHA, PHA's, estrategias de alimentación, consorcios microbianos nativos, ácidos grasos volátiles.
- Bioplastics, microorganisms, sludge, polyhydroxyalkanoates, microbial native consortium, sewage sludge, microbial communities, synthesis, biosynthesis,

production, sewage water, feed, volatile fatty acids, microbial mixed culture, polyhydroxybutyrate, polyhydroxyvalerate, bacterial adaptation processes, dry weight, PHA-producing bacteria, *feast and famine*.

Entre las bases de datos consultadas están: Nature, International Journal of Science, Mendeley, Ezproxy, Proquest, Dialnet, Scielo, Oxford Academics Journal, Scopus, Elsevier, ScienceDirect y Springerlink.

La búsqueda de bibliografía incluyó el uso de las palabras claves y combinaciones de ellas, utilizando los operadores booleanos "AND" y "OR".

Resultados y discusiones

A partir de la selección de documentos que incluyeran el uso de consorcios microbianos, fuentes nutricionales, condiciones de fermentación y de operación, estrategias de alimentación, así como variables de monitoreo, entre otros aspectos principales se realizó un resumen de la búsqueda con los resultados más relevantes (ver [Tabla 3](#)).

Tabla 3. Búsqueda bibliográfica relacionada con la producción de PHA's a partir de lodos de depuradora.

Palabras claves y operador booleano	Gestor bibliográfico, base de datos o Revista*	Datos crudos sin filtro	Datos con filtro 2013 - 2023	No. de artículos seleccionados
PHA OR polyhydroxyalkanoate	Ambientalex.info	3	3	1
PHA AND microbial native consortium AND sewage sludge	Proquest	223	219	7
PHA AND microbial communities AND sewage sludge	Mendeley	8	7	2
Synthesis AND production of polyhydroxyalkanoates AND sewage water	Nature	7	4	1
PHA AND microbial native consortium AND sewage sludge AND feed AND volatile fatty acids	Proquest	10	10	1
PHA AND microbial mixed culture AND sewage sludge	Mendeley	14	13	5
Polyhydroxyalkanoate AND polyhydroxybutyrate AND polyhydroxyvalerate	Mendeley	24	13	2
PHA AND production in mixed bacterial cultures AND volatile fatty acids	Mendeley	17	12	2
PHA AND bacterial adaptation processes	Mendeley	7	5	2
PHA AND dry weight AND biosynthesis	Mendeley	150	58	2
PHA AND PHA producing bacteria	Mendeley	381	232	2

Fuente: autoría propia.

En la **Tabla 3** se observa que al utilizar diversas palabras claves en la búsqueda se obtienen diferentes números de publicaciones. Además, el mayor número de artículos se consiguieron con el gestor de referencias *Mendeley* (381 artículos) y la editorial *Proquest* (223 artículos).

En la **Figura 3** se evidencia el comportamiento del número de artículos publicados obtenidos en el periodo de búsqueda seleccionado.

Adicional a la información obtenida se identificaron trabajos de pregrado y posgrado de interés en repositorios de universidades de educación superior, del Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA).

Consortios microbianos mixtos, presentes en lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas productores de PHA's

En la etapa *upstream* del proceso de biomanufactura se tienen en cuenta el cultivo del microorganismo (en este caso bacteriano) bien sea axénico o que actúen en consorcio, nativo o genéticamente modificado, así como las condiciones de fermentación y la estrategia de acumulación del polímero.

Desde hace varios años se ha trabajado con cultivos de cepas puras altamente productivas (nativas o modificadas genéticamente) y sustratos esterilizados de alto costo para un proceso fermentativo de una sola etapa.

Posteriormente, se abordó el estudio de microorganismos nativos agrupados los cuales les permite resistir condiciones adversas, aprovechar sustratos complejos y generar metabolitos que

favorecen a la industria, sin embargo, algunos de ellos presentan bajas productividades volumétricas [10]. Hoy en día, los estudios de genómica y proteómica, como ejemplos permiten identificar microorganismos acumuladores de PHA's.

En la literatura revisada se resalta la importancia de los consorcios microbianos nativos mixtos en contrarrestar los altos costos de producción por la utilización de una amplia gama de sustratos, incluidos los desechos industriales o agrícolas y que no requieren procesos de esterilización o desinfección [11-13].

Ren *et al.* [14] evaluaron la versatilidad de los cultivos mixtos nativos en lodos activados y encontraron que los cultivos enriquecidos con acetato producen de forma eficiente polihidroxialcanoatos en condiciones aeróbicas.

En cuanto a la caracterización de estos consorcios microbianos mixtos se han identificado diferentes géneros, algunos de ellos son: *Thauera sp*, *Alcaligenes sp*, *Paracoccus sp*, *Bacteroides sp*, *Pseudomonas sp*. [11,15,16,17,18]. Szacherska *et al.* hicieron énfasis en que los cultivos mixtos son comunidades de microorganismos que tienen la capacidad de cooperar entre sí llevando a cabo reacciones intracelulares y extracelulares específicas que permiten el aprovechamiento de sustratos mediante diferentes vías metabólicas [19].

En la **Figura 4**, Hao *et al.* [20] describen la abundancia relativa de los géneros presentes en una comunidad microbiana de un hidrolizado de lodo tratado térmicamente.

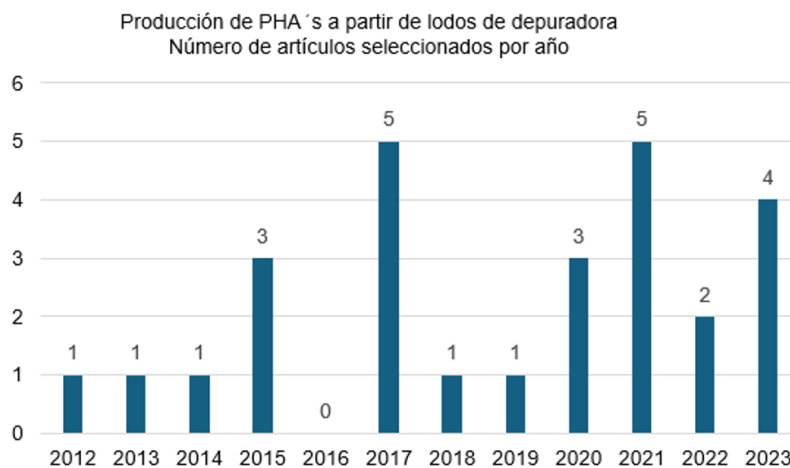


Figura 3. Número de artículos publicados en el periodo 2013 – 2023.
Fuente: autoría propia.

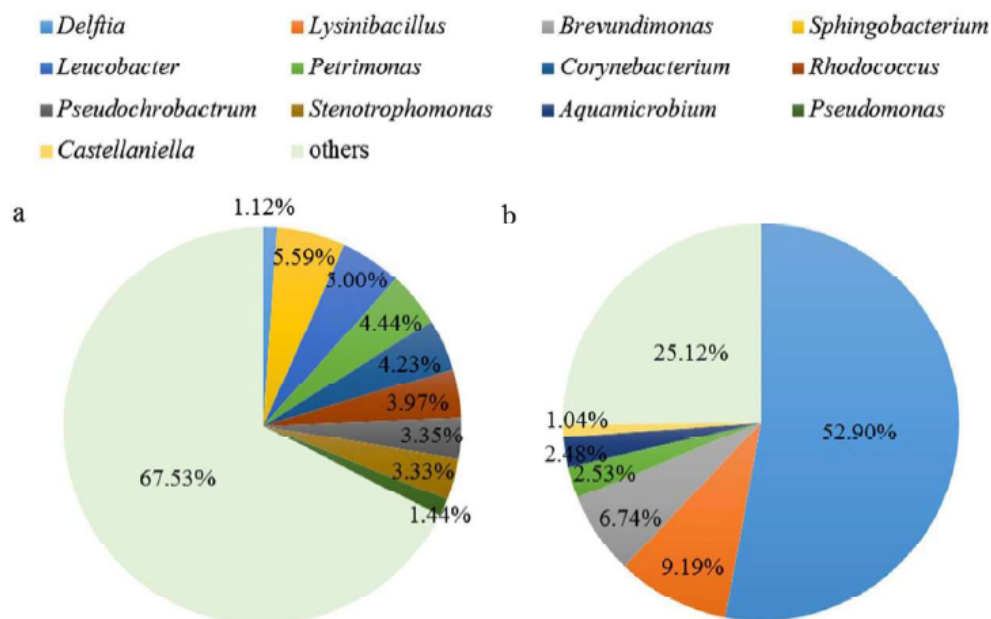


Figura 4. Abundancia relativa de géneros en la comunidad microbiana en un lodo activado original (a) y un cultivo microbiano mixto (b). Los géneros con abundancia relativa menor del 1% se clasifican en otros [20].

En el análisis de la abundancia relativa de géneros se observa que *Delftia acidovorans* fue el microorganismo que más predominó en el cultivo enriquecido, dada la afinidad que tiene hacia el hidrolizado con valerato como sustrato dominante, formando el copolímero poli 3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato (PHBV). Esta bacteria predominó sobre *Lysinibacillus* y *Brevundimonas*, productoras también de PHA [20].

En cuanto a los microorganismos modificados genéticamente se han descrito diferentes géneros, entre ellos: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Burkholderia sacchar*, *Aeromonas hydrophila* y cepas recombinantes de *Escherichia coli* anclados en *R. eutropha* para alcanzar entre un 80-90 % de PHA en peso seco de la célula [12].

Estrategias de adaptación para el aumento de la biomasa microbiana y la acumulación de PHA's a partir de cultivos microbianos mixtos usando lodos del tratamiento de agua residual doméstica

Los lodos de depuradora bien sean primarios, secundarios, activados o anaerobios, pueden ser utilizados como sustrato para la obtención de ácidos grasos volátiles (AGVs) que favorezcan la selección de bacterias acumuladoras de PHA's o utilizarlo como suplemento a un medio sintético formulado. Las condiciones que han propuesto para favorecer la adaptación del consorcio microbiano

y el aumento de la biomasa presente en lodos activados para la producción del biopolímero de interés pueden ser aeróbicas y anaeróbicas.

Diferentes autores proponen tres etapas en diferentes secuencias para el proceso de producción del biopolímero, por ejemplo: anaeróbica para la fermentación acidogénica y aeróbica tanto para la etapa de enriquecimiento y para la producción de PHA's [11,15,17,21,23].

En cuanto a las fuentes nutricionales necesarias para favorecer el crecimiento del consorcio microbiano y la utilización de lodos como sustrato o materia prima, distintas investigaciones concuerdan con que los AGV's se utilizan mayoritariamente como fuente de carbono para llevar a cabo las estrategias de alimentación [22,24,25], seguido de acetato [21,26].

En la [Tabla 4](#), se observa una publicación de Szacherska *et al.* con diferentes fuentes de carbono utilizadas para la producción de PHA's [19].

Además, del tipo de consorcio microorganismo mixto que produce el biopolímero de forma intracelular, su estructura está relacionada con la composición del sustrato y puede determinar un polímero o copolímero de cadena corta y media como se observa en la [Tabla 4](#). Se resalta el uso de ácido acético solo o en proporciones con otros ácidos grasos volátiles.

En cuanto a la estrategia de alimentación, la fase de acumulación de PHA's al interior de las bacterias se favorece bajo la metodología de *feast and famine*. La primera etapa es el periodo de tiempo en el que se consume el sustrato con altas concentraciones de carbono. En la segunda etapa se observa una limitación en la cual el sustrato no está disponible y favorece la acumulación de los gránulos

de reserva de polihidroxicanoatos. Ambas condiciones fuerzan una adaptación fisiológica en los microorganismos los cuales son capaces de prosperar en condiciones de estrés [22,24]. En las Figuras 5 y 6, se observan ejemplos de estrategias de fermentación de *feast and famine*, que facilita la descripción de este proceso.

Tabla 4. Fuentes de carbono utilizadas para la producción de PHA's.

Fuente de Carbono	Tipo de PHA	% de PHA
Ácido acético	P(3HB)	40,0
	P(3HB)	78,5
	P(3HB)	89,0
Aguas residuales municipales + ácido acético	P(3HB)	30,0
Aguas de fábrica de papel fermentado (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico)	P(3HB-co-3HV)	48,0
Melaza fermentada (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico)	P(3HB-co-3HV)	66,0
Desperdicios de alimentos fermentados (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico) + lodos deshidratados	P(3HB-co-3HV)	64,5
Aguas residuales de fábrica de cartón fermentado (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico)	P(3HB-co-3HV)	67,4
Líquido de hidrólisis de lodos (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico)	P(3HB-co-3HV)	45315,0
Glicerol crudo fermentado	P(3HB-co-3HV)	76,0
Residuos de madera fermentada (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico)	P(3HB-co-3HV)	50,3
Suero de queso fermentado (ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico)	P(3HB-co-3HV)	30,0

Fuente: Tomado de Szacherska, traducida por autoras [19].

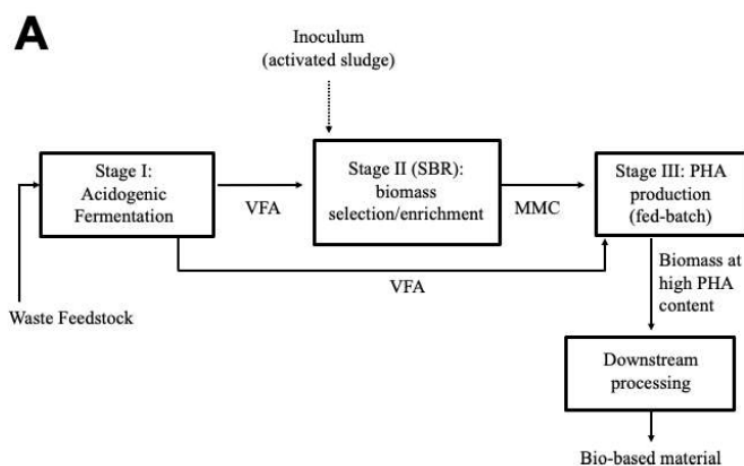


Figura 5. Esquema de producción de PHA con la estrategia de *feast and famine* utilizando lodo activado. Fuente: Crisafi *et al.* [24].

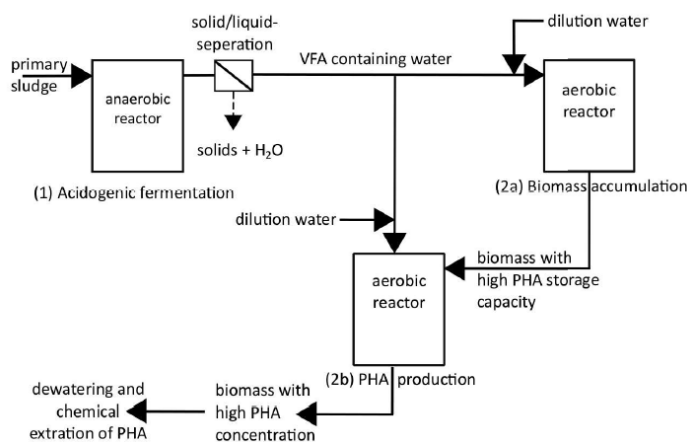


Figura 6. Esquema de producción de PHA con la estrategia de *feast and famine* utilizando lodo primario.
Fuente: Pittmann & Steinmetz [23].

Estos procesos fermentativos se llevan a cabo en reactores generalmente de tipo discontinuo secuencial (SBR) donde se usa un primer reactor para la selección del cultivo microbiano mixto y el enriquecimiento de microorganismos acumuladores de PHA, y un segundo reactor para la acumulación de PHA dentro de la célula, el cual es alimentado de forma intermitente para favorecer la capacidad de almacenamiento de PHA a partir del lodo [21,24].

En la [Tabla 5](#) se presentan ejemplos del tipo de fermentación, estrategia de alimentación y porcentajes de producción de PHA, entre otros aspectos a partir de aguas y lodos residuales.

En cuanto a los microorganismos evaluados han descrito tanto Gram positivos como Gram negativos. Además, se observa que la fermentación más utilizada es la acidogénica y la alimentación es de tipo aeróbica y dinámica siendo frecuente la estrategia de *feast and famine*. El tipo de lodo más evaluado es el lodo activado.

Los valores de PHA's obtenidos son variables y están relacionados con el tipo de lodo utilizado y diferentes condiciones de operación. Pittmann & Steinmetz [23] alcanzaron una producción de PHA (28,40 % del peso seco) a una baja concentración de sustrato, 20 °C, pH neutro y ciclos de 24 horas y, por otro lado, Hao *et al.* [20] obtuvieron un contenido de PHA del 42,31% observando que la producción se inhibe cuando los sustratos exceden un límite determinado. Pei *et al.* [31] produjeron 0,18 a 0,42 g PHA/g VSS utilizando lodos activados y resaltaron que la etapa de enriquecimiento fue un factor importante en el proceso. Morgan-Sagastume *et al.* [26] lograron incrementar la capacidad de almacenamiento de PHA, bajo la estrategia *feast and famine* hasta un 34% utilizando acetato durante 20 horas y confirmaron que los AGVs obtenidos de la fermentación de lodos activados es una materia prima adecuada para la producción de PHA.

Tabla 5. Aspectos generales para la acumulación de PHA's a partir de agua residual y lodos de depuradora.

Sustrato / Residuo	Tipo de fermentación	Estrategia de alimentación	Uso de AGV's	Tipo de lodo	Microorganismos usados	Porcentaje de PHA	Autores
Efluente destilería vino	Fermentación aeróbica / Fermentación semiaeróbica	No menciona	Éster de ácido graso	No Aplica	Cultivos microbianos mixtos, <i>E.coli</i> , <i>Alcaligenes sp</i> , <i>Bacillus sp</i> , <i>Pseudomonas sp</i> .	74 % <i>E. coli</i>	Gangurde <i>et al.</i> [15]
Agua residual industria cervecera	Fermentación Acidogénica	Feast - Famine	Acetato sódico	Lodo Enriquecido	Cultivo microbiano mixto	28 - 39 %	Ben <i>et al.</i> [21]

Sustrato / Residuo	Tipo de fermentación	Estrategia de alimentación	Uso de AGV's	Tipo de lodo	Microorganismos usados	Porcentaje de PHA	Autores
Aguas residuales	Fermentación por lotes de secuenciación	No menciona	No Aplica	Lodo	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Pseudomonas putida</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Pseudomona huttiensis</i> , <i>Yersinia frederiksenii</i> , <i>Aeromonas ichthiosmia</i> y <i>Sphingopyxis terrae</i>	Rendimientos de PHB y PHV de 55 y 45 %	Lam <i>et al.</i> [17]
Residuos Orgánicos Urbanos y lodos de depuradora	Alimentación dinámica aeróbica	Feast - Famine	AGV's	Lodo Activado	Cultivo microbiano mixto	93,0% de 3-hidroxi-butarato (3HB) y 79,8 % de 3-hidroxi-valerato (3HV)	Lorini <i>et al.</i> [22]
Aguas residuales	No menciona	No menciona	No Aplica	Lodo Activado	<i>Bacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> y <i>Acinetobacter</i>	0,360 y 0,9960 g/L.	Giraldo-Montoya <i>et al.</i> [27]
Aguas residuales	Fermentación por lotes alimentados	No Aplica	Ácido Acético	Lodo	<i>Ralstonia eutropha</i>	30 - 50 % de PHAs	Jaramillo <i>et al.</i> [28]
Lodos de depuradora	Fermentación por lotes alimentados	Feast - Famine	No Aplica	Lodos Activados	Cultivo microbiano mixto <i>Alcaligenes latus</i>	29,7 %	Ciesielski <i>et al.</i> [29]
Lodos de aguas residuales	Fermentación acidogénica de lodos	Feast - Famine	Acetato	Lodos Activados	Cultivo microbiano mixto	34 %	Morgan-Sagastume <i>et al.</i> [26]
Aguas residuales	Fermentación por lotes de secuenciación	Feast - Famine	No Aplica	No Aplica	Cultivo microbiano mixto enriquecido en bacterias del género <i>Thauera sp</i>	46,5 % de PHA	Tamang <i>et al.</i> [11]
Lodos de aguas residuales	Fermentación por lotes de secuenciación	Feast - Famine	No Aplica	No Aplica	Cultivo microbiano mixto	80,30 %	Sruamsiri <i>et al.</i> [18]
Lodos de aguas residuales y residuos orgánicos	Fermentación acidogénica de lodos	Feast - Famine	AGV's	Lodos Activados	Cultivo microbiano mixto	48 % g PHA/g SSV	Valentino F. <i>et al.</i> [25]
Lodos de aguas residuales	Fermentación acidogénica	Feast - Famine	AGV's	Lodos Primario	Cultivo microbiano mixto	28,40 %	Pittman <i>et al.</i> [23]
Lodos de aguas residuales	Fermentación acidogénica	Feast - Famine	Valerato	Lodo	Cultivo microbiano mixto	42,31 %	Hao <i>et al.</i> [20]
Lodos de aguas residuales	Fermentación dinámica aeróbica y fermentación acidogénica	No menciona	AGV's	Lodos Activados	----	----	Jayakrishnan <i>et al.</i> [20]

Sustrato / Residuo	Tipo de fermentación	Estrategia de alimentación	Uso de AGV's	Tipo de lodo	Microorganismos usados	Porcentaje de PHA	Autores
Lodos de aguas residuales	Fermentación acidogénica	Feast - Famine	AGV's	Lodos Activados	Cultivo microbiano mixto	0,18 y 0,42 gPHA/gSSV	Pei <i>et al.</i> [31]
Biomasa de lodos activados	Fermentación acidogénica	No menciona	Ácido acético y propiónico	Lodos Activados	Cultivo microbiano mixto	0,29 gPHA gSSV-1	Munir & Jamil [32]
Lodos de aguas residuales	Fermentación acidogénica	reactores batch secuenciales	Acetato, valerato, butirato	Lodos activados	<i>Hydrogenophaga</i> y <i>Comamonas</i>	72,08 % SSV	Zhang <i>et al.</i> [33]

Fuente: Autoras.

Factores y variables que afectan la acumulación de PHA's a partir de lodos de depuradora

La fuente nutricional proporcionada condiciona la síntesis y acumulación de este polímero teniendo en cuenta las condiciones de crecimiento del consorcio nativo, así como la condición de estrés que se logra con una limitación de fósforo, nitrógeno, oxígeno, un pH no óptimo y/o un exceso de la fuente de carbono [19,34]. Pittmann & Steinmetz [23] evaluaron una condición limitada de nutrientes de carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P) en un rango de 100:2:0.5 a 100:3:0.8 y encontraron que la cantidad de PHA producido está influenciada por las condiciones de operación de los reactores relacionadas con la temperatura y el pH. Otros autores refieren que cuando hay una relación baja entre el tiempo de reacción de la etapa de *feast* y el tiempo proporcionado en condiciones aeróbicas se favorece la selección del consorcio microbiano mixto con una mayor capacidad de almacenamiento de PHA's [21,35,36]. Barati *et al.* mencionaron que la duración de la fase de *feast* se mantuvo entre el 12 y el 15 % de la duración total del ciclo aeróbico. Los valores en este rango fueron inferiores al umbral encontrado previamente (20 %) y identificaron como valor límite, por debajo del cual aumenta la presión selectiva sobre la biomasa [36].

En cuanto a la temperatura se encontró que algunos investigadores evaluaron dos temperaturas 15 y 30 °C, obteniendo resultados similares en comparación con un ensayo realizado sin control de temperatura variando de 15 °C hasta 25 y 28 °C [21]. Observaron que el contenido de PHA a 15 °C fue de 23 % y a 30 °C de 19 %, mientras que sin control de temperatura fue del 29 %. Sin embargo, a 30 °C se favoreció el crecimiento celular frente al almacenamiento de PHA y a 15 °C mejoró el proceso con respecto a los 30 °C. Concluyeron que los mejores resultados fueron alcanzados

cuando la temperatura no se controló ya que diferentes temperaturas van a corresponder a diferentes productividades de PHA con una pequeña variación del contenido final entre el 36-48 % g PHA/ g VSS.

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) es un parámetro que está relacionado con la materia orgánica que pueden transformar los microorganismos y que es fácilmente biodegradable. Valentino *et al.* [25] mencionan que una alta relación de AGVs, así como la relación AGV/DQO favorece mayores rendimientos que oscilan en los rangos de 1,5 - 1,7; 31 - 40 y 7,7 g DQO/L. Asimismo, la relación carbono/nitrógeno (C/N) favorece el crecimiento de los microorganismos responsables de la acidogénesis [15] ya que el consumo lento de acetato en relaciones de C/N altas puede causar la ausencia o baja acumulación de biopolímeros [17]. Un parámetro también analizado es el potencial de acumulación de PHA (PAP) el cual sugieren que sea al menos 40 % g PHA/g SSV para la recuperación económica del polímero. Werker *et al.* [35] evaluaron 15 plantas de las cuales cuatro tenían un nivel de PAP de al menos 38 % g PHA/g SSV e hicieron énfasis que en las plantas depuradoras se puede alcanzar hasta un 60 % de PAP.

Estévez-Alonso *et al.* encontraron que una etapa de aclimatación de la biomasa combinado con una estrategia de alimentación de un pulso permitió alcanzar el promedio máximo del contenido de PHA y rendimientos de producto. Además, no encontraron efectos observables en la productividad del PHA con un control de pH y nitrificación activa [37].

Ben desarrolló el proceso en 3 etapas: fermentación acidogénica, cultivo en condiciones aeróbicas y pulsos de altas concentraciones de AGVs para promover el almacenamiento intracelular de PHA's controlando el pH en el reactor acidogénico a un valor de 6,2 [21]. Sin embargo, en la literatura

revisada diferentes rangos de pH pueden cambiar bien sea para el incremento de la biomasa (un valor de pH 5,5 disminuyen la actividad celular) o bien si el interés es la acumulación de PHA's (pH 7,5 - 8,5). Además, en el proceso fermentativo se encontró que el pH puede controlarse o dejarlo sin ajuste [19].

En cuanto a la estrategia de alimentación, varios autores coinciden en que la metodología *feast and famine* es una opción. Alzate *et al.* desarrollaron este proceso en dos etapas (selección de microorganismos y producción) [38], mientras que Sruamsiri *et al.* lo realizaron en tres etapas (fermentación, selección de microorganismos y la producción del biopolímero) [18]. Por su parte, Zhang *et al.* mencionan que el desarrollo del proceso en dos etapas simplifica la producción de PHA y reduce costos. También resaltan que la estrategia de *feast and famine* en condiciones aeróbicas y anaeróbicas respectivamente (denitrificación y producción) se pueden lograr de forma simultánea para reducir el aporte de energía de aireación [39].

Otra condición para evaluar es la tasa de carga orgánica (organic loading rate - *ORL* por sus siglas en inglés). Mineo *et al.* evaluaron tres *ORL* durante la selección de bacterias acumuladoras de PHA en lodos de depuradora en ensayos en *batch* (en lote o cerrados) durante 30 a 56 horas alcanzando un contenido de PHA de 60 % en peso con la carga orgánica más alta (1,8 g COD L⁻¹ d⁻¹) [40].

Por su parte, Cabrera *et al.* ratifican que *feast/famine* (F/F) es una estrategia que favorece la selección de los microorganismos acumuladores de PHA y resaltan que los niveles de oxígeno disuelto pueden ser utilizados para el control del tiempo en los ciclos. Realizaron ensayos en *batch* alimentándolos con acetato como fuente de carbono y evaluaron dos ratios F/F de 0,2 y 0,6 y encontraron que con el último ratio se consiguió mayor productividad de biomasa y contenido de polihidroxibutirato (PHB), el tipo de compuesto esperado cuando se utiliza acetato como fuente de carbono [41].

Conclusiones

Teniendo en cuenta la variabilidad de los resultados encontrados, es necesario seguir analizando las condiciones de selección del consorcio microbiano al sustrato de interés que favorezcan el aumento

de la biomasa y la condición de estrés que permita la acumulación de los polihidroxialcanoatos a partir de lodos de depuradora.

Varios autores demostraron que los cultivos mixtos son una alternativa viable dado la versatilidad para transformar diversos sustratos y el menor número de controles en el proceso que pueden ayudar a disminuir los costos del proceso.

El aumento y ajuste de las concentraciones de AGVs, la alimentación dinámica aeróbica, los regímenes de pulso, el ratio de *feast and famine* (F/F) y los procesos fermentativos en dos etapas (condiciones aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente) para alcanzar de forma simultánea la desnitrificación y la producción del polímero son aspectos que se deben seguir valorando para mejorar las eficiencias y la productividad de los PHA's.

Agradecimientos

Esta investigación realizada en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca fue aprobada en convocatoria interna mediante el Acuerdo 081 de 2020 y está vinculada al grupo de investigación de Bioprocesos y Control.

Referencias bibliográficas

- [1] Di Bartolo A, Infurna G, Dintcheva NT. A Review of Bioplastics and Their Adoption in the Circular Economy. *Polymers*. 2021;13:1229. <https://doi.org/10.3390/polym13081229>
- [2] Ministerio de Ambiente. Ruta hacia la eliminación de la contaminación por plásticos. Disponible en: <https://www.minambiente.gov.co/con-nueva-plataforma-colombia-continua-la-ruta-hacia-la-eliminacion-de-la-contaminacion-por-plasticos/>. Acceso el 22 de julio de 2024.
- [3] Plastics Europe. The fast Facts 2023. (Internet). Disponible en: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>. Acceso el 22 de julio de 2024
- [4] Rosenboom J, Langer, R, Traverso G. Bioplastics for a circular economy. *Nat. Rev. Mat.* 2022;7:117-137. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>

- [5] Choi G, Kim H, Rhee Y. Enzymatic and non-enzymatic degradation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolyesters produced by *Alcaligenes* sp. MT-16. *J. Microbiol.* 2004;42(4):346-52.
- [6] Kumar M, Rathour R, Singh R, Sun Y, Pandey, Gnansounou E, *et al.* Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *J. Clean. Prod.* 2020;263:121500. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121500>
- [7] Aslan AKHN, Ali MDM, Morad NA, Tamunaidu P. Polyhydroxyalkanoates production from waste biomass. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2016;36:012040. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/36/1/012040>
- [8] Rodriguez-Perez S, Serrano A, Pantión A, Alonso-Fariñas B. Challenges of scaling-up PHA production from waste streams. A review. *J. Environ. Manage.* 2018;205:215-230. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.09.083>
- [9] Mulopo J. A systematic overview of current advancements for chemical, material, and energy production using sewage sludge for industrial ecology and sustainability transition. *Environ. Sustain.* 2024;7:5–29. <https://doi.org/10.1007/s42398-023-00301-9>
- [10] Nair C, Meyer B. From Axenic to Mixed Cultures: Technological Advances Accelerating a Paradigm Shift in Microbiology. *Trends in microbiol.* 2018;6:538-554. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.11.004>
- [11] Tamang P, Arndt C, Bruns-Hellberg J, Nogueira R. Polyhydroxyalkanoates production from industrial wastewaters using a mixed culture enriched with *Thauera* sp: Inhibitory effect of the wastewater matrix. *Environ Technol Innov.* 2021;21:101328. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101328>
- [12] Mendoza C, Rafael R. Obtención de polihidroxialcanoato a partir del suero lácteo por cultivos microbianos mixtos (Tesis de doctorado). Coruña, España: Universidad de la Coruña; 2017.
- [13] Lemos A, Mina A. Polihidroxialcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico.* Colombia. 2015;79(1):93-101. <https://doi.org/10.23850/22565035.139>
- [14] Ren Yu, Inoue D, Ike M. Potential of activated sludge-derived mixed microbial culture enriched on acetate to produce polyhydroxyalkanoates from various substrates. *J. Mater. Cycles Waste Manag.* 2024;26:2355–2365. <https://doi.org/10.1007/s10163-024-01974-y>
- [15] Gangurde S, Sayyed R, Kiran S, Gulati A. Development of eco-friendly bioplastic like PHB by distillery effluent microorganisms. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2012;20(1):488-497. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1021-y>
- [16] Szacherska K, Moraczewski K, Rytlewski P, Czaplicki S, Ciesielski S, Oleskowicz-Popiel P, *et al.* Polyhydroxyalkanoates production from short and medium chain carboxylic acids by *Paracoccus homiensis*. *Nature.* 2022;12:7263. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11114-x>
- [17] Lam W, Wang Y, Ling P, Wan S, Fai Y, Chua H, *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) using sludge from different wastewater treatment processes and the potential for medical and pharmaceutical applications. *Env. Tech.* 2017;38(13–14):1779–1791. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1316316>
- [18] Sruamsiri D, Thayanukul P, Boonchayaanant B. *In situ* identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)- accumulating microorganisms in mixed microbial cultures under feast/famine conditions. *Sci. Rep.* 2020;10:3752. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60727-7>
- [19] Szacherska K. Volatile fatty acids as carbon sources for polyhydroxyalkanoates Production. *Polymers.* 2021;13(3):321. <https://doi.org/10.3390/polym13030321>
- [20] Hao J, Wang X, Wang H. Overall process of using a valerate dominant sludge hydrolysate to produce high-quality polyhydroxyalkanoates (PHA) in a mixed culture. *Sci. Rep.* 2017;7:6939. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07154-3>
- [21] Ben M. Producción de polihidroxialcanoatos a partir de agua residual de la industria de la cerveza (Tesis de Doctorado). Coruña, España: Universidad de la Coruña; 2015.
- [22] Lorini L, Martinelli A, Pavan P, Majone M, Valentino F. Downstream processing and characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by mixed microbial culture (MMC) and organic urban waste as substrate. *Biomass Convers. Biorefin.* 2021;11:693–703. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00788-w>

- [23] Pittmann T, Steinmetz H. Polyhydroxyalkanoate Production on Wastewater Treatment Plants: Process Scheme, Operating Conditions and Potential Analysis for German and European Municipal Wastewater Treatment Plants. *Bioeng.* 2017;4(2):54. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020054>
- [24] Crisafi F, Valentino F, Micolucci F, Denaro R. From organic wastes and hydrocarbons pollutants to polyhydroxyalkanoates: Bioconversion by terrestrial and marine bacteria. *Sustainability.* 2022;(14):8241. <https://doi.org/10.3390/su14148241>
- [25] Valentino F, Lorini L, Gottardo M, Pavan P, Majone M. Effect of the temperature in a mixed culture pilot scale aerobic process for food waste and sewage sludge conversion into polyhydroxyalkanoates. *J. of Biotechnol.* 2020;323:54-61. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.07.022>
- [26] Morgan-Sagastume F, Valentino F, Hjort M, Cirne D, Karabegovic L, Gerardin F, *et al.* Polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sludge and municipal wastewater treatment. *Water Sci Technol.* 2014;69(1):177-184. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.643>
- [27] Giraldo-Montoya J, Castaño-Villa G, Rivera-Páez F. Bacteria from industrial waste: potential producers of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in Manizales, Colombia. *Environ. Monit. Assess.* 2020;192:480. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08461-5>
- [28] Jaramillo S. Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) por parte de *Ralstonia eutropha H16* (Tesis de grado). Bogotá, Colombia: Universidad de los Andes; 2017.
- [29] Ciesielski S, Pokoj T, Mozejko J, Klimiuk E. Molecular identification of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria isolated from enriched microbial community. *Polish Journal of Microbiology.* 2013;62(1):45–50.
- [30] Jayakrishnan U, Deka D, Das G. Waste as feedstock for polyhydroxyalkanoate production from activated sludge: Implications of aerobic dynamic feeding and acidogenic fermentation. *J. Environ. Chem. Eng.* 2021;9(4):105550. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105550>
- [31] Pei R, Estévez-Alonso A, Ortiz-Seco L, Van Loosdrecht M, Kleerebezem R, Werker A. Exploring the Limits of Polyhydroxyalkanoate Production by Municipal Activated Sludge. *Environ. Sci. Technol.* 2022;56(16):11729–11738. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03043>
- [32] Munir S, Jamil N. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production in open mixed cultures using waste activated sludge as biomass. *Arch. Microbiol.* 2020;202:1907–1913. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01912-0>
- [33] Zhang Z, Lin Y, Wu S, Li X, Cheng J, Yang Ch. Effect of composition of volatile fatty acids on yield of polyhydroxyalkanoates and mechanisms of bioconversion from activated sludge. *Bioresour. Tech.* 2023;385:129445. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129445>
- [34] Valentino F, Karabegovic L, Majone M, Morgan-Sagastume F, Werker A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) storage within a mixed-culture biomass with simultaneous growth as a function of accumulation substrate nitrogen and phosphorus levels. *Water Res.* 2015;77:49-63. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.016>
- [35] Werker A, Bengtsson S, Korving L, Hjort M, Anterrieu S, Alexandersson T. Consistent production of high quality PHA using activated sludge harvested from full scale municipal wastewater treatment – PHARIO. *Water Sci. Technol.* 2018;78(11):2256-2269. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.502>
- [36] Barati F, Asgarani E, Gharavi S, Soudi M. Considerable increase in Poly(3-hydroxybutyrate) production via *phb C* gene overexpression in *Ralstonia eutropha* PTCC 1615. *BioImpacts.* 2021;11(1):53–7. <https://doi.org/10.34172/bi.2021.07>
- [37] Estévez-Alonso A, Altamira-Algarra B, Arnau-Segarra C, Van Loosdrecht M, Kleerebezem R, Werker A. Process conditions affect properties and outcomes of polyhydroxyalkanoate accumulation in municipal activated sludge. *Bioresour. Technol.* 2022;364:128035. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128035>
- [38] Alzate M, Caravelli A, Zaritzky N. Producción de polihidroxicanoatos por lodos activados a partir de suero de queso. En: Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas; 2015 abr 15-17; San Rafael, Mendoza, Argentina; 2015.
- [39] Zhang Z, Wang Y, Wang X, Zhang Y, Zhu T, Peng L *et al.* Towards scaling-up implementation of polyhydroxyalkanoate (PHA) production from activated sludge: Progress and challenges. *J. Clean. Prod.* 2024;447:141542. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2024.141542>

- [40] Mineo A, Isern-Cazorla L, Rizzo C, Palumbo A, Suárez-Ojeda ME, Mannina G. Polyhydroxyalkanoates production by an advanced food-on-demand strategy: The effect of operational conditions. *Chemical. Eng. J.* 2023;472:145007. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145007>
- [41] Cabrera F, Torres-Aravena Á, Pinto-Ibieta F, Campos J, Jeison D. On-line control of feast/famine cycles to improve PHB accumulation during cultivation of mixed microbial cultures in Sequential Batch Reactors. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(23):12611. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312611>