

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA LEÓN

ESTUDIOS CON RECONOCIMIENTO DE VALIDEZ
OFICIAL POR DECRETO PRESIDENCIAL DEL 27 ABRIL DE 1981



PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES A PARTIR DE BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
**MAESTRO EN MEDIO AMBIENTE CON ENFOQUE EN
SUSTENTABILIDAD**

PRESENTA

MARTÍN BARAJAS SEGOVIANO

ASESORA

DRA. YENY LIZZET COUOH UICAB

Índice

Abstract	1
Introducción	2
Capítulo I	4
1. Antecedentes	4
1.1 Importancia de los bioplásticos	4
1.2 Generalidades de los bioplásticos.	5
1.3 Bacterias productoras de polihidroxicanoatos, PHA's.....	8
1.4 Biopolímeros de origen bacteriano.	9
1.5 Naturaleza de los bioplásticos.	10
1.6 Características de los polihidroxicanoatos.	11
1.7 Síntesis de los PHAs.....	14
1.8 Biopolímeros en el género <i>Bacillus</i>	16
1.9 Producción y extracción de PHA.	18
1.10 Análisis por infrarrojo de los PHA.....	20
Capítulo II	23
2. Metodología.....	23
2.1 Microorganismos y conservación	23
2.2 Detección de cepas bacterianas productoras de PHA.....	23
2.3 Caracterización Bioquímica de las cepas productoras de PHA's.	23
2.3.1 Prueba de catalasa	24
2.3.2 Prueba del Citrato	24
2.3.3 Prueba hidrólisis de Almidón	24
2.3.4 Prueba de la Ureasa	25
2.3.5 Prueba de la hidrólisis de caseína.....	25
2.3.6 Prueba de Fermentación de azúcares.....	25
2.3.7 Tinción de Gram	25
2.4 Identificación Molecular de las bacterias productoras de PHA.....	26
2.4.1 Electroforesis de ADN genómico bacteriano.....	26
2.4.2 Amplificación por PCR del ADN 16S ribosomal	26
2.4.3 Análisis bioinformático	27
2.5 Producción y extracción de los PHA.....	27
2.6 Caracterización estructural de los PHA's.....	28

Capítulo III	28
3. Resultados y Discusión	28
3.1 Selección de cepa bacterianas productoras de PHA's	28
3.2 Caracterización Bioquímica de las cepas productoras de PHA's	30
3.3 Caracterización Molecular de las cepas productoras de PHA's	32
3.4 Análisis Filogenético de las cepas productoras de PHA's	34
3.5 Caracterización de PHAs	39
Conclusiones	44
Bibliografía	45
ANEXO 1. Espectro FTIR del PHA extraído de <i>Bacillus</i>	53
<i>amyloliquefaciens</i>	53
ANEXO 2. Espectro FTIR del PHA extraído de <i>Bacillus</i>	54
<i>amyloliquefaciens</i>	54
ANEXO 3. Espectro FTIR del PHA extraído de <i>Bacillus sp.</i>	55
ANEXO 4. Espectro FTIR del PHA extraído de <i>Morganella morganii</i>	56
ANEXO 5. Medios para la producción de PHAs.	57

Índice de tablas

Tabla 1. Resumen general de resultados obtenidos para cada prueba bioquímica de las cepas.	31
Tabla 2. Identificación molecular de las 4 cepas bacterianas (M1, M2, P2 y K5).	36
Tabla 3. Géneros microbianos productores de polihidroxialcanoatos.....	38
Tabla 4. Picos característicos de los FTIR para los PHA's producidos por las bacterias aisladas. .	41

Índice de figuras

Figura 1. Diferentes tipos de biopolímeros en función de su origen.	6
Figura 2. Producción de biopolímeros a partir de fuentes renovables llevadas a cabo por microorganismos y plantas. (De Eugenio, 2009).	9
Figura 3. Estructura química de las diferentes familias de bioplásticos, (Luego, 2018).	11
Figura 4. Polihidroxialcanoato, estructura. textoscientificos.com.....	12
Figura 5. Gránulos intracelulares de PHA. tecnologíadelosplásticos.blogspot.com.....	12
Figura 6. Degradación completa de PHA en menos de 50 días bajo condiciones tropicales, (Serrano, 2010)..	13
Figura 7. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos. Se indican las principales enzimas implicadas en el proceso, (González García, et al, 2013).	15
Figura 8. Síntesis del poly(3-hidroxybutirato) mediante la polimerización del ácido 3-hidroxybutanóico.	21

Figura 9. Espectro de un estándar de P3HB. Se aprecia la banda (pico) a 1721 cm ⁻¹ , correspondiente al enlace éster carbonilo característico de los PHA, (González García, et al. 2013).	22
Figura 10. Detección de polihidroxicanoatos en medio PDA conteniendo azul Nilo bajo luz UV después de 72 horas de incubación. A) Cepas bacterianas P1-9, B) Cepas bacterianas K1-K6 y M1-M2. En amarillo se marcan las cepas seleccionadas.....	31
Figura 11. Extracción de ADN genómico de cuatro cepas bacterianas. MM: marcador molecular, cepas M1, M2, P2 y K5.....	33
Figura 12. Amplicones productos de la PCR de cada una de las cuatro cepas.MM: marcador molecular, cepas M1, M2, P2 y K5.	33
Figura 13. Ribosoma bacteriano. (Rodicio & Mendoza, 2004)	35
Figura 14. Árbol Filogenético construido mediante el método Neighbor Joining de los aislados bacterianos en el género Bacillus. Basado en el gen ADN ribosomal 16S (MEGA 10).....	37
Figura 15. FTIR de los PHAs producidos por cepas analizadas en el presente estudio. 1: Bacillus amyloliquefaciens – 2, 2: Bacillus amyloliquefaciens – 3, 3: Bacillus sp – 4 y Morganella morganii - 5.....	40
Figura 16. Espectro FTIR del PHA extraído de Bacillus amyloliquefaciens – 2.....	53
Figura 17. Espectro FTIR del PHA extraído de Bacillus amyloliquefaciens – 2.....	54
Figura 18. Espectro FTIR del PHA extraído de Bacillus sp - 4.	55
Figura 19. Espectro FTIR del PHA extraído de Morganella morganii - 5	56

Abstract

The dependence of oil as a preponderant and precursor energy medium for the production of most of the things we use in our daily life, is saturating natural systems with waste causing imbalance, since usually these residues are slow, or very slow degradation

A specific case of these wastes are those generated by the plastics industry, which are found as fragments of all sizes in terrestrial and marine ecosystems, even within animal organisms.

Global plastic consumption has increased from 5 million tons per year in 1950 to 200 million in 2011, and is expected to be close to 500 million by 2021.

This paper aims to contribute from scientific research, to generate knowledge, about biodegradable alternatives of these materials, which are integrated into nature in a short time and do not remain as a contaminant.

Specifically, the production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from nitrogen fixing bacteria is evaluated, from which their growth and their ability to produce these compounds are determined.

Introducción

La dependencia del petróleo como medio energético preponderante y precursor para la producción de la mayoría de las cosas que utilizamos en nuestra vida diaria, está saturando de residuos a los sistemas naturales provocando desequilibrio, ya que por lo general estos residuos son de lenta, o muy lenta degradación.

Un caso concreto de estos residuos, son los generados por la industria del plástico, los cuales pueden durar cientos de años en degradarse, por lo que se les encuentra en fragmentos de todos tamaños contaminando ecosistemas terrestres y marinos, incluso dentro de organismos de animales.

El consumo mundial de plástico se ha incrementado de 5 millones de toneladas anuales en 1950 a 200 millones de toneladas en 2011, y se espera que en el 2020 sea cercano a 500 millones de toneladas (González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013; Greenpeace, 2018).

La conservación del medio ambiente es uno de los temas más importantes hoy en día, por lo que es necesario encontrar alternativas que puedan reemplazar los plásticos derivados del petróleo (García R. L., 2016).

Una alternativa es la producción de plásticos biodegradables mediante bacterias fijadoras de nitrógeno. Los polihidroxialcanoatos (PHAs), son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que algunas bacterias acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía (González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013).

Actualmente se producen PHAs utilizando cultivos puros u organismos genéticamente modificados. Lo cual aumenta considerablemente el costo de producción. Es necesario buscar nuevas estrategias para reducir costos como la exploración de nuevas cepas productoras (García R. L., 2016).

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son plásticos biodegradables que pueden reemplazar a los polímeros de origen petroquímico ya que siendo sintetizados por bacterias a partir de sustratos de bajo valor económico y en general de recursos renovables, tienen características físicas similares a las de los plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno.

La diferencia es que los PHAs tienen la posibilidad de ser degradados a dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias o a metano en condiciones anaerobias, en hábitats tan diversos como suelo, mar, aguas estancadas o aguas residuales (Lemos Delgado & Mina Cordoba, 2015).

El presente trabajo pretende contribuir desde la investigación científica, a generar conocimiento, sobre alternativas biodegradables de estos materiales, que se integren a la naturaleza en corto tiempo y no permanezcan como un contaminante.

El objetivo general es evaluar la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) a partir de bacterias fijadoras de nitrógeno. Para lo anterior, primero se determina el crecimiento de las cepas y su capacidad de producción de PHAs. Esta técnica de determinación se basa en la fluorescencia que emiten los PHAs combinados con el colorante que se agrega al medio de cultivo.

La identificación de los microorganismos se logra mediante la extracción, purificación y amplificación del ADN antes de su secuenciación y análisis, para posteriormente construir el árbol filogenético de los microorganismos que componen la cepa.

Una vez que se determina la cepa y el medio de mayor desempeño, se pasa a la producción de los PHAs. En este trabajo se inocula el medio de mayor desempeño con las cuatro cepas que mostraron mayor crecimiento y producción de PHAs, por separado. Para la extracción de los PHAs se sigue el protocolo Salmiati et al. (Salmiati, Salim, & Olsson, 2009), modificado, el cual usa para tal fin, diferentes solventes. Por otra parte, la determinación de los PHAs se realiza mediante espectroscopia infrarroja.

En el capítulo I se exponen y definen los conceptos teóricos que respaldan los procedimientos para alcanzar los objetivos mencionados, y cuya ejecución es descrita en la metodología propuesta en el capítulo II. Finalmente, en el capítulo III se presentan y analizan los resultados, para posteriormente concluir sobre los mismos.

Capítulo I

1. Antecedentes

1.1 Importancia de los bioplásticos

Un bioplástico se define como todo aquel polímero que tiene propiedades plásticas similares a las de un termoplástico, pero que en lugar de usarse petróleo para su síntesis, éste procede de una fuente orgánica renovable. Entre los bioplásticos más prometedores desde el punto de vista comercial están los producidos por microorganismos, como lo son los polihidroxicanoatos (PHAs). Los cuales son polímeros que pueden ser sintetizados mediante cualquier residuo, sin coste desde el punto de vista comercial y ambiental, por lo que un residuo se convierte en sustrato (Cerrone, 2011).

El primer bioplástico que se comercializó fue el Biopol, en 1982, éste fue un PHA que fue usado para la fabricación de botellas, fibras, rastrillos desechables y algunos productos para empacar alimentos, aceite para motor, shampoo, así como cosméticos. Los PHA tienen otra característica que los hace interesantes, no causan efectos tóxicos, es decir, son biocompatibles, por lo que pueden usarse en la producción de materiales con aplicaciones médicas, como la generación de implantes y la ingeniería de tejidos. La degradación natural de los PHA permite usarlos en agricultura, para la fabricación de dispositivos de dosificación de compuestos químicos como fertilizantes, fungicidas y herbicidas (Segura, Noguez, & Espin, 2007).

Hasta el año 2010 la empresa de mayor producción de PHAs fue la estadounidense ADM, con una producción de 50 000 ton/año, seguida de la también norteamericana Meredian y la italiana Bio on con una producción de 10 000 ton/año. En América Latina, los brasileños también le han apostado a la producción de PHB invirtiendo 14 millones de USD en el 2002 para la construcción de PHB Industrial S.A. En sus inicios, la fábrica tenía una capacidad de producción de 60 ton/año de Biocycle a partir de sacarosa de caña de azúcar. El costo promedio de su producción era de 5 USD/Kg de plástico. Para el 2008 aumentaron sus capacidades de producción de PHB hasta 10 000 ton/año con la habilitación de una nueva planta (González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013; Bello Gil & Brandl, 2007). En México solo existen proyectos en fase experimental para la producción de éstos bioplásticos.

1.2 Generalidades de los bioplásticos.

Los bioplásticos son plásticos que son biobasados, biodegradables o que tienen ambas características, es decir, que en su constitución total provienen de: Materias primas de origen renovable y son biodegradables; materias primas de origen renovable y no son biodegradables, o de materias primas de origen petroquímico y son biodegradables, (Vázquez, Espinoza, Beltrán, & Velasco, 2014). Estos materiales tienen estructura polimérica, es decir, son cadenas formadas por un único monómero o por monómeros diferentes, por lo que se les clasifica dentro de los polímeros biodegradables.

También se llaman bioplásticos (BP) los materiales plásticos certificados como biodegradables que se extraen de materia orgánica (recursos agrícolas, forestales y animales), en principio renovables. Los bioplásticos (BP) constituyen un subgrupo dentro de los “polímeros biodegradables” (PBD) que, al igual que los biopolímeros (BPL) se degradan por la acción de los microorganismos, pero pueden tener su origen en fuentes fósiles (PBFF), (Ecoembalajes España S.A., 2009). La figura 1 muestra una clasificación de los biopolímeros en función de su origen.

Los polímeros biodegradables pueden ser de origen natural como los polihidroxialcanoatos, los polisacáridos (celulosa, almidón, quitina) o pueden ser sintetizados como el ácido poliláctico, el ácido poliglicólico, la policaprolactona, y el alcohol polivinílico. Las principales aplicaciones de los polímeros biodegradables están orientadas hacia la producción de empaques, suturas, miniimplantes bioabsorbibles, como tornillos y stents, la liberación controlada de fármacos, y la ingeniería de tejidos, (Zuluaga, 2013).

Se puede afirmar que las plantas son los productores de biopolímeros más importantes, aunque biopolímeros como los polihidroxialcanoatos (PHA's) y las poliamidas pueden ser sintetizados tanto por microorganismos autótrofos y heterótrofos. El interés de la industria en la producción microbiana de los biopolímeros aumenta a medida que se desarrolla la biotecnología. A demás la tendencia es impulsar la fabricación industrial de productos biotecnológicos a partir de procesos fermentativos, a fin de reservar las plantaciones agrícolas para fines alimentarios, (De Eugenio, 2009).

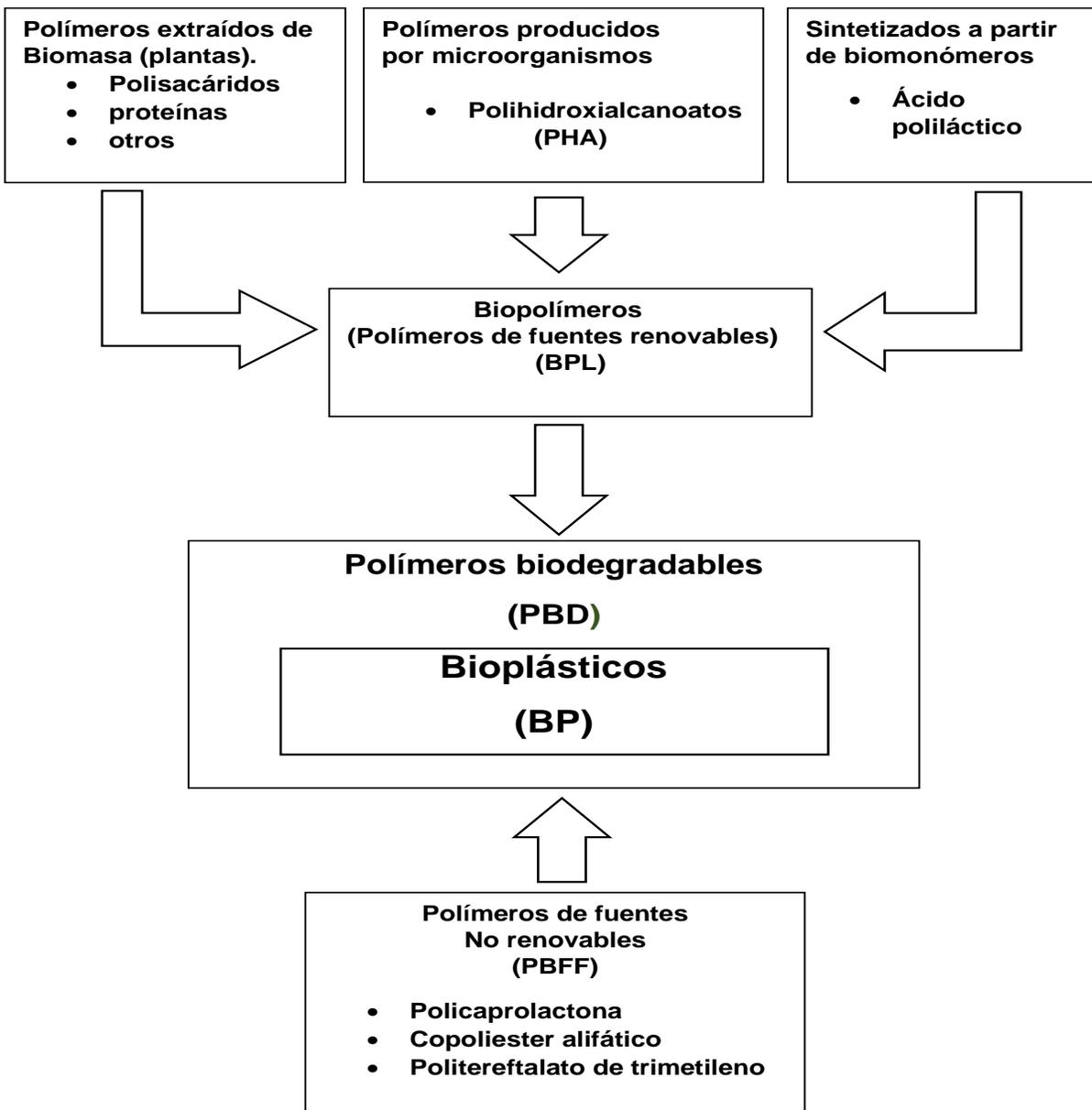


Figura 1. Diferentes tipos de biopolímeros en función de su origen.

A fin de determinar qué tan biodegradable es un biopolímero, ha sido necesario definir las normas de verificación de la biodegradabilidad y compostabilidad de los mismos, ya que un polímero biodegradable puede ser clasificado como compostable solo si el proceso ocurre dentro de ciertas condiciones y dentro de un tiempo establecido.

De acuerdo a la norma ASTM D6400 un polímero biodegradable es un material capaz de descomponerse en: dióxido de carbono, CO₂; metano, CH₄; agua, H₂O; componentes inorgánicos y biomasa, como resultado de la acción de microorganismos. Los polímeros compostables son materiales biodegradables capaces de experimentar la biodegradación en un medio de compost y de descomponerse a una velocidad cercana a la de los materiales compostables conocidos. Es importante entender que para que ocurra la biodegradación se requiere que existan las condiciones ambientales específicas, como un pH determinado, humedad, entre otros, (Campuzano, López, & Álvarez, 2018).

Las normas internacionales más usadas para validar la compostabilidad industrial de un material plástico son EN 13432, AS 4736, ISO 17088 y ASTM D6400. Cabe resaltar que estas normas validan productos y no materiales, y que el material puede tener un comportamiento diferente dependiendo de su forma o presentación. En general, estas normas son específicas en que un producto que es fabricado con un material biodegradable debe cumplir con características, como (Campuzano, López, & Álvarez, 2018):

Desintegración o degradación física. Esto implica que el material debe desintegrarse en un 90% en fragmentos menores a un tamaño específico (usualmente 2x2 mm), dentro de un plazo determinado por la norma (usualmente 12 semanas).

Biodegradación inherente o degradación química. Se refiere a que el material debe cumplir con un nivel de conversión de carbono orgánico a CO₂, dentro de un plazo determinado según la norma (la mayoría de las normas definen en un compostaje industrial, un 90% de degradación en 180 días a 58°C).

Ecotoxicidad o efecto en las plantas. Para determinar esta característica de los materiales plásticos, se compara el crecimiento de plantas en un compost control (obtenido de residuos orgánicos que no contiene el material de ensayo), y en un compost del mismo residuo orgánico que contiene 10% del material de ensayo, añadido al comienzo del compostado.

No deben presentarse diferencias significativas en el crecimiento y desarrollo de las plantas en los dos medios.

Características químicas. El producto plástico deberá tener concentraciones de metales pesados (Cu, Zn, Ni, Cd, Pb, Hg, Cr, Mo, Se, Ar) inferiores al 50% de las prescritas para compost en el país donde se vende el producto.

1.3 Bacterias productoras de polihidroxicanoatos, PHA's.

Las cepas de bacterias, recombinantes o de tipo salvaje, que producen PHA, por lo general lo hacen mediante procesos fermentativos en lotes de dos etapas, una fase de crecimiento celular en un medio rico en nutrientes que asegure la producción de biomasa; y una fase de producción de PHA. Por las condiciones que se requieren para la síntesis de PHA, las bacterias se dividen en dos grupos. En el primer grupo el crecimiento está limitado por el agotamiento de nutrientes como nitrógeno, fósforo, oxígeno o magnesio; esto actúa como un desencadenante del cambio metabólico para detener la replicación y comenzar la producción de PHA, ejemplos de este primer grupo de bacterias son *Alcaligenes eutrophus*, *Protomonas extorquens* y *Pseudomonas oleovorans*. En el segundo grupo de bacterias como la *Alcanigenes lactus*, *Azotobacter vinelandii* y la *Escherichia coli*, la limitación de nutrientes no es necesaria para la síntesis, es decir, pueden producir y acumular PHA durante el crecimiento. Estas propiedades asociadas al crecimiento del segundo grupo de bacterias productoras de PHA permitieron el desarrollo de producción industrial de PHA, (Rehm, 2009).

La acumulación de PHA dentro de la célula bacteriana y el crecimiento de esta debe estar balanceada para evitar que la acumulación de PHA sea incompleta o que termine la fermentación antes de tiempo. Por esta razón frecuentemente se utilizan fuentes de nitrógeno complejas que incrementan el crecimiento celular y la acumulación de PHA, al mismo tiempo. Por otra parte, la concentración celular residual determina la cantidad de PHA que se produce, un alto contenido de PHA con baja concentración celular residual, provocara como resultado un acumulado de PHA deficiente y por tanto baja productividad del proceso. Una alta acumulación de PHA intracelular, con una concentración celular elevada, dará la mejor productividad. La economía de producción de PHA está determinada por el costo de la fuente de carbono, la introducción de fuentes de carbono crudas reduce los costos de producción de PHA, ya que sus precios son más bajos que los de los sustratos carbonatados puros, (Bello, Otero, Ortega, & Carrera, 2009).

1.4 Biopolímeros de origen bacteriano.

Las plantas y microorganismos autótrofos son capaces de sintetizar diferentes productos (biopolímeros y productos no biopoliméricos) a partir de CO₂. Estos productos primarios a su vez pueden convertirse en otros biopolímeros por la acción de los microorganismos heterótrofos, conservándose la sostenibilidad del proceso, Fig. 2, (De Eugenio, 2009).

Ejemplos de biopolímeros importantes sintetizados por bacterias son los xantanos y alginatos, la celulosa, el ácido hialurónico, los levanos, la cianoficina, el poliglutámico y los PHAs. Los cinco primeros son polisacáridos con distinta estructura química, utilizándose algunos de ellos como espesantes en la industria alimentaria (xantanos, alginato y levanos). Los xantanos son polímeros son producidos por bacterias patógenas de plantas del género *Xanthomonas*, y sus principales aplicaciones se centran en su uso como espesante, emulsificante y estabilizante. El alginato tiene una función principal que es la encapsulación de micro y nanoestructuras de aplicación farmacéutica y medicinal, es biocompatible, por lo que puede utilizarse como biomaterial. Lo producen bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Azotobacter* y las algas pardas (De Eugenio, 2009) .

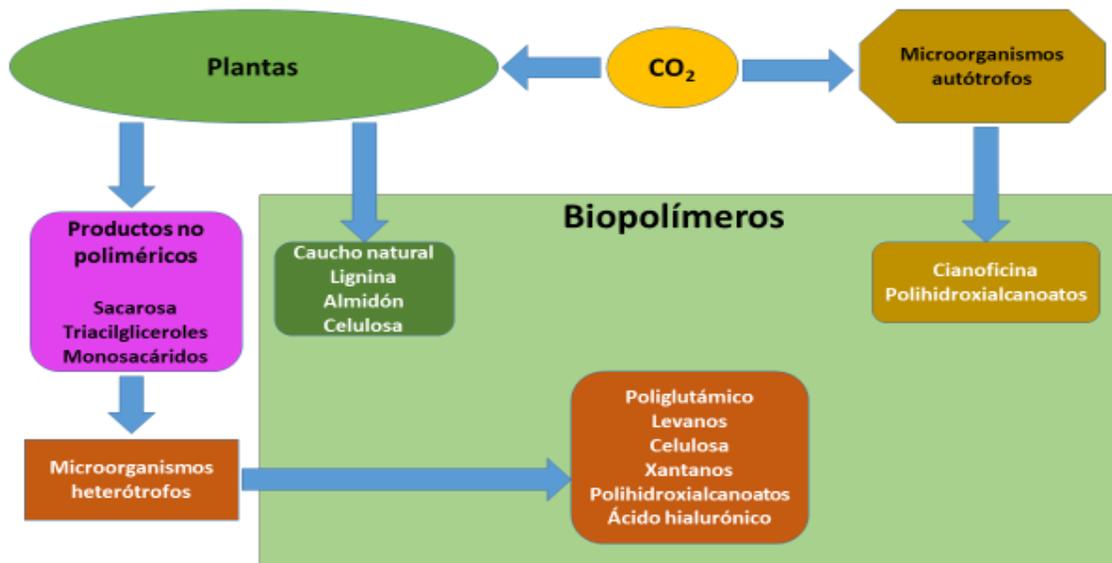


Figura 2. Producción de biopolímeros a partir de fuentes renovables llevadas a cabo por microorganismos y plantas. (De Eugenio, 2009).

Los levantanos, son homopolisacáridos que tienen un papel básicamente como prebióticos en preparados alimenticios de consumo humano y animal. En la industria cosmética son utilizados por sus efectos hidratantes y anti-irritantes en la piel. Levaduras, hongos, bacterias y muchas especies de plantas los producen.

El polisacárido más abundante en la naturaleza es la celulosa, producido por plantas vasculares. Hasta ahora no se ha considerado su producción a gran escala mediante fermentación bacteriana.

A diferencia de la celulosa, la fermentación bacteriana es el método ideal para la síntesis del ácido hialurónico a gran escala, este polímero, tradicionalmente se extraía de restos animales, pues es uno de los componentes de los tejidos, pero las últimas epidemias en animales de consumo impulsaron el desarrollo de técnicas de fermentación a partir de estreptococos de los grupos A y C. La cianoficina y el poliglutámico son dos poliamidas sintetizadas por cianobacterias y bacterias del género *bacillus*, respectivamente. El poliglutámico es usado en la industria alimentaria, cosmética y médica como espesante, crioprotector o humectante, entre otras aplicaciones. Aunque la cianoficina no tiene ninguna aplicación conocida actualmente, puede ser materia prima en la producción de otros compuestos poliméricos y como fuente de aminoácidos libres. Los PHA son poliésteres de ácidos grasos producidos por bacterias, de interés industrial por su posible aplicación como bioplásticos (De Eugenio, 2009).

1.5 Naturaleza de los bioplásticos.

Los bioplásticos son compuestos poliméricos que tienen propiedades semejantes a los plásticos derivados del petróleo, pero a diferencia de ellos, se obtienen de precursores sintetizados por seres vivos. Unos son derivados de macromoléculas biológicas como las de almidón, las que forman el aceite de soja y las de celulosa, es decir, moléculas biodegradables. Otros, están formados por mezclas de estos y de plásticos convencionales, esto implica que son parcialmente biodegradables, y un tercer grupo denominado como bioplásticos de origen microbiano, son polímeros constituidos por unidades sintetizadas íntegramente por bacterias. En este último grupo se encuentran los polihidroxicanoatos (PHAs), poli-lactato (PLA). El poli-butilén-succinato (PBS), el poli-*para*-fenileno (PPP), el poli-trimetilen-tereftalato (PTT) y el polietileno (PE), (Luego, 2018). Ver figura 3.

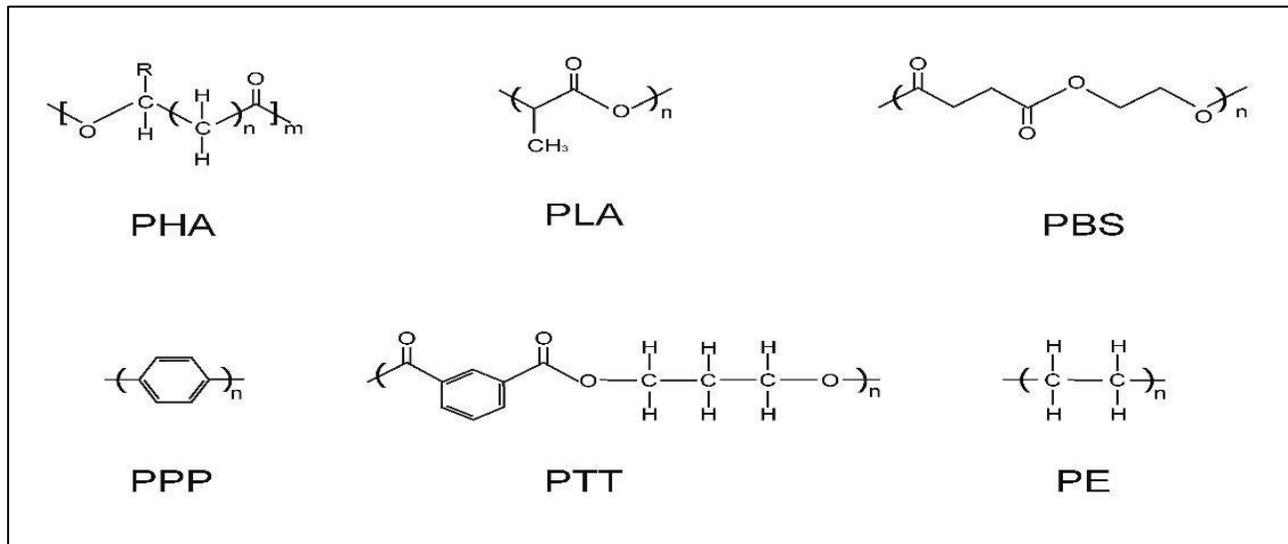


Figura 3. Estructura química de las diferentes familias de bioplásticos, (Luego, 2018).

Aunque existen bioplásticos derivados del almidón, y de otras macromoléculas, la mayoría son poliésteres. Los poliésteres aromáticos como el PTT, presentan buenas propiedades mecánicas para utilizarse como materiales plásticos, aunque prácticamente son resistentes a la biodegradación. Por otra parte, los poliésteres alifáticos son fácilmente biodegradables, pero no tienen propiedades mecánicas tan bien definidas, solo el PHA y el poliláctico (PLA) pueden denominarse renovables, aunque este último es de origen sintético. La producción de ácido láctico se lleva a cabo mediante la fermentación con bacterias del género *Lactobacillus*, pero la síntesis es una polimerización *in vitro* no enzimática. Por tanto, de todos los poliésteres bioplásticos el PHA es el único biodegradable, renovable y producido de forma natural por organismos vivos, (De Eugenio, 2009) .

1.6 Características de los polihidroxicanoatos.

Los PHAs son poliésteres lineales de reserva compuestos de ácidos (R)-3-hdroxicarboxílicos que algunas arqueas y bacterias acumulan intracelularmente, para usarlos como fuente de carbono y energía. Los PHAs son sintetizados dentro de la célula bacteriana durante un desequilibrio nutricional y se acumulan en forma de gránulos rodeados por una monocapa lipídica y proteínas. Figuras 4 y 5.

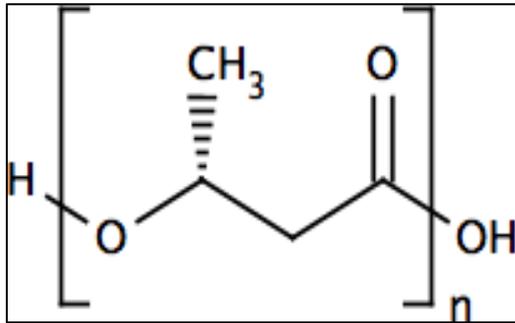


Figura 4. Polihidroxialcanoato, estructura.
textoscientificos.com

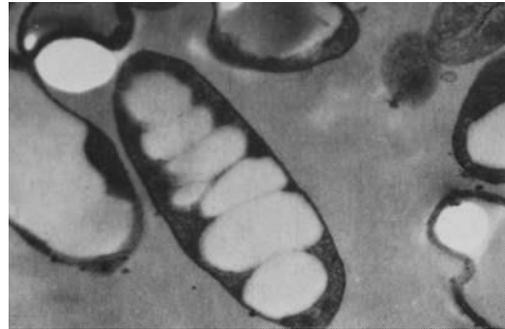


Figura 5. Gránulos intracelulares de PHA.
tecnologíaadelosplásticos.blogspot.com

La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos, tiene lugar mediante la condensación del grupo carbonilo de un monómero de ácido hidroxialcanoico con el grupo hidroxilo del siguiente formándose un enlace éster. Según el número de carbonos en cada monómero, los PHA son de cadena corta (scl-PHAs) con 4 o 5 átomos de carbono; PHA de cadena media (mcl-PHAs) de 6 a 14 carbonos; PHA de cadena larga (lcl-PHA) de más de 14 carbonos y PHA de cadena mixta, que combinan monómeros de cadena corta y media. Los PHAs de cadena corta son polímeros termoplásticos típicos, los cuales pueden ser moldeables arriba de sus puntos de fusión (T_m), la cual es de 180°C , mientras que su temperatura de transición (T_g), está entre -5 y 20°C . El P3HB, ácido 3 – hidroxibutírico, pertenece a este grupo, es muy similar al polipropileno. Las propiedades mecánicas como módulo de Young y la fuerza tensil de estos biopolímeros, así lo indican. La incorporación de P3HV, ácido 3-hidroxivalérico, en el polímero también provoca que tanto la T_m como la T_g disminuyan significativamente, por lo que los copolímeros de cadena corta son materiales más versátiles que el homopolímero. Los PHA de cadena media, son altamente amorfos con una T_g de entre -62 y -26°C y T_m de 42 a 58°C , se clasifican como elastómeros. (González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013; Altamirano & Ramos, 2018).

Como se comentó los gránulos de PHA formados son usados como almacenamiento de energía y carbono, cuando de este hay abundancia en el medio y deficiencia de elementos como oxígeno, nitrógeno, fósforo y magnesio principalmente, lo que los hace más resistentes bajo esta condición de estrés.

El tamaño de los gránulos varía entre 0.2 y 0.5 μm , cada célula tiene entre 8 y 10 gránulos, con un peso molecular de 2×10^5 a 3×10^6 daltons dependiendo de la especie de las bacterias, estas pueden acumular biopolímero hasta el 90% de su peso seco, (Serrano, 2010). Figura 4.

Entre las características importantes de los PHAs está su capacidad de biodegradación, ésta es su principal ventaja (Bhatt, Shah, Patel, & Trivedi, 2008; Ojumu, Yu, & Solomon, 2004). Existen en la naturaleza microorganismos capaces de degradar enzimáticamente a los PHAs de forma extracelular e intracelular mediante hidrolasas y PHA depolimerasas, (Jendrossek & Handrick, 2002), éstas son secretadas de las células de los microorganismos y al adherirse a la superficie del polímero, lo convierten en unidades de monómeros independientes, (Ojumu, Yu, & Solomon, 2004). El tiempo de degradación depende de la naturaleza del polímero, así como de las condiciones ambientales a las que son expuestos, se ha observado que los PHAs tienen degradación en ambientes aerobios, anaerobios, salinos, marinos y otros, (Ojumu, Yu, & Solomon, 2004). Lo reportado indica que los tiempos estándares de degradación de una pieza fabricada con PHB varían entre dos meses en suelos con temperatura constante (Mergaert, Webb, Anderson, A., & J., 1993), hasta dos años en ambientes marinos, (Madison & Huisman, 1999). También se ha reportado que el tiempo de degradación puede ser acelerado bajo condiciones anaerobias y con la exposición a radiación ultravioleta, (Shangguan, Ya-Wu, & Chen, 2006).

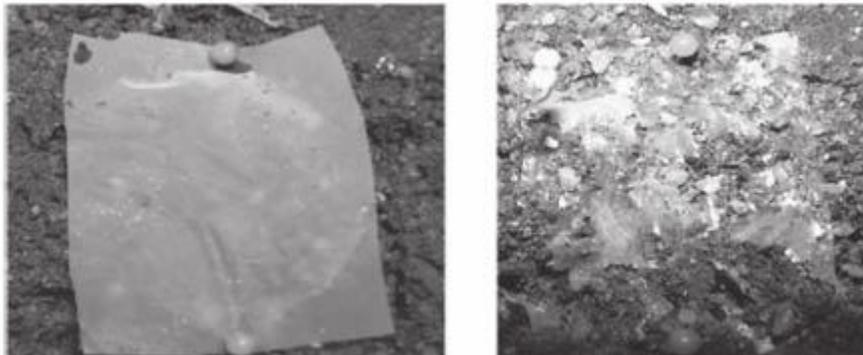


Figura 6. Degradación completa de PHA en menos de 50 días bajo condiciones tropicales, (Serrano, 2010).

1.7 Síntesis de los PHAs.

Los PHAs se sintetizan mediante ácidos grasos u otras fuentes de carbono, su composición depende del sustrato y de la cepa utilizada. La producción de PHAs en bacterias se encuentra ligada a tres rutas metabólicas: (1) síntesis de ácidos grasos, la cual produce precursores de (R)-hidroxíacil-CoA formados a partir de fuentes de carbono como glucosa y gluconato; (2) la degradación de ácidos grasos vía β -oxidación, (3) la cadena de elongación, en la cual el acil-CoA es alargada por la acetil-CoA. En general, la síntesis de PHAs consiste en tres pasos principales: en el primer paso la enzima β -celostiasa PHA específica, codificada por el gen *phaA*, cataliza la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. En el segundo paso, la molécula de acetoacetil-CoA es reducida vía acetoacetil-CoA reductasa codificada por el gen *phaB*, para producir β -hidroxíacil-CoA. Finalmente, la molécula de β -hidroxíacil-CoA es polimerizada por la enzima PHA sintetasa, la cual es codificada por el gen *phaC*. (González, 2008).

El PHA más estudiado es el P3HB, producido por la bacteria *Ralstonia eutropha* por lo que la ruta de biosíntesis en este microorganismo a partir de carbohidratos ha sido descrita con detalle. El proceso metabólico para la producción de PHA de cadena corta comienza a partir de acetil-CoA, en una secuencia de reacciones catalizadas por las enzimas 3-cetotiolaza, acetoacetil-CoA reductasa y poli(3-hidroxibutirato) sintetasa (Fig. 7). Generalmente las bacterias que sintetizan P3HB no producen PHA de cadena media, pero con microorganismos recombinantes se logran mezclar las rutas metabólicas para producir polímeros o copolímeros con monómeros de cadena corta, media o ambas, (González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013).

La capacidad de síntesis de los PHAs se encuentra genotípicamente determinada y no se realiza permanentemente en las bacterias, se encuentra regulada en respuesta a una condición subóptima para el crecimiento y reproducción, además de estar relacionada con otros procesos metabólicos de la célula. Este proceso de síntesis es regulado a nivel transcripcional y enzimático y puede variar entre organismos, (González, 2008).

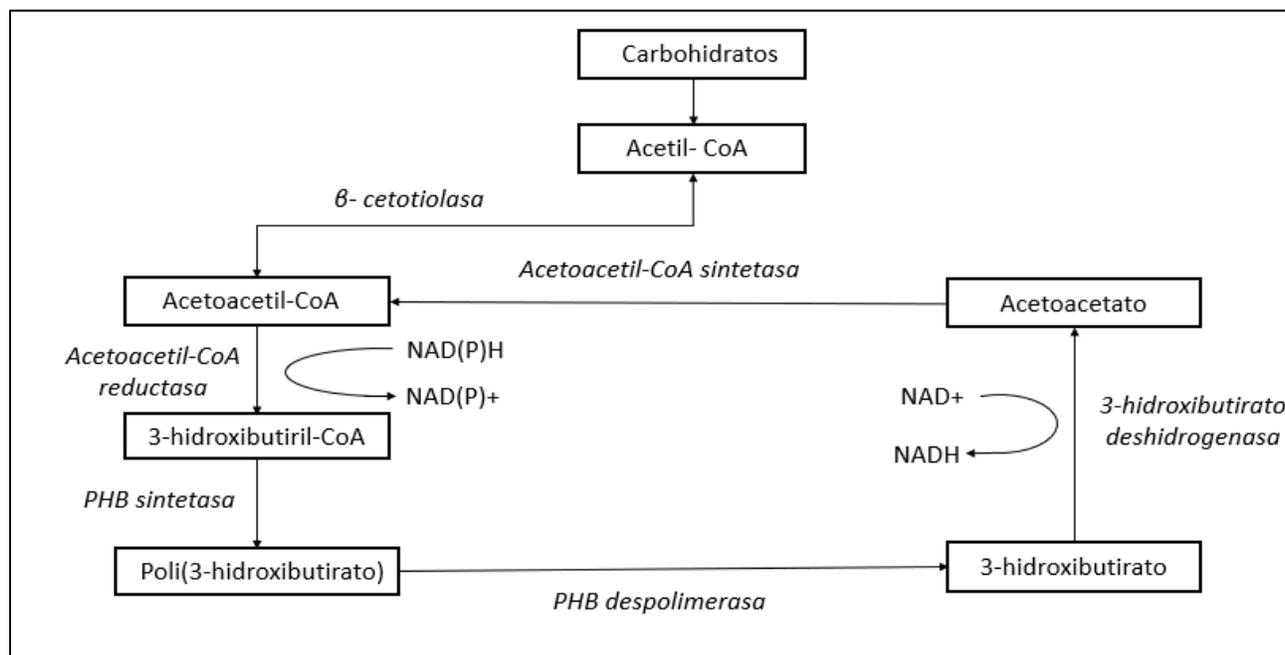


Figura 7. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos. Se indican las principales enzimas implicadas en el proceso, (González García, et al, 2013).

La detección de gránulos de PHA en células bacterianas se ha llevado a cabo por medio de la tinción con colorante lipofílico negro Sudán B, debido a la naturaleza lipídica de los PHAs. Por otro lado, la detección intracelular de los PHAs también puede llevarse a cabo mediante espectroscopía infrarroja (FT-IR). La metodología más reportada para la extracción de PHA de la biomasa microbiana ha sido el uso de hidrocarburos clorados, específicamente la técnica utilizando reflujo con cloroformo. La solución resultante de PHA se filtra para la remoción de restos celulares, luego se concentra para después precipitar en metanol o etanol, los PHAs. Con esta técnica los lípidos de bajo peso molecular permanecen en solución y no interfieren en la determinación. Los solventes clorados son los más utilizados para la extracción de PHA de cadena corta como el P3HB, sin embargo para la extracción de PHA de cadena media es más amplio el rango de solventes utilizados, (García, Novoa, Franco, & Higuera, 2015).

1.8 Biopolímeros en el género *Bacillus*.

Aproximadamente se conocen 300 especies de bacterias productoras de PHAs, incluidas bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero solo algunas son utilizadas industrialmente por sus altas eficiencias para concentrar biopolímeros en sus células, (Barbosa, Espinoza Hernandez, Malagón Romero, & Moreno Sarmiento, 2005; López, y otros, 2012).

De las bacterias Gram negativas se destacan *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *P. oleovorans* y *Azotobacter vinelandii*; destaca también, una cepa de *Escherichia coli* recombinante que contiene el operón de la biosíntesis de PHAs de *Cupriavidus necator*, (Barbosa, Espinoza Hernandez, Malagón Romero, & Moreno Sarmiento, 2005).

En relación a las bacterias Gram positivas, se ha reportado que varias especies del género *Bacillus* producen PHAs, como *B. megaterium* y *B. cereus* (Yilmaz & Beyatli, Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) production by a *Bacillus cereus* M5 strain in sugarbeet molasses, 2005) (Reddy, Ghai, & Kalia, 2003), así como actinomicetes del género *Streptomyces*, (Franco Correa, Gómez Méndez, Castro Medina, & Rendón Ruiz, 2009).

El estudio del género *Bacillus* en la producción de PHA no ha sido explotado totalmente; han sido estudiados aspectos de la producción de PHA en *B. megaterium*, *B. cereus* y *B. micoides*. Estos estudios han sido enfocados principalmente, al efecto del crecimiento en diferentes fuentes de carbono, así como al uso de diferentes fuentes de fósforo y nitrógeno, (González, 2008).

Se han realizado estudios en *B. cereus* cepa SPV evaluando las propiedades químicas de los PHA sintetizados, así como los genes que están involucrados en las rutas de biosíntesis de estos polímeros (Valappil, Boccaccini, Bucke, & Roy, 2007; Valappil, Peiris, Langley, Herniman, Boccaccini, Bucke, & Roy, 2007; Valappil, Rai, Bucke, & Roy, 2008).

Una ventaja del uso de bacterias del género *Bacillus* se fundamenta en su capacidad de sintetizar co- polímeros de manera natural a partir de un gran número de fuentes de carbono como glucosa, fructosa, sacarosa, glicerol, incluso polímeros naturales como el almidón, sin adicionar sustratos precursores. Otra ventaja se observa cuando el PHA proviene de bacterias Gram negativas, en este caso el PHA tiene lipo-polisacáridos (LPS) que pueden producir reacciones inmunogénicas cuando son utilizados en aplicaciones médicas, a diferencia de los PHAs producidos por bacterias Gram positivas que no tienen LPS, (Valappil, Boccaccini, Bucke, & Roy, 2007).

El género *Bacillus* tiene su mayor obstáculo para ser implementado a nivel industrial en la esporulación. La esporulación es un proceso de supervivencia desarrollado por los organismos de especies pertenecientes a este género, cuando están limitados nutricionalmente, formando un complejo inmune en condiciones adversas como valores extremos de pH y temperaturas altas. Es una desventaja que el mismo proceso que estimula la acumulación de PHA, conduce a la esporulación como medio de supervivencia. Por lo anterior, la acumulación de PHA en estos organismos no llega al 65% en peso seco, (Kulpreecha, Boonruangthavorn, Meksiriporn, & Thongchul, 2009; Valappil, Peiris, Langley, Herniman, Boccaccini, Bucke, C., & Roy, 2007).

Entre la gran cantidad de microorganismos que producen PHAs las bacterias del género *Bacillus* como: *Bacillus sp.* JMa5 (Wu, y otros, 2001), *B. mycoides* RLJ B-017 (Borah, Thakur, & Nigam, 2002), *B. amyloliquefaciens* DSM7, *B. laterosporus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. coagulans*, *B. Brevis*, *B. sphaericus* ATCC 14577 (Yilmaz, Soran, & Beyatli, Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp., 2005), *B. cerus*, *B. circulans*, *B. firmus* G2, *B. sphaericus* X3, *B. megaterius* Y6 (Katircioglu, Aslim, Yöksek, Mercan, & Beyatli, 2003), *B. thuringiensis* (Porwal, y otros, 2008), se han caracterizado, entre otros, por sintetizar diferentes homo y copolímeros, por ejemplo el P(3HB), P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx), P(3HB-co-4HBco-3HHx) y el P(3HB-co-6HHx-co-3HHx).

Diferentes investigadores han demostrado que varios *Bacillos spp.* sintetizan copolímeros cuando se les alimenta con varios sustratos. Por ejemplo, para *B. cerus* UW85, se registró la producción de un termopolímero de 3HB, 3HV y 6HHx con ϵ -caprolactona como única fuente de carbono en un medio de sales minerales sin glucosa.

Sin embargo, se observó que la adición de glucosa junto con la ϵ -caprolactona parecía suprimir la síntesis de copolímeros y el resultado fue la producción de PHB, (Singh, K.S. Patel, & C. Kalia, 2009).

Estudios más recientes han producido información más interesante. Cuando se cultiva *B.cerus* SVP en fuentes de carbono estructuralmente no relacionadas, como fructuosa, sacarosa y gluconato, el resultado es la síntesis de 4HB con los dos primeros sustratos, y 4HB y 3HV con gluconato en el medio, (Valappil, Peiris, D., Langley, G., Herniman, J., Boccaccini, A., Bucke, C., & Roy, 2007). Aunque se sabe que la limitación de oxígeno, nitrógeno y fósforo en las condiciones de cultivo influye en la producción de PHB, los medios limitantes de potasio dieron como resultado la producción de un copolímero que contienen monómeros 3HB y 3HV en contraste con la producción de solo PHB bajo la limitación de azufre, fósforo o nitrógeno, (Valappil, Rai, Bucke, & Roy, 2008).

B. megaterius produjo PHB en melaza de caña (Gouda, Swellam, & Omar, 2001), *B. cerus* CFR06 en almidón (Halami, 2008) y otras *Bacillus spp.* también podrían producir PHB a partir de aguas residuales de la industria de alimentos, de desechos de soja y de desechos de malta de la fabricación de cerveza y de la lechada de cáscara de guisante (Kumar, Singh, Purohit, & V.C., 2009).

1.9 Producción y extracción de PHA.

Los estudios publicados sobre la producción de PHAs y en general sobre la producción de bioplásticos coinciden en destacar que la principal desventaja para el desarrollo de estos productos, es la diferencia en su costo de producción en relación con los plásticos derivados del petróleo.

Producir un kilogramo de bioplástico (PHA) cuesta aproximadamente 10 USD, en comparación con el costo de los plásticos convencionales, que está alrededor de 1 USD por kilogramo de polímero producido, (Bello, Otero, Ortega, & Carrera, 2009, pág. 4). En estos estudios la fuente de carbono usada para hacer crecer los microorganismos productores de PHA es glucosa, sacarosa y ácidos orgánicos de cadena corta. Estos sustratos son caros, en especial si se quieren obtener copolímeros, (Cerrone, 2011).

Para lograr que el proceso de producción sea económicamente competitivo los trabajos de investigación se han dirigido hacia las siguientes estrategias, (González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013):

- 1) Optimizar procesos de fermentación, obteniendo cultivos con el más alto contenido de polímero.
- 2) Mejorar procesos de extracción y purificación del PHA, para tener mayores eficiencias de recuperación.
- 3) Uso y fuentes de carbono económicas, renovables y altamente disponibles.
- 4) Búsqueda de nuevos microorganismos silvestres o genéticamente modificados, que sean capaces de sintetizar copolímeros con estructura y peso molecular deseable.
- 5) Obtener PHA con propiedades físicas nuevas o mejoradas que permitan ampliar su uso en aplicaciones de alto valor agregado.

Entre las fuentes de carbono, renovables, disponibles y con gran potencial económico, se puede citar como ejemplo, el glicerol derivado de la producción de biodiesel, los hidrolizados de residuos celulósicos y los diversos efluentes industriales. En México, sería interesante utilizar como fuente de carbono residuos de la industria tequilera y cervecera, subproductos y residuos del cultivo de maíz y de los procesos industriales basados en él, (González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013).

Los ejemplos de sustratos van desde lodos activos utilizados en alternancia de condiciones anaeróbica-aeróbica (Liu, y otros, 2000), a residuos generados en la refinación del aceite de palma previa digestión anaeróbica de los productos (Hassan, y otros, 1996), aceites vegetales de diferente naturaleza (Thakor, Trivedi, & Patel, 2005), alcanos, en especial metano, si procede de la fermentación de otros sustratos (Wendlandt, Jechorek, Helm, & Stottmeister, 2001; Steinbüchel, 2003; Helm, Wendlandt, Jechorek, & Stottmeister, 2008), aguas residuales procedentes de la producción de almidón (Yu, 2001), aguas residuales procedentes de la industria del papel (Bengtsson, Werker, Christensson, & Welandar, 2008), hidrolizados de biomasa forestal (Keenan, Nakas, & Tanenbaum, 2006) y residuos agrícolas con un alto contenido de xilosa (Tsuge, 2002).

Otro parámetro importante en el intento de hacer rentable la producción de PHAs en el sistema de fermentación, es método de extracción y purificación de los polihidroxicanoatos sintetizados y almacenados dentro de la célula.

La lisis celular y la extracción de los gránulos de PHA es el paso principal en el proceso de separación de los PHAs del resto de la masa celular o NPCM (non-PHA cell mass).

Un método de extracción ideal debería conducir a un nivel alto de pureza de los PHAs y un costo de producción bajo. Una mejora al proceso, implica agregar un paso de pretratamiento al paso principal de extracción, además, se puede agregar también, un paso de purificación para obtener mayor pureza.

El método de digestión es el más usado para recuperar PHA por que puede reducir el uso de grandes cantidades de solvente, un ejemplo de este método es el uso de hipoclorito de sodio para la digestión diferencial, o selectiva, del material celular que no es PHA, (Salmati, Salim, & Olsson, 2009). Entre los investigadores que proponen este método se encuentran Rawte y Mavinkurve (2002), es decir proponen una digestión con hipoclorito de sodio, seguida de una extracción con agua, cloroformo y etanol.

Kim et al., 2003, propone una digestión usando dodecil sulfato de sodio, SDS, y la extracción de los PHAs la lleva a cabo con agua. Por otra parte, Jaruwat Marudkla et al, 2018, usa tanto SDS como el hipoclorito de sodio para la digestión, siendo ésta tan eficiente, que una vez retirada la biomasa precipitada, los PHAs que quedan en la fase líquida, están listos para ser separados, evaporando el líquido.

1.10 Análisis por infrarrojo de los PHA.

Los polihidroxicanoato, PHAs, son polímeros de ácidos hidroxicanoicos. La polimerización de los ácidos hidroxicanoicos, por acción de enzimas intracelulares, tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxicanoico), con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster por lo que también se le conoce con el nombre de biopolíesteres, Figura 8, (González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013).

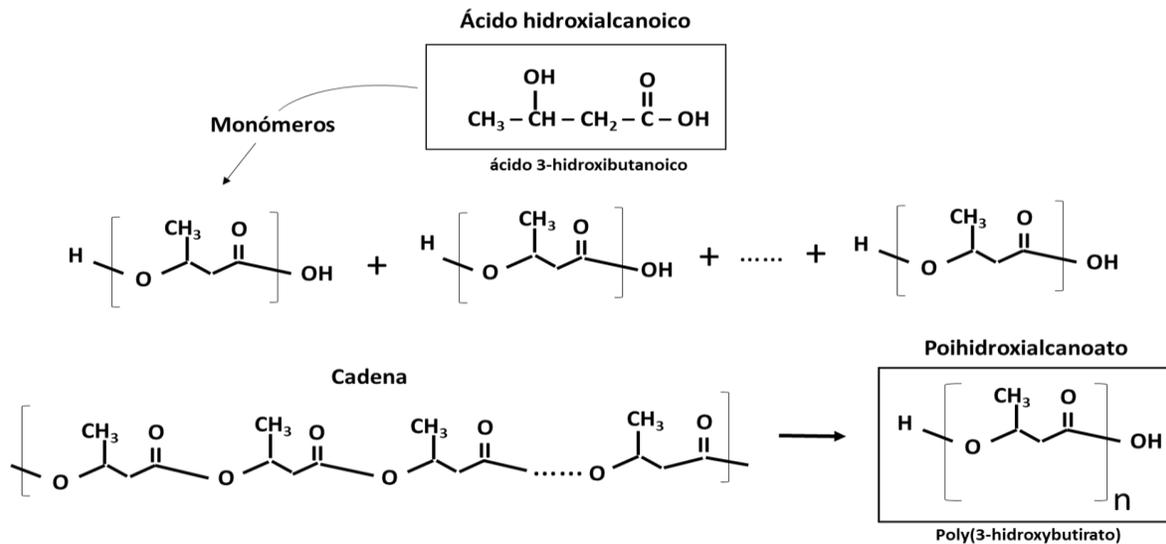


Figura 8. Síntesis del poly(3-hidroxybutirato) mediante la polimerización del ácido 3-hidroxibutanoico.

La detección de PHA intracelular se puede realizar mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM), ya que todas las moléculas pueden manifestar una serie de bandas de absorción que corresponden, cada una, con un movimiento de vibración de un enlace específico dentro de la molécula. En las muestras biológicas el tener información acerca de los constituyentes, permite identificar los enlaces principales que conducen a la caracterización de un compuesto, (Barraza, y otros, 2013).

En el caso específico de los PHAs, la cadena de biopolímero exhibe a los grupos, carbonilo (- C = O), metilo (- CH₃), y metileno (- CH₂ -), por lo que las bandas de absorción que se buscan en un espectro de estos compuestos, en el IR medio, son la debidas a la absorción de los enlaces, C = O para ácidos carboxílicos, C - H para alcanos, así como para el enlace C - O propio de los ésteres, formado por la unión de dos monómeros, en la cadena de PHAs. Fig. 8.

Las frecuencias aproximadas (o los números de onda) a las que vibran estos grupos funcionales en el infrarrojo, se pueden calcular a partir de las masas de los átomos y de las constantes de fuerza del enlace que los une. Estas frecuencias de grupo no son invariables, debido a las interacciones con otras frecuencias asociadas a uno o a los dos átomos enlazados.

Sin embargo, los efectos de estas interacciones suelen ser pequeños, por lo que, se puede asignar un intervalo de frecuencias dentro del cual es muy probable encontrar la banda de absorción (pico de absorción) para un grupo funcional específico. Los intervalos de frecuencia en la que vibran los grupos mencionados, reportado por la literatura son: 1690 cm^{-1} - 1760 cm^{-1} para el grupo $\text{C} = \text{O}$; 1050 cm^{-1} - 1300 cm^{-1} para $\text{C} - \text{O}$; en tanto que para el grupo $\text{C} - \text{H}$ se reportan dos intervalos, $2850\text{ cm}^{-1} - 2970\text{ cm}^{-1}$ y $1340\text{ cm}^{-1} - 1470\text{ cm}^{-1}$, (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

Todos los trabajos que usan espectroscopia de infrarrojo para detectar PHA coinciden en señalar que los espectros de PHA exhiben una banda (o pico) dentro de un intervalo que va de 1690 cm^{-1} a 1760 cm^{-1} correspondiente al enlace éster carbonilo, el cual es característico de los PHA, (Hong, Sun, Tian, Q., & Huang, 1999; González García, Meza Contreras, González Reynoso, & Córdova López, 2013; López J. A., 2011).

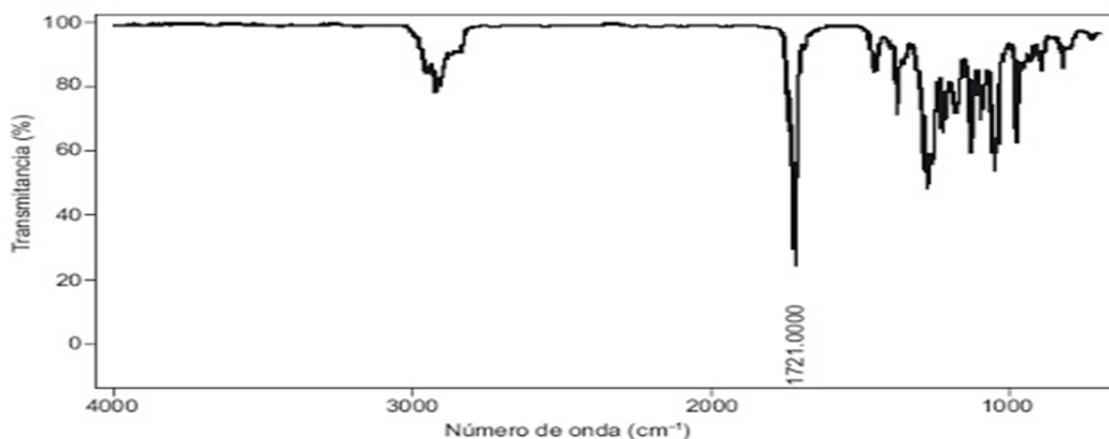


Figura 9. Espectro de un estándar de P3HB. Se aprecia la banda (pico) a 1721 cm^{-1} , correspondiente al enlace éster carbonilo característico de los PHA, (González García, et al. 2013).

Otras bandas características de los PHA son: la que corresponde a la tensión asimétrica del metileno cercana a los 2925 cm^{-1} (Hong, Sun, Tian, Q., & Huang, 1999; Barbosa, Espinoza Hernandez, Malagón Romero, & Moreno Sarmiento, 2005); las que se encuentran entre los 1000 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} , que corresponden a la vibración del enlace $\text{C}-\text{O}$ del grupo éster y las bandas a 3444 cm^{-1} , las cuales son originadas por los grupos OH terminales, o porque la muestra contiene agua remanente o absorbida (López J. A., 2011). Las bandas inherentes (Barbosa, Espinoza Hernandez, Malagón Romero, & Moreno Sarmiento, 2005).

Capítulo II

2. Metodología

2.1 Microorganismos y conservación

Se utilizaron cepas bacterianas denominadas P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, M1 y M2 provenientes de la colección del Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón (ITSPR) fueron utilizadas para determinar sus capacidades para acumular PHAs como polímero de almacenamiento celular. Las cepas se propagaron en medio LB (Luria Bertani) a 37°C, durante 18 horas y 120 rpm. Las cepas fueron conservadas en glicerol y almacenadas a - 20°C.

2.2 Detección de cepas bacterianas productoras de PHA.

Para el ensayo del crecimiento de cepas productoras de PHA se utilizaron 5 medios de cultivo en placa (Ver anexo 5). Para la detección cualitativa del crecimiento de las cepas se utilizó el colorante lipofílico Nilo Azul A, como método de tinción sensible para detectar ácido hidroxialcanoico en colonias bacterianas en crecimiento. El colorante se disolvió en DMSO y fue directamente adicionado al medio fundido previo a la inoculación a una concentración final en el medio de 0.5 µg/ml. Las cepas fueron "plaqueadas", crecidas por 5 días a 30°C y su crecimiento y fluorescencia fue visualizada bajo Lámpara UV ($\lambda_{excit.}$ 312 nm).

Las cepas que mostraron un halo fluorescente como resultado de la posible combinación del colorante con material lipofílico, y la naturaleza de las sustancias en formación, fueron seleccionadas como cepas positivas para la producción de PHA.

2.3 Caracterización Bioquímica de las cepas productoras de PHA's.

Con la finalidad de caracterizar Bioquímicamente las cepas productoras de PHA's, se realizaron las siguientes pruebas Bioquímicas:

2.3.1 Prueba de catalasa

La prueba de catalasa se realizó para verificar la capacidad de la bacteria de catabolizar el peróxido de hidrogeno. La prueba se realizó a partir de un cultivo joven de la bacteria en BHI sólido.

Se colocó una asada de bacteria en un portaobjetos limpio. Posteriormente se le adicionó unas de peróxido de hidrogeno al 30%.

2.3.2 Prueba del Citrato

La prueba del Citrato se realizó a partir de un cultivo joven de 24 horas crecido en medio solido BHI infusión cerebro corazón. La técnica consistió en el crecimiento de la bacteria en agar citrato de Simmons.

La composición del medio contiene como fuente de carbono al citrato de sodio y algunas sales de amonio como fuente de nitrógeno.

Se distribuyó 5 mL de medio en tubos de ensayo con tapa limpios y desinfectados. Los tubos con medio se esterilizaron en una autoclave durante 20 minutos a 121.5 °C y 15 lb. Ya estéril se dejó polimerizar el medio, teniendo los tubos inclinados a 30° desde su posición horizontal. Después se procedió con la siembra del microorganismo en el pico de flauta del medio, con la ayuda de un asa bacteriológica y se dejó en incubación a 37 °C durante 24 horas.

2.3.3 Prueba hidrólisis de Almidón

Esta prueba se realizó a partir de un cultivo joven de 24 horas crecido en medio BHI infusión cerebro corazón. El ensayo consistió en el desarrollo de la bacteria en medio almidón líquido y analizar su capacidad enzimática. Se adicionó almidón al 0.2% en medio basal. Se colocó 5 mL de medio en tubos de 16x125 cm con taparrosca y se esterilizó a 121.5°C y 15 lb durante 15 minutos. El medio almidón se inoculó con la ayuda de un asa bacteriológica, a partir de un cultivo puro de 24 horas. se incubo a 35°C durante 24 horas. Para realizar la interpretación de los resultados, se añadieron unas gotas de una solución de yodo.

2.3.4 Prueba de la Ureasa

Esta prueba determina la capacidad de un microorganismo de producir 2 moléculas de amoníaco a partir de la hidrólisis de la urea, utilizando la enzima ureasa. La prueba consistió en el crecimiento de la bacteria en Caldo de urea Stuart. Se distribuyó el medio, 2 ml en tubos de 16 x 125 y rápidamente sin esterilizar el medio y con la ayuda de una asa bacteriológica se cultivó la bacteria en el caldo Stuart, a partir de una placa de cultivo joven de la bacteria, posteriormente se selló el tubo y se puso a incubar durante 24 horas a 37°C.

2.3.5 Prueba de la hidrólisis de caseína

El análisis se realizó a partir de un cultivo joven de 24 horas, cultivado en placa, en medio de cultivo infusión cerebro corazón. Posteriormente, con la ayuda de una asa bacteriológica se cultivó en medio agar Leche previamente esterilizado a 15 lb y 121.5°C durante, 15 minutos, y se sembró de una sola estriada en la parte central del agar y se puso a incubar durante 24 horas a 37°C.

2.3.6 Prueba de Fermentación de azúcares

Esta prueba se realizó para determinar la capacidad de fermentación de azúcares que tiene el microorganismo; se pesaron cantidades de medio basal con rojo fenol, añadiendo 10 gramos del hidrato de carbono específico que se desea analizar por cada litro de medio. Se esterilizó a 121°C y 15 lb durante 3 minutos, el medio se fracciono en 8 ml por tubo y se dejó enfriar en posición vertical. La inoculación se realizó a partir de un cultivo puro y joven de 24 horas en medio BHI infusión cerebro corazón. Se incubó durante 24 horas a 35 °C.

2.3.7 Tinción de Gram

La tinción de Gram se realizó de acuerdo a Vázquez et al, 2010. Para ello, se tomó una asada del cultivo microbiano y se depositó sobre el portaobjetos, se adiciono una gota de agua, para extender de forma uniforme. La muestra se fijó mediante calor, se adicionó una gota de cristal violeta durante un minuto, se lavó el colorante un minuto y se agregó una gota de Yodo-Lugol, se dejó 1 min a temperatura ambiente y se lavó la muestra con etanol-acetona (1:1). Seguidamente, se adicionó 1 gota de safranina y se lavó con agua nuevamente, la muestra se dejó secar y se observó en el microscopio.

2.4 Identificación Molecular de las bacterias productoras de PHA

Las bacterias seleccionadas en las pruebas de tinción, fueron cultivadas durante 18 h en medio líquido Luria Bertani (LB), a 120 rpm y 37 °C. Los cultivos fueron centrifugados a 4.000 rpm por 3 min, para obtener precipitados celulares y dar inicio a la extracción de ADN. Al precipitado celular se le adicionó 200 μ L de buffer de lisis (40 mM de Tris-HCl pH 7.8, 20 mM de acetato de sodio, 1mM de EDTA y 1% de SDS). Seguidamente, se homogenizó y adicionó 66 μ L de NaCl 5M, se incubó 10 min, a 65°C, la muestra se homogenizó nuevamente y se centrifugó a 12000 rpm por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se adicionó 200 μ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). La muestra se homogenizó y centrifugo a 12000 rpm durante 10 min.

Se recuperó el sobrenadante y se adicionó dos volúmenes de etanol frio y se incubó a -20°C durante 30 minutos. Seguidamente la muestra se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min.

La pastilla obtenida se lavó con 1000 μ L de etanol al 70%. Y se centrifugo a 7500 rpm durante 5 min. Finalmente, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 μ L de buffer TE (Tris 10 mM – EDTA 1 mM). El ADN genómico se almacenó a - 20°C, hasta su uso.

2.4.1 Electroforesis de ADN genómico bacteriano

La integridad del ADN obtenido fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 1X y 1 μ L de SYBR green (10 mg mL⁻¹). En el primer pozo de cada fila se colocaron 5 μ l de marcador 1 kB (MT) más 1 μ l de buffer de carga 6 x (Azul de Xilencianol Sigma Aldrich), mientras que por cada muestra se colocaron 3 μ l de ADN (ADN genómico o Fragmentos de ADN amplificados) y 1 μ l de buffer de carga 6 x. La electroforesis se corrió a 100 mV durante 30 min; al término el gel fue visualizado en un fotodocumentador de luz UV, las imágenes fueron obtenidas mediante la cámara del fotodocumentador.

2.4.2 Amplificación por PCR del ADN 16S ribosomal

Los aislamientos bacterianos fueron identificados a partir de secuenciación de regiones 16S del ADNr. Para esto, se amplificaron mediante PCR cerca de 1492 pb de este gen, con los cebadores 27F (Forward): AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG y 1492 R (Reverso): ACCTTGTTACGACTT (Lane, 1991).

Las reacciones para la PCR contenían 12.5 μ l de Mastermix Master mixTAGDNTPS- *MgCl*₂, 1 μ l de muestra de ADN extraído, 1 μ l de cada primer y 9.5 μ l de agua ultrapura a cada tubo de PCR nuevo estéril obteniendo un volumen final de 25 μ l por cada muestra a amplificar. El programa utilizado fue 95°C, 5 min, 95°C 30 seg, 60°C 30 seg, 72°C 2 min (35 ciclos) y a 72°C, 10 min. Los amplicones generados en la reacción de PCR, fueron purificados y enviados a secuenciar a LANGEBIO.

2.4.3 Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas con cada cebador, fueron editadas, construyéndose secuencias consenso y confirmándose su identidad por comparación con las bases de datos moleculares, mediante BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>).

En adición, se obtuvieron del GenBank secuencias 16S del ADNr de bacterias relacionadas taxonómicamente con los microorganismos putativamente identificados mediante el BLASTN, realizándose un alineamiento con Clustal W (Hall, 1999) y construyéndose árboles filogenéticos por los métodos de Neighbor-Joining (NJ) y Máxima verosimilitud (ML), con 1000 iteraciones para determinar los valores de Bootstrap. (Tamura, y otros, 2011).

2.5 Producción y extracción de los PHA.

Para la producción y extracción de PHA's, se inocularon 500 mL de medio 2 con cada una de las cepas seleccionadas previamente. En el presente trabajo, el método de extracción usado para recuperar de los PHAs, integró una adaptación del pretratamiento y digestión propuestos por Jaruwat Marudkla et al., 2018, y la extracción por solventes propuesto por Salmiati et al., 2009. Los medios inoculados se incubaron a 37°C, 120 rpm, durante 96 horas. La biomasa fue centrifugada, con la de obtener el pellet celular. La muestra fue pesada para obtener el peso fresco. Seguidamente, las muestras fueron sometidas a un choque térmico a 100°C durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se incubaron a 55°C durante 30 min, seguido de una incubación a 4°C, 30 min y -20°C durante 48 horas. Posteriormente se agregó a cada muestra 5 mL de SDS al 1%, se agito a 150 rpm, para luego incubar a 55°C durante 30 min. Pasado este tiempo, a cada muestra se le adicionó 5 mL de hipoclorito al 7% y 5 mL de cloroformo, se agito vigorosamente y se dejó en el orbitador a 200 rpm, 150 min a una temperatura de 37°C.

Se agregó, 5 mL de metanol – cloroformo (9:1). Se extrajo el precipitado (la fase del fondo) y se colocó en un tubo nuevo, la muestra se dejó secar a 37°C, hasta evaporar el solvente. Seguidamente se pesó el PHA de cada muestra.

2.6 Caracterización estructural de los PHA's

Para la prueba de Infrarrojo Espectral con Transformada de Fourier (IR-FT), se prepararon pastillas transparentes por medio de prensado, las cuales están compuestas por bromuro de potasio (secado a 100°C) y PHA altamente macerado. La pastilla se colocó en el compartimiento del equipo (Thermo Fisher Scientific, Nicolet 200. USA) y se procedió a hacer un barrido en toda la franja de infrarrojo. Finalmente se obtuvo el espectro para su posterior análisis.

Capítulo III

3. Resultados y Discusión

3.1 Selección de cepa bacterianas productoras de PHA's

En este estudio se analizó el crecimiento y la capacidad de las cepas bacterianas: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, M1 y M2 de emitir fluorescencia bajo UV, Las cepas fueron cultivadas durante 72 horas, en presencia del colorante Nilo Azul A. Del total de cepas analizadas a exposición UV a una longitud de 340 nm. Las cepas P1, P3, P4-P9, K1-4 y K6-7, presentaron menor crecimiento y fluorescencia, respecto a las cepas M1, M2, P2 y K5, las cuales presentaron éstos atributos en mayor proporción (Figura 10). Las cepas bacterianas P1-9 provienen de un residuo industria pelambre, las cepas K1-7, provienen una planta tratadora de aguas residuales urbanas (Fermentador anaerobio) y las cepas M1 y M2, provienen de un biofertilizante a base de ortiga. De acuerdo al resultado de fluorescencia, las cepas que presentaron mayor producción de polihidroxialcanoatos fueron las cepas M1, M2, P2 y K5.

Esta diferencia de producción de fluorescencia, puede deberse a que la tasa de producción de polihidroxicanoatos depende del género bacteriano, además del nutriente, la velocidad de crecimiento y el estrés ambiental (Bello, 2007).

En el 2010, Wagas et al., realizaron un escrutinio de cepas productoras de polihidroxicanoatos, para ello seleccionaron 20 bacterias, de las cuales al ser analizadas el resultado mostró que solo 14 cepas mostraron fluorescencia en presencia de azul Nilo.

En el trabajo realizado por Sánchez et al., 2010, aislaron 248 bacterias a partir de suelos contaminados de desecho de Fique. Los cuales fueron agrupados en siete morfotipos: F1) colonias sin borde definido traslúcidas, fuertemente adheridas al agar, F2) colonias con aspecto rizoide de color blanco, F3) colonias puntiformes traslúcidas, F4) colonias redondas mucosas de color crema brillante, F5) colonias puntiformes de color crema, F6) colonias redondas convexas de color blanco y, F7) colonias redondas de color crema y opacas.

En este estudio, se encontró que las cepas con los morfotipos F1, F2, F3 y F4, dieron emisión de fluorescencia en las pruebas con el rojo de Nilo y se consideraron potencialmente productores de PHAs.

Este resultado se confirmó por microscopía de fluorescencia de 450 nm, empleando azul de Nilo para la tinción. Las cepas F1 y F2 procedían de suelo con bagazo en fermentación, F3 y F4 fueron obtenidas de suelo contaminado con jugo de fique.

Por su parte Almagro, 2020, aisló cinco bacterias productoras de polihidroxicanoatos a partir de aguas residuales provenientes de Industrias lácteas. Se identificó cinco 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 presentaron inclusiones intracelulares sugestivas gránulos de PHA's.

Por otro lado, Martínez en el 2020, aislaron distintos grupos microbianos a partir de compostaje de residuos vegetales, teniendo una colección total de 1475 cepas, de las cuales 61 fueron identificadas como pertenecientes al género *Pseudomonas*.

Las etapas en las que se aislaron los microorganismos se corresponden con los distintos rangos de temperatura observados, desde la constitución de las pilas con la mezcla de materiales a temperatura ambiente (Materia Prima), el ascenso térmico (Mesófila), alcanzando temperaturas superiores a 45 °C que permiten la higienización del material (Termófila), el descenso de la temperatura, debido al agotamiento de los nutrientes, hasta alcanzar nuevamente un rango ambiental (Enfriamiento) y el mantenimiento previo a la salida del compost final (Maduración). Para llevar a cabo un cribado inicial de las 61 cepas de la colección se utilizó el medio suplementado con Rojo Nilo y glucosa. Del total de 61 bacterias analizadas, sólo 16 cepas mostraron una fluorescencia más notable al ser sometidas a la radiación ultravioleta aplicada con el transiluminador.

En este sentido, es importante indicar que existen diversos métodos para identificar organismos productores de PHAs, (Spiekermann, Rehem, Kalscheuer, Baumeister, & Steinbuchel, 1999).

En la mayoría se utilizan colorantes lipofílicos como el negro Sudán, el azul de Nilo y rojo de Nilo, que se unen al polímero emitiendo fluorescencia, (Solaiman, Ashby, & Flogia, 2000). Aunque estas metodologías son muy sensibles, no son completamente efectivas para la selección, porque los colorantes pueden formar complejos fluorescentes con compuestos afines a los biopolímeros, como lo son las inclusiones lipídicas.

Además, la producción de PHAs depende de las condiciones nutricionales del medio de crecimiento, especialmente de las relaciones C/N y C/P. Otro factor que incide, es la naturaleza del sustrato, a tal punto que, aunque los genes del operón bacteriano existan, no logran expresarse, dando lugar a falsos negativos (Solaiman, Ashby, & Flogia, 2000; Shamala, Chandrashekar, Viiayendra, & Kshama, 1999).

3.2 Caracterización Bioquímica de las cepas productoras de PHA's

En la actualidad la identificación de los microorganismos se realiza por varios métodos. Existen métodos clásicos que utilizan como criterios de diferenciación caracteres fenotípicos como los morfológicos y fisiológicos que se describen en el Manual de Clasificación de Bergey [Claus y Berkeley, 1986].

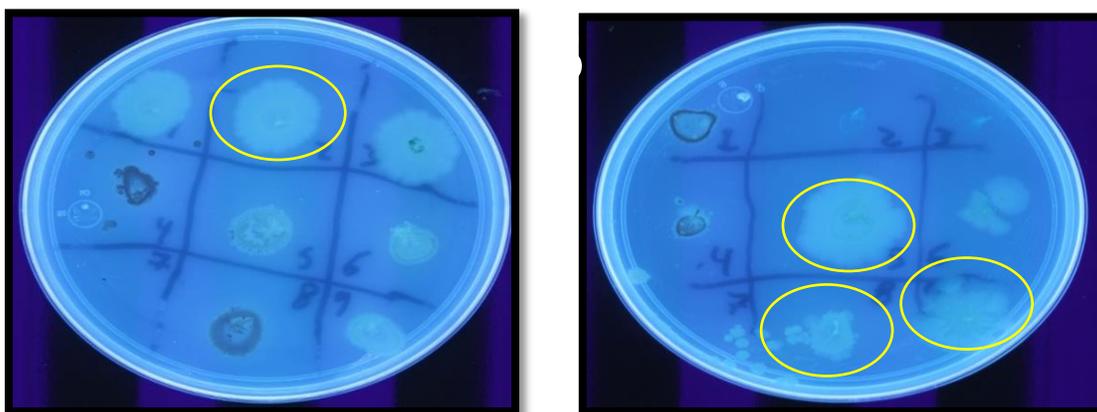


Figura 10. Detección de polihidroxicarboxilatos en medio PDA conteniendo azul Nilo bajo luz UV después de 72 horas de incubación. A) Cepas bacterianas P1-9, B) Cepas bacterianas K1-K6 y M1-M2. En amarillo se marcan las cepas seleccionadas.

De acuerdo con las pruebas bioquímicas realizadas, los aislamientos de M1, M2, P2, K5 presentaron tinción de Gram positiva, endospora de posición central y forma elipsoidal, crecimiento aerobio, utilización de citratos, hidrólisis del almidón positiva. En la tabla 1, se resumen los resultados de las pruebas bioquímicas: presenta el resumen general de los resultados obtenidos para cada prueba bioquímica representando con un signo (+), resultados positivos, un signo (-) para resultados negativos y un signo (+, -) para resultados donde el resultado es positivo, después de un lapso prolongado para el tiempo de prueba.

Tabla 1. Resumen general de resultados obtenidos para cada prueba bioquímica de las cepas.

PRUEBA / CEPA	M1	M2	P2	K5
Catalasa	+	+	+	+
Hidrólisis de caseína	+	+	+	+
Fermentación de sacarosa	+	+	+	+
Fermentación de glucosa	+	+	+	+
Fermentación de fructosa	+	+	+	+
Fermentación de maltosa	+, -	+, -	+, -	+
Urea	-	-	-	-
Citratos	+	+	+	+
Amilasa	-	-	-	-
Rojo De Metilo	-	-	-	-

Las pruebas bioquímicas son herramientas que permiten la caracterización de las bacterias. Soto en el 2018, a través pruebas bioquímicas de catalasa y crecimiento en PGA confirmaron características bacterianas metabólicas apartadas del grupo *Rhizobium*. Estas pruebas le permitieron, identificar ocho cepas bacterianas de tipo ácido productoras. Por su parte, Vivas et al., en el 2008, usaron pruebas bioquímicas para la caracterización de cepas degradadoras de parafina. Por otro lado, Cruz en 2015, caracterizó cepas microbianas provenientes de recursos y productos pesqueros.

Es importante destacar que existen en el mercado numerosos sistemas o equipos multipruebas con el fin de conseguir una mayor rapidez en la identificación de algunas bacterias. Todos exigen unas condiciones muy precisas de concentración del inóculo, de inoculación, de incubación y de lectura, que si no se observan pueden dar lugar a importantes errores, por lo que es fundamental la experiencia del microbiólogo o laboratorista, en la elección de una prueba o una batería de pruebas de forma secuencial en función de la fiabilidad de las mismas, del género o de la especie bacteriana que se pretende identificar, del origen del aislado bacteriano, así como del coste de las mismas.

Los laboratorios deben elaborar y realizar un proceso de identificación normalizado en su actividad diaria, que utilice de forma secuencial o simultánea un conjunto de pruebas cuyo propósito final sea la identificación del microorganismo a nivel de género y especie (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011).

3.3 Caracterización Molecular de las cepas productoras de PHA's

La aplicación de técnicas moleculares permite establecer las relaciones filogenéticas entre los organismos, la cual tiene una gran repercusión sobre la taxonomía bacteriana, la cual permite la clasificación e identificación precisa de los microorganismos (Byung-Hyuk, Rishiram, Dae-Hyun, & Hee-Mock, 2014)

Para la caracterización molecular de las bacterias M1, M2, B2 y K5, se extrajo el ADN genómico de las cuatro cepas, se realizó la amplificación por PCR del gen 16sARNr con los oligonucleótidos universales 27F y 1492R, los amplicones obtenidos fueron verificados en un gel de agarosa al 1%. En las figuras 11 y 12 se muestran el ADN genómico y los amplicones generados por PCR, respectivamente. Los amplicones fueron purificados y enviados a secuenciar a LANGEBIO.

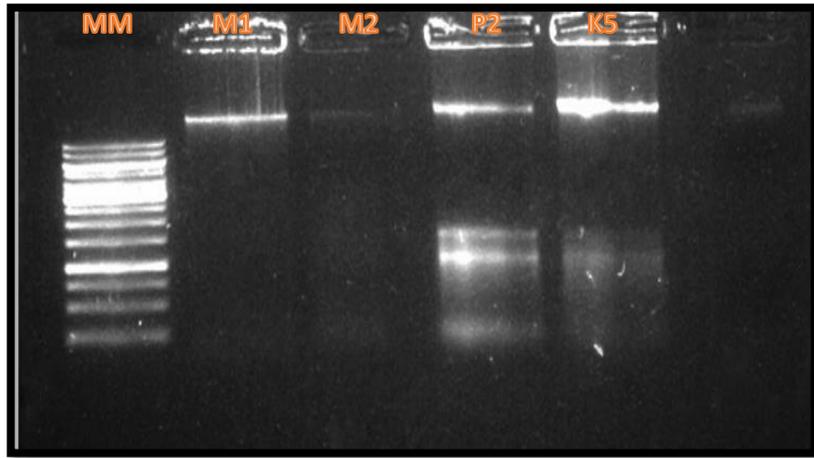


Figura 11. Extracción de ADN genómico de cuatro cepas bacterianas. MM: marcador molecular, cepas M1, M2, P2 y K5.

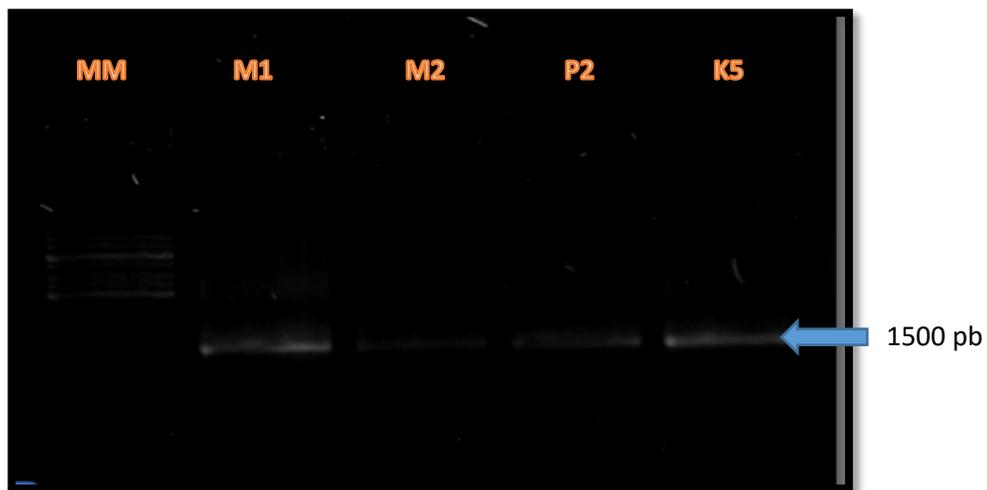


Figura 12. Amplicones productos de la PCR de cada una de las cuatro cepas. MM: marcador molecular, cepas M1, M2, P2 y K5.

Una amplia variedad de genes, han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en las distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa. Sin embargo, en otras circunstancias, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite realizar con el ARNr 16S una identificación a nivel de especie o de géneros. En estos casos, podemos recurrir a otros genes dianas para realizar asignación de especie.

Los genes descritos con mayor frecuencia con utilidad en taxonomía bacteriana y/o filogenia son los que se desarrollan a continuación del ARNr 16S (Bou, Fernández, García, Sáez, & Valdezate, 2011).

La identificación molecular por ARNr 16S, originalmente propuesta por Pace et al., 1986, ha sido utilizado como una opción para la clasificación de bacterias. La idea fue rápidamente adoptada por la comunidad científica y la secuencia del ARNr 16S se ha utilizado para conformar bases de datos especializadas. Lo anterior ha permitido que las secuencias del ARNr 16S sean utilizadas como una herramienta importante en la reconstrucción de relaciones filogenéticas. Además, el uso de secuencias del ARNr 16S ha facilitado el establecimiento del proyecto árbol de la vida universal (All-Species Living Tree Project), el cual se ha constituido como una referencia de relación de procariotas fácilmente organizada en bases de datos dinámicas que compilan y curan los datos de todas las secuencias accesibles del gen ARNr 16S (Yarza, y otros, 2010). Pese a algunas controversias y dificultades técnicas, el ARNr 16S se sigue utilizando como un excelente marcador molecular y se han planteado nuevas estrategias de estudio, aprovechando las bondades de las nuevas técnicas genómicas (Savolainen, Cowan, Vogler, Roderick, & Lane, 2005) (Tanabe & Toju, 2013). Debido a la rápida generación de información genómica y a la caracterización de las secuencias del ARNr 16S, en los últimos años se ha observado un cambio significativo en los métodos para la identificación de especies bacterianas y una aceleración en la asignación de especies.

3.4 Análisis Filogenético de las cepas productoras de PHA's

Los cromatogramas obtenidos de la secuenciación de genes 16s RNAr de las cuatro cepas fueron depurados y ensamblados. Posteriormente fueron comparados en la base de datos del GEN BANK, mediante el programa Blast 2.2.20 (Basic Local Aligmente Search Tool). Las cepas M1 y M2 obtuvieron una similitud de 99% con *Bacillus amyloliquefasciens*. Mientras que la cepa P5 mostró una similitud con *Bacillus* sp 99% y la cepa K5 mostró una similitud del 97.7% con *Morganela morganii*.

El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas. Su aplicación como cronómetro molecular fue propuesta por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de la década de 1970.

El ribosoma bacteriano (Figura 13), tiene un coeficiente de sedimentación de 70S (expresado en unidades Svedberg), y puede disociarse en dos subunidades, la subunidad grande (50S) y la subunidad pequeña (30S). Cada subunidad es un complejo ribonucleoproteico constituido por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes (numeradas desde S1-S21, donde S procede de small), mientras que la subunidad 50S contiene los ARNr 5S y 23S junto con unas 34 proteínas (L1-L34; L, large).

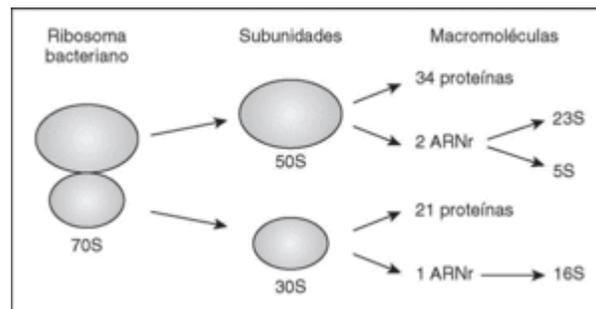


Figura 13. Ribosoma bacteriano. (Rodicio & Mendoza, 2004)

El ARNr 16S, es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 nt, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica.

Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmentos de doble cadena, alternando con regiones de cadena sencilla. Los ARNr SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas. El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos reveló un hecho adicional de gran importancia práctica: la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos.

Por ello, los oligonucleótidos firma, pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo. En el 2016, Ruiz-Sánchez et al., confirmaron la identidad de los aislados de mediante los genes 16S rRNA, gyrA y rpoB por PCR. La amplificación de la región hipervariable de 16S rRNA, genes especie específicos gyrA y rpoB de las siete cepas de *Bacillus* produjeron amplicones de 535 pb, 960-1005 pb y 546 bp, respectivamente, todos los aislados fueron colocados taxonómicamente como *B. subtilis subsp. inaquosorum* y *B. subtilis subsp. subtilis* en árboles filogenéticos.

Tabla 2. Identificación molecular de las 4 cepas bacterianas (M1, M2, P2 y K5).

Aislamiento	16S ARN r	Número de acceso	Porcentaje de Identidad
M1	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	MN087771.1	99.6
M2	<i>Bacillus amyloliquefasciens</i>	MN087771.1	99.6
P2	<i>Bacillus sp</i>	MK163310.2	99.55
K5	<i>Morganella Morganii</i>	CP032295.1	97.17

Información del GENBANK

El árbol filogenético presentó una agrupación similar a la taxonomía establecida en el Genbank. Las cepas M1, M2 y P2, corresponden al género *Bacillus*. En la actualidad se han identificado diversos géneros bacterianos con capacidad de producir polihidroxicanoatos, dentro de estos géneros se encuentra *Bacillus*, lo cual concuerda con las bacterias identificadas en este trabajo (Figura 14). En la tabla 3, se enlista los géneros productores de polihidroxicanoatos. En el caso de la cepa K5, correspondiente a *M. morganii*, es el primer reporte que indica una enterobacteria del género *Morganella*, productora de polihidroxicanoatos.

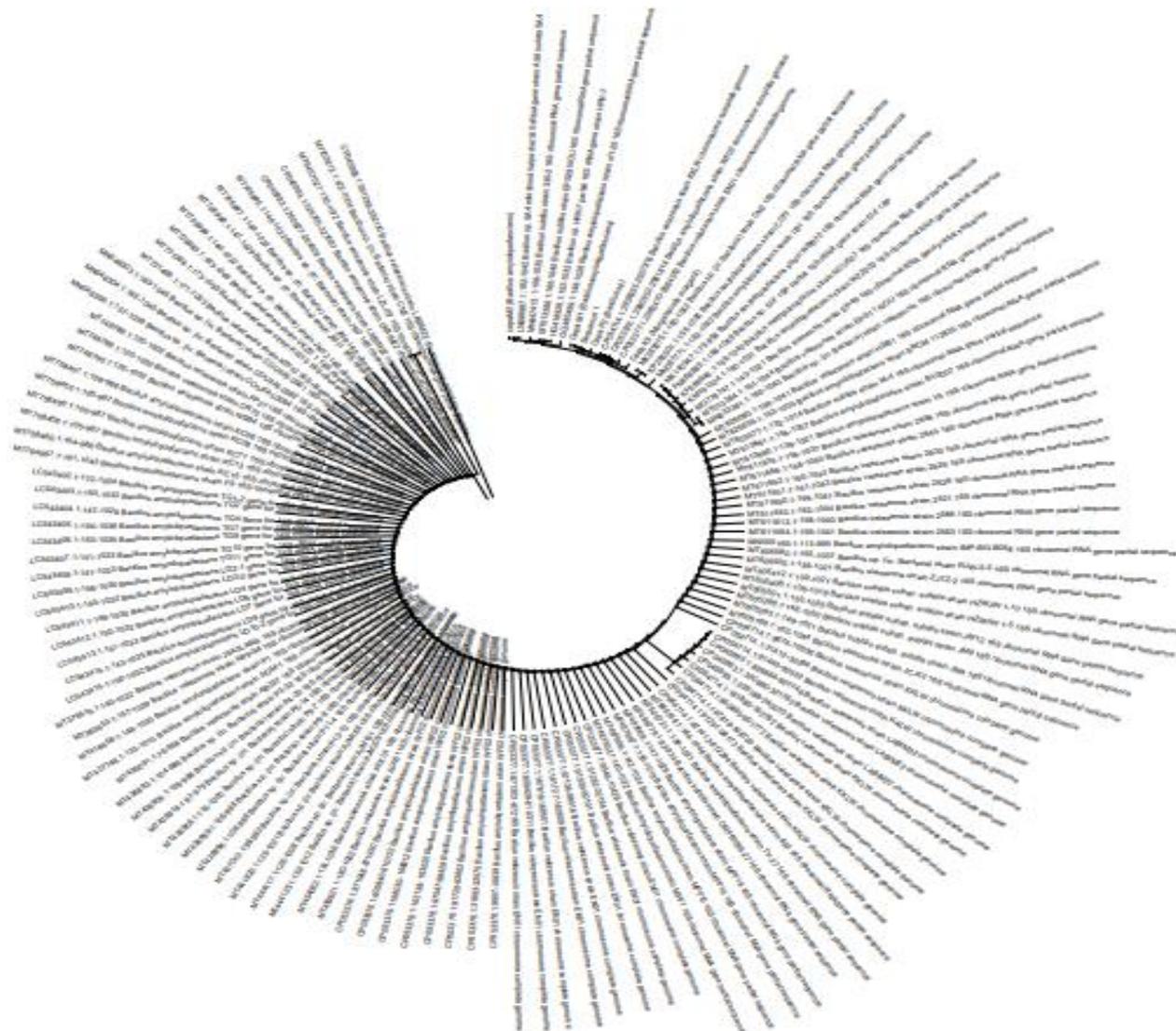


Figura 14. Árbol Filogenético construido mediante el método Neighbor Joining de los aislados bacterianos en el género *Bacillus*. Basado en el gen ADN ribosomal 16S (MEGA 10).

Tabla 3. Géneros microbianos productores de polihidroxicanoatos (*Braunegg, Bona, & Koller, 2004*)

<i>Acinetobacter</i>	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Paracoccus</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pedomicrobium</i>
<i>Aphanothece</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Photobacterium</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Gamphosphaeria</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Asticcaulus</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Ralstonia</i>
<i>Azomonas</i>	<i>Halobacterium</i>	<i>Rhizobium</i>
<i>Azospirillum</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Rhodobacter</i>
<i>Azotobacter</i>	<i>Lampropedia</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Leptothrix</i>	<i>Sphaerotilus</i>
<i>Beggiatoa</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>Spirulina</i>
<i>Beneckea</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Stella</i>
<i>Caryophanon</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Stremtomyces</i>
<i>Caulobacter</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Syntrophomona</i>
<i>Chloroflexus</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>sThiobacillus</i>
<i>Chlorogloea</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Chromatium</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Chromobacterium</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Mycoplana</i>	<i>Thioespedia</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Nitrobacter</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Derxia</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Xanthobacter</i>
	<i>Oceanospirillum</i>	<i>Zoogloea</i>

3.5 Caracterización de PHAs

En la tabla 4 Se presentan los picos característicos de los polihidroxicanoatos (PHA's) obtenidos por las cuatro cepas que se analizaron en el presente estudio.

Los espectros obtenidos en el presente estudio (Fig.15) fueron similares a los reportados en diversos estudios, la banda encontrada a 3450 cm^{-1} pertenece al estiramiento del grupo -OH correspondiente al ácido carboxílico (Baikar, Rane, & Deopurkar, 2017; Zheng, Lu, Tong, Li, & Chen, 2015; Otari & Ghosh, 2009); el polímero caracterizado por los autores derivó de *Bacillus megaterium* VB89 aislado de una planta productora de biogás. Odeniyi y Adeola (2017), presentaron un pico en este mismo número de onda, para PHA purificado de *B. thuringiensis* correspondientes a las vibraciones C-H correspondientes al esqueleto hidrocarbonado del polímero. La gran banda expresada en la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* – 1, se presentó debido a la asociación de moléculas de agua debido a que la muestra no se encontraba completamente deshidratada cuando se realizó el análisis espectral (Mohammed, H.T., Dekebo, & Ray, 2020).

El pico registrado a un número de onda 3260 cm^{-1} fue característico de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* – 2, se presentó debido al estiramiento O-H del grupo hidroxilo presente en la cadena del polímero, este mismo pico fue reportado por Maheshwari *et al.* 2018, ellos aislaron cepas bacterianas secuestradoras de dióxido de carbono, en donde *Bacillus cereus* SS105 mostró ser una cepa acumuladora de PHA cuando se cultivó en presencia de bicarbonato de sodio y melaza como fuente de carbono. Las bandas correspondientes a los números de onda de 2970 , 2920 y 2850 cm^{-1} pertenecen al tramo CH del alcano: $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ (asimétrico de las cadenas monoméricas laterales) y $-\text{CH}_3$ (simétrico, resultado del desorden conformacional durante el proceso de cristalización) respectivamente (Maheshwari, Kumar, Thakur, & Srivastava, 2018; López-Cuellar, Alba-Flores, & Pérez-Guevara, 2011).

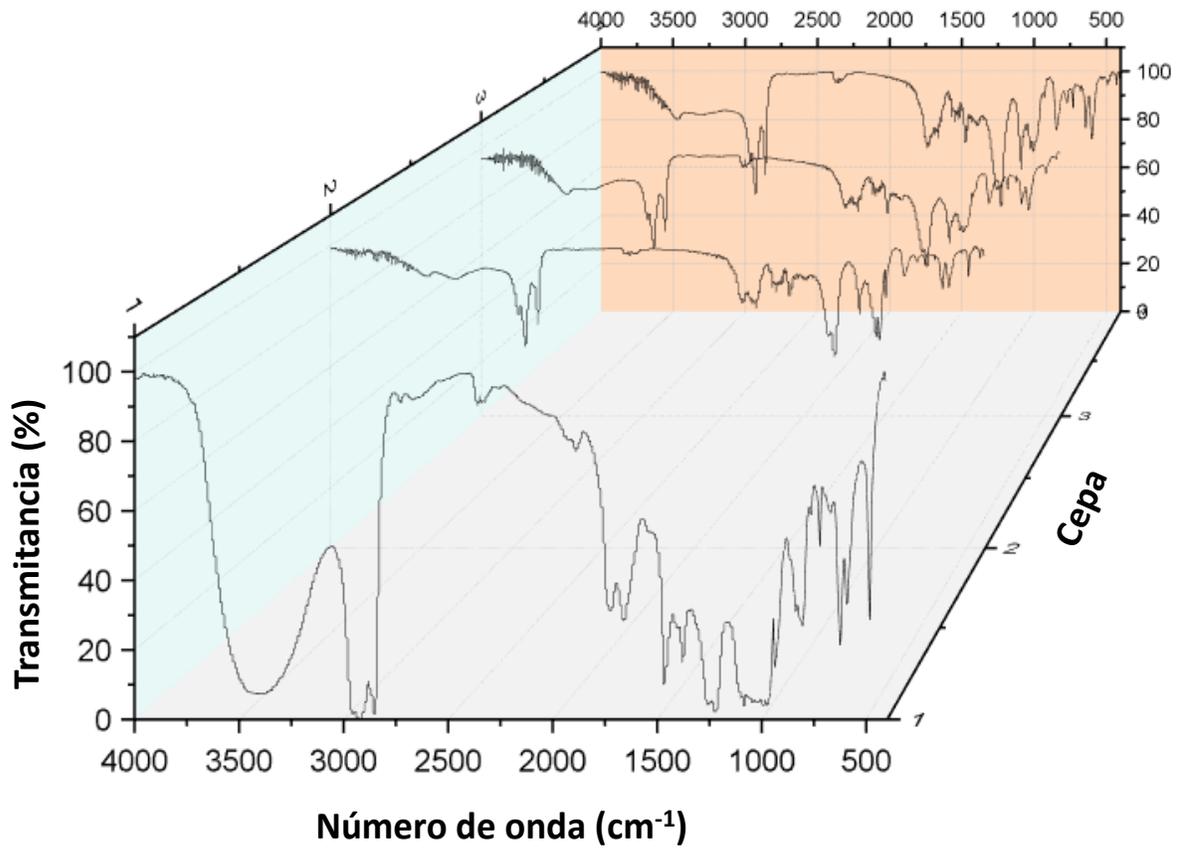


Figura 15. FTIR de los PHAs producidos por cepas analizadas en el presente estudio.

1: *Bacillus amyloliquefaciens* – 1,

2: *Bacillus amyloliquefaciens* – 2,

3: *Bacillus sp* – 3 y

4: *Morganella morganii* - 4.

Los espectros diferenciados por picos se presentan en los Anexos: 1-4.

En la región comprendida entre 2250-2400 cm^{-1} , se presenta debido al CO_2 y CO formado durante la alineación de las cadenas copoliméricas de los PHA's (Odeniyi & Adeola, 2017), en el presente estudio se presentó un pico a los 2350 cm^{-1} , y por lo reportado en la literatura se considera que se encontraban moléculas de monóxido y dióxido de carbono en el PHA's analizados en el presente estudio.

El pico encontrado 1720 cm^{-1} pertenece al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$, estiramiento) de éster o ácido, estas vibraciones de tensión han sido reportadas por diversos autores durante la caracterización de los PHA's obtenidos por diferentes microorganismos del género *Bacillus* (Mohammed *et al.* 2020; Maheshwari *et al.*, 2018; Baikar y col., 2017; Odeniyi y Adeola, 2017; Bhuwal A. , Singh, Aggarwal, Goyal, & Yadav, 2014).

El pico encontrado a los 1650 cm^{-1} es característicos de los enlaces contenidos en la molécula del agua posiblemente asociada a las moléculas ligadas al polímero y que es característico de vibraciones de estiramiento entre enlaces $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ oxígeno e hidrógeno (Gahlawat, Kumari, & Bhagat, 2020).

Tabla 4. Picos característicos de los FTIR para los PHA's producidos por las bacterias aisladas.

Número de onda (cm^{-1})	Descripción
3450	$\text{C}-\text{H}$, $-\text{OH}$, vibraciones
3260	$\text{O}-\text{H}$ estiramiento
2970	CH_3- asimétrico
2920	CH_2- asimétrico
2850	CH_2- simétrico
2350	CO_2 y CO vibraciones
1720	$\text{C}=\text{O}$ estiramiento
1650	$\text{H}-\text{O}-\text{H}$ estiramiento
1470	$-\text{CO}-\text{N}-$ vibraciones y CH_3- asimétrico
1270	$\text{C}-\text{O}-\text{C}$ asimétrico
1080	$\text{C}-\text{CH}_3$ y $\text{C}-\text{O}$ estiramiento
835	$\text{C}-\text{H}$ vibraciones
635	$\text{C}-\text{C}$ vibraciones

El pico encontrado a 1470 cm^{-1} corresponde a los grupos amida intracelular ($-\text{CO}-\text{N}-$, vibraciones de estiramiento), como lo reportado por Maheshwari *et al.*, 2018 para PHA producido por una cepa de *B. cereus* SS105, sin embargo también otros autores refieren en la proximidad $\sim 1460\text{ cm}^{-1}$ la presencia de estiramiento asimétrico de los grupos metilo reportado por PHA generado en cepas de *Bacillus cereus* sp. BNPI-92 donde se utilizaron fuentes de carbono rentables como petróleo crudo, melaza de caña de azúcar, salvado de arroz y trigo (Mohammed, H.T., Dekebo, & Ray, 2020; Kovalcik y otros, 2017).

El pico correspondiente a los 1270 cm^{-1} corresponde a la vibración asimétrica del enlace $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, esta banda fue encontrada en *B. cereus* SS105 y *Bacillus* sp. NA10, (Maheshwari *et al.*; 2018; Bhuwal *et al.* 2014). Ansari y Fatma (2016) reportaron picos similares a los reportados en este trabajo en PHB producidos por cianobacterias marinas, *N. muscorum* NCCU-442.

Los picos encontrados en los números de onda de 1080 , 997 , 835 y 635 cm^{-1} corresponde a $\text{C}-\text{CH}_3$ y $\text{C}-\text{O}$ (estiramiento), $-\text{CH}_3$ (vibraciones), $\text{C}-\text{H}$ (vibraciones), $\text{C}-\text{C}$ (vibraciones), respectivamente. Diversos autores han reportado grupos metilo ($-\text{CH}_3$) y los azúcares urónicos característicos se indicaron para números de onda entre 1223.01 y 1003 cm^{-1} , en PHA producidos por *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*, cultivados en melaza de caña fortificada con etanol (Gomaa, 2014).

Durante la producción de los PHA's, la fuente de carbono puede dejar evidencia de su presencia y que se verán reflejados durante la caracterización mediante FTIR de los PHA como lo reportado por Gomaa *et al.* 2014, donde la banda máxima observada a 877 cm^{-1} podría ser generada por los enlaces glucosídicos que se producen entre unidades de azúcar monoméricas (Gupta, Madan, & Bansal, 1987).

La caracterización mediante FTIR de los PHA's producidos por las cepas que se analizaron en el presente estudio *Bacillus amyloliquefaciens* – 1, *Bacillus amyloliquefaciens* – 2, *Bacillus* sp, fueron similares a los reportados por diversos autores que trabajaron con bacterias de la especie *Bacillus* (Odeniyi y Adeola 2017; Maheshwari *et al.* 2018; Mohammed *et al.* 2020; Baikar *et al.* 2017; Cibichakravarthy, Abinaya, & Prabakaran, 2017; Ali & Jamil, 2018). Sin embargo, el presente estudio es el primero en reportar la bacteria *Morganella morganii* como productora de PHA, sin embargo, la caracterización mediante espectroscopía infrarroja reveló que los grupos funcionales eran semejantes a los reportados por diversos autores.

Gomaa *et al.* 2014 reportaron para *E. coli* picos similares a los PHA's producidos por bacterias del género *Bacillus*, en este caso de la familia enterobacterias, en el cual se agrupa a *M. morganii*. Naheed *et al.* (2012), informaron un contenido de PHA's, el poli-(R)-3-hidroxibutirato [P(3HB)] de $57.61 \pm 0.57\%$ en peso y $58.07 \pm 0.25\%$ en peso de melazas usando cepas bacterianas *Enterobacter* sp. SEL2 y la bacteria *Enterobacteriaceae* PFW1, respectivamente.

El crecimiento óptimo y la acumulación de PHA se observó en medios minerales suplementados con 2% de melaza y 0.2% de sulfato de amonio, estos reportes demuestran algunos estudios que se han realizado utilizando algunos microorganismos de la familia enterobacterias, (Al-Ashraf, Ramachandran, Huong & Kannusamy, 2015; Gomaa, 2014).

Conclusiones

Los PHA son plásticos microbianos biodegradables y biocompatibles que se obtienen a partir de fuentes renovables. En este estudio se analizaron 17 cepas bacterianas, se evaluó su fluorescencia con el colorante azul Nilo. De las cuales 4 cepas fueron las que presentaron la mayor fluorescencia.

La identificación molecular de las cepas permitió conocer que Las cepas M1 y M2 obtuvieron una similitud de 99% con *Bacillus amyloliquefaciens*. Mientras que la cepa P2 mostró una similitud con *Bacillus sp* 99% y la cepa K5 mostró una similitud del 97.7% con *Morganella morganii*.

La caracterización mediante FTIR de los PHA's producidos por las cepas que se analizaron en el presente estudio *Bacillus amyloliquefaciens* – 1, *Bacillus amyloliquefaciens* – 2, *Bacillus sp* – 3, fueron similares a los reportados por diversos autores que trabajaron con bacterias de la especie *Bacillus*. Este estudio es el primero en reportar la bacteria *Morganella morganii* como productora de PHA, la caracterización mediante espectroscopía infrarroja reveló que los grupos funcionales eran semejantes a los encontrados en las cepas de *Bacillus*.

En México, en particular sería interesante utilizar como fuente de carbono residuos de la industria tequilera y cervecera, así como subproductos y residuos del cultivo de maíz y de los procesos industriales basados en este grano.

Es importante la búsqueda de nuevos microorganismos, capaces de acumular grandes cantidades de polímero, que presenten un crecimiento rápido bajo diversas condiciones ambientales y utilicen fuentes de carbono económicas; así como el estudio del metabolismo de microorganismos ya conocidos, que den lugar a cepas superproductoras. En este estudio, las cepas analizadas provienen de residuos de la industria curtidora, de un biodigestor anaerobio de una planta tratadora de agua y de un biofertilizante a base de ortiga.

Es recomendable continuar con las investigaciones sobre la producción de PHA, la caracterización química y física de los PHA, de las cepas bacterianas que los sintetizan y la evaluación de diferentes sustratos, con la finalidad de optimizar los procesos de producción de PHA's.

Bibliografía

- Al-Ashraf, A., Ramachandran, H., Huong, K. H., & Kannusamy, S. (2015). *Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates: The Renewable Feedstock. En Microbial-based Polyhydroxyalkanoates: Upstream and Downstream Processing*. United Kingdom: Smithers Rapra.
- Ali, I., & Jamil, N. (2018). Biosynthesis and Characterization of Poly3-hydroxyalkanoate (PHA) from Newly Isolated Bacterium Bacillus sp. AZR-1. *Iran J. Sci. Technol. Trans. Sci.*, 371-378.
- Almagro, J. (2020). Identificación de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) en aguas residuales provenientes de dos industrias lácteas. *Tesis de Maestría*. Quito, Perú: Universidad San Francisco de Quito USFQ. Colegio de Ciencias Biológicas y ambientales.
- Altamirano, L. M., & Ramos, E. (2018). Rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de *Asparagus officinalis* L., noviembre - diciembre, 2016. Lambayeque, Peru: Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Ansari, S., & Fatma, T. (2016). Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization. *PLOS ONE*, 11(6) e0158168.
- Baikar, V., Rane, A., & Deopurkar, R. (2017). Characterization of Polyhydroxyalkanoate Produced by *Bacillus megaterium* VB87 Isolated from Nisargruna Biogas Plant. *Appl Biochem Biotechnol*, 241-253.
- Bänzinger, S., Tobler, N., & Brandl, H. (2001). The formation of reserve polymers in *Bacillus megaterium*. Zurich: University of Zurich.
- Barbosa, M., Espinoza Hernandez, A., Malagón Romero, D., & Moreno Sarmiento, N. (2005). Producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Revista de la Facultad de Ciencias PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA*, 10(1), 45-54.
- Barraza, G., De la rosa, L. A., Martinez, A., Castillo, H., Cotte, M., & Alvarez, E. (2013). La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIRM) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista latinoamericana de química*, 4(3), 105-107.

- Bello Gil, D., & Brandl, H. (2007). Selección de bacterias productoras de Poli-hidroxibutirato. *ICIDCA, Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XLI(2)*, 10-18.
- Bello, D., Otero, M. A., Ortega, G., & Carrera, E. (2009). Estado del arte en la producción microbiológica de Polihidroxialcanoatos. *ICDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, XLIII(2)*, 3-13.
- Bengtsson, S., Werker, A., Christensson, M., & Welander, T. (2008). Production of polyhydroxyalkanoates by activated sludge treating a paper mill wastewater. *Bioresource Technology, 99(3)*, 509-516.
- Berlanga, M., Montero, M. T., Hernández Borrell, J., & Guerrero, R. (2006). Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *International Microbiology, 9*, 95-102.
- Bhatt, R., Shah, D., Patel, K., & Trivedi, U. (2008). PHA-rubber blends: Synthesis, characterization and biodegradation. *Bioresource Technology, 99(11)*, 4615-4620.
- Bhuwal, A., Singh, G., Aggarwal, N., Goyal, V., & Yadav, A. (2014). Poly- β -hydroxybutyrate production and management of cardboard industry effluent by new *Bacillus* sp. NA10. *Bioresour bioprocess*, 1-9.
- Borah, B., Thakur, R. P., & Nigam, J. N. (2002). The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. *Journal of Applied Microbiology 2002, 92(4)*, 776-783.
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáez, J. A., & Valdezate, S. (2011). Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, (29)* 601-608.
- Braunegg, G., Bona, R., & Koller, M. (2004). Sustainable polymer production. *Polymer-plastic Technology and Engineering, (43)* 1779-1793.
- Byung-Hyuk, K., Rishiram, R., Dae-Hyun, C., & Hee-Mock, O. (2014). Role of *Rhizobium*, a plant growth promoting bacterium, in enhancing algal biomass through mutualistic interaction. *Biomass and Bioenergy, (69)* 95-105.
- Campuzano, J. F., López, I. D., & Álvarez, C. (julio de 2018). *Tecnología del plástico*. (Instituto de Capacitación e Investigación del Plástico y del Caucho (ICIPC) de Medellín, Colombia) Recuperado el 19 de mayo de 2020, de <http://www.plastico.com/temas/Normativas-y-regulaciones-para-polimeros-biodegradables-y-compostables+126663>
- Cerrone, F. (2011). Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alperujo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. *Tesis doctoral*. Granada, España: Universidad de Granada.
- Cibichakravarthy, B., Abinaya, S., & Prabakaran, S. R. (2017). Syntrophic association of termite gut bacterial symbionts with bifunctional characteristics of cellulose degrading and polyhydroxyalkanoate producing bacteria. *Int. J. Biol. Macromol*, 613-620.

- Cruz, M. (2015). Importancia y estudios de las comunidades microbianas en los recursos y productos pesqueros. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, (2) 99-115.
- De Eugenio, L. I. (2009). Tesis doctoral: Estudio bioquímico, genético y fisiológico de la degradación intracelular de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Centro de Investigaciones Biológicas.
- Ecoembalajes España S.A. (2009). *Proyecto de análisis de bioplásticos*. España: Ecombes.
- Franco Correa, M., Gómez Méndez, D., Castro Medina, N., & Rendón Ruiz, M. (2009). Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. *Revista Peruana de Biología*, 16(1), 115-118.
- Gahlawat, G., Kumari, P., & Bhagat, N. R. (2020). Technological Advances in the Production of Polyhydroxyalkanoate Biopolymers. *Current Sustainable/Renewable Energy Reports*, 73-83.
- García, L. A., Novoa, J. A., Franco, A. M., & Higuera, L. M. (2015). Estudio de la síntesis de biopolímeros de origen microbiano. *Quid. Investigación, Ciencia y Tecnología*, 1(25), 68-77.
- García, R. L. (2016). Cuantificación de polihidroxicanoatos en cianobacterias cultivadas en agua residual. Barcelona: UPC BARCELONATECH.
- Gomaa, E. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. *Braz. Arch. Biol. Technol*, 1516-8913.
- González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 29 (1) 78-79.
- González, M. G. (2008). Producción de poli-hidroxicanoatos por bacterias del género *Bacillus* de origen marino. La Paz, Baja California Sur: Centro de Investigaciones Biológicas de Noreste, S. C.
- Gouda, M., Swellam, A., & Omar, S. (2001). Production of PHB by a *Bacillus Megaterium* Strain Using Sugarcane Molasses and Corn Steep Liquor as Sole Carbon and Nitrogen Sources. *Microbiol Res.*, 156(3), 201-207.
- Greenpeace. (2018). Datos sobre la producción de plástico. *GPM Greenpeace Magazine*.
- Gupta, S., Madan, R. N., & Bansal, M. C. (1987). Chemical composition of *Pinus caribaea* hemicelluloses. *Tappi Journal*, 113-114.
- Halami, P. M. (2008). Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 805-812.
- Hall, T. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Chiyoda, Tokyo, Japan: National Institute of informatics.
- Hassan, M., Shirai, Y., Kusubayashi, N., Karim, M., Nakanishi, K., & Hashimoto, K. (1996). Effect of organic acid profiles during anaerobic treatment of palm oil mill effluent on the

- production of polyhydroxyalkanoates by *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(2), 151-156.
- Helm, J., Wendlandt, K., Jechorek, M., & Stottmeister, U. (2008). Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly- β -hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture. *Journal of applied Microbiology*, 105(4), 1054-1061.
- Hong, K., Sun, S., Tian, W., Q., C. G., & Huang, W. (1999). A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 523-526.
- Jendrossek, D., & Handrick, R. (2002). Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*, 56, 403-432.
- Katircioglu, H., Aslim, B., Yüksekdad, Z., Mercan, N., & Beyatli, Y. (2003). Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative *Bacillus* mutant strains by SDS-PAGE of total cell protein. *African Journal of Biotechnology*, 2(6), 147-149.
- Keenan, T., Nakas, J., & Tanenbaum, S. (2006). Polyhydroxyalkanoate copolymers from forest biomass. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 616-626.
- Kim, M., Cho, K.-S., Ryu, H., Lee, E., & Chang, Y. (2003). Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of *Ralstonia eutropha* by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *Biotechnology Letters*, 25, 55-59.
- Kovalcik, A., Meixner, K., Mihalic, M., Zelinger, W., Fritz, I., Fuchs, W., . . . Drosig, B. (2017). Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. *Int. J. Biol. Macromol*, 497-504.
- Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., & Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(3), 240-245.
- Kumar, T., Singh, M., Purohit, V., & V.C., K. (2009). Potential of *Bacillus* sp. to produce polyhydroxybutyrate from biowaste. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1365-2672.
- Lemos Delgado, A. C., & Mina Cordoba, A. (2015). Polihidroxiálcanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Dialnet*, 79(1), 79 (1) 93-101.
- Liu, W., Linning, K., Nakamura, K., Mino, T., Matsuro, T., & L.J., F. (2000). Microbial community changes in biological. *Microbiology*, 146(5), 1099-1107.
- López, J. A. (2011). Tesis doctoral: Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxi-butirato (PHB). Bahía Blanca, Argentina.: Universidad Nacional del Sur.
- López, J., Naranjo, J., Higueta, J., Cubito, M., Cardona, C., & Billar, M. (2012). Biosynthesis of PHB from a new isolated *Bacillus megaterium* strain: outlook on future developments with endospore forming bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(2), 250-258.

- López-Cuellar, M., Alba-Flores, J., & Pérez-Guevara, F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *Int. J. Biol. Macromol*, 48, 74-80.
- Luego, M. J. (2018). Bioplásticos de origen bacteriano: los polihidroxiálcanoatos. *Ambiociencias*(16), 5-24.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 21-53.
- Maheshwari, N., Kumar, M., Thakur, I., & Srivastava, S. (2018). Production, process, optimization and molecular characterization of polyhydroxyalkanoate (PHA) by CO₂ sequestering B. cereus SS105. *Bioresource Technology*, 75-82.
- Martínez, M. (2020). Búsqueda y selección de cepas bacterianas productoras de polihidroxiálcanoatos. *Tesis de Maestría*. Almería, España: Universidad de Almería.
- Marudkla, J., Patjawit, A., Chuensangjun, C., & Sirisansaneeyakul, S. (2018). Optimization of poly(3-hydroxybutyrate) extraction from *Cupriavidus necator* DSM 545 using sodium dodecyl sulfate and sodium hypochlorite. *Agriculture and Natural Resources*, 52(3), 266-273.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., A., W., & J., S. (1993). Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10), 3233-3238.
- Mohammed, S., H.T., B., Dekebo, A., & Ray, L. (2020). Optimization of the culture conditions for production of Polyhydroxyalkanoate and its characterization from a new *Bacillus cereus* sp. BNPI-92 strain, isolated from plastic waste dumping yard. *Int. J. Biol. Macromol*, 1064-1080.
- Mona, K. G., Azza, E. S., & Sanaa, H. O. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156(3), 201-207.
- Naheed, N., Jamil, N., Hasnain, S., & Abbas, G. (2012). Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* sp. SEL2 and *Enterobacteriaceae* bacterium sp. PFW1 using sugar cane molasses as media. *Academic Journals*, 11 (14) 3321-3332.
- Odeniyi, O., & Adeola, O. (2017). Production and characterization of polyhydroxyalkanoic acid from *Bacillus thuringiensis* using different carbon substrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 407-413.
- Ojumu, T., Yu, J., & Solomon, B. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 18-24.
- Otari, S., & Ghosh, J. (2009). Production and characterization of the polymer polyhydroxy butyrate-co-polyhydroxy valerate by *Bacillus megaterium* NCIM 2475. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 23-26.

- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., & Olsen, G. J. (1986). The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Advances in Microbial Ecology*, 1-55.
- Porwal, S., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., . . . Kalia, V. (2008). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology*, 99(13), 5444-5451.
- Rawte, T., & Mavinkurve, S. (2002). Characterization of polyhydroxy alkanoates – Biodegradable plastics from marine bacteria. *Current Science*, 83(5), 562-564.
- Reddy, C., Ghai, R., & Kalia, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87(2), 137-146.
- Rehm, B. H. (2009). Polyhydroxyalkanoates: from Bacterial Storage Compound via Renewable Plastic to Bio-Bead. En *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors Applications and perspectives* (pág. 272). Palmerston North: Institute of Molecular BioSciences Massey University.
- Rodicio, M. d., & Mendoza, M. d. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22 (4) 238-245.
- Ruiz-Sánchez, E., Mejia-Bautista, M. A.-D., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y., & Valencia-Botín, A. J. (2016). ANTIFUNGAL ACTIVITY AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF NATIVES STRAINS OF *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, Vol. 50 (2) 133-148.
- Salmati, Z. U., Salim, M. R., & Olsson, G. (2009). Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from mixed microbial cultures by simple digestion and saponificación. *Proceeding of the 3rd International Water Association (IWA)-ASPIRE*, 1(1), 8-15.
- Sanchez, S., Marín, M., Mora, A., & Yepes, M. (2010). Identificación de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología*, (14) 89-100.
- Savolainen, V., Cowan, R. S., Vogler, A. P., Roderick, G. K., & Lane, R. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philos Trans R Soc London B Biol Sci*, (360) 1805-1811.
- Segura, D., Noguez, R., & Espin, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14, 361- 367.
- Senior, P. J., Beech, G. A., Ritchie, A. F., & Dawes, A. (1972). The Role of Oxygen Limitation in the Formation of Poly-P-hydroxybutyrate during Batch and Continuous Culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.*, 128, 1193-1201.
- Serrano, J. Y. (2010). Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *TEORÍA Y PRÁXIS INVESTIGATIVA*, 5(2), 80.

- Shamala, T., Chandrashekar, A., Viiayendra, S., & Kshama, L. (1999). . Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Microbiology*, (3) 369-374.
- Shangguan, Y.-Y., Ya-Wu, W., & Chen, G.-Q. (2006). The mechanical properties and invitro biodegradation and biocompatibility of uv-treated poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Biomaterials*, 27(11), 2349-2357.
- Singh, M., K.S. Patel, S., & C. Kalia, V. (2009). *Bacillus subtilis* como productor potencial de polihidroxicanoatos. *Microbial Cell Factories*, 8(38), 1475-2859.
- Skoog, D., Holler, F. J., & Nieman, T. A. (2001). *Principios de análisis instrumental*. Madrid: Mc. Graw Hill.
- Solaiman, D., Ashby, R., & Flogia, T. (2000). Rapid and specific identification of medium-chainlength polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Applied microbiology and biotechnology*, (6) 690-694.
- Soto, J. (2018). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador. . *CIENCIA ergo-sum*, (25) 1-12.
- Spiekermann, P., Rehem, 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 for Microbiology*, (171) 73-80.
- Steinbüchel, A. (2003). Production of rubber-like polymers by microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 261-270.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods . *Molecular Biology and Evolution*, 2731-2739.
- Tanabe, A. S., & Toju, H. (2013). Two New Computational Methods for Universal DNA Barcoding: A benchmark Using Barcode Sequences of Bacteria, Archaea, Animals, Fungi, and Land Plants. *PLOS ONE*, (8) e76910.
- Thakor, N., Trivedi, U., & Patel, K. (2005). Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils. *Bioresource Technology*, 96(17), 1843-1850.
- Tsuge, T. (2002). Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6), 579-584.
- Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91, 1-17.

- Valappil, S., Peiris, D., Langley, G., Herniman, J., Boccaccini, A., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 475-487.
- Valappil, S., Rai, R., Bucke, C., & Roy, I. (2008). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1624-1635.
- Vázquez, A., Espinoza, R. M., Beltrán, M., & Velasco, M. (2014). Bioplásticos y plásticos degradables. *Biblioteca del plástico*(46), 2.
- Vázquez, C., Martín, A., Silóniz, M., & Serrano, S. (2010). Técnicas básicas de Microbiología Observación de Bacterias. *Reduca (Biología)*, 15-38.
- Vivas, M., Martínez, M., García, F., & Salgado, R. (2008). Identificación y caracterización de cepas degradadoras de parafina. *Ciencia y tecnología*, (2) 51-60.
- Wagas, N., Nazia, J., Iftikhar, A., Mian, H., & Shahida, H. (2010). Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon soueces. *Ann Microbial*, (61) 623-629.
- Wendlandt, K., Jechorek, M., Helm, J., & Stottmeister, U. (2001). Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *Journal of Biotechnology*, 86(2), 127-133.
- Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K., & Chen, G. (2001). Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 111-118.
- Yarza, P., Ludwig, W., Euzéby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., & Glöckner, F. O. (2010). Update of the All-Species Living Tree Project based on 16S and 23S rRNA sequence analyses. *Syst Appl Microbiol*, (33) 291-9.
- Yilmaz, M., & Beyatli, Y. (2005). Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) production by a *Bacillus cereus* M5 strain in sugarbeet molasses. *Zuckerindustrie*, 130(2), 109-112.
- Yilmaz, M., Soran, H., & Beyatli, Y. (2005). Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 565-566.
- Yu, J. (2001). Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology*, 86(2), 105-112.
- Zheng, B., Lu, J., Tong, Y., Li, H., & Chen, Q. (2015). Isolation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate)-producing bacteria from aerobic sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 421-427.
- Zuluaga, F. (2013). Algunas aplicaciones del ácido poli-Lláctico. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 37(142), 126.

ANEXO 1. Espectro FTIR del PHA extraído de *Bacillus amyloliquefaciens*.

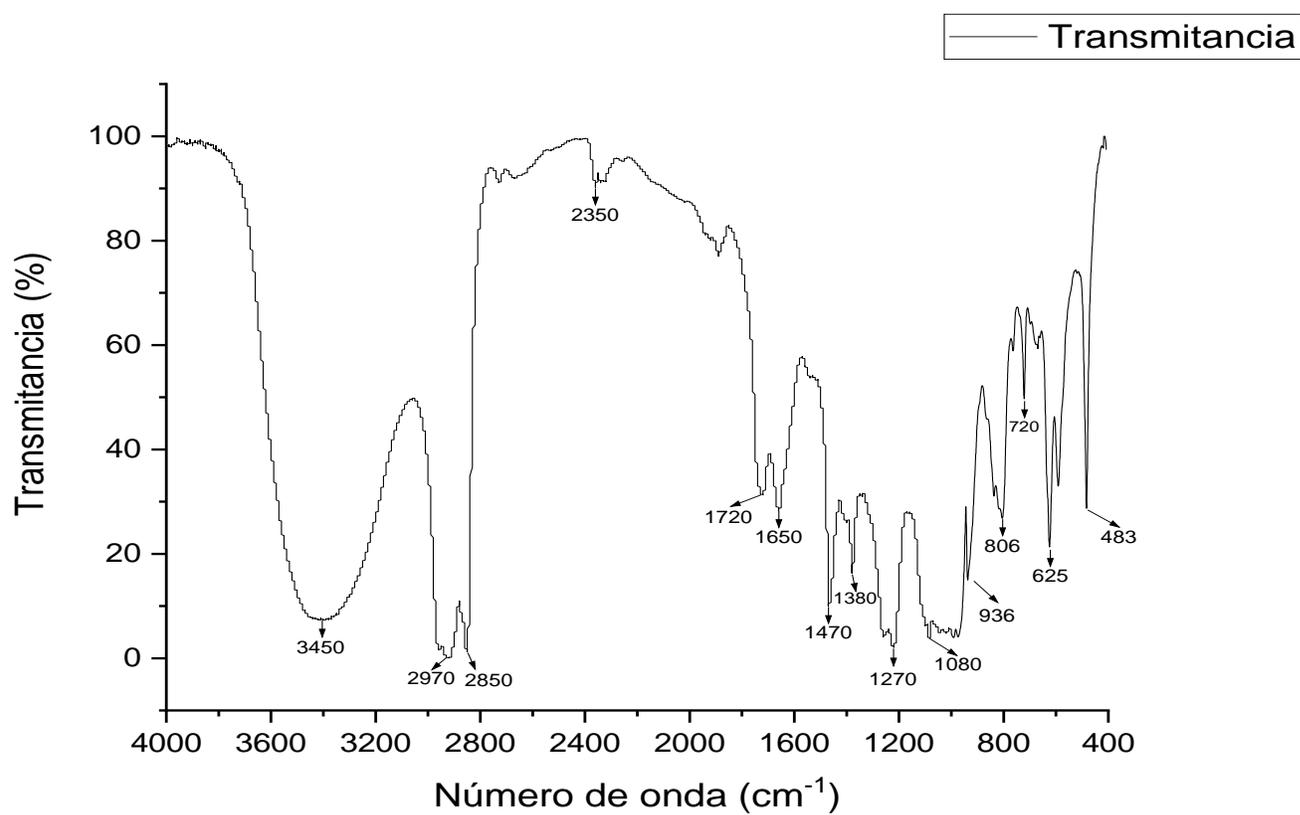


Figura 16. Espectro FTIR del PHA extraído de *Bacillus amyloliquefaciens* – 1.

ANEXO 2. Espectro FTIR del PHA extraído de *Bacillus amyloliquefaciens*.

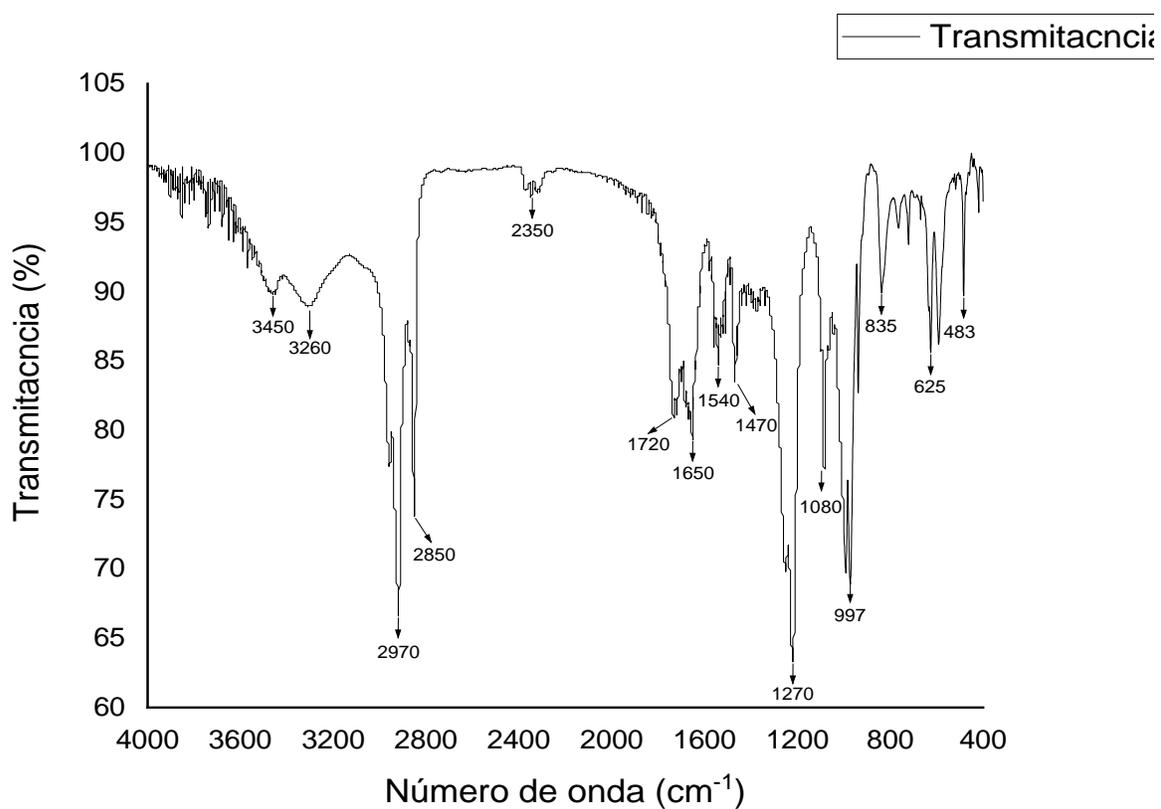


Figura 17. Espectro FTIR del PHA extraído de *Bacillus amyloliquefaciens* – 2.

ANEXO 3. Espectro FTIR del PHA extraído de *Bacillus sp.*

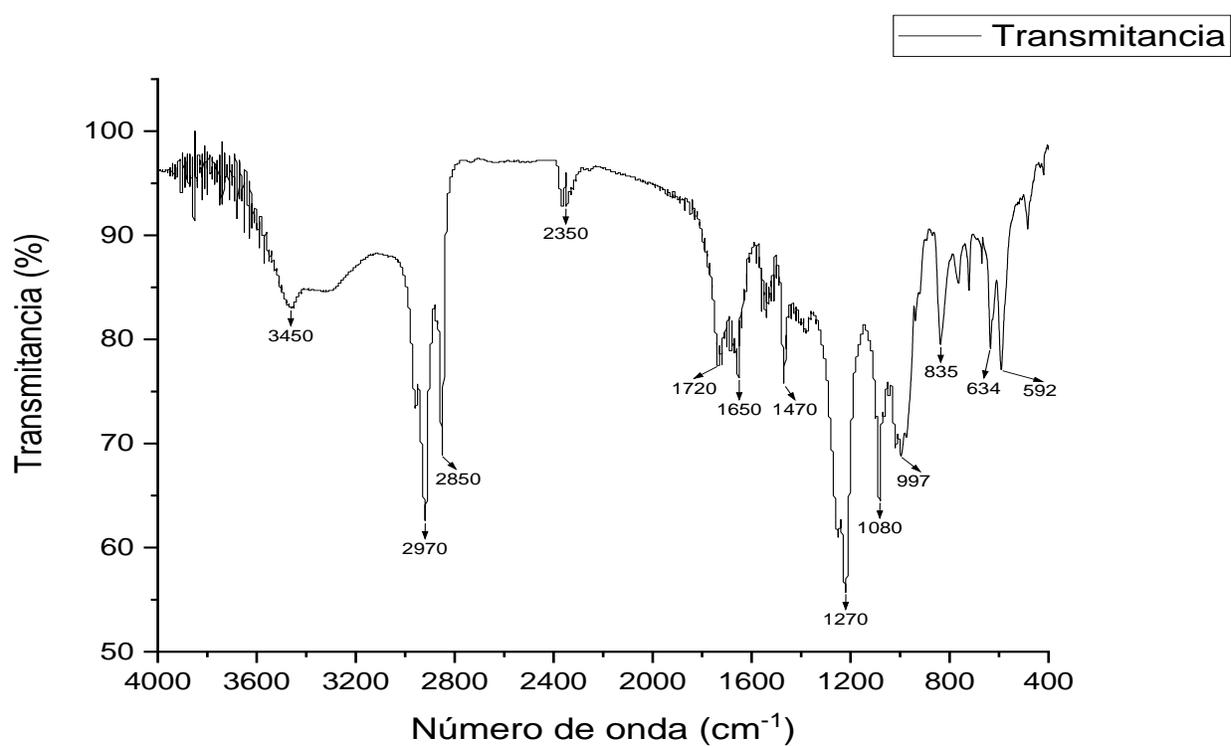


Figura 18. Espectro FTIR del PHA extraído de *Bacillus sp.* - 3.

ANEXO 4. Espectro FTIR del PHA extraído de *Morganella morganii*.

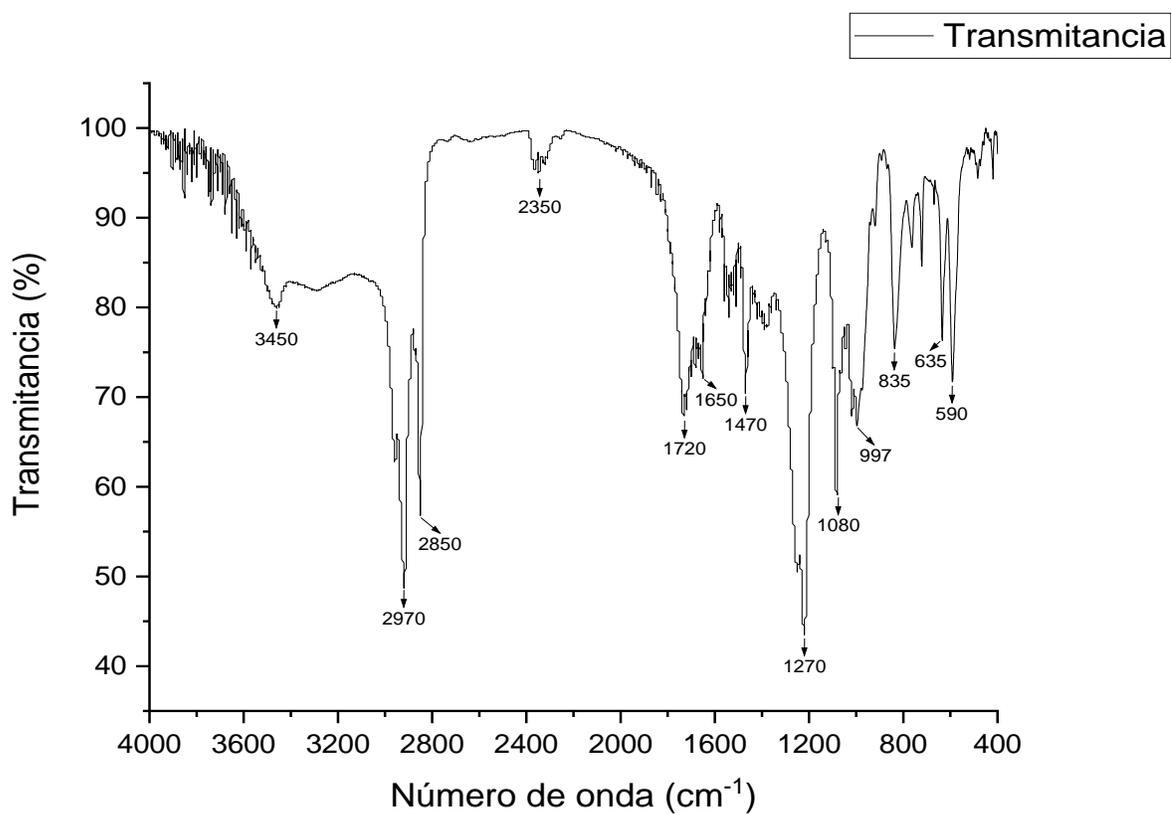


Figura 19. Espectro FTIR del PHA extraído de *Morganella morganii* - 4

ANEXO 5. Medios para la producción de PHAs.

Tabla 5. Medios para la producción de PHAs.

Nutriente	Medio 1	Medio 2	Medio 3	Medio 4	Medio 5
	pH 7.0 ± 0.1				
	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
Sacarosa	20.00				
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.00				
KH ₂ PO ₄	1.00	0.60	2.30		1.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20	0.20	0.50	0.40	0.20
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02	0.07			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.01		0.012	
Agar	15.00	15.00	15.00	15.00	15.00
Glucosa		10.00		20.00	
EDTA		0.01			
K ₂ HPO ₄		0.90		2.00	
Extracto de Levadura		1.00			
Fructosa			20.00		
NH ₄ Cl			0.50		0.10
Na ₂ HPO ₄			2.30		
NaHCO ₃			0.50		
Citrato Férrico			0.05		
CaCl ₂			0.01	0.11	0.01
NaMoO ₄ ·2H ₂ O				0.01	
NaCl				0.40	10.00
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O					6.70
Citrato ferroso de amonio					0.06

Medio 1. (Borah, Thakur, & Nigam, 2002)

Medio 2. (Bänzinger, Tobler, & Brandl, 2001)

Medio 3. (Mona, Azza, & Sanaa, 2001)

Medio 4. (Senior, Beech, Ritchie, & Dawes, 1972)

Medio 5. (Berlanga, Montero, Hernández Borrell, & Guerrero, 2006)