



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y  
PARASITOLOGÍA**

**“Rendimiento de polihidroxialcanoatos, PHA, de  
bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de  
salinas en Mórrope, Lambayeque, 2014”**

**T E S I S**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. Anasilvia del Pilar Flores Vásquez**

**Br. Enrique III Idrogo Baigorria**

**LAMBAYEQUE, PERÚ  
2015**

**“Rendimiento de polihidroxialcanoatos, PHA, de bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambayeque, 2014”**

## **T E S I S**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**APROBADO POR:**

Dr. Antero Celso Vásquez García  
**PRESIDENTE**

---

Dra. Gianina Llontop Barandiarán  
**SECRETARIO**

---

Dra. Tarcila Amelia Cabrera Salazar  
**VOCAL**

---

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán  
**PATROCINADORA**

---

**LAMBAYEQUE, PERÚ  
2015**

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>01</b>
<b>II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....</b>	<b>04</b>
2.1. Antecedentes de la investigación.....	04
2.2. Bacterias halófilas.....	07
2.3. Polihidroxialcanoatos.....	09
2.4. Biosíntesis de polihidroxialcanoatos.....	11
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1. Materiales.....	15
3.1.1. Material biológico.....	15
3.1.2. Población y muestra de estudio.....	15
3.2. Métodos.....	15
3.2.1. Variables en estudio.....	15
3.2.2. Tipo de estudio y contrastación de hipótesis.....	16
3.2.3. Lugar de muestreo.....	16
3.2.4. Obtención de muestras de suelo y agua.....	16
3.2.5. Enriquecimiento de bacterias de muestras de suelo y agua.....	20
3.2.6. Aislamiento de bacterias halófilas.....	20
3.2.7. Detección de gránulos de PHA en bacterias halófilas.....	20
3.2.8. Selección de bacterias halófilas según el número de células con gránulos.....	27
3.2.9. Rendimiento de polihidroxialcanoatos de bacterias halófilas nativas.....	27
3.3. Análisis de los datos.....	36
<b>IV.RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1. Bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas de Mórrope, Lambayeque 2014.....	37
4.2. Bacterias halófilas productoras de gránulos de PHA.....	43
4.3. Bacterias halófilas productoras de PHA seleccionadas.....	43
4.4. Rendimiento Y (p/x) de PHA en bacterias halófilas.....	53
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>59</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>64</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>VIII.RESUMEN.....</b>	<b>66</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>
<b>X. ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Tiempo requerido para observar crecimiento en el enriquecimiento bacteriano de suelo de salinas en Mórrope, 2014.....	40
<b>Tabla 2.</b>	Tiempo requerido para observar crecimiento en el enriquecimiento bacteriano de agua de salinas en Mórrope, 2014.....	40
<b>Tabla 3.</b>	Color y textura de colonias de bacterias halófilas aisladas de muestras de suelo en salinas de Mórrope, 2014.....	44
<b>Tabla 4.</b>	Color y textura de colonias de bacterias halófilas aisladas de muestras de agua en salinas de Mórrope, 2014.....	44
<b>Tabla 5.</b>	Frecuencia morfológica de bacterias halófilas productoras de PHA aisladas de suelo en diferentes concentraciones de NaCl.....	48
<b>Tabla 6.</b>	Frecuencia morfológica de bacterias halófilas productoras de PHA aisladas de agua en diferentes concentraciones de NaCl.....	48
<b>Tabla 7.</b>	Número de células con gránulos de PHA en primer cultivo de bacterias halófilas en caldo HM <sub>2</sub> por 144 horas.....	50
<b>Tabla 8.</b>	Número promedio de células con gránulos de PHA en bacterias halófilas cultivadas en caldo HM <sub>2</sub> .....	52
<b>Tabla 9.</b>	Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de bacterias halófilas.....	54
<b>Tabla 10.</b>	Absorbancia (600 nm) corregida de biomasa de bacterias halófilas cultivadas en glucosa como fuente de carbono.....	55
<b>Tabla 11.</b>	Concentración (gL <sup>-1</sup> ) de biomasa de bacterias halófilas cultivadas en glucosa como fuente de carbono.....	56
<b>Tabla 12.</b>	Biomasa y número de células con gránulos de PHA en bacterias halófilas cultivadas en glucosa como fuente de carbono.....	57
<b>Tabla 13.</b>	Concentración (gL <sup>-1</sup> ) de polihidroxialcanoatos (PHA) de bacterias halófilas a los 4 días de cultivo en glucosa como fuente de carbono.....	58
<b>Tabla 14.</b>	Rendimiento Y (p/x) de polihidroxialcanoatos de bacterias halófilas.....	58

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Ubicación geográfica de la zona de muestreo correspondiente al distrito de Mórrope, provincia de Lambayeque, región Lambayeque, 2014.....	17
<b>Figura 2.</b>	Entrada a la salinas del distrito de Mórrope en la región Lambayeque, 2014.....	17
<b>Figura 3.</b>	Salina del distrito de Mórrope en la región Lambayeque, 2014....	18
<b>Figura 4.</b>	Toma de muestra de suelo de las salinas de Mórrope.....	18
<b>Figura 5.</b>	Muestras de suelo y agua de salinas acondicionadas para su transporte.....	19
<b>Figura 6.</b>	Muestras de agua de salinas de Mórrope.....	19
<b>Figura 7.</b>	Flujograma del proceso de aislamiento de bacterias halófilas en suelo y aguas de salina.....	21
<b>Figura 8.</b>	Enriquecimiento de muestra de bacterias de suelo en caldo HM <sub>1</sub> .	22
<b>Figura 9.</b>	Bacterias halófilas enriquecidas en caldo HM <sub>1</sub> .....	22
<b>Figura 10.</b>	Colonias de bacterias halófilas desarrolladas en agar HM <sub>1</sub> .....	23
<b>Figura 11.</b>	Cultivo de bacteria halófila en agar HM <sub>1</sub> .....	23
<b>Figura 12.</b>	Caldo HM <sub>2</sub> para el cultivo de bacterias halófilas.....	24
<b>Figura 13.</b>	Caldo HM <sub>2</sub> cultivado con bacterias halófilas.....	24
<b>Figura 14.</b>	Toma de muestra de cultivo bacteriano para tinción con Sudan Negro B.....	25
<b>Figura 15.</b>	Tinción con Sudán Negro B, (a) adición del colorante, (b) decoloración, (c) tinción con safranina, (d) lavado.....	26
<b>Figura 16.</b>	Flujograma del proceso de obtención de curva patrón para la cuantificación de biomasa por turbidimetría. ....	28
<b>Figura 17.</b>	Inoculación de bacterias halófilas en caldo HM <sub>2</sub> .....	29
<b>Figura 18.</b>	Bacterias halófilas cultivadas en caldo HM <sub>2</sub> para obtener la curva patrón.....	29
<b>Figura 19.</b>	Caldo HM <sub>2</sub> cultivado con bacterias halófilas y sus diluciones para obtener la curva patrón.....	30
<b>Figura 20.</b>	Lectura de absorbancia en espectrofotómetro con luz visible.....	30
<b>Figura 21.</b>	Flujograma de proceso de obtención de biomasa y PHA.....	32

<b>Figura 22.</b>	Bacterias halófilas cultivadas en caldo HM <sub>2</sub> .....	33
<b>Figura 23.</b>	Lectura de absorbancia de caldo HM <sub>2</sub> cultivado con bacteria halófila.....	33
<b>Figura 24.</b>	Centrifugación de caldo HM <sub>2</sub> cultivado con bacteria halófila.....	34
<b>Figura 25.</b>	Biomasa de bacterias halófilas en caldo HM <sub>2</sub> centrifugado.....	34
<b>Figura 26.</b>	Biomasa de bacterias halófilas obtenida después de centrifugación y decantación .....	35
<b>Figura 27.</b>	Observación de dos fases en biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio (a) y cloroformo (b).....	35
<b>Figura 28.</b>	Porcentaje de muestras de suelo y agua positivas al enriquecimiento de bacterias halófilas en caldo HM <sub>1</sub> .....	38
<b>Figura 29.</b>	Turbidez por crecimiento de bacterias halófilas en caldo HM <sub>1</sub> ....	38
<b>Figura 30.</b>	Película superficial blanquecina de bacterias halófilas en caldo HM <sub>1</sub> .....	39
<b>Figura 31.</b>	Coloración anaranjado - rojizo por crecimiento de bacterias halófilas en caldo HM <sub>1</sub> .....	39
<b>Figura 32.</b>	Frecuencia de muestras de suelo y agua positivas para el aislamiento de bacterias halófilas, 2014.....	41
<b>Figura 33.</b>	Porcentaje de bacterias halófilas según procedencia de muestras de suelo y agua, 2014.....	41
<b>Figura 34.</b>	Colonias de bacterias halófilas con diversas coloraciones desarrolladas en agar HM <sub>1</sub> ; (a) blanco, (b) melón, (c) naranja, (d) rojo, (e) rosa, (f) translúcido.....	42
<b>Figura 35.</b>	Porcentaje de aislados de bacterias halófilas en muestras de suelo según la concentración de NaCl de agar HM <sub>1</sub> .....	45
<b>Figura 36.</b>	Porcentaje de aislados de bacterias halófilas en muestras de agua según la concentración de NaCl de agar HM <sub>1</sub> .....	45
<b>Figura 37.</b>	Frecuencia de bacterias halófilas productoras de gránulos de PHA en aislados de muestras de suelo y agua de salinas de Mórrope, 2014.....	46
<b>Figura 38.</b>	Gránulos de PHA en bacterias halófilas teñidas con Sudan Negro B.....	47
<b>Figura 39.</b>	Porcentaje de bacterias halófilas productoras de PHA aisladas de muestras de suelo según la concentración de NaCl en agar HM <sub>1</sub> .....	49

<b>Figura 40.</b>	Porcentaje de bacterias halófilas productoras de PHA aisladas de muestra de agua según la concentración de NaCl en agar HM <sub>1</sub> .....	49
<b>Figura 41.</b>	Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de bacterias halófilas productoras de PHA.....	54

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b>	Cálculo de número de muestras de suelo y agua de las salinas para el aislamiento de bacterias productoras de PHA.....	75
<b>Anexo 2.</b>	Cálculo del porcentaje de NaCl según conductividad eléctrica.....	76
<b>Anexo 3.</b>	Medio de cultivo (g/L) específico para halófilos extremos.....	77
<b>Anexo 4.</b>	Técnica de coloración con Sudán Negro B.....	78
<b>Anexo 5</b>	Determinación cualitativa de polihidroxialcanoatos por espectrofotometría.....	79



## I. INTRODUCCIÓN

El plástico tiene cualidades muy versátiles, entre las que destacan su durabilidad y resistencia a la degradación, por lo que se utiliza ampliamente en la manufactura de una variedad de productos imprescindibles para el estilo actual de vida. Su consumo se ha incrementado de 5 millones de toneladas en 1950, a cerca de 200 millones de toneladas al año; sin embargo, al ser resistentes a la degradación, su uso genera residuos, en una tasa de 35 millones de toneladas al año, 40% de los cuales se depositan en rellenos sanitarios y el resto contamina el ambiente terrestre y marino (Reddy *et al.*, 2003; Salehizadeh & Van Loosdrecht, 2004). Se estima que para fabricar plástico se utiliza 5% del petróleo disponible; sin embargo, para cubrir la demanda de 2000 millones de toneladas anuales de plástico en el 2100, será requerido el 50% del petróleo disponible, lo que incrementará significativamente el precio (González *et al.*, 2013).

Los bioplásticos del tipo de los polihidroxicanoatos, PHA, constituyen una alternativa de solución a la problemática de los plásticos derivados del petróleo. Los PHA son poliésteres sintetizados intracelularmente por microorganismos

como reserva de carbono y energía, que una vez extraídos de la célula, presentan propiedades físicas similares a los petroplásticos. Particularmente, el polihidroxibutirato (P3HB) y el polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato P(3HBco3HV) se producen a escala comercial, con una concentración del polímero de más de  $80 \text{ gL}^{-1}$ , una productividad de más de  $2 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ , en sistemas por lote alimentado o continuo, que potencialmente podrían producir 50 000 toneladas por año (Salehizadeh y Van Loosdrecht, 2004).

El uso de los PHA es limitado, porque los plásticos derivados del petróleo son muy baratos, lo que hace que los procesos de producción de plásticos biodegradables no sean competitivos, cuando se analizan solo desde el punto de vista económico. En la producción de PHA se requieren grandes inversiones para los procesos de fermentación y recuperación o purificación del producto a gran escala y los sustratos para que las bacterias produzcan PHA no son suficientemente baratos. De esta manera, el costo de producción de 1 Kg de plástico bacteriano es de 16 dólares, comparado con 1 dólar por Kg de los plásticos derivados del petróleo (Segura *et al.*, 2007).

Se han reportado más de 300 especies de bacterias que acumulan PHA, destacando las bacterias halófilas que alcanzan más del 70% de rendimiento. En términos generales, la rentabilidad de una bacteria para producir PHA a escala industrial, depende de factores como la estabilidad e inocuidad del organismo, velocidad de acumulación del polímero, velocidad de crecimiento, densidad celular que se puede alcanzar, contenido y peso molecular del polímero, facilidad de extracción, rango de fuentes de carbono utilizables, costo del medio de cultivo y generación de subproductos (González *et al.*, 2013). En este contexto, se requiere aislar y desarrollar cepas bacterianas con mejor rendimiento de PHA, que puedan utilizar sustratos baratos para disminuir los costos de producción del polímero.

Lambayeque tiene una diversidad biológica en las salinas, que no ha sido explotada. El aislamiento de bacterias halófilas, posibilita la obtención de especies capaces de acumular grandes cantidades del polímero, que presenten crecimiento rápido bajo diversas condiciones nutricionales y en sustratos de bajo costo. Las bacterias obtenidas en la presente investigación constituirán la base

para la investigación de PHA, en un proceso productivo económicamente y ambientalmente amigable, así como también para la obtención de PHA con propiedades físicas nuevas o mejoradas que permitan ampliar su uso en aplicaciones de alto valor agregado.

Por lo expuesto se planteó el siguiente problema: ¿Cuál es el rendimiento de polihidroxialcanoatos, PHA, de bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambayeque?. Para resolver el problema, el objetivo general fue: Determinar el rendimiento de polihidroxialcanoatos de bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambayeque. Los objetivos específicos fueron: Aislar bacterias halófilas en muestras de suelo y agua de las salinas, detectar gránulos de PHA en las bacterias, utilizando la tinción de Sudan Negro B, seleccionar las bacterias halófilas según el número de células con gránulos de PHA y determinar el rendimiento de PHA. La hipótesis planteada fue: Las bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope alcanzan un rendimiento de PHA mayor al 60% de su peso seco.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 2.1 Antecedentes de la investigación

Los PHA son ideales para sustituir a los plásticos sintéticos; sin embargo, se requiere investigar bacterias capaces de crecer en sustratos baratos y cuyo rendimiento en la acumulación del polímero sea aceptable. En este contexto, se aislaron bacterias productoras de PHA en muestras de suelo. El medio utilizado fue cultivo base suplementado con Rojo Nilo al 0,1% y después de la incubación a 30°C, por 48 horas, se seleccionaron las colonias bacterianas con fluorescencia naranja, bajo el transiluminador de luz UV a 340 nm. La tinción con Sudan Negro B demostró gránulos de PHA en las células de doce colonias, entre las que *Bacillus mycoides* alcanzó más de 300 mg del polímero por litro de medio de cultivo. La caracterización por cromatografía de gases identificó el Poli-(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato), con un grado de cristalinidad y punto de fusión menores al del PHB, aspectos que lo hacen más interesante para la aplicación comercial (Fernández *et al.*, 2005).

Actinomicetos acumuladores de PHA se aislaron de suelo rizosférico de *Vitis vinífera* “vid”. Las muestras se colectaron, diluyeron y sembraron en agar

avena, aislando 30 actinomicetos. La tinción con Azul Nilo identificó en tres aislados la presencia de gránulos intracelulares fluorescentes del tipo PHA. Estas bacterias fueron cultivadas 8 días a 25°C, en agitación y después se recuperó y cuantificó el polímero, determinando 27,48% en peso seco. El análisis molecular identificó el actinomiceto con el mayor rendimiento de PHA como *Streptomyces subutilus*, considerándose promisorio para la producción de PHA (Franco *et al.*, 2009).

La producción de PHA se investigó en 20 especies de *Haloarqueas*. Las bacterias fueron cultivadas a 37°C, en agitación constante (180 rpm) en medio basal sintético y medio complejo, monitoreándose el crecimiento en espectrofotómetro, a 520 y 600 nm, respectivamente. Al inicio de la fase estacionaria las células fueron teñidas con Sudan Negro B y Azul Nilo A y las colonias con Rojo Nilo fluorescentes. Se observaron gránulos de PHA en *Halococcus spp.*, *Natronococcus occultus*, *Haloarcula hispánica*, *Haloferax mediterranei* y *Halorubrum chaoviator*. Los poliésteres se caracterizaron como PHB Poli-β-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), destacando seis especies de *Halococcus* con la mayor cantidad de poliéster (Legat *et al.*, 2010).

La producción de PHA se incrementa en condiciones desfavorables. En este contexto, se obtuvieron 17 aislados bacterianos en áreas urbanas contaminadas y 13 en áreas montañosas. Las 30 bacterias fueron Gram negativas y se identificaron como *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Enterobacter*. Mediante la tinción con Sudan Negro B se demostró la presencia de gránulos de PHA y en la cuantificación, los mayores valores alcanzados con las bacterias de áreas urbanas fueron de 50,4; 40,6 y 37,9%, en comparación con 45,8; 42,4 y 37,6% de las áreas montañosas. Los genes pha C1/C2 fueron amplificados en las bacterias, obteniéndose un fragmento de 540 pares de bases, correspondiente al gen responsable de la síntesis de PHA (Razzaq *et al.*, 2010).

La concentración de PHA producido por bacterias halófilas nativas se investigó en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de *Solanum tuberosum* L. "papa". Las bacterias se aislaron de muestras de agua de salinas, las que fueron enriquecidas en caldo HM<sub>1</sub> a 30°C con 5, 10, 15, 20, 25 y 30 g/100 de NaCl. A continuación, se tomaron alícuotas y se sembraron en agar HM<sub>1</sub>. Se aislaron 203 bacterias halófilas, detectándose PHA con Sudan

Negro B en el 38,92% de las bacterias cultivadas en caldo HM<sub>2</sub> con glucosa como fuente de carbono. Los aislados con gránulos de PHA en el 70% a más del soma, fueron llevados a fermentación, alcanzándose un rendimiento  $Y$  (p/x) de 0,174 – 0,889 gg<sup>-1</sup>. En almidón de cascara de papa, los valores máximos en la concentración de PHA fueron 19,0; 15,9; 7,39 y 6,26 mgL<sup>-1</sup> después de 20, 40, 24 y 16 horas con rendimientos  $Y$  (p/x) de 10,7; 14,3; 13,2 y 9,5% respectivamente. Se demostró que las bacterias halófilas nativas producen PHA con residuos de bajo costo (Guzmán y Hurtado, 2011).

En suelos contaminados con residuos del beneficio de *Furcraea bedinghausii* “fique” se aislaron 248 colonias bacterianas, se realizaron tinciones con rojo y azul de Nilo, detección por PCR del gen *pha C* y las bacterias positivas a dichas pruebas fueron identificadas utilizando análisis filogenético de secuencias del 16S del ADN<sub>r</sub> y pruebas bioquímicas. A su vez, en cultivo sumergido con medio mínimo de sales y glucosa como fuente de carbono se obtuvo el polímero, cuya naturaleza química se determinó mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas GC-MS/SJM. El 1,6% de las bacterias presentó potencial para producir PHA, identificándose *Bacillus megaterium* (50%), *B. mycoides* (25%) y *Gordonia sp.* (25%). El gen *pha C* se detectó en *B. megaterium*, cuantificándose 63,8 - 95,3 mg g<sup>-1</sup> de PHB. Las bacterias aisladas tienen potencial para la producción de PHA a partir de residuos agroindustriales (Sánchez *et al.*, 2012).

Bacterias productoras de PHA se investigaron en lactosuero derivado de queso, melaza, cachaza y bagazo de caña de azúcar. Las bacterias se aislaron en medio mínimo de sales suplementado en 2% de glucosa y 1 µL<sup>-1</sup> de Rojo Nilo (0,1 % en acetona). Después de 72 horas, las colonias que presentaron fluorescencia al ser expuestas a un transiluminador ultravioleta de 340 nm, fueron transferidas individualmente a placas de Petri con el mismo medio para confirmar la fluorescencia y posteriormente fueron cultivadas en agar nutritivo para comprobar la fluorescencia rojo-naranja, indicativa de la producción de PHA. Se obtuvieron 38 colonias de bacterias pertenecientes a 18 morfotipos, identificándose molecularmente *Lactococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Enterococcus* en lactosuero, así como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella* y *Gluconobacter* en los subproductos de caña de azúcar. El gen *pha C* se detectó en 16 bacterias, demostrándose la posibilidad de

generar valor agregado a los residuos, utilizando bacterias productoras de PHA (Cardona *et al.*, 2013).

## 2.2 Bacterias halófilas

Las bacterias halófilas así como las halotolerantes son aquellas que se encuentran en ambientes hipersalinos; no obstante, las halófilas son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sal que en su ausencia. Es posible distinguir diferentes grupos de bacterias halófilas según los requerimientos de sal para sus actividades metabólicas. Así, las halófilas débiles, como la mayoría de los organismos marinos, requieren 3%, (p/v) de NaCl. Las halófilas moderadas presentan un crecimiento óptimo en un rango de 3 – 15%, (p/v) de NaCl y las halófilas extremas se desarrollan mejor a 25% (p/v) NaCl (Ramírez *et al.*, 2004). Entre los halófilos extremos se encuentran principalmente bacterias de la familia *halobacteriaceae*. A su vez, los halófilos moderados son filogenéticamente diversos incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, alguna de ellas metanogénicas (Castro *et al.*, 2011).

El hábitat natural de las bacterias halófilas extremas está constituido por salinas marinas y lagos hipersalinos de todo el mundo, en lugares donde la salinidad es diez veces superior al agua de mar (Ventosa, 2006). Todos los halófilos caracterizados son aerobios obligados o anaerobios facultativos, desde el punto de vista morfológico son cocos (0,2 – 2,0  $\mu\text{m}$ ) dispuestos individualmente, en parejas, tétradas o racimos en los que es difícil distinguir cada uno de los cocos y bacilos que adoptan multitud de formas: rectángulos, triángulos irregulares, discos y muchos tienen aspecto pleomórfico (Dyall, 2008). Algunos géneros son móviles mientras que otros carecen de movimiento, las colonias presentan coloración rojiza por la producción de carotenoides rosas o blancas y además poseen vacuolas de gas que les permiten flotar en la superficie. Los carotenoides están incorporados en la membrana y protegen a la célula de la acción fotooxidadora de la luz solar (Quillahuaman *et al.*, 2004; Ventosa, 2006).

La temperatura óptima de crecimiento de muchas especies halófilas es de 40 – 50°C, aunque temperaturas inferiores (37 – 42°C) son empleadas para el cultivo de estos microorganismos en el laboratorio, con el fin de incrementar la

solubilidad del oxígeno en medios de cultivo líquidos (Dyall, 2008). Los halófilos crecen bien como quimiorganótrofos, muchos tienen requerimientos nutricionales sencillos y pueden desarrollar con una fuente de carbono y energía, amonio como fuente de nitrógeno y fosfato como fuente de fósforo (Rodríguez & García, 1990). Aminoácidos como el glutamato o ácidos orgánicos como el succinato son fuentes de energía para estos microorganismos. También se ha comprobado que el glicerol producido por algas verdes como *Dunaliella* es una importante fuente de energía para los halófilos quedando así conectados los metabolismos autotróficos y heterotróficos en los medios hipersalinos (Díaz, 2007).

Diversos estudios de la composición de citoplasma de halófilos obligados muestran elevadas cantidades de sales intracelulares (4 M K<sup>+</sup>, 1 M Na<sup>+</sup>), esenciales para ser iso-osmóticos con su hábitat. Algunas bacterias halófilas no solo han desarrollado mecanismos de transporte activo de sales como la bomba electrogénica de cloro (Cl<sup>-</sup>) conducida por la luz: bacteriorodopsina, sino que además exhiben un metabolismo y una maquinaria biosintética dependiente de la sal. Con esta adaptación, los halófilos consiguen evitar la desnaturalización o precipitación de las proteínas producidas por elevadas concentraciones de sal (Ramírez *et al.*, 2004; Ventosa, 2006).

Las sales se requieren para todas las formas de vida; no obstante los microorganismos halófilos se distinguen o clasifican por el requerimiento de condiciones hipersalinas para su crecimiento: halófilos ligeros o débiles crecen con una concentración de NaCl que oscila entre 0,2 y 0,85 M (2 – 5%); los halófilos moderados, con 0,85 – 3,4 M (5 – 20%) de NaCl y los halófilos extremos con 3,4 – 5,1 M (20 – 30%) de NaCl (González y Peña, 2002). En contraste, los organismos no halófilos solo pueden crecer por debajo de 0.2 M de NaCl. Los organismos halotolerantes son aquellos que habitualmente viven mejor sin sal; no obstante, admiten cierta concentración en su medio ambiente, pudiendo crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal (Meseguer, 2004), con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y los factores nutricionales (Das Sarma y Arora, 2001).

Los microorganismos halófilos tienen dos estrategias diferentes para desarrollarse en los ambientes extremos, la primera consiste en la acumulación



citoplasmática de solutos compatibles (glicerol, ectoína o sacarosa), propios de las bacterias halófilas y en la segunda estrategia se acumulan sales inorgánicas en el citoplasma, como en el caso de las haloarqueas (Díaz, 2007). Las bacterias halófilas ofrecen muchas aplicaciones en la biotecnología, por su diversidad metabólica en la síntesis de diversos tipos de bacteriorodoxinas, solutos compatibles, biopolímeros, biosulfactantes y exopolisacaridos (Margesin & Schinner, 2001). Algunas bacterias halófilas: *Halomonas boliviensis* y *Haloferax mediterranei* acumulan grandes cantidades de polihidroxialcanoatos, que se investigan intensamente para su producción a gran escala (Quillahuaman *et al.*, 2008).

### **2.3 Polihidroxialcanoatos**

Los plásticos biodegradables pueden ser divididos en tres categorías, los sintetizados químicamente, los que contienen amidas adicionadas a su estructura y los polihidroxialcanoatos (PHA). Entre los primeros están los ácidos poliglicólicos o ácidos poliláctico–alcohol polivinílico y la poli-e-caprolactona, que son susceptibles a la degradación microbiana, pero su aplicación comercial es reducida porque no presentan propiedades mecánicas como los plásticos de origen petroquímico. En el segundo grupo están los plásticos que tienen un grupo amida como agente de carga o ligando, ejemplo, el amido-polietileno y los microorganismos degradan fácilmente la amida quebrando la matriz polimérica; sin embargo, algunos de los fragmentos de estos polímeros permanecen en el ambiente por largos periodos. Los PHA pertenecen al tercer grupo, son de origen microbiano, totalmente biodegradables, con características semejantes a los petroplásticos y pueden ser producidos a partir de recursos renovables (De Almeida *et al.*, 2004; Dantas, 2005).

Estructuralmente los PHA son polímeros lineales de (R)–3–hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del siguiente monómero. El radical R puede ser un átomo de hidrógeno o una cadena de hasta trece átomos de carbono, que puede contener insaturaciones, cadenas cíclicas, grupos aromáticos e incluso otros átomos como bromo, flúor o cloro. La naturaleza del radical R determina la identidad de la unidad monomérica y junto con el valor de x (que puede variar de 600 a

35 000) las propiedades del polímero. Se han identificado más de 100 unidades monoméricas como constituyentes de estos poliésteres (Dantas, 2005).

Según la composición de los monómeros en la cadena, los PHA pueden ser clasificados en homopolímeros (un tipo de monómero) y copolímeros (más de un tipo de monómero). Dependiendo del número de átomos de carbono presentes en la cadena de un monómero, se consideran dos clases: PHA de cadena corta (3 a 5 átomos de carbono) o PHA – SCL (short chain length), con ácidos 3-hidroxibutírico (3HB) y 3-hidroxisovalérico (3HV) y polímeros de cadena media (6 – 14 átomos de carbono) o PHA – MCL (médium chain length), que contienen monómeros de C6(3-hidroxihexanoato) a C14(3-hidroxitetradecanoato). Los PHA de cadena corta son producidos por *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *A. chroococcum* y *Methylobacterium organophilum* entre otros, mientras que los PHA de cadena media son encontrados en *Pseudomonas oleovorans*, *P. aeruginosa* y otras *pseudomonas* fluorescentes (Dantas, 2005; Ávila, 2007).

La masa molecular de los PHA varía dependiendo del microorganismo productor, siendo en promedio de 50 000 - 1 000 000 Da ( $2 \times 10^3$  a  $3 \times 10^6$  Da). Las propiedades físicas y mecánicas como rigidez, ductilidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y resistencia a los solventes orgánicos varían considerablemente, en función de su composición monomérica. Los polímeros de cadena corta son duros y quebradizos, mientras que los de cadena media son flexibles y tienen un punto más bajo de cristalinidad, por lo que cada polímero tiene diferentes aplicaciones. Los PHA de cadena media, por tener cristalinidad y punto de fusión menores son reconocidos como elastómeros. Los PHA de cadena corta tienen un elongamiento para ruptura menor que 5%. La incorporación de unidades de valerianatos (ésteres del ácido pentanoico, 3HV) al P3HV permite aumentar la flexibilidad y resistencia al impacto, alcanzándose 50% en elongamiento para ruptura (Ávila, 2007).

Las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) y de transición vítrea ( $T_g$ ) de los PHA, están íntimamente relacionadas con la estructura de los monómeros y la cantidad de comonómeros en los copolímeros. Su temperatura de fusión parcial es superior a los 180°C y se tornan alternamente viscosos y moldeables en temperaturas cercanas o mayores a su punto de fusión. De esta misma manera, la temperatura de fusión y de transición vítrea se incrementan conforme aumenta

la masa molecular, en el caso de los PHA de bajo peso molecular, pero el comportamiento se invierte en los PHA con elevado peso molecular. Los homopolímeros como el PHB son materiales muy cristalinos y rígidos, pero los heteropolímeros de hidroxibutirato–hidroxivalerato son dúctiles y resistentes. La adición de monómeros de hidroxivalerato disminuye el punto de fisión, pero aumenta su biodegradabilidad. Los copolímeros PHBV se forman cuando se utilizan mezclas de sustratos como glucosa y valerato (Hermida y Díaz, 2004; Dantas, 2005).

Las dos clases de PHA más comunes son el homopolímero polihidroxibutirato P(3HB) y el copolímero de polihidroxibutirato y polihidroxivalerato conocido como polihidroxibutirato-valerato (PHBV). El P(3HB), presenta unidades repetidas de ácido 3-hidroxibutírico, todas en la configuración D(-), debido a la estereospecificidad de las enzimas involucradas en la síntesis, lo que lo hace totalmente cristalino y frágil. La masa molecular del P(3HB) bacteriano varía entre  $10^3$  a  $3 \times 10^8$  Da, con una polidispersidad en torno a 2. Las densidades del polímero amorfo y cristalino respectivamente son de 1,18 y 1,26 gcm<sup>-3</sup>. Es soluble en cloroformo y en hidrocarburos halogenados, con poca resistencia frente a los ácidos y las bases pero es muy resistente a la radiación ultravioleta (Hermida y Díaz, 2004; Dantas, 2005; Ávila, 2007).

## **2.4 Biosíntesis de polihidroxialcanoatos**

Los PHA son producidos por una gran variedad de procariotas, siendo acumulados en forma de gránulos en el citoplasma, visibles al microscopio óptico de contraste de fases debido a su elevada refractividad. Las bacterias aerobias, anaerobias, heterótrofas y fotosintéticas acumulan PHA. Las bacterias nitrificadoras en particular, acumulan estos polímeros como estrategias de supervivencia y de regulación del metabolismo energético tanto en simbiosis como en vida libre (Dantas, 2005).

La acumulación de PHA se ha detectado en cerca de 300 especies bacterianas; sin embargo, el porcentaje de acumulación en muchas de ellas es muy bajo, por lo cual se rechazan ante la imposibilidad de industrializar el proceso. Especies como *Cupriavidus necator*, *Methylobacterium* spp., *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans*, *P. putida*, *P. denitrificans*, *P. aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Halomonas boliviensis*, *Azospirillum*

*brasiliense*, *Escherichia coli* recombinante y *Azotobacter vinelandii* han sido investigadas ampliamente (Barbosa, *et al.*, 2005). También son consideradas algunas especies de los géneros *Agrobacterium*, *Actinobacillus*, *Mesorhizobium*, *Rhodobacter*, *Methylocystis*, *Leptothrix*, *Rhizobium*, *Halomonas* y *Sphaerotilus* (Ávila, 2007; Guzmán & Guzmán, 2008).

Existen géneros de bacterias que sintetizan el polímero únicamente en la fase estacionaria de crecimiento, por limitación de un nutriente en presencia de una fuente de carbono en exceso, por ejemplo: *C. necator*, *P. oleovorans*, *Azotobacter beijerinckii* y *Azospirillum brasiliense*. Otras bacterias acumulan PHA durante su crecimiento, sin necesidad que se agote un nutriente esencial, ejemplo: *Mesorhizobium plurifarum*, *Alcaligenes latus*, *P. putida*, *Haloferax mediterranei*, *Azotobacter chroococcum*, los mutantes de *Azotobacter vinelandii* y las cepas recombinantes de *E. coli* (Lasala *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006).

La biosíntesis de P(3HB) o de otros PHA se inicia con el transporte facilitado y difusión pasiva de una fuente de carbono hacia el citoplasma para ser convertida en un tioéster (coenzima A) de un hidroxialcanoico, que puede ser utilizado como sustrato por la PHA sintetasa y a través de varios caminos anabólicos o catabólicos se forma un poliéster por acción de la enzima sintetasa. Independientemente de la fuente de nutrientes utilizada, la síntesis de PHA depende de la formación de acetil-CoA, un intermediario en las vías degradativas de los carbohidratos del ciclo de Krebs. Durante el crecimiento vegetativo, el acetil CoA sigue el ciclo del ácido tricarboxílico y es oxidado hasta dióxido de carbono y agua, generando energía en forma de ATP y GTP. En ausencia de restricciones nutricionales, el nivel de CoASH se incrementa y el acetil-CoA sigue el ciclo de Krebs. Cuando el crecimiento es limitado por los nutrientes el nivel de CoASH se reduce y se favorece la síntesis de PHA (Dantas, 2005).

Los gránulos de PHA tienen un diámetro típico de 0,1 - 0,8  $\mu\text{m}$  y poseen una membrana como cobertura de cerca de 2 nm de grosor, compuesta por lípidos y proteínas, representando el 0,5 - 2% del peso del gránulo. Parece que el número de gránulos por célula es fijado en los estados tempranos de la acumulación del polímero y durante la acumulación, la célula pierde su conformación típicamente cilíndrica para acomodar al polímero adicional, hasta el punto en que la síntesis de PHA disminuye. El cese en la acumulación del polímero puede deberse a la

cantidad acumulada, puesto que una vez alcanzado su porcentaje máximo de reserva, la PHA polimerasa permanece activa, lo que sugiere que una constricción física opera e impide que la célula acomode más polímero dentro de ella, a pesar de la disponibilidad de sustrato y de la polimerasa activa (Dong *et al.*, 2006).

La formación de los gránulos sigue cuatro pasos: a) La polimerasa soluble actúa en concentraciones cada vez mayores de 3-hidroxibutiril-CoA en el citoplasma, durante la fase log, los oligómeros de hidroxibutiril (HB) son formados y se mantienen unidos con la enzima. b) Los oligómeros de HB forman micelas aumentan en tamaño e hidrofobicidad. Consecuentemente estas películas proveen una unión de dos fases, con la polimerasa en la interface. c) La enzima procede rápidamente con la síntesis de P(3HB) dentro del gránulo en crecimiento, lo cual precisa de una superficie disponible. d) Eventualmente las micelas coalescen formando grandes gránulos que pueden ser fácilmente visualizados en el microscopio de contraste de fases (Ávila, 2007).

Entre las bacterias utilizadas para la producción a gran escala de PHA están *C. necator*, *Pseudomonas oleovorans*, *Azospirillum brasilense*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, algunos metilótrofos y *E. coli* recombinante. Cada bacteria requiere condiciones de crecimiento específicas para la síntesis de PHA, pero pueden ser considerados dos grupos: uno que requiere condiciones limitantes de algún nutriente esencial como carbono o nitrógeno para incrementar la eficiencia de la producción de PHA, por ejemplo *C. necator*, *P. oleovorans* y algunos metilótrofos y un segundo grupo conformado por los que no requieren estas condiciones y acumulan PHA durante el crecimiento, por ejemplo *Azotobacter vinelandii*, *Alcaligenes latus* y *E. coli* recombinante (Franco *et al.*, 2009).

Los procesos para la producción de PHA se realizan en su mayoría en fermentación sumergida, principalmente en cultivos alimentados o fedbatch, obteniendo una elevada concentración de biomasa, necesaria para una elevada productividad, que conduce la formación del polímero. Las fermentaciones continuas permiten una alta productividad, pero sólo cuando el cultivo puede ser mantenido estable sin contaminación. Los estudios en fermentadores muestran

la influencia del tipo y concentración de la fuente de carbono así como de los niveles de aireación sobre el éxito productivo (Ávila, 2007; Franco *et al.*, 2009).

La estrategia actual en la producción de PHA es realizar lotes alimentados o fedbatch para alcanzar elevadas densidades celulares en una primera etapa, evitando además la posible inhibición por el sustrato. En una segunda etapa se reducen, los niveles de suministro de oxígeno (o se fuerza otra condición de estrés apropiada) para acumular el producto, mientras que la concentración de biomasa permanece constante. Existen dos procesos para producir PHA. El proceso en paralelo se ha demostrado en *Rhodospirillum rubrum*, *P. oleovorans*; sin embargo, durante el crecimiento celular parte del polímero formado inicialmente se pierde debido a que se utiliza como sustrato en el mantenimiento del metabolismo celular. En el proceso en serie, las bacterias como *C. necator* se cultivan con una fuente de carbono para obtener biomasa celular y luego se elimina un nutriente esencial en el medio, a la vez que se añade un sustrato para la formación del polímero (De Almeida *et al.*, 2004; Dantas, 2005).

Aunque la fermentación sumergida es la más generalizada para la producción de PHA, la fermentación en estado sólido (FES) es una alternativa viable. Es un proceso caracterizado por la ausencia total de agua libre en el material sólido impregnado con el medio de crecimiento microbiano. En muchos casos el sustrato sirve también de soporte para el crecimiento de los microorganismos. Las bacterias y levaduras desarrollan en la superficie del material sólido y los hongos filamentosos colonizan inclusive el interior (Dantas, 2005).

Una de las ventajas de la fermentación en estado sólido, FES, es la posibilidad de la utilización de fuentes de nutrientes de bajo costo como los subproductos o residuos agroindustriales. Asimismo, la purificación de los productos se facilita por estar más concentrados en medios sólidos. Los sustratos utilizados en FES pueden ser divididos en tres grupos, según el compuesto principal que constituye la fuente de carbono: los que presentan almidón (arroz, camote, yuca), los que presentan celulosa o lignocelulosa (maderas) y los que tienen azúcares solubles como fuentes de carbono, mencionándose el forraje y pulpa de frutas (Dantas, 2005; Dong *et al.*, 2006).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Material biológico**

Bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas.

##### **3.1.2 Población y muestra de estudio**

La población estuvo constituida por las bacterias halófilas productoras de PHA presentes en suelo y agua de las salinas en el distrito de Mórrope y como muestra se investigaron las bacterias aisladas de 54 unidades de muestreo, colectadas en agosto – octubre de 2014. El número de muestras fue calculado según la formula mencionada por Alvitres, 2000 (Anexo 1), con una prevalencia de 90%, determinada por los autores en un muestreo piloto.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables en estudio**

Independiente: Bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas.

Dependiente: Rendimiento de PHA.

### **3.2.2 Tipo de estudio y contrastación de hipótesis**

El trabajo de investigación fue descriptivo y transeccional (Hernández *et al.*, 2010) y para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla de Goode y Hatt (1986), mencionado por Vásquez *et al.* (2012).

### **3.2.3 Lugar de muestreo**

En las salinas de Mórrope (Figuras 1, 2,3), se obtuvieron 54 muestras de suelo y agua. El distrito de Mórrope está a 23 msnm, 6°31'44'' y 6°32'17'' de latitud sur y 80°00'38'' y 80°00'50'' de longitud oeste del Meridiano de Greenwich. Limita por el norte con el Puerto de Bayovar en Piura, por el sur con las Pampas de Salitre en Lambayeque, por el este con la carretera Panamericana Norte y por el Oeste con el Océano Pacífico (INDECI, 2004).

### **3.2.4 Obtención de muestras de suelo y agua**

Las muestras de suelo y agua se colectaron en las salinas y alrededores y se depositaron en frascos de vidrio de boca ancha, previamente esterilizados e identificados convenientemente. Las muestras de suelo se colectaron con una espátula (Figura 4), retirando los 5 cm superficiales y colectando 250 g, que fueron depositados en frascos de vidrio. A su vez, para colectar las muestras de agua, los frascos tapados e invertidos fueron sumergidos en las salinas hasta 10 cm por debajo de la superficie, después se destaparon, se colectaron 250 mL de agua y se taparon herméticamente (Figura 4). Las muestras de suelo y agua se depositaron en una caja térmica ( $10 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) y se transportaron al laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Figuras 5, 6).

En simultáneo a la toma de muestras para el aislamiento de bacterias halófilas, se colectó una muestra compuesta de 1 kg de suelo y 1 L de agua, para determinar el contenido de NaCl y la conductividad eléctrica en el laboratorio de análisis de suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Según los resultados el contenido promedio de NaCl fue de 27.9% y la conductividad eléctrica de  $558 \text{ dSm}^{-1}$  (Anexo 2).





**Figura 1.** Ubicación geográfica de la zona de muestreo correspondiente al distrito de Mórrope, provincia de Lambayeque, región Lambayeque, 2014 (<https://maps.google.com.pe/>).



**Figura 2.** Entrada a las salinas del distrito de Mórrope en la región Lambayeque, 2014 (<https://maps.google.com.pe/>).



**Figura 3.** Salina del distrito de Mórrope en la región Lambayeque, 2014.



**Figura 4.** Toma de muestra de suelo de las salinas de Mórrope.





**Figura 5.** Muestras de suelo y agua de salinas acondicionadas para su transporte.



**Figura 6.** Muestras de agua de salinas de Mórrope.

### **3.2.5 Enriquecimiento de bacterias de muestras de suelo y agua**

Las bacterias de las muestras de suelo y agua se enriquecieron, depositando 1g o 1mL en tubos de 15 x 150 mm conteniendo 9 mL de caldo HM<sub>1</sub> modificado por los autores con 15, 20 y 25% de NaCl (Figuras 7, 8, anexo 3). Las muestras se incubaron a 30° C, por tiempo suficiente, para observar crecimiento, denotado por turbidez o formación de película en la superficie del caldo (Figura 9).

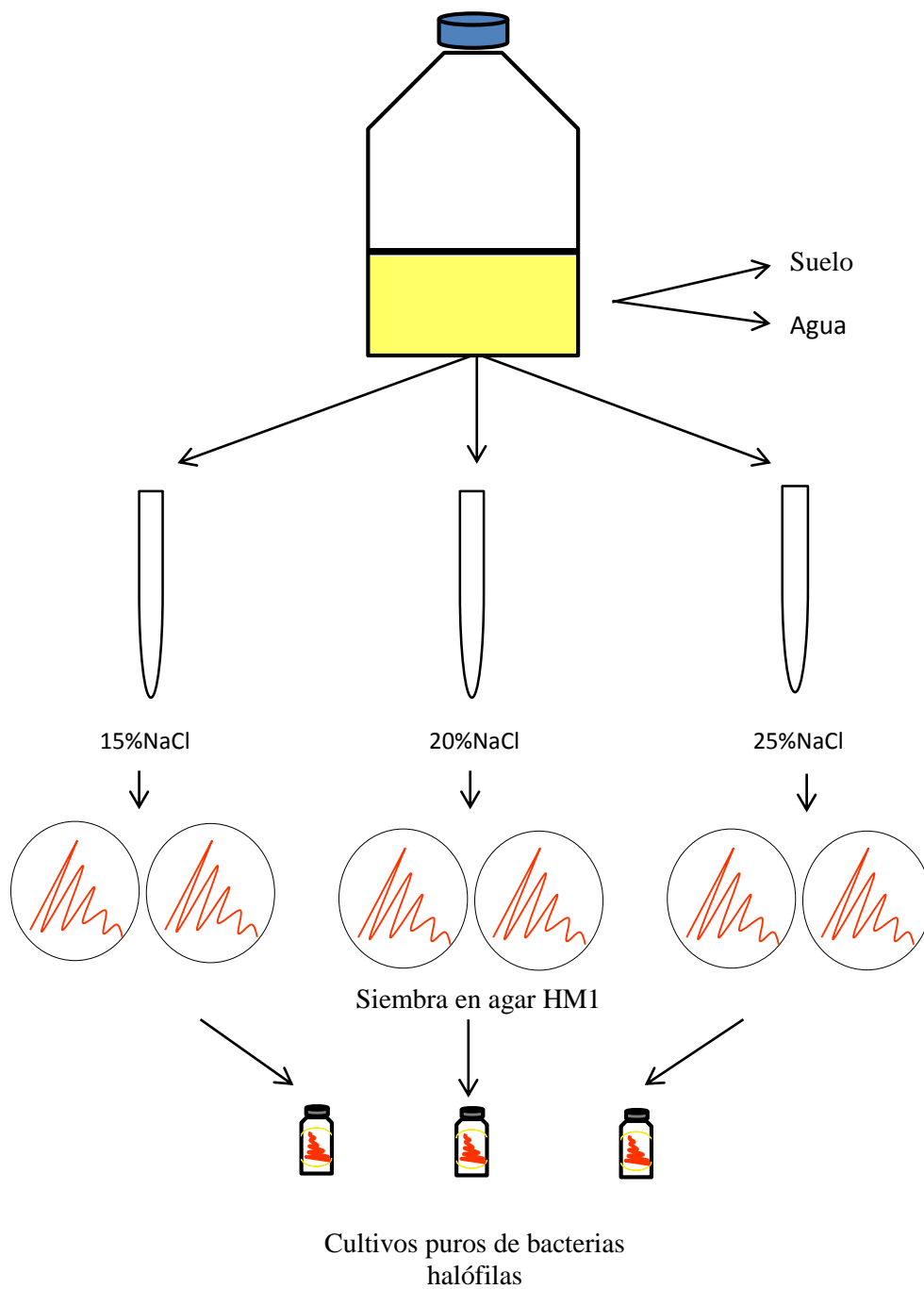
### **3.2.6 Aislamiento de bacterias halófilas**

En cada muestra de suelo y agua con bacterias previamente enriquecidas, se tomaron alícuotas y se sembraron por duplicado en agar HM<sub>1</sub>, con su correspondiente concentración de NaCl, incubándose a 30°C, en aerobiosis por tiempo suficiente hasta observar el crecimiento de colonias (Figura 10, anexo 3). Éstas se caracterizaron macroscópicamente, registrando la textura y el color; se cultivaron por duplicado en viales con el mismo agar de procedencia (Figura 11), se incubaron a 30°C, en aerobiosis, hasta observar crecimiento y se llevaron a refrigeración (8°C).

### **3.2.7 Detección de gránulos de PHA en bacterias halófilas**

Las bacterias halófilas fueron cultivadas en 5mL de caldo HM<sub>2</sub> (Figuras 12, 13), a 30°C, en aerobiosis. A continuación, según Guzmán y Hurtado (2011) se tomaron alícuotas, se sembraron en tubos con 5 mL de caldo HM<sub>2</sub>, se incubaron a 30°C, en aerobiosis y agitación constante (125 rpm), por 144 horas. Posteriormente, se realizaron tinciones con Sudan Negro B (Figuras 14, 15, anexo 4). La presencia de gránulos negros o grisáceos en el interior de células rosadas se consideró positiva para la detección de PHA (Baca & Sánchez, 2010). Se cuantificó el número de células con gránulos en cinco campos microscópicos por bacteria halófila y se seleccionaron las 20 bacterias que presentaron mayor número de células con gránulos por campo.

Las bacterias seleccionadas se cultivaron nuevamente en 5 mL de caldo HM<sub>2</sub>, a 30 °C, en aerobiosis, con agitación constante y se realizaron tinciones con Sudan Negro B a las 144, 168, 192 y 216 horas, determinándose el tiempo optimo o tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células bacterianas con gránulos.



**Figura 7.** Flujograma del proceso de aislamiento de bacterias halófilas en suelo y aguas de salina.



**Figura 8.** Enriquecimiento de muestra de bacterias de suelo en caldo HM<sub>1</sub>.



**Figura 9.** Bacterias halófilas enriquecidas en caldo HM<sub>1</sub>.





**Figura 10.** Colonias de bacterias halófilas desarrolladas en agar HM<sub>1</sub>.



**Figura 11.** Cultivo de bacteria halófila en agar HM<sub>1</sub>.



**Figura 12.** Caldo HM<sub>2</sub> para el cultivo de bacterias halófilas.



**Figura 13.** Caldo HM<sub>2</sub> cultivado con bacterias halófilas.





**Figura 14.** Toma de muestra de cultivo bacteriano para tinción con Sudan Negro B.



**Figura 15.** Tinción con Sudán Negro B, (a) adición del colorante, (b) decoloración, (c) tinción con safranina, (d) lavado.

### **3.2.8 Selección de bacterias halófilas según el número de células con gránulos**

Los 20 cultivos de bacterias halófilas con el mayor número promedio de células con gránulos de PHA, se seleccionaron para determinar el rendimiento.

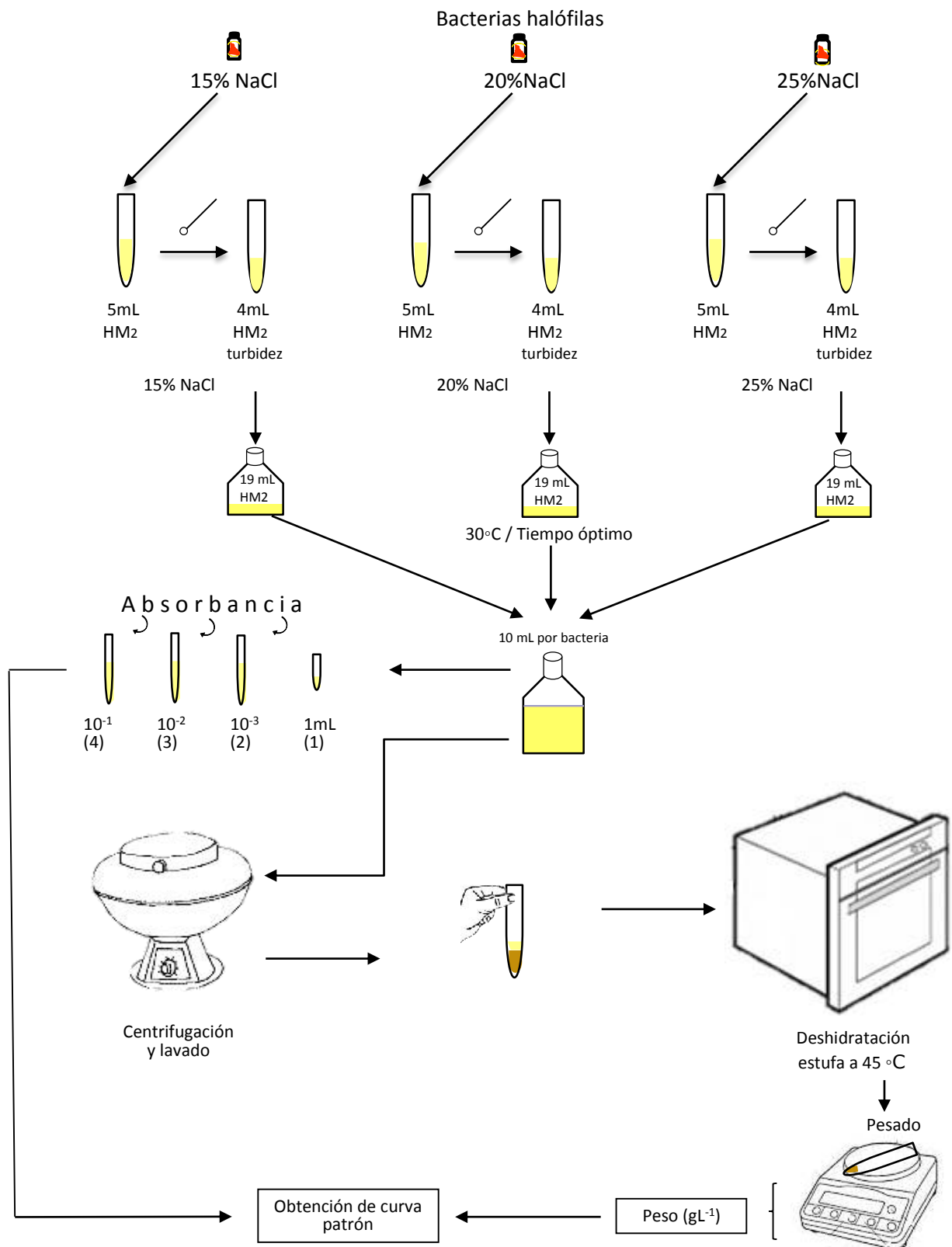
### **3.2.9 Rendimiento de polihidroxicanoatos de bacterias halófilas nativas**

Con las 20 bacterias halófilas seleccionadas, se determinó la concentración de biomasa. Para determinar la naturaleza, absorbancia y concentración del polímero producido, se seleccionaron las cinco bacterias cultivadas con la mayor concentración de NaCl y el mayor número de células con gránulos en el menor tiempo óptimo.

#### **a. Obtención de la curva patrón para la cuantificación de la biomasa**

Para cuantificar la biomasa por turbidimetría a 600 nm ( $DO_{600}$ ) según la metodología de Guzmán & Hurtado (2011), modificada por los autores (Figura 16), cada bacteria halófila reactivada en 5 mL de caldo HM<sub>2</sub> fue cultivada en 4 mL del mismo caldo por el tiempo requerido para observar turbidez y luego se inoculó (5%) en frascos de 100 mL de capacidad con 19 mL de caldo HM<sub>2</sub> (Figuras 17, 18), a 30°C, durante el tiempo óptimo previamente determinado y se tomaron submuestras de 10 mL de cada cultivo, totalizando 200 mL. A continuación, se tomaron por triplicado 2 mL, uno para determinar la absorbancia a 600 nm (tubo 1) y otro para realizar diluciones decimales hasta  $10^{-3}$  (tubos 2, 3, 4), a los que también se determinó su absorbancia (Figuras 19, 20). Los 194 mL restantes de caldo HM<sub>2</sub> se centrifugaron a 4000 rpm, durante 20 minutos. El sedimento o biomasa se lavó rápidamente con solución salina (0,85% NaCl) esterilizada, se centrifugó y deshidrató a 45°C, hasta obtener peso constante.

La biomasa deshidratada se pesó y el valor obtenido se expresó en gramos por litro ( $g\cdot L^{-1}$ ), correspondiendo a la absorbancia de tubo 1. Asimismo, el valor de la biomasa se dividió entre 10, 100 y 1000, correspondiendo a la absorbancia de los tubos 2, 3 y 4 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ). Con los valores obtenidos se determinó la ecuación de regresión, para calcular la biomasa de cada bacteria nativa.



**Figura 16.** Flujograma del proceso de obtención de curva patrón para la cuantificación de biomasa por turbidimetría.



**Figura 17.** Inoculación de bacterias halófilas en caldo HM<sub>2</sub>.



**Figura 18.** Bacterias halófilas cultivadas en caldo HM<sub>2</sub> para obtener la curva patrón.





**Figura 19.** Caldo HM<sub>2</sub> cultivado con bacterias halófilas y sus diluciones para obtener la curva patrón.



**Figura 20.** Lectura de absorbancia en espectrofotómetro con luz visible.

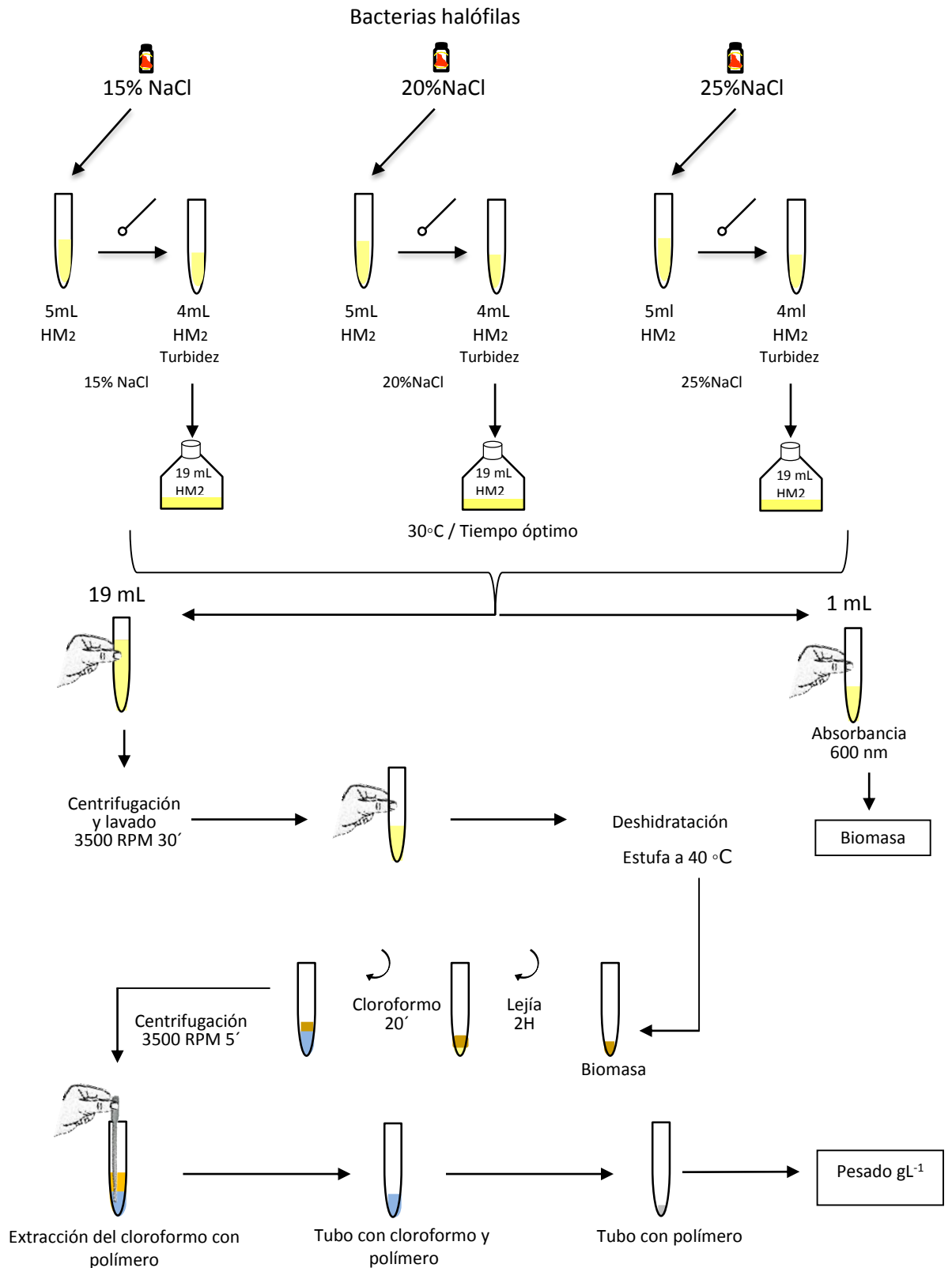
### **b. Proceso fermentativo**

En el proceso fermentativo, según Guzmán & Hurtado (2011), cada bacteria halófila productora de PHA seleccionada, se cultivó en 5 mL de caldo HM<sub>2</sub>, a 30°C, por tiempo suficiente hasta observar crecimiento denotado por turbidez (Figura 21). Para la obtención del inóculo bacteriano, se tomó una alícuota de cada tubo y se cultivó en 4 mL de caldo HM<sub>2</sub>, por tiempo suficiente para observar turbidez. A continuación, 1 mL (5%) se inoculó por triplicado en frascos de 100 mL de capacidad con 19 mL de caldo HM<sub>2</sub> (Figura 22) y se incubó a 30°C, por el tiempo óptimo requerido para alcanzar el mayor número de células bacterianas con gránulos previamente determinado. Posteriormente, se cuantificó la biomasa y PHA producidos.

### **c. Determinación de la concentración de biomasa y PHA**

La concentración de biomasa de cada bacteria fue determinada por turbidimetría cada 24 horas durante 5 días después de observar turbidez por crecimiento bacteriano. Se tomó 1 mL de cada cultivo y se registró la absorbancia a 600 nm (Figura 23). Los valores de biomasa se calcularon en la ecuación de regresión de la curva patrón entre absorbancia y biomasa seca, previamente obtenida.

Para cuantificar el PHA los 19 mL restantes de caldo se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 minutos (Figura 24). El sedimento o biomasa celular (Figuras 25, 26) obtenida se lavó rápidamente con solución salina (0,85% NaCl) para eliminar el exceso de sales, se centrifugó y se deshidrató en estufa a 42°C, hasta obtener un peso constante, el cual se determinó con una balanza analítica. Con la biomasa, se recuperó el PHA producido por cada bacteria. Según el protocolo de Law & Slepecky (1961), mencionado por Cholula (2005), en el tubo que contenía la biomasa deshidratada se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio al 5%, para debilitar la membrana celular y facilitar el proceso de extracción y después de 2 horas, se adicionó 1 mL de cloroformo para separar la biomasa del polímero (Figura 27). Se observaron dos fases: una inferior transparente y una superior amarillenta. Transcurridos 20 minutos, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm, durante 5 minutos y nuevamente se obtuvieron dos fases, una superior constituida por hipoclorito con restos celulares y una inferior conteniendo el cloroformo con el polímero, PHA.



**Figura 21.** Flujograma de proceso de obtención de biomasa y PHA.





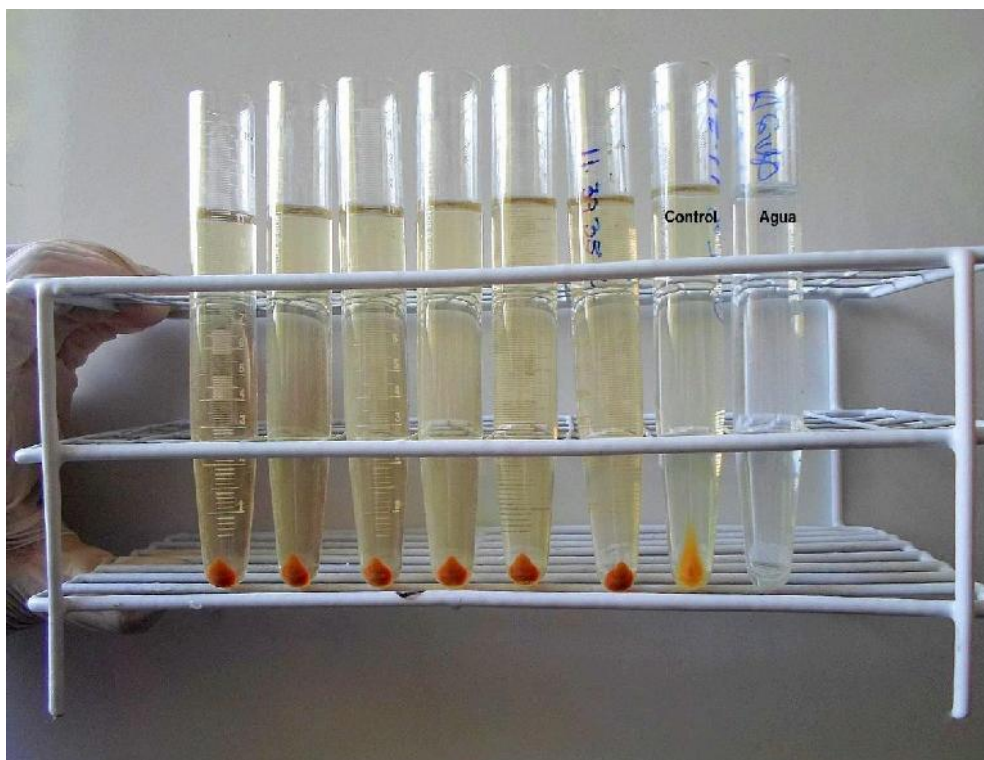
**Figura 22.** Bacterias halófilas cultivadas en caldo HM<sub>2</sub>.



**Figura 23.** Lectura de absorbancia de caldo HM<sub>2</sub> cultivado con bacteria halófila.



**Figura 24.** Centrifugación de caldo HM<sub>2</sub> cultivado con bacteria halófila.

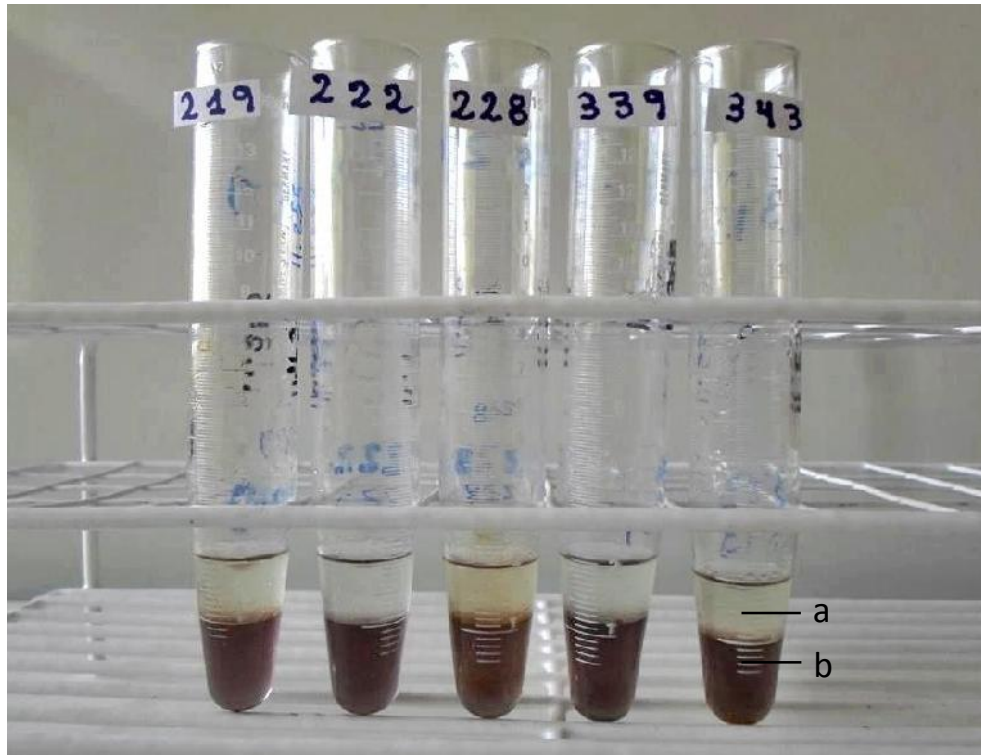


**Figura 25.** Biomasa de bacterias halófilas en caldo HM<sub>2</sub> centrifugado.





**Figura 26.** Biomasa de bacterias halófilas obtenida después de centrifugación y decantación.



**Figura 27.** Observación de dos fases en biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio (a) y cloroformo (b).

Con una pipeta Pasteur se extrajo el cloroformo con el polímero, se depositó en un tubo de 10x100 mm, previamente pesado ( $P_i$ ) y se llevó a estufa a 40°C, por tiempo suficiente para la evaporación del cloroformo. El tubo conteniendo el PHA se pesó ( $P_f$ ) en una balanza analítica y la diferencia del peso final ( $P_f$ ) menos el peso inicial ( $P_i$ ) constituyó el PHA obtenido.

Para verificar la naturaleza del polímero las muestras se diluyeron en 1,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 80%, se calentaron por 30 minutos a 90°C en baño María, se enfriaron a temperatura ambiente (28 °C), se depositaron en celdas de cuarzo y se realizó un “barrido” en el espectrofotómetro de luz ultravioleta UNICO S-2150, en el rango de 220 a 250 nm. La absorbancia de un pico máximo de 235 nm se consideró positiva para el PHA. A continuación, se leyó la absorbancia de cada muestra de PHA a 235 nm (Anexo 5).

#### **d. Cálculo del rendimiento de PHA**

El  $Y_{p/x}$  o coeficiente de rendimiento de producto en relación a la biomasa o cantidad del producto obtenido por cantidad de biomasa formada ( $gg^{-1}$ ), se calculó dividiendo los gramos de PHA entre los gramos de biomasa según Dorán (1998).

$$Y_{p/x} = \frac{P - P_0}{X - X_0} = \frac{P}{X}$$

### **3.3 Análisis de los datos**

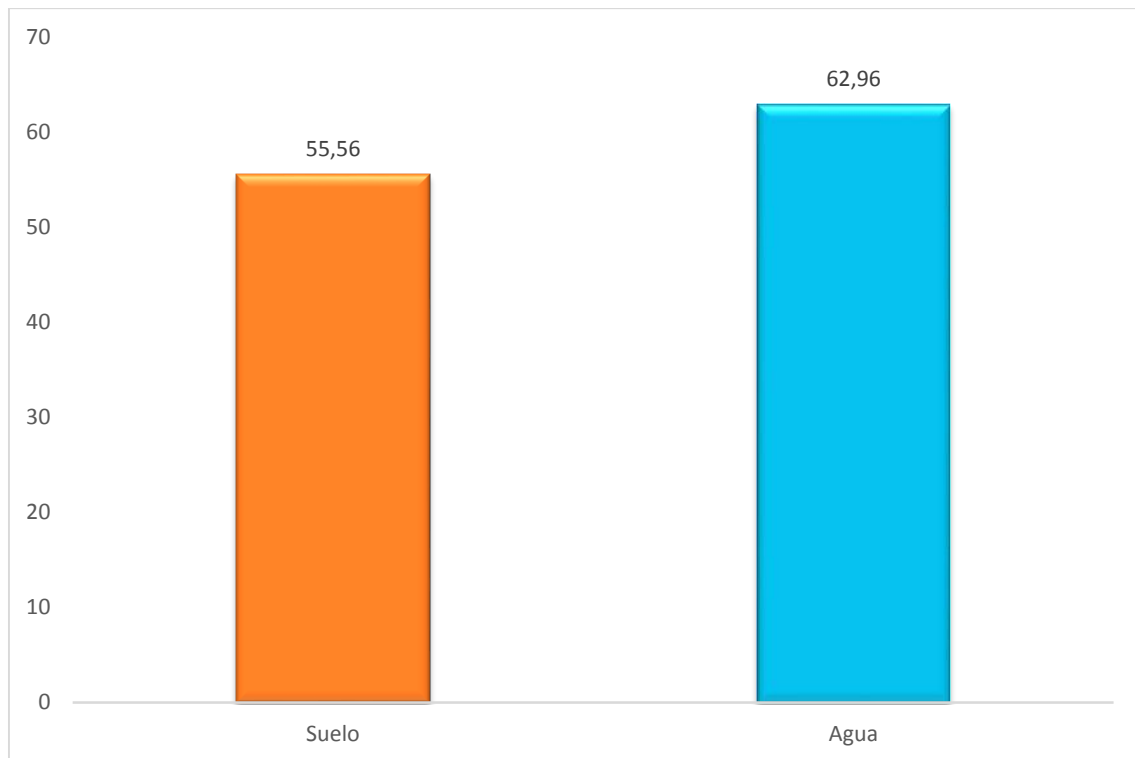
Los valores de la concentración de biomasa, PHA y rendimiento de las bacterias se ordenaron en tablas y figuras que permitieron diferenciar la cinética de la producción, durante un determinado tiempo. Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Microsoft Office Excel 2013.

## **IV. RESULTADOS**

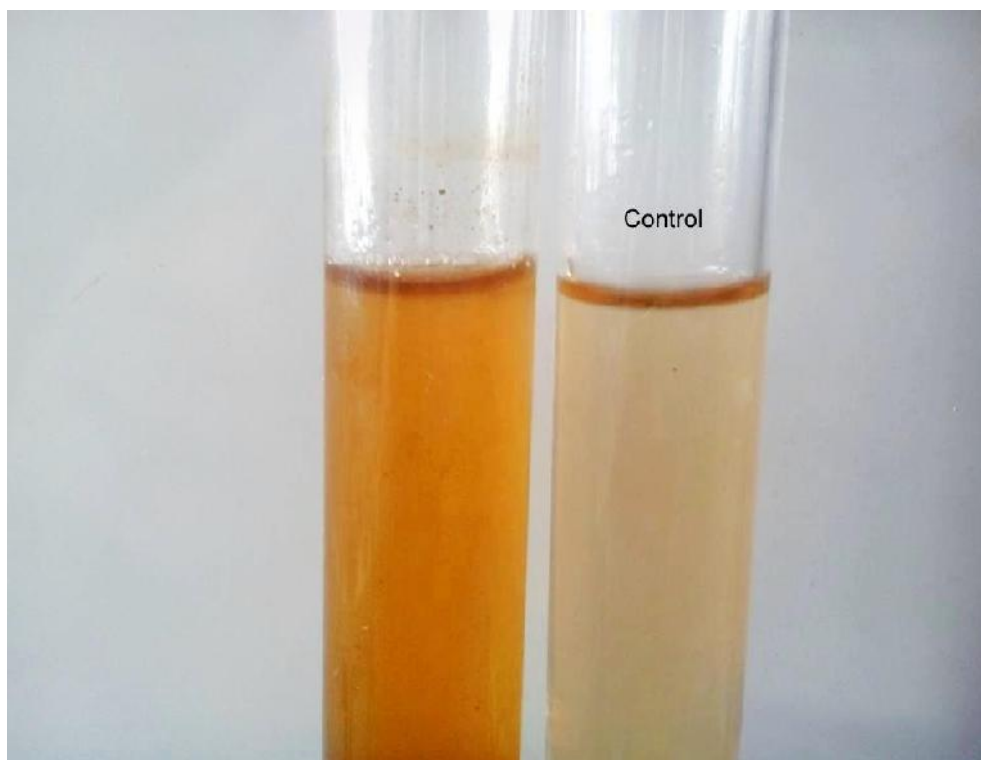
### **4.1 Bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas de Mórrope, Lambayeque 2014**

El 55,56% (15) de muestras de suelo y 62,96% (17) de muestras de agua de salinas de Mórrope fue positivo para el enriquecimiento de bacterias (Figura 28), cuyo crecimiento se evidenció por turbidez (53,13%), película blanquecina superficial (38,38%) y coloración anaranjado – rojiza (Figuras 29, 30, 31) del caldo HM<sub>1</sub> con 15, 20 y 25% de NaCl, en un tiempo que osciló entre 9 a 14 días para las muestras de suelo (Tabla 1) y 10 a 14 días en las muestras de agua (Tabla 2).

El 44,44% (12) de muestras de suelo y 59,26% (16) de muestras de agua de salinas de Mórrope fue positivo para el aislamiento de bacterias halófilas en 15, 20 y 25% NaCl, obteniéndose 234 aislados bacterianos: 38,46% (90) provenientes de muestras de suelo y 61,54%(144) de muestras de agua (Figuras 32, 33). Las colonias de bacterias halófilas observadas fueron de consistencia mucosa y pastosa, con diversos colores (Figura 34).



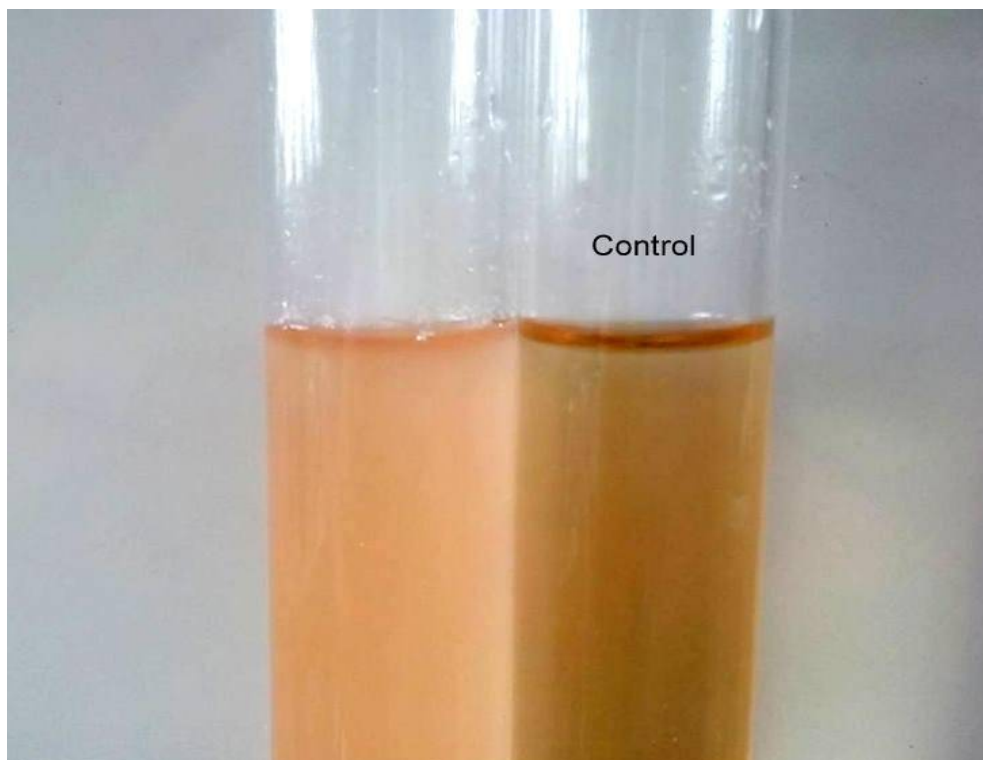
**Figura 28.** Porcentaje de muestras de suelo y agua positivas al enriquecimiento de bacterias halófilas en caldo HM<sub>1</sub>.



**Figura 29.** Turbidez por crecimiento de bacterias halófilas en caldo HM<sub>1</sub>.



**Figura 30.** Película superficial blanquecina de bacterias halófilas en caldo HM<sub>1</sub>.



**Figura 31.** Coloración anaranjado - rojizo por crecimiento de bacterias halófilas en caldo HM<sub>1</sub>

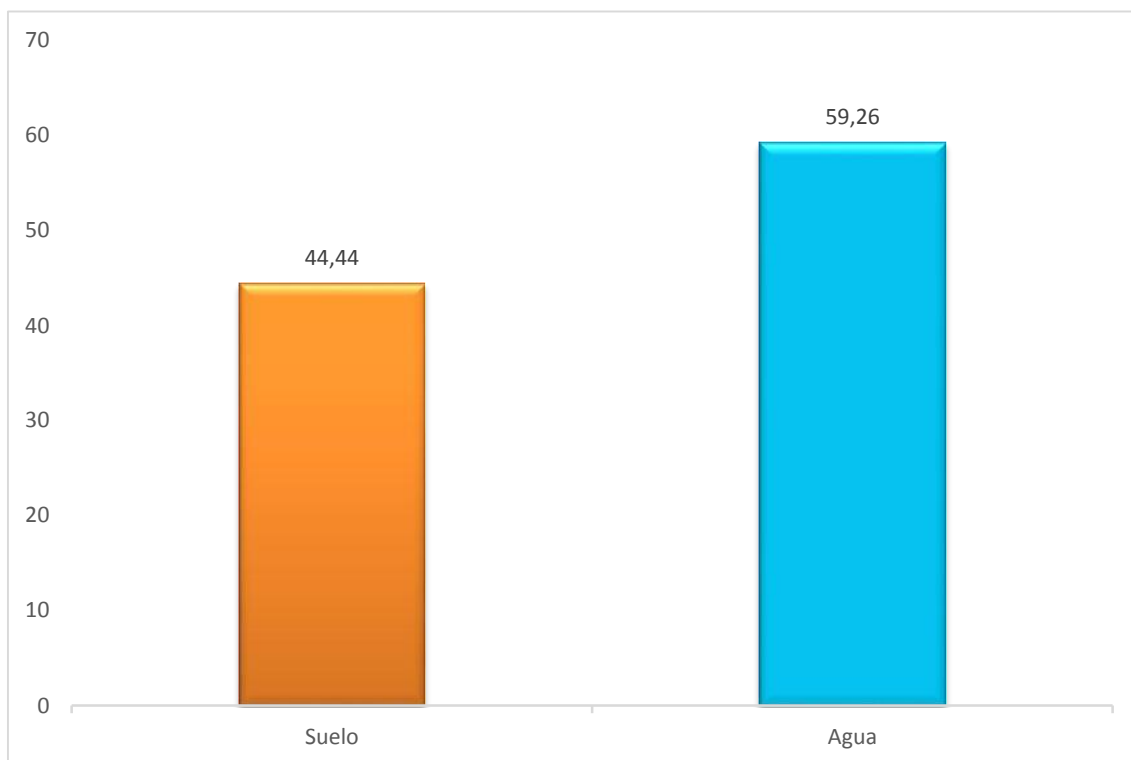
**Tabla 1.** Tiempo requerido para observar crecimiento en el enriquecimiento bacteriano de suelo de salinas en Mórrope, 2014

Muestras		Tiempo de incubación
N°	%	(días)
10	37,03	9
8	29,63	10
5	18,52	11
4	14,82	14

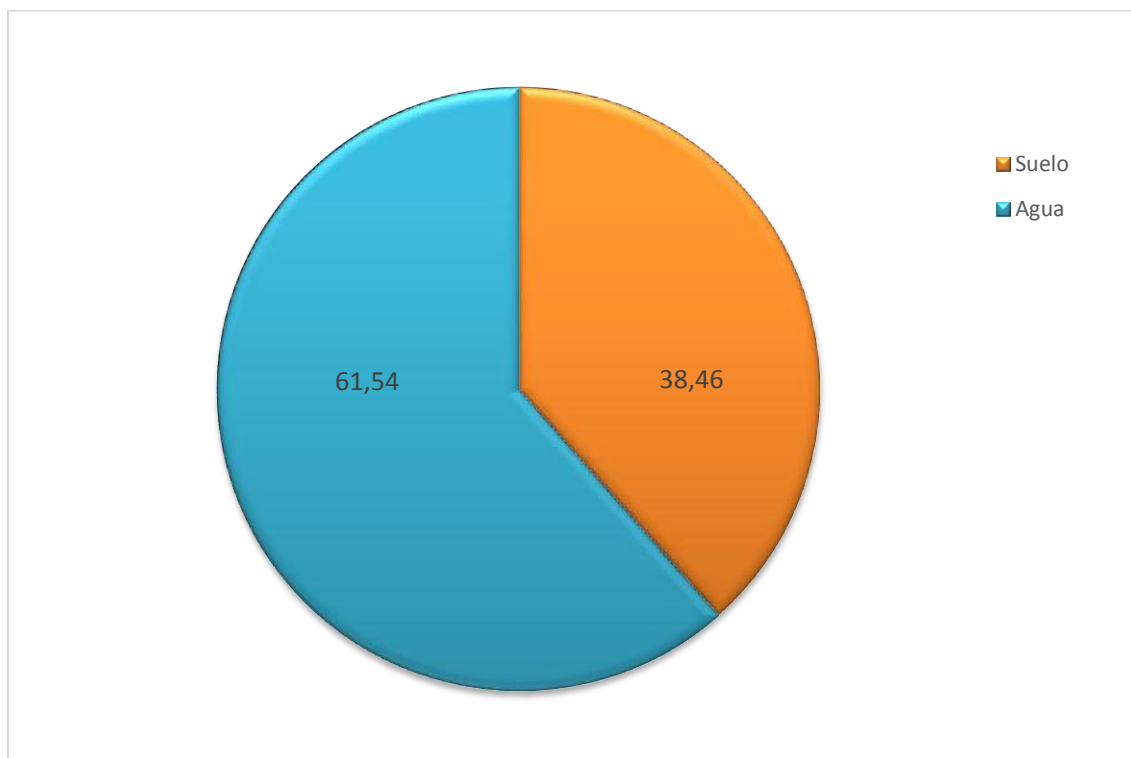
**Tabla 2.** Tiempo requerido para observar crecimiento en el enriquecimiento bacteriano de agua de salinas en Mórrope, 2014

Muestras		Tiempo de crecimiento
N°	%	(días)
15	55,56	10
5	18,52	12
6	22,22	13
1	3,70	14

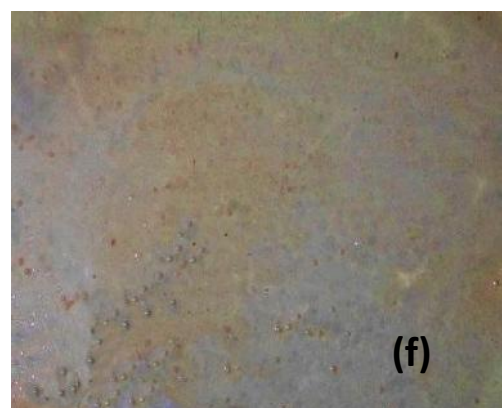
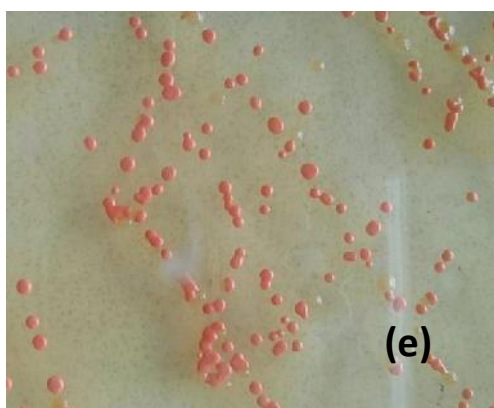
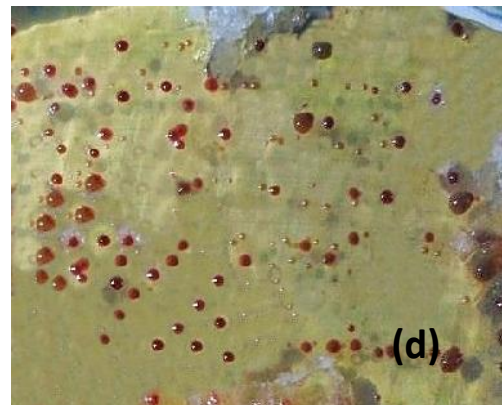
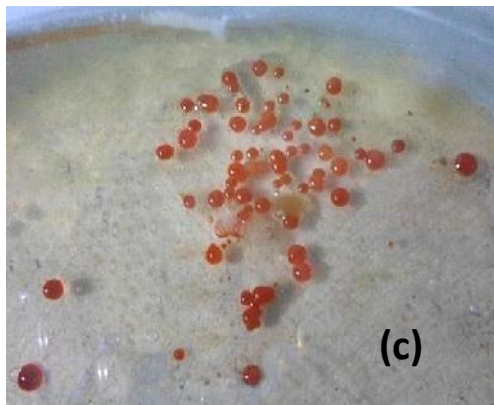
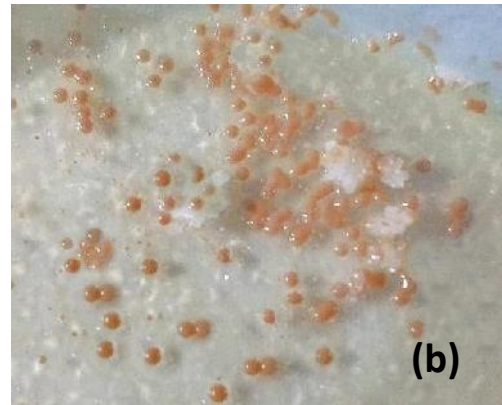
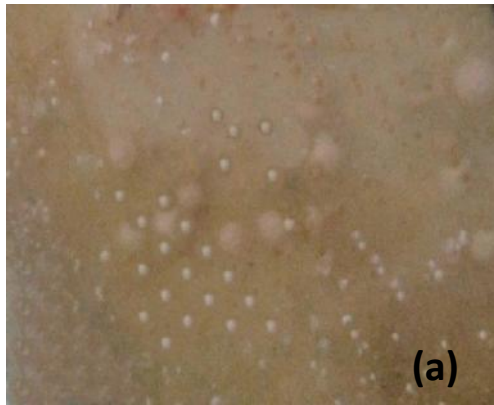




**Figura 32.** Frecuencia de muestras de suelo y agua positivas para el aislamiento de bacterias halófilas, 2014.



**Figura 33.** Porcentaje de bacterias halófilas según procedencia de muestras de suelo y agua, 2014.



**Figura 34.** Colonias de bacterias halófilas con diversas coloraciones desarrolladas en agar HM<sub>1</sub>; (a) blanco, (b) melón, (c) naranja, (d) rojo, (e) rosa, (f) translúcido.

En suelo predominaron las colonias translúcidas en agar HM<sub>1</sub> con 15 y 20% NaCl y anaranjadas en HM<sub>1</sub> con 25% NaCl, en todos los casos con una consistencia pastosa. En agua predominaron las colonias translúcidas en agar HM<sub>1</sub> con 15 y 20% NaCl y melón en HM<sub>1</sub> con 25% NaCl, en todos los casos con una consistencia pastosa (Tablas 3, 4).

Las bacterias halófilas de muestras de suelo y agua se aislaron en todas las concentraciones de NaCl. Las bacterias de suelo correspondieron a: 65,56% (59) en 15% NaCl; 18,89%(17) en 25% NaCl y 15,56% (14) en 20% NaCl (Figura 35). Las bacterias de agua correspondieron a 54,86%(79) en 15% NaCl; 24,31% (35) con 25% NaCl y 20,83% (30) con 20% NaCl (Figura 36).

#### **4.2 Bacterias halófilas productoras de gránulos de PHA**

En el 39,74% (93) de las bacterias halófilas se observaron gránulos de PHA mediante la tinción lipofílica de Sudan Negro B (Figura 37). El 32% (30) de estas bacterias se aislaron de suelo y el 68% (63) de agua. Los gránulos de PHA se observaron negros en el interior de las células vegetativas rosadas (Figura 38), que mayoritariamente fueron de forma bacilar, dispuestas aisladamente, tanto para las bacterias aisladas de suelo (Tabla 5) como de agua (Tabla 6).

En muestras de suelo, las bacterias halófilas productoras de PHA correspondieron al 63,33% (19) en 15% NaCl; 26,67% (8) en 25% NaCl y 10% (3) en 20% NaCl (Figura 39). En muestras de agua los aislados de bacterias halófilas productoras de PHA correspondieron a 38,10% (24) en 15% NaCl, 31,75% (20) en 20% NaCl y 30,15% (19) en 25% NaCl (Figura 40).

#### **4.3 Bacterias halófilas productoras de PHA seleccionadas**

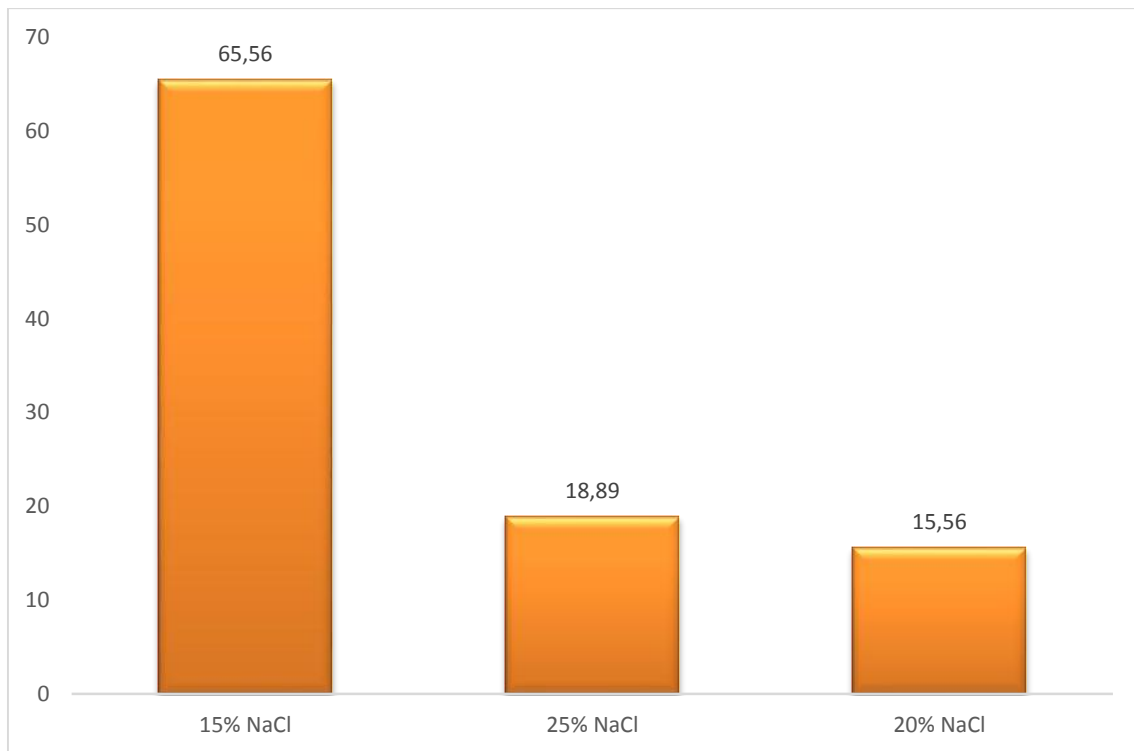
En el primer cultivo de bacterias halófilas en caldo HM<sub>2</sub> a las 144 horas, se cuantificaron en promedio 4-85 células con gránulos de PHA, seleccionándose las 20 bacterias que presentaron 40–85 células con gránulos (Tabla 7). En el segundo cultivo, todas las bacterias halófilas seleccionadas presentaron un tiempo óptimo de incubación, en el cual se diferenciaron claramente las células con gránulos de PHA y después del cual el número de estas células disminuyó. En el 30% (6) de bacterias halófilas seleccionadas el número de células con PHA fue de 62-91 a las 144 horas, en el 35% (7) fue 49-61 a las 168 horas, en el 20% (4) fue 65-84 a las 192 horas y en el 15% (3) fue 45-48 a las 216 horas (Tabla 8).

**Tabla 3.** Color y textura de colonias de bacterias halófilas aisladas de muestras de suelo en salinas de Mórrope, 2014

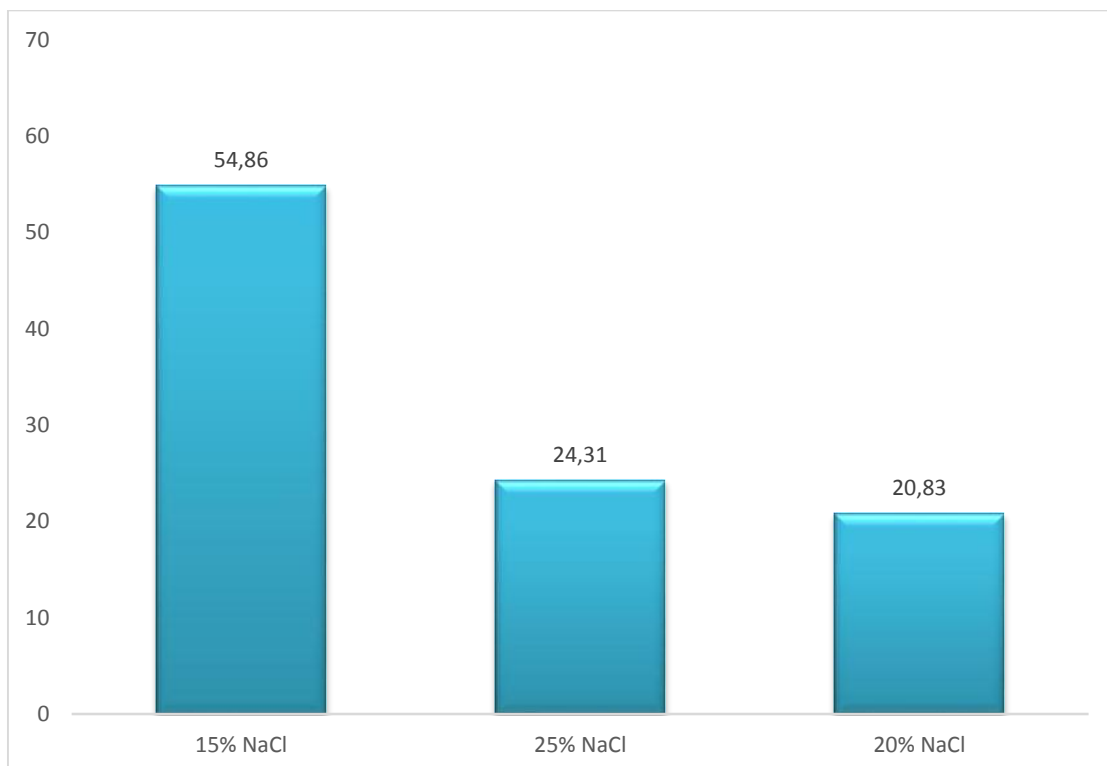
Características macroscópicas	Cultivos de bacterias según NaCl (%)		
	15	20	25
<b>Color</b>			
Blanco	7,04	0	0
Crema	0	0	0
Melón	8,45	0	60
Naranja	1,41	0	0
Rojo	5,63	0	10
Rosa	0	0	0
Translúcido	77,47	100	30
<b>Textura</b>			
Mucosa	0	0	2
Pastosa	100	100	98

**Tabla 4.** Color y textura de colonias de bacterias halófilas aisladas de muestras de agua en salinas de Mórrope, 2014

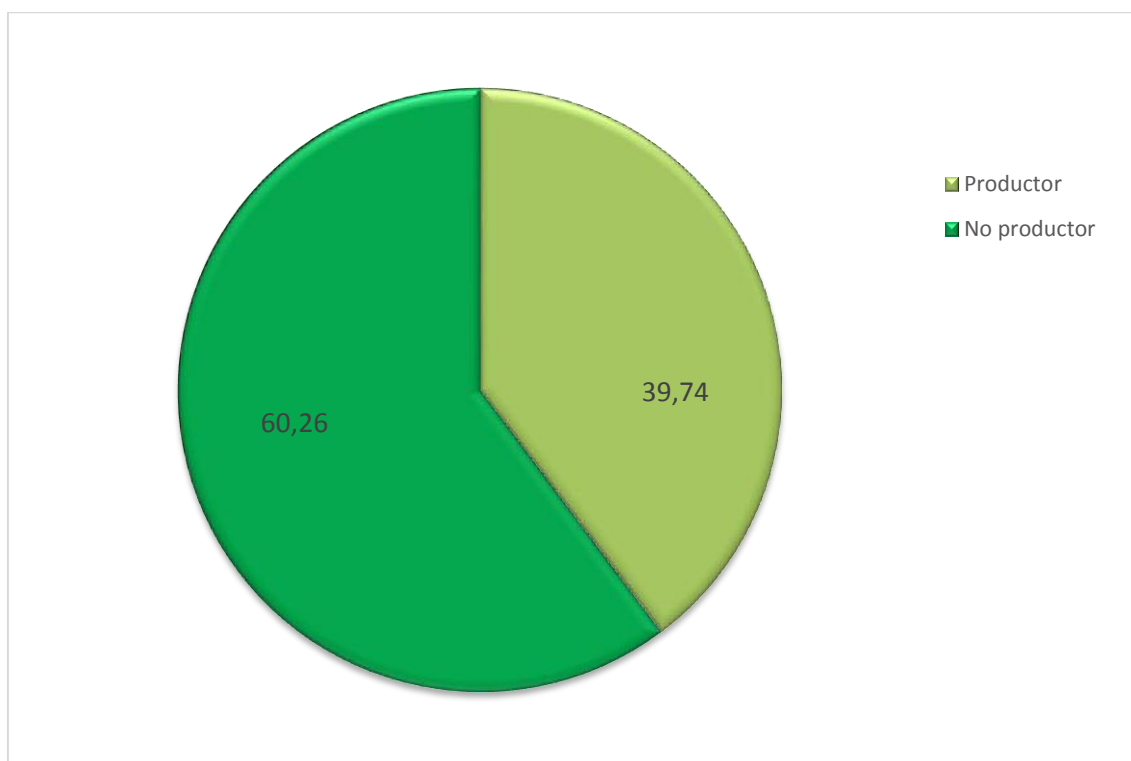
Características macroscópicas	Cultivos de bacterias según NaCl (%)		
	15	20	25
<b>Color</b>			
Blanco	1,19	0	0
Crema	2,38	0	0
Melón	11,90	0	55,73
Naranja	3,57	0	0
Rojo	13,10	6,82	9,84
Rosa	3,57	0	3,28
Translúcido	64,29	93,18	31,15
<b>Textura</b>			
Mucoso	8,33	0	16,39
Pastoso	91,67	100	83,61



**Figura 35.** Porcentaje de aislados de bacterias halófilas en muestras de suelo según la concentración de NaCl de agar HM<sub>1</sub>.

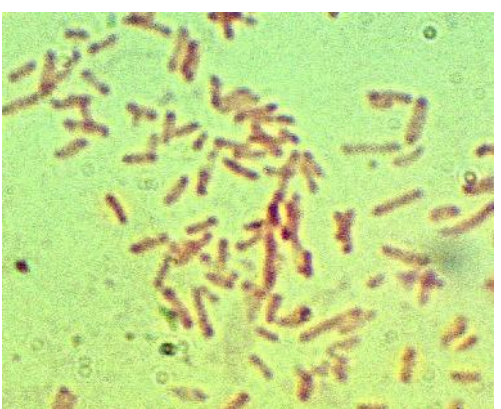
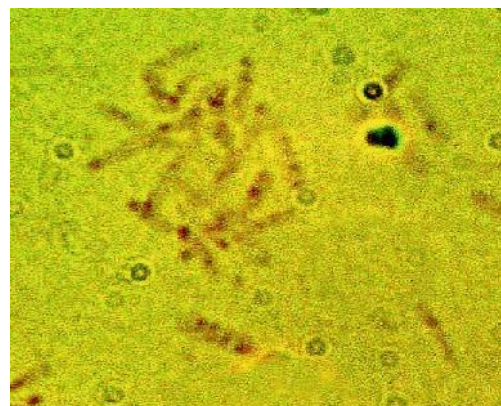
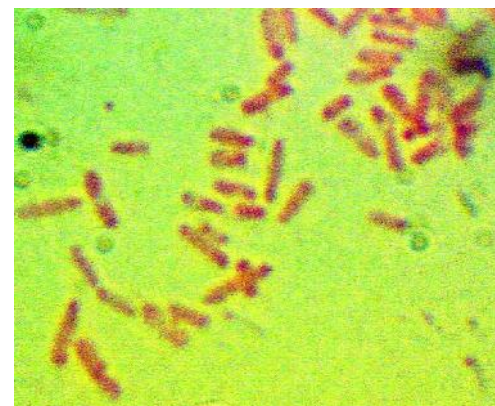
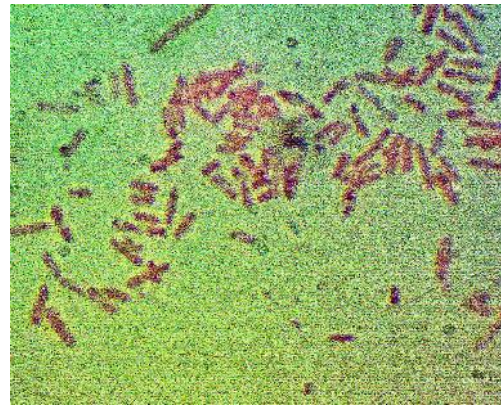
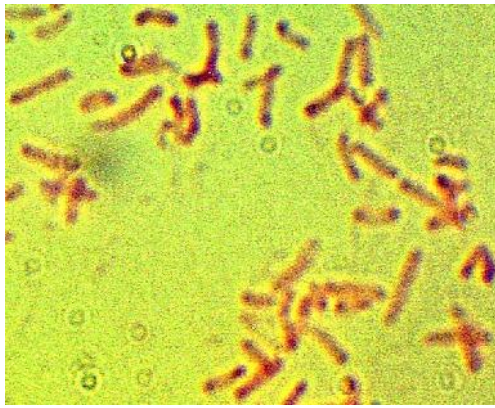


**Figura 36.** Porcentaje de aislados de bacterias halófilas en muestras de agua según la concentración de NaCl de agar HM<sub>1</sub>.



**Figura 37.** Frecuencia de bacterias halófilas productoras de gránulos de PHA en aislados de muestras de suelo y agua de salinas de Mórrope, 2014.





**Figura 38.** Gránulos de PHA en bacterias halófilas teñidas con Sudan Negro B.

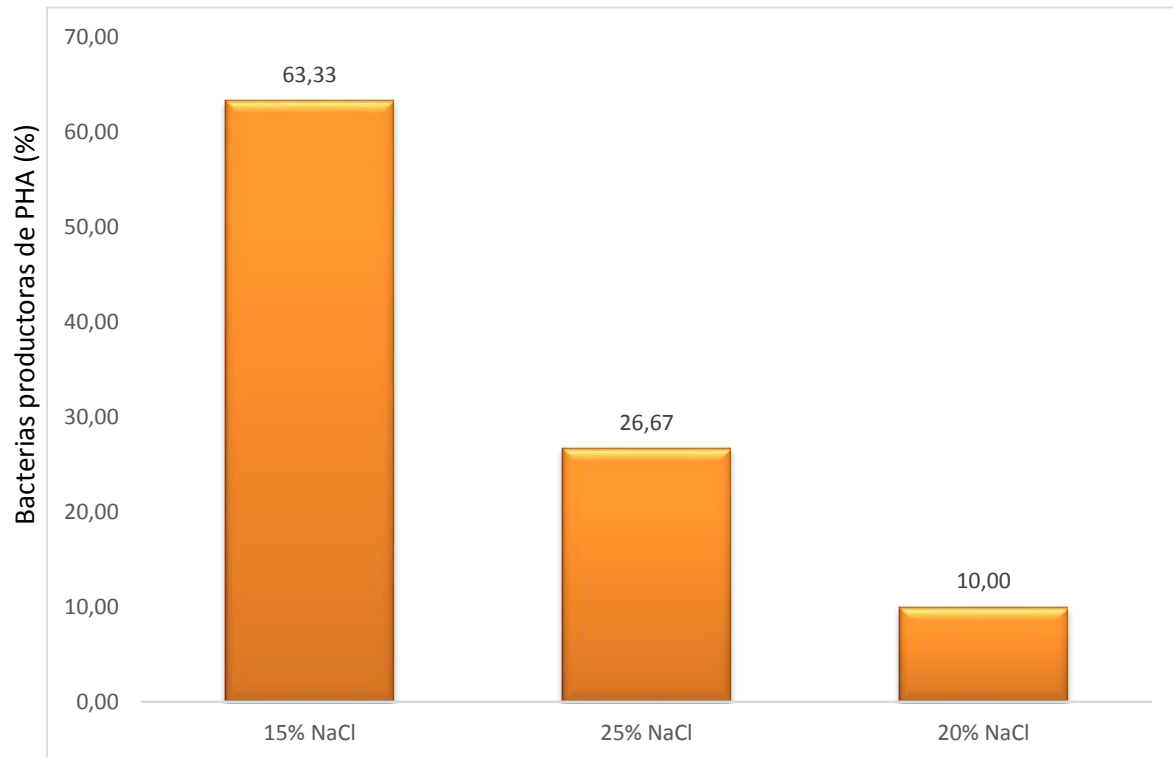
**Tabla 5.** Frecuencia morfológica de bacterias halófilas productoras de PHA aisladas de suelo en diferentes concentraciones de NaCl

<b>NaCl (%)</b>	<b>Bacilos aislados</b>	<b>Bacilos en cadena</b>	<b>Bacilos pleomórficos</b>	<b>Formas cocoides</b>	<b>Total</b>
15	18	0	0	1	19
20	3	0	0	0	3
25	8	0	0	0	8

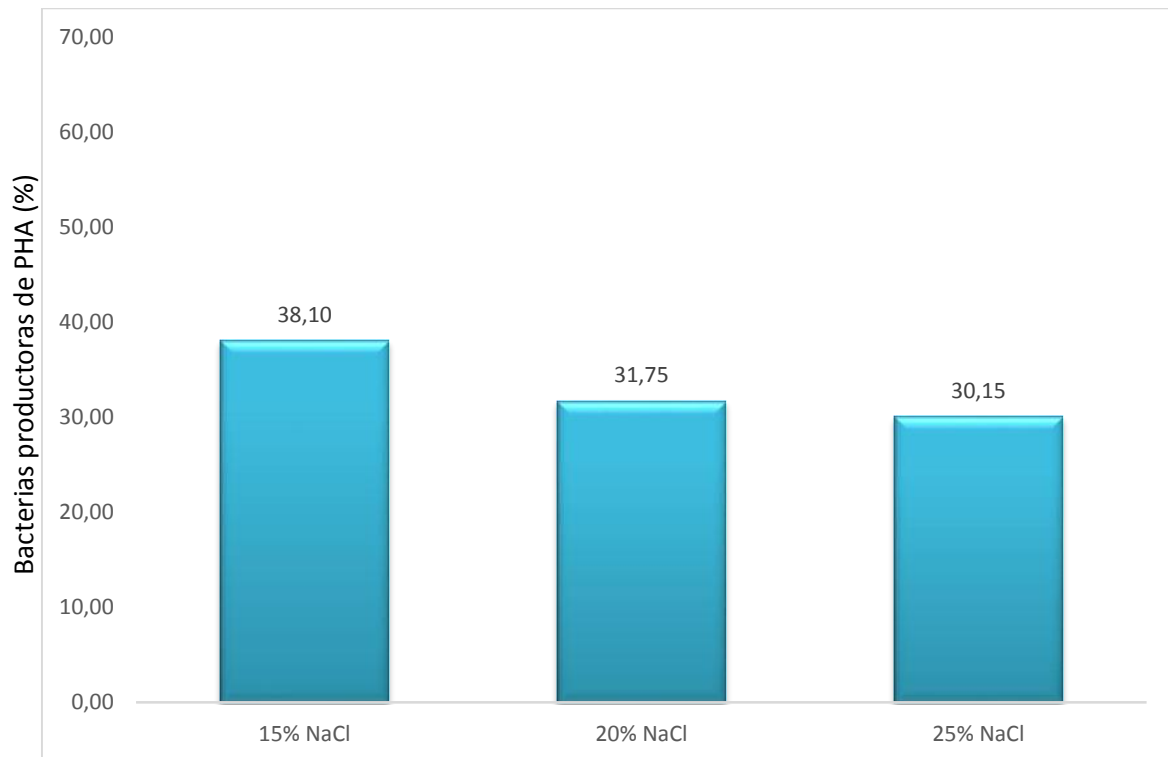
**Tabla 6.** Frecuencia morfológica de bacterias halófilas productoras de PHA aisladas de agua en diferentes concentraciones de NaCl

<b>NaCl (%)</b>	<b>Bacilos aislados</b>	<b>Bacilos en cadena</b>	<b>Bacilos pleomórficos</b>	<b>Formas cocoides</b>	<b>Total</b>
15	23	0	0	1	24
20	17	0	2	1	20
25	18	1	0	0	19





**Figura 39.** Porcentaje de bacterias halófilas productoras de PHA aisladas de muestras de suelo según la concentración de NaCl en agar HM<sub>1</sub>.



**Figura 40.** Porcentaje de bacterias halófilas productoras de PHA aisladas de muestra de agua según la concentración de NaCl en agar HM<sub>1</sub>.

**Tabla 7.** Número de células con gránulos de PHA en primer cultivo de bacterias halófilas en caldo HM<sub>2</sub> por 144 horas

NaCl (%)	Código bacteria	Número de células con gránulos de PHA/campo					$\bar{x}$
		r1	r2	r3	r4	r5	
15	AE110	89	77	75	70	69	72
	AE065	71	69	70	67	73	70
	AE073	65	71	63	68	73	68
	AE020	37	33	36	28	41	35
	AE137	31	35	42	28	39	35
	AE049	38	29	35	31	42	35
	AE115	41	33	29	35	37	35
	AE119	34	43	30	34	29	34
	AE077	37	34	28	39	32	34
	AE131	28	35	39	26	40	34
	AE025	31	28	33	38	35	33
	AE072	27	32	37	30	39	33
	AE099	39	29	32	27	33	32
	AE143	30	38	25	36	26	31
	AE012	34	29	33	28	31	31
	AE126	28	37	30	25	35	31
	AE016	32	29	32	30	26	30
	AE097	26	36	24	35	29	30
	AE134	31	27	30	29	33	30
	AE112	28	35	32	30	25	30
	AE008	21	26	29	35	34	29
	AE118	32	20	35	28	30	29
	AE087	28	32	23	29	33	29
	AE059	33	29	30	27	21	28
	AE092	30	25	27	19	34	27
	AE114	28	32	25	30	20	27
	AE038	19	27	34	26	29	27
	AE013	26	26	26	26	26	26
	AE043	25	29	24	31	21	26
	AE066	29	25	27	19	30	26
	AE113	26	18	30	28	23	25
	AE128	24	21	20	29	31	25
	AE042	31	28	25	19	22	25
	AE015	19	26	23	20	27	23
	AE078	27	22	27	21	18	23
	AE125	28	20	18	23	19	21
	AE063	15	19	17	17	22	18
	AE056	20	18	21	19	12	18
	AE096	16	20	18	16	20	18
	AE105	22	19	15	21	13	18
	AE151	14	12	22	16	21	17
	AE024	16	20	13	16	15	16
	AE034	18	13	17	12	20	16

NaCl (%)	Código bacteria	Número de células con gránulos de PHA/campo					
		r1	r2	r3	r4	r5	$\bar{x}$
20	AE415	64	70	66	69	72	58
	AE442	59	47	50	53	56	53
	AE444	51	53	55	49	52	52
	AE433	53	50	46	52	44	49
	AE432	45	48	52	44	46	47
	AE450	38	41	44	38	41	40
	AE410	32	20	35	28	30	29
	AE441	26	18	30	28	23	25
	AE437	17	20	23	18	12	18
	AE448	19	13	17	11	20	16
	AE408	18	14	12	10	21	15
	AE421	20	10	18	15	12	15
	AE413	12	17	14	09	17	14
	AE443	08	12	20	14	11	13
	AE419	12	17	09	10	11	12
	AE445	10	14	12	17	07	12
	AE427	07	13	11	09	15	11
	AE438	11	11	08	13	07	10
	AE426	13	05	11	07	09	9
	AE428	06	12	08	09	10	9
	AE424	12	07	05	11	05	8
	AE434	10	06	07	06	11	8
	AE402	02	07	04	09	03	5
25	AE219	74	69	71	78	73	65
	AE222	67	70	76	73	69	71
	AE339	70	76	65	69	65	69
	AE343	65	72	62	66	70	67
	AE228	65	60	63	70	67	65
	AE334	60	69	57	65	59	62
	AE353	55	51	60	59	60	57
	AE337	62	58	54	49	52	55
	AE338	51	46	49	51	43	48
	AE335	43	50	45	47	45	46
	AE212	39	45	51	42	48	45
	AE210	32	20	35	28	30	29
	AE225	19	26	23	20	27	23
	AE341	27	25	23	18	24	23
	AE209	19	13	17	11	20	16
	AE346	12	17	14	09	17	14
	AE231	08	12	20	14	11	13
	AE214	11	09	13	18	14	13
	AE358	07	13	11	09	15	11
	AE232	06	13	09	15	07	10
	AE230	09	05	11	11	09	9
	AE203	13	07	05	09	11	9
	AE223	04	11	08	12	05	8
	AE342	05	11	08	07	04	7
	AE213	10	04	06	02	07	6
	AE218	03	06	10	08	03	6
	AE229	06	04	02	05	03	4

**Tabla 8.** Número promedio de células con gránulos de PHA en bacterias halófilas cultivadas en caldo HM<sub>2</sub>

<b>Código bacteria</b>	<b>Número de células con gránulos de PHA/horas</b>			
	<b>144</b>	<b>168</b>	<b>192</b>	<b>216</b>
AE219	91	75	76	74
AE222	89	73	72	72
AE339	85	67	65	67
AE343	81	65	66	64
AE228	69	68	63	63
AE334	62	59	57	57
AE353	59	61	55	48
AE337	58	60	55	51
AE442	50	55	43	36
AE338	44	55	45	44
AE212	47	50	45	41
AE444	49	50	45	39
AE335	48	49	47	45
AE110	79	82	84	83
AE065	75	79	81	81
AE073	72	75	75	73
AE415	55	58	65	65
AE432	30	39	45	48
AE433	24	30	41	47
AE450	38	42	43	45

#### 4.4 Rendimiento Y (p/x) de PHA en bacterias halófilas

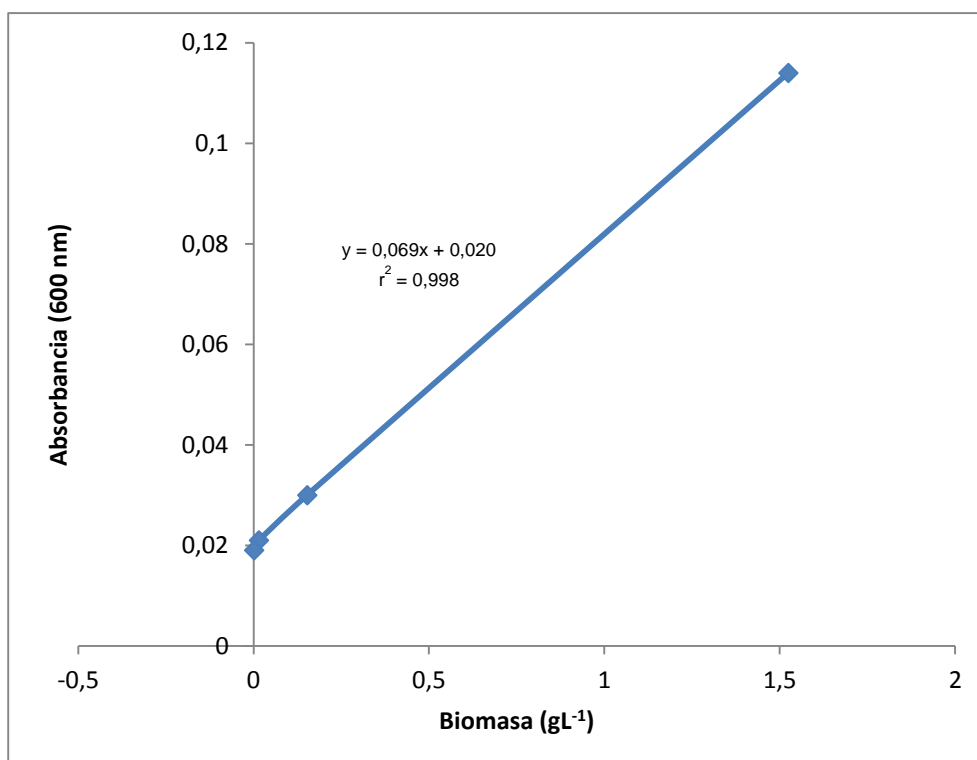
Con los valores de absorbancia (Tabla 9) obtenidos con diferentes concentraciones de biomasa de bacterias halófilas cultivadas en caldo HM<sub>2</sub>, se obtuvo la ecuación  $y = 0,069x + 0,020$  (Figura 41). Debido a que el valor de  $R^2$  fue mayor a 0,9 se aceptó como patrón de referencia para el cálculo de la concentración de biomasa (Mantilla, 2007).

En el proceso fermentativo la absorbancia de la biomasa de las bacterias halófilas osciló entre 0,020 a las 72 horas con AE334 y 0,242 a las 240 horas con AE450 (Tabla 10), valores correspondientes a 0,000 y 3,211 gL<sup>-1</sup> de biomasa, respectivamente (Tabla 11). Para determinar la naturaleza del polímero producido por las bacterias halófilas, se seleccionaron cinco bacterias a las que correspondió la mayor concentración de NaCl en el cultivo, el mayor número de células con gránulos de PHA, en el menor tiempo, pero no necesariamente la mayor biomasa (Tabla 12).

La naturaleza del polímero PHA recuperado obtenido fue verificada, obteniendo un pico máximo de absorbancia a 235 nm. Los valores de absorbancia (235 nm) del PHA producido por las bacterias halófilas oscilaron entre 0,132 y 0,323 (Tabla 13). La concentración de PHA fue de 0,167 gL<sup>-1</sup> con la bacteria AE222 y 0,500 gL<sup>-1</sup> con la bacteria AE339. El rendimiento Y(p/x) fue 0,270 gg<sup>-1</sup> con AE339 y 0,725 gg<sup>-1</sup> con AE228, correspondientes a 27,02 y 72,52%, respectivamente (Tabla 14).

**Tabla 9.** Valores de absorbancia (600 nm) de biomasa de bacterias halófilas

Biomasa (gL <sup>-1</sup> )	Absorbancia (600 nm)
1,268	0,114
0,1268	0,030
0,01268	0,021
0,001268	0,019



**Figura 41.** Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de bacterias halófilas productoras de PHA.

**Tabla 10.** Absorbancia (600 nm) corregida de biomasa de bacterias halófilas cultivadas en glucosa como fuente de carbono

Código bacteria UNPRG	Absorbancia 600nm/horas							
	72	96	120	144	168	192	216	240
AE339	0,070	0,076	0,088	0,148	0,139	-	-	-
AE228	0,020	0,036	0,053	0,060	0,059	-	-	-
AE343	0,020	0,038	0,049	0,056	0,055	-	-	-
AE219	0,020	0,021	0,026	0,040	0,038	-	-	-
AE222	0,021	0,023	0,032	0,039	0,039	-	-	-
AE334	0,020	0,022	0,025	0,031	0,030	-	-	-
AE212	-	0,031	0,062	0,052	0,200	0,200	-	-
AE442	-	0,106	0,120	0,157	0,194	0,190	-	-
AE444	-	0,108	0,117	0,159	0,188	0,185	-	-
AE335	-	0,085	0,079	0,087	0,108	0,107	-	-
AE338	-	0,025	0,043	0,067	0,081	0,079	-	-
AE337	-	0,072	0,067	0,077	0,075	0,074	-	-
AE353	-	0,046	0,047	0,025	0,028	0,027	-	-
AE110	-	-	0,201	0,235	0,279	0,340	0,338	-
AE065	-	-	0,149	0,178	0,245	0,311	0,309	-
AE073	-	-	0,156	0,168	0,185	0,230	0,228	-
AE415	-	-	0,052	0,082	0,144	0,164	0,163	-
AE450	-	-	-	0,215	0,221	0,248	0,256	0,242
AE432	-	-	-	0,198	0,213	0,218	0,239	0,223
AE433	-	-	-	0,101	0,105	0,102	0,115	0,107



**Tabla 11.** Concentración (gL<sup>-1</sup>) de biomasa de bacterias halófilas cultivadas en glucosa como fuente de carbono

Código bacteria UNPRG	Biomasa (gL <sup>-1</sup> )/horas							
	72	96	120	144	168	192	216	240
AE339	0,725	0,816	0,990	1,850	1,725	-	-	-
AE228	0,000	0,232	0,473	0,575	0,565	-	-	-
AE343	0,005	0,256	0,425	0,522	0,507	-	-	-
AE219	0,000	0,014	0,087	0,290	0,261	-	-	-
AE222	0,014	0,048	0,174	0,275	0,275	-	-	-
AE334	0,000	0,029	0,072	0,159	0,145	-	-	-
AE212	-	0,164	0,609	0,459	2,609	2,609	-	-
AE442	-	1,251	1,444	1,981	2,517	2,464	-	-
AE444	-	1,280	1,411	2,014	2,440	2,391	-	-
AE335	-	0,937	0,855	0,976	1,280	1,261	-	-
AE338	-	0,077	0,338	0,681	0,884	0,855	-	-
AE337	-	0,758	0,686	0,821	0,797	0,783	-	-
AE353	-	0,372	0,396	0,077	0,116	0,101	-	-
AE110	-	-	2,628	3,111	3,749	4,643	4,609	-
AE065	-	-	1,865	2,295	3,266	4,222	4,188	-
AE073	-	-	1,971	2,150	2,386	3,048	3,014	-
AE415	-	-	0,459	0,903	1,797	2,092	2,072	-
AE450	-	-	-	2,826	2,913	3,304	3,415	3,211
AE432	-	-	-	2,580	2,802	2,870	3,169	2,947
AE433	-	-	-	1,174	1,227	1,188	1,382	1,266

**Tabla 12.** Biomasa y número de células con gránulos de PHA en bacterias halófilas cultivadas en glucosa como fuente de carbono

Código bacteria UNPRG	NaCl %	Células con gránulos PHA		Biomasa	
		Número	Horas	(gL <sup>-1</sup> )	Horas
AE110	15	84	192	4,643	192
AE065		81	192	4,222	192
AE073		75	168	3,048	192
AE450	20	45	216	3,415	216
AE432		48	216	3,169	216
AE442		55	168	2,517	168
AE444		50	168	2,440	168
AE415		65	192	2,092	192
AE433		47	216	1,382	216
AE212	25	50	168	2,609	168
AE339		85	144	1,850	144
AE335		49	168	1,280	168
AE338		55	168	0,884	168
AE337		60	168	0,821	144
AE228		69	144	0,575	144
AE343		81	144	0,522	144
AE219		91	144	0,290	144
AE222		89	144	0,275	144
AE334		62	144	0,159	144
AE353		61	168	0,116	168

**Tabla 13.** Concentración ( $\text{gL}^{-1}$ ) de polihidroxialcanoatos (PHA) de bacterias halófilas a los 4 días de cultivo en glucosa como fuente de carbono

<b>Código bacteria</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>PHA</b>
<b>UNPRG</b>	<b>(235 nm)</b>	<b>(<math>\text{gL}^{-1}</math>)</b>
AE339	0,323	0,500
AE228	0,266	0,417
AE343	0,147	0,300
AE219	0,138	0,183
AE222	0,132	0,167

**Tabla 14.** Rendimiento Y (p/x) de polihidroxialcanoatos de bacterias halófilas

<b>Código bacteria</b>	<b>Biomasa</b>	<b>PHA</b>	<b>Rendimiento</b>	
			<b>Y (p/x)</b>	
<b>UNPRG</b>	<b>(<math>\text{gL}^{-1}</math>)</b>	<b>(<math>\text{gL}^{-1}</math>)</b>	<b>(<math>\text{g g}^{-1}</math>)</b>	<b>(%)</b>
AE228	0,575	0,417	0,725	72,52
AE219	0,290	0,183	0,631	63,10
AE222	0,275	0,167	0,607	60,72
AE343	0,522	0,300	0,575	57,47
AE339	1,850	0,500	0,270	27,02

## V. DISCUSIÓN

Las bacterias de muestras de suelo y agua de las salinas se enriquecieron en caldo HM<sub>1</sub> con 15, 20 y 25% de NaCl, coincidiendo con Llontop (2012). La técnica del enriquecimiento permite incrementar los microorganismos investigados y disminuir los contaminantes no deseados, que se encuentran en una muestra biológica (Madigan *et al.*, 2004). El incremento de los microorganismos halófilos se evidenció por turbidez, característica de aerobios y anaerobios aerotolerantes (Madigan *et al.*, 2004); película blanquecina superficial, típica de los microorganismos aerobios estrictos (Carreño *et al.*, 2010) y coloración anaranjado rojiza atribuida a los pigmentos carotenoides característicos de las haloarqueas (Castillo y Barragán, 2011). En cuanto a la turbidez y película superficial se coincide con Guzmán y Hurtado (2011) y en la coloración anaranjada con Llontop (2012), investigadores que también enriquecieron bacterias halófilas de muestras de agua de salinas en caldo con 5 – 20% de NaCl.

Las bacterias enriquecidas de las muestras de suelo y agua de salinas se aislaron en medio sólido con 15 - 25% NaCl. Similarmente, Quillihuaman *et al.*, 2004, Fuentes (2011), Guzmán y Hurtado (2011) y Llontop (2012), obtuvieron bacterias halófilas de lagos salados y salinas con un contenido de hasta 25% de sal. El término halófilo se asigna a todo microorganismo cuyo crecimiento es mayor en medio hipersalino, compite exitosamente en este medio y resiste los efectos desnaturalizantes de la sal (Lovera *et al.*, 2008). En los tres dominios: Archea, Bacteria y Eukarya existen microorganismos capaces de vivir en presencia de sales. Los microorganismos que requieren sal para su crecimiento son halófilos y los que crecen en ausencia y presencia de sal son halotolerantes. Las estrategias que les permiten enfrentar las condiciones salinas desfavorables son: acumulación de alta concentración intracelular de sal en las Arqueas halofílicas y alta concentración intracelular de solutos orgánicos osmóticos en las Eubacterias halofílicas o halotolerantes (Margesin y Schinner, 2001).

Las colonias de bacterias halófilas presentaron diversas coloraciones y textura mucosa y pastosa, coincidiendo con Flores *et al.* (2010) y Llontop (2012). Al respecto, Flores *et al.* (2010) aislaron bacterias halófilas que desarrollaron colonias de color naranja, crema, blanco, melón y rojo, en su mayoría de consistencia mucosa. Las haloarqueas formaron colonias rosadas o rojas, debido a que sintetizan carotenoides parcialmente responsables de la típica coloración rojiza de muchos ambientes naturales en los que se desarrollan en grandes cantidades (Ventosa, 2006; Castillo & Barragán, 2011). En cuanto a la textura, Luque *et al.* (2010) concluyeron que el aspecto colonial mucoso indica posible producción de exopolisacáridos, característica confirmada en bacterias halófilas de los géneros *Halobacterium* y *Haloferax* (Margesin y Schinner, 2001).

Las bacterias halófilas de muestras de suelo y agua se aislaron mayoritariamente en medio con 15% NaCl, seguido de 25% NaCl y en menor número en 20% NaCl, resultado que puede ser explicado por su requerimiento de NaCl. Krushner (1978) mencionado por Margesin y Schinner (2001), concluyó que los organismos son halófilos débiles cuando su crecimiento óptimo es con 3% p/v NaCl (marinos), halófilos moderados con 3 - 15%, p/v NaCl y halófilos extremos con 25%, p/v NaCl. Según Kushner & Kamekura (1988), en los

ambientes de salinidad extrema (>10%) los Archea son los predominantes y debido a que requieren 2,5-5,2 M NaCl (15 - 32%, p/v) para su crecimiento óptimo son considerados halófilos extremos. Por su parte, las Bacterias son mayoritarias a menos de 10% de sal y las Eukaria son escasas en más de 5% de sal (Margesin y Schinner, 2001).

Considerando el criterio de Krushner (1978), mencionado por Margesin y Schinner (2001), en el presente estudio se aislaron bacterias halófilas moderadas (caldo con 15% NaCl) y extremas (20 y 25% NaCl). Se coincide con Guzmán & Hurtado (2011) y Llontop (2012). Al respecto, Ventosa (2006) determinó que en los ambientes hipersalinos con más de 1,5 M (10%) predominan las bacterias halófilas moderadas y halófilas extremas o haloarqueas.

La técnica de coloración con Sudan negro B resultó adecuada para la detección in vivo de gránulos de PHA, que se observaron grisáceos o negros en las células vegetativas rosadas, coincidiendo con Martínez *et al.* (2004); Moreno *et al.* (2005); Legat *et al.* (2010), Guzmán & Hurtado (2011) y Llontop (2012). Tradicionalmente la detección de gránulos de PHA en células microbianas se realiza mediante la tinción con el colorante Sudan Negro B, debido a la naturaleza lipofílica de los PHA. También existen otros colorantes con mayor afinidad y especificidad como el azul Nilo A y Rojo Nilo, con los que los gránulos de PHA son reconocidos por una fluorescencia naranja (460 nm) y amarillo dorado (450-500 nm) o rosa-rojo (515 – 560nm), respectivamente (Gonzales *et al.*, 2013); sin embargo, no son completamente efectivos para la selección, porque los colorantes pueden formar cuerpos fluorescentes con los compuestos afines a los biopolímeros como son las inclusiones lipídicas (Sánchez *et al.*, 2012).

En el 39,74% de las bacterias se observaron gránulos de PHA, superando 4,17% reportado por Guzmán y Hurtado (2011) y 9% registrado por Llontop (2012) para bacterias y haloarqueas aisladas de salinas en caldo con 20 y 25% NaCl, respectivamente. Los PHA son poliésteres sintetizados y acumulados en forma de gránulos en el citoplasma por una variedad de procariotas, siendo utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes, por lo que constituyen una estrategia desarrollada para incrementar la supervivencia (de Almeida *et al.*, 2004; López 2010). De esta manera,

bacterias productoras de PHA se han aislado en ambientes extremos como las salinas (Guzmán & Guzmán 2008; Guzmán & Hurtado, 2011; Llontop, 2012); suelo, agua y sedimentos de habitats con 15-18 % p/v de salinidad (Luque *et al.*, 2010), aunque también se han reportado aislados con ambientes contaminados (Razzaq *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2012), residuos industriales (Cardona *et al.*, 2013) y suelo rizosférico de cultivos agrícolas (Baca y Sánchez 2010; Lisboa y Segura, 2010).

El mayor porcentaje de bacterias halófilas con gránulos de PHA fueron bacilos, pero también se observaron cocos y formas pleomórficas coincidiendo con López (2010) Guzmán y Hurtado (2011) y Llontop (2012). El número máximo de células con gránulos de PHA a las 144 horas fue 85 células con el primer cultivo y 91 células en el segundo cultivo; sin embargo, los valores disminuyeron conforme transcurrió el tiempo, siendo de 61 a las 168 horas, 84 a las 192 horas y 48 a las 216 horas. Esta disminución es explicada por la degradación intracelular de PHA o respuesta endógena de las bacterias, que le permite hidrolizar sus reservas de carbono acumuladas en forma de PHA a monómeros hidroxialcanoatos, mediante la participación de despolimerasas intracelulares ancladas en la superficie de los gránulos (Segura *et al.*, 2007). Estudios en *P. oleovorans* demostraron que antes que la bacteria complete la utilización de fuente de carbono, la célula disminuye 12-20% la concentración de polimerasa e incrementa 10 – 15% la despolimerasa. Este comportamiento representa la respuesta de la célula a un ambiente metabólico cada vez menos permisible, preparándose las células a movilizar las reservas de carbono para su supervivencia (Fernández, 2012).

Las bacterias halófilas sintetizaron gránulos de PHA en caldo HM<sub>2</sub> con glucosa como fuente de carbono en exceso y deficiencia de nitrógeno, coincidiendo con Guzmán & Hurtado (2011) y Llontop (2012). Las bacterias productoras de PHA se agrupan según las condiciones para la síntesis del polímero. El primer grupo requiere la limitación de un nutriente esencial (N, P, S, Mg, O<sub>2</sub>) para sintetizar PHA a partir de un exceso de carbono en la fase estacionaria de crecimiento. El segundo grupo de bacterias acumula PHA durante la fase de crecimiento, sin necesidad que se agote un nutriente esencial. Estas bacterias acumulan grandes cantidades del polímero durante la fase exponencial de crecimiento (>50%), a diferencia del primer grupo, que durante



esta fase acumula muy baja concentración del polímero (González *et al.*, 2013). Investigadores como Han *et al.* (2007), Legat *et al.* (2010) y Guzmán & Hurtado (2011) sugieren que los gránulos de PHA son sintetizados por las haloarqueas durante la fase de crecimiento. Las enzimas son constitutivas para la síntesis de PHA y el polímero se acumula continuamente a bajos niveles, independientemente de la concentración de nutrientes (Legat *et al.*, 2010).

Las bacterias halófilas aisladas de salinas sintetizaron PHA, cuya naturaleza fue verificada mediante el método espectrofotométrico, basado en la conversión del polímero a ácido crotonico, mediante el uso de ácido sulfúrico concentrado y la aplicación de calor. El ácido crotonico producido se cuantifica por espectrofotometría UV alcanzando un pico máximo a 235 nm (González *et al.*, 2013). De igual manera, Meseguer (2004), Luque *et al.* (2010), Guzmán & Hurtado (2011) y Llontop (2012) verificaron la naturaleza del PHA producido por bacterias halófilas.

La biomasa de las bacterias halófilas se cuantificó por turbidimetría, por cuanto bajo las condiciones del presente estudio no se podrían cuantificar mínimas cantidades de biomasa; no obstante, se requería determinar el tiempo con la mayor biomasa para recuperar el polímero. Según Fernández (2012) en condiciones de producción de PHA, la monitorización de la turbidimetría no es un reflejo directo del número de células. El valor de la  $DO_{600}$  es un parámetro complejo que permite tener una idea inicial del perfil de crecimiento y producción de PHA, pero hay que tener en cuenta que se ve afectado no solo por el número de células de un cultivo sino también por la cantidad de polímero acumulado por cada célula.

Concluido el proceso fermentativo y debido a que los gránulos de PHA son intracelulares, se realizó la extracción a través de una digestión química de la membrana celular, utilizando hipoclorito de sodio. Se coincide con Salmian *et al.* (2008) quienes demostraron que este agente químico en bajas concentraciones (< 10%) disuelve los componentes celulares, excepto los gránulos de PHA y permite alcanzar 86% de pureza. Para facilitar la recuperación del PHA se utilizó cloroformo como solvente orgánico, que solubiliza el polímero, siendo preferido por su rapidez y eficacia en la extracción del polímero (Naranjo, 2010; Cerrone, 2011). Los valores máximos en la concentración en PHA correspondieron a los aislados AE339 (0,500 gL<sup>-1</sup>), AE228 (0,417 gL<sup>-1</sup>) y AE343

(0,300 gL<sup>-1</sup>). Según Fernández *et al.* (2005) bacterias con más de 0,3 gL<sup>-1</sup> de PHA se consideran con potencial industrial para la producción de PHA, tomando en cuenta que el medio de cultivo empleado aún no ha sido optimizado.

En algunas bacterias productoras de PHA, el rendimiento Y (p/x) no estuvo relacionado directamente con la concentración de biomasa, como sucedió con el aislado AE339 al que le correspondió el mayor valor de biomasa y el menor rendimiento, coincidiendo con Lasala *et al.* (2004), Guzmán & Hurtado (2011), Llontop (2012) y Ríos & Rivera (2012). Al respecto, Fernández (2012) demostró que el perfil de crecimiento de *P. putida* Kt 2442 es alterado por la síntesis de PHA. Investigando esta bacteria y el mutante en el gen que codifica para la polimerasa phaC1, se determinó que en condiciones de producción de PHA, las células utilizaron parte de su materia y energía para la producción de PHA, alcanzando menor masa celular en comparación con la biomasa del mutante no acumulador del polímero.

El rendimiento Y (p/x) máximo alcanzado por el aislado AE228 fue 0,725 gg<sup>-1</sup>, superando 0,460 gg<sup>-1</sup> y 0,348 gg<sup>-1</sup> reportados por Guzmán & Hurtado (2011) y Llontop (2012) para bacterias halófilas aisladas de salinas, respectivamente. Los aislados AE228, AE219 y AE222, alcanzaron rendimientos de PHA de 60,72 – 72,52% superando el rango 21 – 48% mencionado por Dong *et al.* (2006), Huang *et al.* (2006), Guzmán & Hurtado (2011) y Llontop (2012). Estas bacterias son consideradas promisorias por su rendimiento, por cuanto el contenido de PHA afecta la eficiencia de extracción. Para que el proceso sea rentable es necesario que la bacteria acumule por lo menos 60% de masa celular en PHA. El rendimiento y la pureza en el proceso de extracción son dependientes del contenido de PHA y cuanto mayor es éste, menor es el costo de insumos requeridos (Dalcanton, 2006). Si las condiciones de fermentación son mejoradas es posible que se incremente la acumulación de PHA. Adicionalmente estas bacterias autóctonas pueden ser mejoradas genéticamente para aumentar la viabilidad económica en la producción del polímero (Naranjo, 2010).

## VI. CONCLUSIONES

- En muestras de suelo y agua de las salinas de Mórrope se aislaron bacterias halófilas moderadas (15% NaCl) y extremas (20-25% NaCl).
- En el 39,74% de las bacterias halófilas se observaron gránulos de PHA mediante la tinción de Sudan Negro B.
- Las bacterias halófilas en las que se cuantificó el mayor número (40-85) de células con gránulos de PHA se seleccionaron.
- Los mayores rendimientos  $Y$  (p/x) fueron  $0,725 \text{ gg}^{-1}$  con la bacteria halófila AE228;  $0,631 \text{ gg}^{-1}$  con AE219 y  $0,607 \text{ gg}^{-1}$  con AE222, equivalentes a 75,52; 63,10 y 60,72% respectivamente.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Identificar a nivel molecular las bacterias halófilas AE228, AE219 y AE222.
- Determinar las características físico-químicas del PHA producido por las bacterias AE228, AE219 y AE222.
- Optimizar el proceso fermentativo para producir PHA con las bacterias AE228, AE219 y AE222.

## VIII. RESUMEN

Los plásticos de origen petroquímico son muy utilizados en la actualidad; no obstante, al ser resistentes a la biodegradación se acumulan y contaminan el ambiente. Los bioplásticos del tipo de los polihidroxialcanoatos, PHA, sintetizados por bacterias constituyen una alternativa de reemplazo. En este contexto, se realizó la presente investigación, cuyo objetivo fue determinar el rendimiento de PHA de bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambayeque. Las muestras se enriquecieron en caldo HM<sub>1</sub> con 15, 20 y 25% NaCl, aislándose bacterias halófilas moderadas (15% NaCl) y extremas (20 - 25% NaCl). En el 39,74% de las bacterias se observaron gránulos de PHA, mediante la tinción con Sudan Negro B. Las bacterias en las que se cuantificó el mayor número (40 – 85) de células con gránulos de PHA, se seleccionaron y cultivaron en caldo HM<sub>2</sub>, alcanzándose rendimientos Y (p/x) de 0,725 gg<sup>-1</sup> con AE228; 0,631 gg<sup>-1</sup> con AE219 y 607 gg<sup>-1</sup> con AE222, equivalentes a 72,52; 63,10 y 60,72%. Se demostró que las bacterias halófilas nativas tienen potencial como productores de PHA.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación*. Lambayeque, Perú. Editorial Ciencia.
- Ávila, I. (2007). *Determinación del efecto producido por diferentes tipos de aceites vegetales y combinaciones en la biosíntesis y composición del polihidroxicanoato producido por Pseudomonas putida IPT046 y Pseudomonas aeruginosa IPT171*. (Tesis de Microbiología). Pontificia Universidad Javeriana, Sao Paulo, Brasil.
- Baca, K. & Sánchez, M. (2010). *Polihidroxicanoatos de cepas de Azospirillum spp. aisladas de raíces de Lycopersicon esculentum Mill. "tomate" y Oryza sativa L- "arroz" en Lambayeque*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Barbosa, M., Espinosa, A., Malagón, D. & Moreno, N. (2005). *Producción de poli-B-hidroxibutirato (PHB) por Ralstonia eutropha ATCC 17697*. *Universitas Scientarum*, 10(1), 45-54.
- Chen, C., Dong, T. & Yeng, H. (2006). Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly (3 – hydroxybutyrate – co – 3 – hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry*, 41, 2289 – 2296.

- Cardona, A., Mora, A. & Marín, M. (2013). Identificación molecular de bacterias productoras de Polihidroxialcanoatos en subproductos de lácteos y caña de azúcar. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 66(2), 7129-7140.
- Cholula, L. (2005). *Estudio de la producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense* Sp7*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, Tamaulipas, México.
- Carreño, C., Hurtado, A. & Mendoza, V. (2010) *Microbiología General*. Lambayeque, Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Castillo, L. & Barragán, B. (2011). Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. *Revista Sistemas Ambientales*, 4(2), 45-54.
- Castro, L., Flores, A., Rodríguez, A., Aguilar, M., Aguilar, C. & Rodríguez, R. (2011). Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro Ciénegas Coahuila, México, *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3, 5-8.
- Cerrone, F. (2011). *Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alpeorujo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno*. (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, España.
- Dantas, A. (2005). *Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido*. (Tese de Mestrado). Universidad Federal Río de Janeiro, Maio, Brasil.
- De Almeida, A., Ruiz, J. López, N. & Pettinari, M. (2004). Bioplásticos: Una alternativa ecológica. *Revista Química Viva*, 3, 122 – 133.
- Dalcanton, F. (2006). *Produção, extração e caracterização de Poli (3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos*. (Tesis de Maestría). Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Das Sarma, S. & Arora, P. (2001). *Halophiles, Encyclopedia of Life Sciences*. Natura Publishing Group, 8, 458-466.
- Díaz, S. (2007). *NAD – glutamato deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*: clonaje, secuenciación y expresión: Purificación y propiedades de la enzima nativa y recombinante*. (Tesis de Doctorado). Universidad de Alicante, Alicante, España.
- Dorán, P. (1988). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. España: Editorial Acribia, S.A.



- Dong, C., Will, C. & Tzu, Ch. (2006). Preparation and characterization of poly (hydroxyalkanoates) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*, *Journal of Biomaterials Science Polymer*, 17(12), 1425 – 1438.
- Dyall, M. (2008). *The Halohandbook: Protocols for haloarchaeal genetics*. Recuperado de <http://www.haloarchaea.com>
- Fernández, P., Ortiz, F., Burbano, O., Guerrero, M. & Edmundo, J. (2005). Caracterización de poli-(hidroxibutirato - co-hidroxiclaurato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides*, FLB2. *Revista Centro de Estudios en Salud*, 1(6), 5-12.
- Fernández, I. (2012). *Estudio del metabolismo de polihidroxiclauratos con Pseudomonas putida: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de plásticos funcionalizados*. (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Franco, M., Gómez, D., Castro, N. y Rendón, M. (2009). Polihidroxiclauratos en actinomicetos nativos de suelos colombianos. *Revista Peruana de Biología*, 16(1), 115 – 118.
- Flores, M., Zavaleta, A., Zambrano, Y., Cervantes, L. & Izaguirre, V. (2010). Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e Investigación*, 13(1), 42-46.
- Fuentes, J. (2011). *Exopolisacáridos con actividad emulgente sintetizados por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de melaza de caña (Saccharum officinarum L.)*. (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- González, Y., Meza, J., González, O. & Córdova J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxiclauratos: Plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, 29(1), 77 – 115.
- Gonzales, J. & Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(3-4), 137-156.
- Guzmán, C. & Hurtado, A. (2011). *Producción de polihidroxiclauratos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de Solanum tuberosum L.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Guzmán, M. & Guz, H. (2008). *Producción de plásticos biodegradables obtenidos de bacterias halófilas aisladas de la laguna Blanca-Potosí Biotecnológicos*. (Tesis de Maestría) Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia.
- Han, J., Lu, Q., Zhou, L., Zhou, J & Xiang, H. (2007). Molecular Characterization of the phaEC<sub>hm</sub> genes, required for biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6058-6065.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: Mc Graw. Hill Interamericana Editores S.A.
- Hermida, E. & Díaz, G. (2004). Cambios microestructurales durante la cristalización de poliésteres biodegradables. Recuperado de <http://www.materiales-sam.org.ar/sitio/biblioteca/laserena/173.pdf>
- Huang, T., Duan, K. & Huang, S. (2006). Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*, *Journal of Microbiology Biotechnology*, 33, 701 – 706.
- Kushner, D. & Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic bacteria, *Halophilic Bacteria*, 1, 109 – 138.
- Instituto Nacional de Defensa Civil, INDECI. (2004). Mapa de peligros de la ciudad de Morrope: informe final. Recuperado de [http://bvpad.indeci.gob.pe/doc/estudios\\_CS/Region\\_lambayeque/lambayeque/morrope\\_mp.pdf](http://bvpad.indeci.gob.pe/doc/estudios_CS/Region_lambayeque/lambayeque/morrope_mp.pdf)
- Lasala, F., Martinez, J., Nuñez, R., Rozsa, Ch., Galego, N., Carballo, M. & Solano, R. (2004). Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por bacterias Diazótrofas II. Estudio de la síntesis a escala de Zaranda con *Mesorhizobium plurifarium* (4033). *Revista Biología*, 18(2), 136 – 146.
- Legat, A., Gruber, C., Zangger, K., Wanner, G. & Stan, H. (2010). Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 87, 1119-1127.
- Lisboa, C. & Segura, S. (2010). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos de cepas de Cupriavidus necator aisladas de rizósfera de Zea mays “maíz”, en Reque, Lambayeque, 2010*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Llontop, M. (2012). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos de bacterias halófilas extremas aisladas de salinas en Lambayeque, 2012*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- López, A. (2010). Bioprospección de bacterias marinas productoras de polihidroxialcanoatos en tapetes microbianos contaminados. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, México.
- Lovera, D., Zavaleta, A., Puente, L., Quiñones, J., Gagliufi, P., Coronado et al. (2008). Hidrometalurgia de minerales sulfurados con presencia de bacterias en medios salinos. *Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG*, 11 (22), 7-12.
- Luque, R., Quesada, E., Béjar, V. & Llamas, I. (2010). Aislamiento de cepas del género *Halomonas* con interés biotecnológico en Rambla Salada (Murcia). *Ars Pharmaceutica*, 51, 453-462.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Brock Biología de los Microorganismos*; 10ª edición. Madrid, España: Pearson Educación.
- Mantilla, M. (2007). *Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de Crisantemo (Chrysanthemum morifolium var. Yoko ono) en período de enraizamiento*. (Tesis de Microbiología), Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Martinez, J. (2004). Producción de polihidroxialcanoatos en bacterias diazótrofes I. Influencia de la aireación en la síntesis de poli- $\beta$ -hidroxibutirato en cepas de *Azospirillum brasilense* cepa 7. *Revista Biología*, 18(1), 87-95.
- Martínez, J., Rodríguez, M., Fernández, A., Villaverde, M., López, L., Marin, D., Núñez, R., Galego, N. & Carballo, E. (2004). Producción de polihidroxialcanoatos en bacterias diazótrofes. *Revista Biología*, 18(1), 87-95.
- Meseguer, I. (2004) Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e Investigación*, 2(2), 13-17.
- Margesin, R. & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5, 73-83.
- Moreno, N., Barbosa, M., Espinoza, A. & Malagón, D. (2005). Producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 176997. *Universitas Scientiarum*, 1, 45 – 54.

- Naranjo, J. (2010). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.
- Quillahuaman, J., Hatti, R., Mattiasson, B., Alvarez, M. & Delgado, O. (2004). *Halomonas bolivienses* sp. nov. analkalitolerant moderate halophile isolated from soil around a bolivian hypersaline lake. *International Journal of Systematic Anal Evolutionary Microbiology*, 54, 721 – 725.
- Quillahuaman, J., Doran-van., T., Guzmán, D., Martin, J., Everest, A & Hattikaul, R. (2008). Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 227-232.
- Razzaq, A., Jamil, N., Naheed, N. & Hasnain, S. (2010). Bacteria from contaminated urban and hilly areas as a source of polyhydroxyalkanoates production. *African Journal of Biotechnology*, 9(13), 1919-1925.
- Ramírez, N., Sandoval, A. & Serrano, J. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24, (1-2), 1-21.
- Reddy, C., Ghai, R., Rashmi & Kalai, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*, 87(2), 137-146.
- Ríos, D. & Rivera, M. (2012). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos (PHAs) producidos por bacterias halófilas aisladas de agua de mar en los distritos de Pimentel y Santa Rosa en Lambayeque, 2011*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Rodríguez, F. & García, J. (1990). Effects of culture conditions on poli ( $\beta$ -hidroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Applied Environmental Microbiology*, 56(8), 2517-2521.
- Salmiati, Z., Salim, R & Olsson, G. (2008). *Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from mixed microbial cultures by simple digestion and saponification*. Malaysia: University Teknologi, Institute of Environmental and Water Resource Management.
- Sanchez, S., Marin, M., Mora, A. & Yepes, M. (2012). Identificación de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de Fique. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV(2), 89-100.

- Salehizadeh, H. & Van Loosdrecht, MC. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnology Advances*, 22(3), 261 – 279.
- Segura, D., Noguez, R. & Espin, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14, 361-372.
- Ventosa, A. (2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats: Hypersaline environments. España: University of Sevilla.

## ANEXO 1

### Cálculo de número de muestras de suelo y agua de las salinas para el aislamiento de bacterias productoras de PHA (Alvitres, 2000)

$$n = \frac{Z^2(p \cdot q)}{t^2}$$

Dónde:

n = Tamaño de la muestra.

Z = 1,96 ( $\alpha=0,05$ ) valor estándar.

p = Prevalencia o presencia de bacterias productoras de PHA en suelo y agua de salinas (0,90).

q = Ausencia (0,10).

t = Error permitido (8%)

$$n = \frac{(1,96)^2(0,10 \times 0,90)}{(0,08)^2}$$

$$\mathbf{n = 54 \text{ muestras}}$$

## ANEXO 2

### Cálculo del porcentaje de NaCl según conductividad eléctrica (CE).

Conductividad Eléctrica: millisiemens/centímetro [mS/cm]

$$CE = 558 \text{ [mS/cm]}$$

Conversión de millisiemens [mS] a micromho [ $\mu\text{S}$ ]

$$1 \text{ [mS]} = 1000 \text{ [ $\mu\text{S}$ ]}$$

$$558 \text{ [mS]} = 558000 \text{ [ $\mu\text{S}$ ]}$$

Conversión de micromho [ $\mu\text{S}$ ] a Partes Por Millón [ppm]

$$2000 \text{ micromhos [ $\mu\text{S}$ ] } = 1000 \text{ ppm}$$

$$558000 \text{ micromho [ $\mu\text{S}$ ] } = 279000 \text{ ppm}$$

Conversión de Partes Por Millón [ppm] a Porcentaje de NaCl (%NaCl)

$$10000 \text{ ppm} = 1\% \text{ NaCl}$$

$$279000 \text{ ppm} = 27,9\% \text{ NaCl}$$

### ANEXO 3

#### Medio de cultivo (g/L) específico para halófilos extremos

(Según Rodríguez & García, 1990)

##### a. Caldo Halófilo extremos HM<sub>1</sub> modificado

MgCl <sub>2</sub>	16,000
MgSO <sub>4</sub>	24,000
CaCl <sub>2</sub>	1,000
KCl	5,000
NaHCO <sub>3</sub>	0,200
NaBr	0,500
NH <sub>4</sub> Cl	2,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,400
FeCl <sub>3</sub>	0,005
Glucosa	15,000
Extracto de levadura	7,500
Agua destilada cantidad suficiente	1000,000
pH final	7,0

Adicionar NaCl según la concentración requerida: 150, 200 y 250 gL<sup>-1</sup> (15, 20 y 25%). Para preparar agar halófilos extremos HM<sub>1</sub> modificado a 1 L de caldo HM<sub>1</sub> modificado agregar 20 g de agar-agar.

##### b. Caldo Halófilos Extremos HM<sub>2</sub> modificado

MgCl <sub>2</sub>	16,000
MgSO <sub>4</sub>	24,000
CaCl <sub>2</sub>	1,000
KCl	5,000
NaHCO <sub>3</sub>	0,200
NaBr	0,500
NH <sub>4</sub> Cl	2,000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,400
FeCl <sub>3</sub>	0,005
Glucosa	30,000
Extracto de levadura	0,750
Agua destilada cantidad suficiente	1000,000
pH final	7,0

Adicionar NaCl según la concentración requerida: 150, 200 y 250 gL<sup>-1</sup> (15, 20 y 25%).



## **ANEXO 4**

### **Técnica de coloración con Sudán Negro B**

(Según Martínez, 2004; modificado por Guzmán & Hurtado, 2011)

- Realizar un frotis.
- Cubrir con solución de Sudán Negro B durante 15 minutos.
- Decolorar con xilol y dejar secar a temperatura ambiente.
- Contrateñir con safranina durante 50 segundos.
- Lavar con agua.
- Observar con lente de inmersión: los gránulos de PHA se colorean gris negro y las células vegetativas de rosado.

## **ANEXO 5**

### **Cuantificación de polihidroxicanoatos por espectrofotometría**

(Según Law & Slepecky, 1961; mencionado por Cholula, 2005)

- Colocar el polímero obtenido en un tubo de ensayo.
- Agregar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Llevar a baño maría a 90 – 95 °C por 10 minutos en agitación constante.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Depositar el polímero tratado en una celda de cuarzo y leer la absorbancia a 235 nm.