



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO
DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



**Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por
microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el
distrito de San José en Lambayeque, 2019**

TESIS

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

AUTOR:

Bach. Jhonattan Jhoseph Cantos Chávez

ASESORA:

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

**LAMBAYEQUE, PERÚ
2023**

**Rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por
microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el
distrito de San José en Lambayeque, 2019**

TESIS

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

APROBADA POR:

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza



PRESIDENTA

Dra. Gianina Llontop Barandiarán



SECRETARIA

Lic. Julio César Silva Estela



VOCAL

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán



ASESORA

LAMBAYEQUE, PERÚ
2023

AGRADECIMIENTO

Con estas breves palabras expreso mi más grande y sincero agradecimiento a Dios y a todas las personas que con su ayuda han colaborado en la elaboración del presente trabajo.

Un agradecimiento muy especial a mi asesora la Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán quien se comprometió desde el inicio transmitiéndome su conocimiento y sabiduría, por sus aportes profesionales que la caracterizan, por su visión crítica, por sus consejos, que siempre los llevare conmigo en mi transitar profesional.

A mi familia, ustedes han sido siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas, quienes estuvieron siempre a mi lado, siempre han sido mis mejores guías de vida y les dedico a ustedes este logro, como una meta más conquistada.

Índice

I.	INTRODUCCIÓN	10
II.	DISEÑO TEÓRICO	12
2.1	Antecedentes	12
2.2	Bases teóricas	14
2.3	Operacionalización de variables	17
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1	Tipo de investigación y Diseño de contrastación de hipótesis	18
3.2	Población y muestra	18
3.3	Procedimiento	18
3.4	Procesamiento y análisis de datos	24
IV.	RESULTADOS	25
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
VI	CONCLUSIONES	57
VII.	RECOMENDACIONES	58
VIII.	REFERENCIAS	59
IX	ANEXOS	71

Índice de Tablas

Tabla 1.	Conductividad eléctrica y porcentaje de sodio intercambiable de suelos salino-sódicos donde se aislaron microorganismos, Lambayeque 2019.....	27
Tabla 2.	Características diferenciales de morfotipos de colonias de microorganismos halófilos procedentes de suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019.....	27
Tabla 3.	Microorganismos halófilos según forma de las células y reacción a la coloración de Gram, aislados de suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019.....	31
Tabla 4.	Características diferenciales del crecimiento de microorganismos halófilos en caldo MH ₂ , Lambayeque 2019.....	33
Tabla 5.	Numero de células de microorganismos halófilos con gránulos de PHA a las 30, 45 y 60 horas de crecimiento en caldo MH ₂ , Lambayeque 2019...	37
Tabla 6.	Número de cultivos de microorganismos halófilos Gram positivos según el número de células con gránulos de PHA, Lambayeque 2019.....	38
Tabla 7.	Número de cultivos de microorganismos halófilos Gram negativos según el número de células con gránulos de PHA, Lambayeque 2019.....	38
Tabla 8.	Bacilos halófilos productores y acumuladores de gránulos de PHA seleccionados, Lambayeque 2019.....	39
Tabla 9.	Densidad óptica (600 nm) del caldo MH ₂ cultivado con microorganismos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.....	41
Tabla 10.	Velocidad específica de crecimiento de microorganismos Gram positivos y Gram negativos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoato, Lambayeque 2019.....	45
Tabla 11.	Características morfológicas bioquímicas y fisiológicas del microorganismo halófilo productor y acumulador de gránulos de polihidroxialcanoatos aislado de suelo salino-sódico, Lambayeque 2019.....	46

Tabla 12. Parámetros de rendimiento de polihidroxialcanoatos en relación a la biomasa (Y p/x) de <i>Halomonas</i> sp. C-361, en glucosa como fuente de carbono, Lambayeque 2022.....	49
---	----

Índice de Figuras

Figura 1.	Ubicación del distrito San José en Lambayeque, 2019 (https://maps.google.com.pe/)	20
Figura 2.	Zona de muestreo en el sector de riego La Compuerta, distrito San José, provincia Lambayeque, región Lambayeque, 2019.....	20
Figura 3.	Coloración con Sudan Negro B. (a) adición del colorante, (b) flameo, (c) decoloración, (d) tinción con safranina, (e) lavado.....	22
Figura 4.	Frecuencia de aislamiento de los morfotipos de colonias microbianas halófilas en suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019.....	28
Figura 5.	Frecuencia de microorganismos Gram positivos y Gram negativos halófilos aislados en suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019.....	28
Figura 6.	Observación microscópica (1000x) de levaduras halófilas cultivadas en agar MH ₂ , Lambayeque 2019.....	29
Figura 7.	Frecuencia de bacterias y levaduras halófilas aisladas en suelos salino-sódicos en el distrito de San José, Lambayeque 2019.....	29
Figura 8.	Observación microscópica (1000x) de cocos Gram positivos halófilos cultivados en agar MH ₂ , Lambayeque 2019.....	30
Figura 9.	Observación microscópica (1000x) de filamentos Gram positivos halófilos cultivados en agar MH ₂ , Lambayeque 2019.....	30
Figura 10.	Colonias de bacilos Gram positivos (a,b) y Gram negativos (c, d y e) halófilas desarrollados en agar MH ₂ , Lambayeque 2019	32
Figura 11.	Película superficial de microorganismos halófilos en caldo MH ₂ , Lambayeque 2019.....	33
Figura 12.	Gránulos de polihidroxialcanoatos en bacilos (a, b) y filamentos (c, d) de microorganismos halófilos, Lambayeque 2019.....	35

Figura 13.	Frecuencia de microorganismos halófilos Gram positivos y Gram negativos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos aislados de suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019.....	36
Figura 14.	Porcentaje de microorganismos halófilos con gránulos de polihidroxialcanoatos a las 30, 45 y 60 horas de crecimiento en caldo MH ₂ , Lambayeque 2019.....	36
Figura 15.	Observación microscópica (1000x) de bacterias Gram positivas (a) y bacterias Gram negativas (b) con el rango de 1 – 50 células con gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.....	37
Figura 16.	Densidad óptica (600 nm) del caldo MH ₂ cultivado con microorganismos Gram positivos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.....	42
Figura 17.	Densidad óptica (600 nm) del caldo MH ₂ cultivado con microorganismos Gram negativos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.....	42
Figura 18.	Linealización de la fase exponencial de crecimiento de microorganismos Gram positivos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.....	43
Figura 19.	Linealización de la fase exponencial de crecimiento de microorganismos Gram negativos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.....	44
Figura 20.	Observación microscópica (1000x) de <i>Halomonas</i> sp. C-361 productora y acumuladora de gránulos de polihidroxialcanoatos coloreados con Sudan Negro B, Lambayeque 2019.....	47
Figura 21.	Polihidroxialcanoato producido por <i>Halomonas</i> sp. C-361, Lambayeque 2022.....	49

RESUMEN

Los polihidroxialcanoatos (PHA) microbianos constituyen una alternativa de reemplazo a los poliésteres derivados petróleo, contaminantes del ambiente. El objetivo de la investigación fue determinar el rendimiento de PHA producido por los microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el distrito de San José en Lambayeque. Los microorganismos se aislaron con agar nutritivo con 5% NaCl, se seleccionaron los microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de PHA, se comparó la cinética de crecimiento de diez microorganismos seleccionados, se identificó el género del microorganismo con la mayor velocidad específica de crecimiento y se determinó el rendimiento del producto PHA en relación a la biomasa ($Y_{p/x}$). El 41 % los microorganismos halófilos (89 % Gram positivos y 11 % Gram negativos) cultivados por 60 horas en glucosa como fuente de carbono demostraron ser productores y acumuladores de gránulos de PHA y entre éstos se seleccionaron seis bacilos Gram positivos y cuatro bacilos Gram negativos, que presentaron 103 - 186 células con gránulos de PHA. La velocidad específica de crecimiento fue de $0,1662 - 0,3946 \text{ h}^{-1}$ y el microorganismo con el mayor valor se identificó como *Halomonas* sp. C-361. Este microorganismo alcanzó $3,950 \text{ g L}^{-1}$ de biomasa celular (x); $3,090 \text{ g L}^{-1}$ de PHA (P), con un $Y_{p/x}$ de $0,782 \text{ g g}^{-1}$ y demostró potencial para la producción de PHA.

Palabras clave: Polihidroxialcanoatos, Suelo salino-sódicos, *Halomonas*.

ABSTRACT

Microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) are a replacement alternative to petroleum-derived polyesters, which pollute the environment. The objective of the research was to determine the yield of PHA produced by microorganisms isolated from saline-sodic soils in the district of San José in Lambayeque. The microorganisms were isolated on nutrient agar with 5% NaCl, halophilic microorganisms producing and accumulating PHA granules were selected, the growth kinetics of ten selected microorganisms were compared, the genus of the microorganism with the highest specific growth rate was identified and the PHA product yield was determined in relation to the biomass ($Y_{p/x}$). The 41 % halophilic microorganisms (89 % Gram positive and 11 % Gram negative) cultured for 60 hours in glucose as carbon source proved to be producers and accumulators of PHA granules and among these six Gram positive and four Gram negative bacilli were selected, which presented 103 - 186 cells with PHA granules. The specific growth rate was $0.1662 - 0.3946 \text{ h}^{-1}$ and the microorganism with the highest value was identified as *Halomonas* sp. C-361. This microorganism reached 3.950 g L^{-1} of cell biomass (x); 3.090 g L^{-1} of PHA (P), with a $Y_{p/x}$ of 0.782 g g^{-1} and showed potential for PHA production.

Key words: Polyhydroxyalkanoates, Saline-sodic soil, *Halomonas*.

I. INTRODUCCIÓN

Los plásticos son polímeros derivados del petróleo (petroplásticos) con resistencia a la humedad, productos químicos y temperatura, características por las que son utilizados en la mayoría de productos (Urtuvia et al., 2014); sin embargo, también los hacen recalcitrantes a la degradación microbiana y se ha estimado que 4,9 billones de los plásticos producidos se acumulan al año en los vertederos o en los ambientes naturales (Nielsen et al., 2020). Los plásticos constituyen el 8 % en peso o 25 % en volumen de los residuos urbanos, persisten en el suelo por más de 100 años (Qui et al., 2021) y por acción de los factores ambientales se fragmentan en microplásticos (< a 5 mm) y nanoplásticos (< 1 μm) que contaminan el suelo, mar y aire (Strungaru et al., 2019; Gasperi et al., 2017; Pinto et al., 2016).

En el suelo los plásticos reducen la fertilidad y la capacidad de filtración del agua en las plantas (Pramila y Vijaya, 2015), afectan el crecimiento y rendimiento de los cultivos agrícolas (Qi et al., 2018; Urbina et al., 2018) e inhiben el crecimiento e incrementan la mortalidad de las lombrices de tierra *Eisenia foetida* (Cao et al., 2017). En el mar los plásticos son ingeridos por los organismos de la base de la cadena alimenticia o constituyen una superficie disponible para la adherencia de contaminantes orgánicos persistentes que se bioacumulan y biomagnifican (Di Mauro et al., 2017; Pinto et al., 2016; Elías, 2015).

En la región Lambayeque se recogen en promedio 1099 toneladas diarias de residuos sólidos municipales (RSM), que en su mayoría (91,5 %) son arrojados en los botaderos y el resto es reciclado o quemado (Orihuela, 2018). En la provincia de Lambayeque el 7,31 % de los RSM domiciliarias corresponde al plástico polietileno de baja densidad; el 2,62 % el cloruro de polivinilo y el 2,55 % al tereftalato de polietileno (Municipalidad Provincial de Lambayeque, 2015). En los botaderos el plástico se acumula y persiste 55 – 500 años y cuando es quemado genera gases tóxicos (Oficina de Información Científica y Tecnológica para el Congreso de la Unión [INCyTU], 2019).

En los suelos salino-sódicos el contenido de sales solubles expresado como conductividad eléctrica (CE_e) es mayor de 4 dSm^{-1} y el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) es mayor de 15 %, condiciones que desfavorecen la disponibilidad de nutrientes y son adversas para los seres vivos (Lamz y González, 2013). Los

microorganismos pueden sobrevivir gracias a diferentes mecanismos, entre los que destaca la síntesis de polihidroxialcanoatos, PHA (Flores et al., 2018), que constituyen una fuente de carbono y energía (Park et al., 2012).

Los PHA son poliésteres producidos por diferentes microorganismos y acumulados con gránulos intracelulares. Presentan propiedades similares a los petroplásticos, pero son biodegradables; sin embargo, el costo de producción es muy alto (2,0 – 5,0 euros por kg) en comparación con el de los petroplásticos, con un costo menor de 1 euro por kg (Alcaraz et al., 2017). Por tanto, las investigaciones se orientan a la búsqueda de nuevas cepas microbianas con mayor rendimiento (Kovalcik et al., 2017), uso de sustratos residuales para la obtención del polímero (Malagón et al., 2017), mejoramiento de las técnicas de recuperación (Alcaraz et al., 2017) y modificación genética de los microorganismos productores (Palmeiro et al., 2022; Ye et al., 2018).

El problema de la investigación fue: ¿Cuál es el rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el distrito de San José en Lambayeque, 2019?. La hipótesis planteada fue: Los microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el distrito de San José en Lambayeque, 2019, alcanzan un rendimiento de polihidroxialcanoatos (PHA) mayor de 0,60 g por g de biomasa formada o un contenido mayor al 60 % de su biomasa seca.

El objetivo general de la investigación fue: Determinar el rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por los microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el distrito San José, Lambayeque, 2019. Los objetivos específicos fueron: Seleccionar los microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de PHA de suelos salino-sódicos en el distrito de San José en Lambayeque, 2019, comparar la cinética de crecimiento de los microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de PHA seleccionados, identificar el género del microorganismo con mayor velocidad específica de crecimiento y determinar el rendimiento del producto PHA en relación a la biomasa ($Y_{p/x}$) o contenido del polímero en el microorganismo seleccionado.

II. DISEÑO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Li et al. (2021) Investigaron la síntesis y acumulación de PHA por bacterias halófilas aisladas de salinas. Dos bacterias seleccionadas se cultivaron en diferentes azúcares, ácidos orgánicos y ácidos grasos como fuente de carbono para la producción de PHA. En la biomasa obtenida se recuperó el PHA y se caracterizó mediante Cromatografía de Permeación en Gel (GPC). Se aislaron 50 colonias de bacterias entre las que el 4 % demostró producción y acumulación de PHA. Se identificaron dos cepas de *Vibrio alginolyticus* (01 y 02). La cepa 01 produjo PHB en glucosa, sucrosa, almidón soluble, acetato, butirato, glicerol y ácidos oleico y linoleico y la cepa 02 sólo produjo el polímero en almidón soluble y glicerol. Con *V. alginolyticus* 01 el contenido de PHA fue de 37,14 % (sucrosa), 22,96 % (glicerol) y 23,21 % (ácido oleico) y la concentración máxima de polímero fue de 1,87 g L⁻¹ con glicerol. El análisis por GPC demostró en el PHA un peso molecular promedio en peso (Mw) de 201 x 10³ Da y un peso molecular promedio numérico (Mn) de 90 x 10³ Da, ambos valores en el rango del peso del PHA. Se evidenció la producción de PHA por bacterias halófilas del género *Vibrio*.

El-malek et al. (2021) Investigaron la producción de PHA por bacterias marinas del género *Halomonas* en hidrolizado de algas como fuente de carbono. Las bacterias ASL10 y ASL11 se cultivaron en medio sales minerales con 2 % de sucrosa y también con 2 % de hidrolizado de algas, 37 °C, 160 rpm por 72 horas. La biomasa obtenida se mezcló con acetona, se centrifugó y se agregó cloroformo para recuperar el PHA. El polímero se caracterizó por Cromatografía de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y las nanopartículas se obtuvieron con el método de “emulsión del aceite en agua”. Las bacterias cultivadas en sucrosa como fuente de carbono alcanzaron 3,5 g PHA L⁻¹ (*H. pacifica*) y 3,7 g L⁻¹ (*H. salifodiane*) y contenidos de 82 y 83 % respectivamente en comparación de 2,8 - 3,0 g PHA L⁻¹ y contenido de 63 - 67 % en hidrolizado de *Corallina mediterranea*. FTIR demostró los grupos funcionales característicos del PHA y las nanopartículas obtenidas demostraron potencial para aplicaciones farmacéuticas.

Gabr (2018) investigó la eficiencia de producción de PHA en bacterias aisladas de suelo. Las bacterias se reconocieron por la fluorescencia observada en agar nutritivo

más Rojo Nilo. El polímero recuperado con la bacteria de mayor fluorescencia se analizó mediante espectroscopía infrarroja (IR). La bacteria seleccionada se cultivó en cuatro medios con diferentes fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, pH y períodos de incubación. *Bacillus* sp. alcanzó la mayor producción de PHA con 8 % de jarabe de palma; 0,2 % de cloruro de amonio; 0,2 % de fosfato de potasio y pH 7,2 durante 72 horas. Se demostró que *Bacillus* sp. puede ser utilizado para la producción de PHA en diferentes sustratos.

Flores et al. (2018) investigaron la producción de PHA por microorganismos halófilos de suelo y aguas de salinas. El proceso fermentativo se realizó con caldo HM₁, con glucosa (15 g L⁻¹) y NaCl (15, 20, 25 g/100 mL) se incubó a 30 °C y los microorganismos halófilos se aislaron en agar HM1. En el 38,74 % de los microorganismos aislados se observaron gránulos de PHA coloreados con Sudan Negro B y se seleccionaron 20 microorganismos con 40 - 85 células con gránulos de PHA. La biomasa fue de 0,005 g L⁻¹ (72 horas) y 3,211 g L⁻¹ (240 horas). El rendimiento Y_{p/x} fue de 0,270 - 0,725 g g⁻¹ y destacaron con más de 60 % los microorganismos AE222 (60,73 %), AE2019 (63,10 %) y AE228 (72,52 %), considerados promisorios para la producción de PHA.

Martínez (2018) caracterizó los microorganismos productores de PHA en ambientes hipersalinos. Éstos se aislaron en agar marino suplementado con glucosa o acetato (carbono) y *Pseudomonas* agar F. Las colonias microbianas productoras de PHA se seleccionaron por las inclusiones citoplasmáticas refringentes (Rojo Nilo) detectadas en el microscopio de contraste de fases y los gránulos lipofílicos teñidos con Sudan Negro B y posteriormente se realizó la caracterización molecular. Se seleccionaron 55 morfotipos de colonias y en el 10,87 % se detectó la presencia de gránulos de PHA. La caracterización basada en las secuencias parciales del gen 16S ARNr identificó los géneros *Halomonas*, *Parococcus*, *Planomicrobium* y *Staphylococcus* como productores de PHA. Se demostró que los tapetes microbianos de ambientes hipersalinos albergan bacterias que pueden ser utilizadas la producción de PHA.

Wala`a Shawkat et al. (2017) caracterizaron bacterias productoras de PHA aisladas de suelos y residuos orgánicos. Las muestras se mezclaron con solución salina (10⁻⁸) y se sembraron en agar nutritivo, las bacterias aisladas se sembraron en medio marino Davis por 48 - 72 horas y después se colorearon con Sudan Negro B para

observar los gránulos de PHA característicos. El PHA se recuperó mediante el método de hipoclorito-cloroformo y se caracterizó mediante espectroscopía de infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) y cromatografía de gases/ espectrometría de masas (GC/MS). Se aislaron 28 bacterias y en el 71 % se diferenciaron gránulos de PHA. Las bacterias seleccionadas W1, W2 y W3 de suelo y S1 y S2 de residuos orgánicos, identificadas como *Bacillus* spp. produjeron 1 - 74 mg/L de polímero caracterizado como PHB. Se demostró el potencial de *Bacillus* spp. para la producción de PHB.

Guzmán et al. (2017) investigaron la producción de PHA por bacterias halófilas en tres concentraciones de almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. "papa". Las bacterias del agua de ocho salinas se enriquecieron en caldo HM₁ con 5 - 30 g 100 mL⁻¹ de NaCl. Se obtuvieron 203 bacterias halófilas que fueron cultivadas en caldo HM₂ con 10 g L⁻¹ de glucosa y en el 38,92 % se observaron gránulos de PHA coloreados por Sudan Negro B. Los 20 microorganismos con gránulos de PHA en el 65 - 95 % de las células fueron llevados a fermentación y alcanzaron 0,174 - 0,889 g g⁻¹ de rendimiento Y (p/x). *Halomonas* sp. M4C1 sintetizó 0,144 g g⁻¹ PHA en caldo HM₂ con 10 g L⁻¹ almidón como fuente de carbono. Se demostró la producción de PHA por las bacterias halófilas en un sustrato residual de bajo costo.

2.2 Bases teóricas

Los PHA son considerados como una estrategia desarrollada por diversos procariotas para sobrevivir bajo condiciones desfavorables. Estos compuestos son metabolizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes, para el enquistamiento, la esporulación y para la protección del complejo nitrogenasa. Los PHA son termoplásticos y por su naturaleza química son poliésteres de ácidos hidroxialcanoicos en los que el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del siguiente monómero (Prados y Maicas, 2016). El peso molecular oscila entre 2×10^5 a 3×10^6 Da. Los PHA pueden ser de cadena corta (short chain lenght, scl-PHA) con C3 a C5; de cadena media (medium chain lenght, mcl-PHA) con C6 - C14; cadena larga (long chain lenght, lcl-PHA) con más de C14 y PHA constituidos por cadenas cortas y medias (Muhammadi et al., 2015).

La biosíntesis de PHA ocurre básicamente en dos pasos: generación de hidroxilacil-CoA (HA-CoA) usando varios metabolitos como precursores y polimerización de los HA-CoA en reacción catalizada por la PHA sintasa. Los PHA son

metabolitos secundarios, sintetizados y acumulados como gránulos en el citoplasma, bajo condiciones deficientes de nitrógeno (N), fósforo (P), azufre (S), magnesio (Mg) u oxígeno, con exceso de la fuente de carbono (Park et al., 2012). El número de gránulos de PHA depende de la presencia de las fasinas o proteínas estructurales. Estos gránulos pueden constituir más del 90 % del peso de la materia seca y todos son degradados hasta dióxido de carbono y agua mediante la mineralización microbiana (Prados y Maicas, 2016).

Las colonias de bacterias productoras de PHA observadas en medio sólido suplementado con Rojo Nilo o con Azul Nilo se reconocen por la fluorescencia observada bajo Luz ultravioleta (Otero y Fernández, 2013; Sangkhakarak y Prasertsan, 2012). Los gránulos de PHA intracelulares son detectados mediante la coloración con Sudan Negro B (Martínez et al., 2018), Rojo Nilo (Gabr, 2018) y Azul de Nilo A (Santoyo y Noriega, 2017) y se observan estructuras redondeadas de color azul oscuro o con fluorescencia refringente color anaranjado, respectivamente.

Los géneros de microorganismos identificados como productores de PHA son *Bacillus* (Gabr, 2018), *Proteus*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium* (Sangkhakarak y Prasertsan, 2012), *Cupriavidus* (Johnston et al., 2018), *Halomonas* (Xiao et al., 2021) y las *Archaea* *Haloferax*, *Halobacterium*, *Halococcus*, entre otros (Muhammadi et al., 2015). El polímero es caracterizado mediante cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, GC-MS (Wala`a Shawkat et al., 2017) y espectrometría Infrarroja, IR (Gabr, 2018), entre otras técnicas (López, 2015).

2.2.1 Microorganismos halófilos

Los halófilos son microorganismos que viven en los ambientes salinos. Se encuentran en los dominios Arquea, Bacteria y Eukarya y son clasificados de acuerdo a la salinidad requerida para su crecimiento óptimo en halófilas débiles (0,2 - 0,85 M: 1 - 5 % NaCl), halófilos moderados (0,84 - 3,4 M: 5 – 20 % NaCl) y halófilos extremos (3,4 - 5,1 M: 20 - 30 % NaCl). Los microorganismos halófilos incluyen arqueas metanogénicas, bacterias fotosintéticas, litotróficas y heterotróficas y eucariotas fotosintéticas y heterotróficas como por ejemplo la arquea *Halobacterium* sp, la cianobacteria *Aphanathece halophytica* y el alga verde *Dunaliella salina* (DasSarma y DasSarma, 2017).

Los microorganismos no requieren la misma concentración de sal para el crecimiento óptimo. La clasificación de los halófilos más aceptada considera los halófilos débiles (0,2 - 0,5 M sales), halófilos moderados (0,5 - 2,5 M sales), halófilos en el límite de los halófilos extremos (1,5 - 4 M sales), halófilos extremos (2,5 - 5,2 M sales) y los halotolerantes que no son halófilos, pero pueden tolerar más de 2,5 M sales (Daoud y Ben, 2020).

Los hábitats salinos en su mayoría son ambientes extremos debido a su salinidad extrema y los microorganismos que viven en estos ambientes son calificados como extremófilos halófilos (5 M NaCl), halófilos moderados (3 M NaCl) y halófilos débiles con un 1 M NaCl (Bin-Salman et al., 2018), aunque también son considerados halófilos aquellos microorganismos que crecen en el rango 0,6 - 5 M NaCl (Delgado et al., 2018).

Los organismos halófilos se encuentran en los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya, con predominio en los dos primeros dominios. Algunos halófilos no desarrollan debajo de 15 - 20% NaCl (p/v) y otros halotolerantes crecen sin o con NaCl (10 - 15 %). En 1962 se establecieron las categorías de microorganismos halófilos según la concentración de sales requerida para su óptimo crecimiento: halófilas débiles (2 - 5 % NaCl), halófilos moderados (5 - 20 % NaCl) y halófilos extremos (20 - 30 % NaCl). En el 2013 se establecieron las categorías microorganismos halofílicos (0 - 60 NaCl g L⁻¹), halófilos débiles (10 - 111 NaCl g L⁻¹), halófilos moderados (25 - 200 NaCl g L⁻¹), halofílicos en el límite de los halófilos extremos (80 - 230 NaCl g L⁻¹), halófilos extremos (115 - 300 NaCl g L⁻¹), halotolerantes (0 > 60 NaCl g L⁻¹) y haloversátiles (0 > 175 g L⁻¹), con valores (NaCl g L⁻¹) para el crecimiento óptimo < 10; 10 - 30; 30 - 115; 115 - 175; > 175; < 10 y 10 - 30 respectivamente (Daoud y Ben, 2020).

En la actualidad existen 1000 especies de microorganismos halofílicos identificados en los dominios Bacteria (50,1 %), Eukarya (27,8 %) y Archaea (21,9 %) (Daoud y Ben, 2020). Al respecto, Delgado et al. (2018) concluyeron que existe una correlación entre el contenido de aniones y cationes del suelo y la presencia de diferentes géneros de bacterias halofílicas. Los investigadores determinaron predominancia de *Alkalibacillus* en suelos con elevada concentración de Na⁺ y *Bacillus* y *Halobacillus* en los suelos con mayor concentración de Ca²⁺, Mg²⁺ y SO₄²⁻.

Los microorganismos halófilos crecen de manera óptima con más de 0,2 M NaCl y los halotolerantes viven con y sin alta salinidad. Para evitar el efecto deletéreo de la salinidad los halófilos acumulan altas concentraciones de solutos en el citoplasma. Éstos son denominados solutos compatibles u osmolitos que pueden ser aminoácidos, azúcares y polialcoholes y que no interfieren con el proceso metabólico (DasSarma y DasSarma, 2017).

En los ambientes salinos la disponibilidad del agua es mínima y las sales están muy concentradas, condición que favorece la deshidratación del microorganismo; no obstante, los halofílicos intercambian cationes y osmolitos (Delgado et al., 2018). El conjunto de mecanismos que presentan los microorganismos para controlar la presión osmótica interna se denomina osmorregulación. Los principales mecanismos son el transporte de iones a través de la membrana (bomba de iones) y la formación y acumulación de moléculas orgánicas en las células (Daoud y Ben, 2020).

2.3 Operacionalización de variables

Variables	Definición conceptual	Indicadores	Unidad
Rendimiento de polihidroxialcanoatos (PHA)	Contenido de PHA en relación a la biomasa celular (Flores et al., 2018).	Peso del PHA (p)	g L ⁻¹
		Peso de la biomasa (x)	g L ⁻¹
		Rendimiento Y p/x	g g ⁻¹
		Contenido de PHA	%
Microorganismos aislados de suelos salino-sódicos	Archaea, Bacteria y Eukarya desarrollados en suelos con una conductividad eléctrica > 4 dSm ⁻¹ y un porcentaje de sodio intercambiable > 15 % (Daoud y Ben, 2020).	Células microbianas con gránulos de PHA	Nº
		Velocidad específica de crecimiento	h ⁻¹

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de investigación y Diseño de contrastación de hipótesis

La investigación fue descriptiva y transversal, con un enfoque cuantitativo y un diseño observacional para la contrastación de la hipótesis.

3.2 Población y muestra

En la investigación de los microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de PHA la población correspondió a los suelos salino-sódicos del distrito San José, Lambayeque y se investigaron 54 muestras no probabilísticas y por conveniencia, colectadas durante octubre - diciembre de 2019. En la determinación del rendimiento de PHA en relación de la biomasa formada, se consideró como población a los microorganismos productores y acumuladores de gránulos aislados de suelos salino-sódicos de San José, Lambayeque y se investigó una muestra no probabilística y por conveniencia de un microorganismo seleccionado.

3.3 Procedimiento

a. Muestreo

El muestreo de suelo se realizó en el distrito de San José, en los sectores de riego de la Comunidad Campesina San José, denominados Rastrojo Baca, Gallito, La Madrid y La Compuerta (Figuras 1,2). En los sectores de riego Rastrojo Baca, Gallito y la Madrid se colectaron 13 muestras y en el sector La Compuerta 15 muestras, con un total de 54 muestras de suelo. En los cuatro sectores de riego se seleccionaron suelos salino-sódicos reconocidas por la dureza y la presencia de costras blancas superficiales, se delimitaron cuadrados de 1 m² y se colectaron muestras de suelo (100 g) hasta los 20 cm de profundidad (Delgado et al., 2018), se depositaron en frascos de vidrio y se trasladaron al laboratorio, donde se homogenizaron mediante el método del cuarteo y amontonamiento (Contreras y Carreño, 2018), se colectaron dos submuestras de 10 g y el suelo restante (80 g) de las muestras de cada sector de riego se mezcló y de esta manera se obtuvieron cuatro muestras compuestas de aproximadamente 1 kg cuya conductividad eléctrica (CE_e) y porcentaje de sodio intercambiable (PSI) se determinaron en el Laboratorio Agrícola Análisis de Suelos y Aguas (CYSAG).

Figura 1

Ubicación del distrito San José en Lambayeque, 2019 (<https://maps.google.com.pe/>).

**Figura 2**

Zona de muestreo en el sector de riego La Compuerta del distrito San José, provincia Lambayeque, región Lambayeque, 2019.



b. Selección de microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos en suelos salino-sódicos en el distrito San José, Lambayeque 2019

Las muestras (10 g) de suelo se depositaron en erlenmeyers con 90 mL de una solución salina esterilizada (NaCl 5 % p/v), se homogenizaron (5 minutos), se tomaron alícuotas, se sembraron por duplicado con agar nutritivo modificado (NaCl 5 % p/v, pH 8,0, 3 % agar) y se incubaron (RAYPA ID-50 serie 53546) a 30 °C por 120 horas. Las colonias microbianas desarrolladas se cultivaron por duplicado en caldo nutritivo con 5 % NaCl (Rizki et al., 2023) y 0,85 % NaCl, se incubaron a 30 °C por 120 horas y se consideraron microorganismos halófilos aquellos que crecieron en caldo nutritivo con 5 % NaCl, pero no con 0,85 % NaCl y microorganismos halotolerantes aquellos que crecieron en ambos caldos.

Los microorganismos halófilos se cultivaron nuevamente en agar nutritivo modificado (NaCl 5 % p/v, pH 8,0 y 3 % agar). En las colonias microbianas desarrolladas se identificaron los diversos morfotipos con base a la forma, borde, aspecto, elevación y color, se seleccionó una colonia representativa y se realizaron coloraciones de Gram. Los cultivos de microorganismos halófilos obtenidos se mantuvieron en refrigeración a 8 °C (Guzmán et al., 2017).

La detección de los microorganismos productores y acumuladores de gránulos de PHA se realizó mediante el cultivo de cada microorganismo halófilo en 8 mL de medio halófilos (HM₂) con glucosa (30 g L⁻¹) como fuente de carbono a 30 °C, en agitación a 180 rpm (LABNET ORBIT TM-1000 17030427) por 60 horas. A continuación, se realizaron coloraciones con Sudan Negro B, para lo cual a los frotis de las células microbianas se les agregó Sudan Negro B (0,3 % en etanol 70 %) y después de 15 minutos, se flamearon (20 segundos), transcurridos 20 minutos el exceso de colorante se removió con xilol, se agregó safranina 0,5 % (p/v) y después de 1 minuto se enjuagó con agua destilada (Figura 3) y se observó bajo el microscopio óptico (Worch et al., 2019). Los microorganismos se consideraron productores y acumuladores de gránulos de PHA cuando en el citoplasma coloreado de rosado se observaron gránulos negros o grisáceos.

Figura 3

Coloración con Sudan Negro B, (a) adición del colorante, (b) flameo, (c) decoloración, (d) tinción con safranina, (e) lavado.



Los microorganismos acumuladores de gránulos de PHA se cultivaron por segunda vez en 8 mL de caldo HM₂ con glucosa (30 g L⁻¹), a 30 °C, 180 rpm, se realizaron coloraciones con Sudan Negro B a las 30, 45 y 60 horas para contar el número de células con gránulos en diversos periodos (Flores et al., 2018) y se seleccionaron los diez microorganismos que alcanzaron el mayor número de células con gránulos de PHA en el menor tiempo.

c. Comparación de la cinética de crecimiento de microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos seleccionados, Lambayeque 2019

Los diez microorganismos seleccionados se cultivaron en caldo HM₂ con NaCl (50 g L⁻¹), pH 7,0, a 30 °C durante 24 horas, por dos veces consecutivas. En el segundo caldo cultivado se tomaron 10 mL y se inocularon por triplicado en erlenmeyers con 90 mL del mismo caldo, se incubaron (RAYPA ID-50 serie 53546) a 30 °C en un agitador orbital a 180 rpm (LABNET ORBIT TM-1000 17030427), cada 5 horas durante 50 horas se tomó una muestra de 1 mL para leer la densidad óptica en el espectrofotómetro a 600 nm (UNICO modelo SQ-2800 190 - 1100 nm) y se incluyó como testigo el caldo HM₂ no cultivado.

La curva de crecimiento se visualizó con el promedio de los valores de la densidad óptica (600 nm) de los caldos HM₂ cultivados por 50 horas. Luego, la fase exponencial de cada microorganismo se linealizó y se estimó la velocidad específica de crecimiento (μ) mediante el ploteo del logaritmo natural de la densidad óptica (600 nm) en función del tiempo (Khatami et al., 2022). El microorganismo con la mayor velocidad específica de crecimiento se seleccionó para determinar el rendimiento de un producto en relación a la biomasa ($Y_{p/x}$)

d. Identificación del género del microorganismo con la mayor velocidad específica de crecimiento, Lambayeque 2019

La identificación del género del microorganismo con la mayor velocidad específica de crecimiento se realizó considerando la coloración de Gram, forma y color de las colonias, motilidad, forma de las células, formación de endosporas, las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa, indol, Voges Proskauer, utilización del citrato, rojo de metilo, fermentación de manitol, hidrólisis de la urea, reducción de nitratos y las pruebas fisiológicas de rango de temperatura crecimiento (20-25-30-35-40-45 °C),

rango de pH (5-6-7-8-9) y rango de tolerancia al NaCl 6-7-8-9 % NaCl (Bin-Salman et al., 2018; Halder et al., 2016).

e. Determinación del rendimiento de polihidroxialcanoatos en relación a la biomasa del microorganismo seleccionado, Lambayeque 2019

El microorganismo productor de gránulos de polihidroxialcanoato (PHA) seleccionado se cultivó en caldo HM₂ con NaCl (50 g L⁻¹) y pH 7,5 (Li et al, 2019; Flores et al, 2018), a 30 ° C durante 24 horas por dos veces consecutivas. En el segundo caldo cultivado se tomaron 15 mL (3 %) y se inocularon por triplicado en 485 mL de caldo HM₂, se incubaron (RAYPA ID-50 serie 53456) a 30 °C a 180 rpm (LABNET ORBIT TM-1000 17030427) por 40 horas, y finalizado el proceso fermentativo se separó la biomasa celular y se recuperó el polímero (PHA) producido.

La biomasa celular se obtuvo mediante la centrifugación del caldo HM₂ (HERMLE, modelo Z206A 60160433) a 3500 rpm (8 minutos), el sedimento o biomasa se enjuagó con solución salina (5 % NaCl) dos veces consecutivas, se centrifugó (3500 rpm por minuto) y se deshidrató en la estufa (Blue Pard Modelo DHG) a 45 °C hasta alcanzar un peso constante por tres veces consecutivas, en una balanza de precisión (AS 220/X Radwag).

El polímero de los gránulos intracelulares se recuperó a partir de la biomasa microbiana deshidratada, la cual se mezcló con similar volumen de hipoclorito de sodio al 5 %, en agitación (150 rpm) por 2 horas y luego con cloroformo para capturar el PHA. Inmediatamente se observaron dos capas: una superior amarillenta del hipoclorito de sodio con los restos de las células microbianas y otra inferior del cloroformo con el PHA. Después de 1 hora a 30 °C, en agitación (150 rpm) la mezcla se centrifugó (3500 rpm por 8 minutos), con una jeringa (1 mL) se extrajo el contenido de la capa inferior correspondiente el cloroformo con el PHA y se depositó en una placa de Petri para su deshidratación en la estufa a 45 °C, hasta alcanzar un peso constante por tres veces consecutivas, el cual se determinó en una balanza de precisión (Mostafa et al., 2020).

La naturaleza del polímero recuperado se determinó con el método del ácido crotónico de Law y Slepecky descrito por Pungsungvorn y Wisetsing (2021) mediante la digestión del polímero con H₂SO₄ concentrado en Baño María (90 °C) durante 30 minutos, enfriamiento (25 °C) y lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro de luz ultravioleta (UNICO modelo SQ-2800 190 - 1100 nm). Se utilizó como blanco el

ácido sulfúrico. La observación de un pico máximo de absorbancia a 235 nm identificó el polímero como PHA (Ghosh y Chakraborty, 2020).

El rendimiento ($Y_{p/x}$) de PHA en relación a la biomasa se calculó mediante la división de los gramos del PHA entre los gramos de la biomasa celular y el resultado se expresó como g de PHA por g de biomasa formada ($g\ g^{-1}$). El rendimiento también se expresó como contenido de PHA en porcentaje o porcentaje de acumulación de PHA (Flores et al., 2018).

3.4 Procesamiento y análisis de datos

Los valores obtenidos en el número de células con gránulos de PHA y rendimiento de PHA en función de la biomasa, fueron analizados con la estadística descriptiva: promedio y desviación estandar (Hernández et al., 2014), mediante los programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

IV. RESULTADOS

4.1 Selección de microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos de suelos salino-sódicos en el distrito de San José en Lambayeque, 2019

De 54 muestras de suelos salino-sódicos procedentes de cuatro sectores de riego de la Comunidad Campesina San José en San José, Lambayeque 2019, se aislaron 600 microorganismos que formaron colonias en agar nutritivo con 5 % NaCl (Tabla 1). El 90 % de los microorganismos demostraron ser halófilos porque crecieron en caldo nutritivo con 5 % NaCl pero no con 0,85 % NaCl. El 10 % de los microorganismos demostraron ser halotolerantes porque crecieron en caldo nutritivo con 5 y 0,85 % NaCl.

Los microorganismos halófilos presentaron siete morfotipos de colonias, entre las cuales predominó (66,48 %) el morfotipo 1 (Tabla 2, figura 4). Las células microbianas halófilas fueron Gram positivas (90 %) y Gram negativas (10 %) y el 99,07 % correspondió a bacterias y el 0,93 % a levaduras (Figuras 5 a 7). La forma predominante de las bacterias correspondió a los bacilos (84,67 %), seguidos de los cocos (8,04 %) y los filamentosos con 7,29 % (Figuras 8, 9, tabla 3). Se diferenciaron bacilos Gram positivos (74,58 %), bacilos Gram negativos (10,09 %), cocos Gram positivos (8,04 %) y filamentos Gram positivos (7,29 %). En el medio sólido las colonias de las bacterias halófilas fueron transparentes o presentaron coloraciones rojo, naranja, rosado, crema, blanco y melón (Figura 10). En medio líquido con el 56,26 % de las bacterias halófilas se observó turbidez y película, con el 42,99 % turbidez y con el 0,75 % película superficial (Figura 11, tabla 4).

Tabla 1

Conductividad eléctrica y porcentaje de sodio intercambiable de suelos salino-sódicos donde se aislaron microorganismos, Lambayeque 2019

Distrito de San José Sectores de riego	Conductividad eléctrica (dSm ⁻¹)	Porcentaje de sodio intercambiable (%)	Cultivos de microorganismos	
			N °	%
Rastrojo Baca	20,28	15,18	56	9,26
Gallito	27,84	16,04	78	12,96
La Madrid	23,68	19,65	111	18,52
La Compuerta	120,67	25,93	355	59,26
Total			600	100

Tabla 2

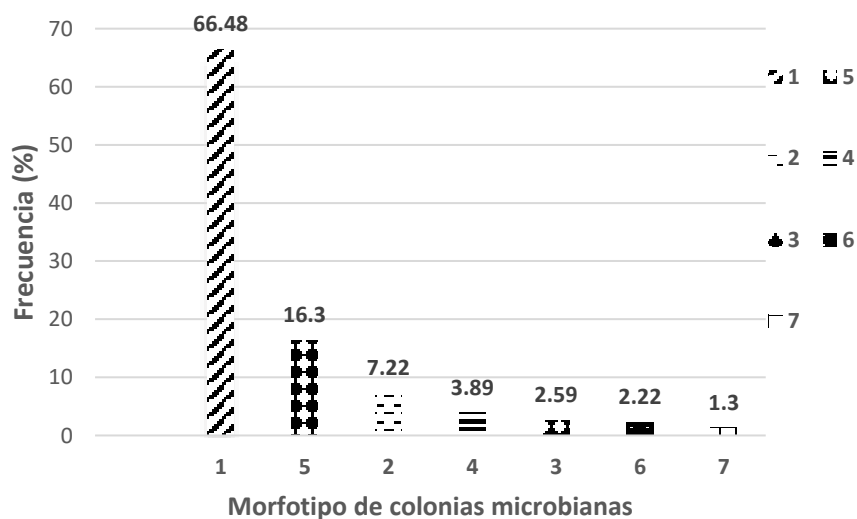
Características diferenciales de morfotipos de colonias de microorganismos halófilos procedentes de suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019

Morfotipos	Características de morfotipos de colonias microbianas					Frecuencia	
	Forma	Borde	Aspecto	Elevación	Color	N °	%
1	Circular	Ondulado	Cremosa	Plana	Crema	359	66,48
2	Filamentosa	Filamentoso	Seca	Plana	Blanca	39	7,22
3	Puntiforme	Entero	Mucosa	Convexa	Crema	14	2,59
4	Circular	Entero	Mucosa	Convexa	Crema	21	3,89
5	Circular	Entero	Lisa	Convexa	Translúcida	88	16,30
6	Circular	Entero	Mucosa	Convexa	Translúcida	12	2,22
7	Circular	Irregular	Mucosa	Convexa	Opaca	7	1,30
Total						540	100

Forma: irregular, circular, filamentosa, fusiforme; Borde: entero, ondulado, filamentoso; Aspecto: pastosa, cremoso, mucosa, seca; Elevación: plana, convexa, papilada, umbilicada; color: translúcido, rojo, anaranjado, rosado, crema, blanco, melón.

Figura 4

Frecuencia de aislamiento de los morfotipos de colonias microbianas halófilas en suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019.

**Figura 5**

Frecuencia de microorganismos Gram positivos y Gram negativos halófilos aislados en suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019.

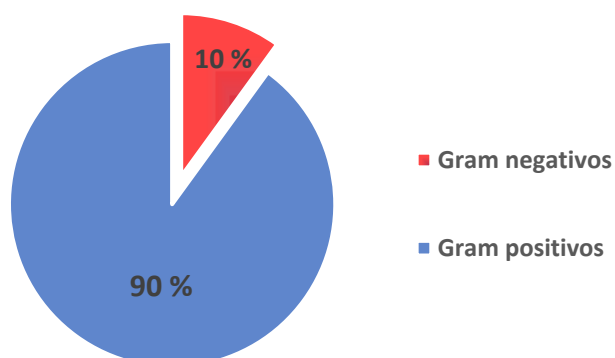
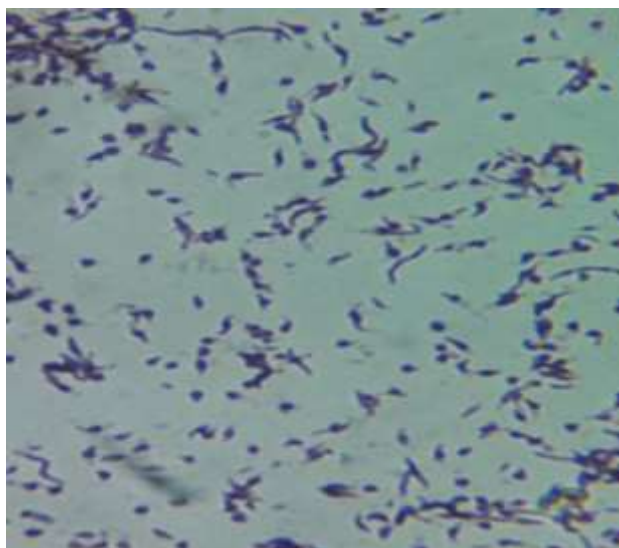


Figura 6

Observación microscópica (1000x) de levaduras halófilas cultivadas en agar MH₂, Lambayeque 2019.

**Figura 7**

Frecuencia de bacterias y levaduras halófilas aisladas en suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019.

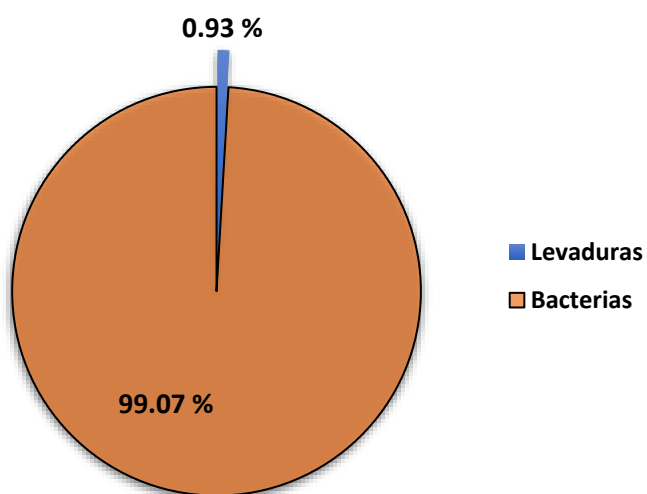
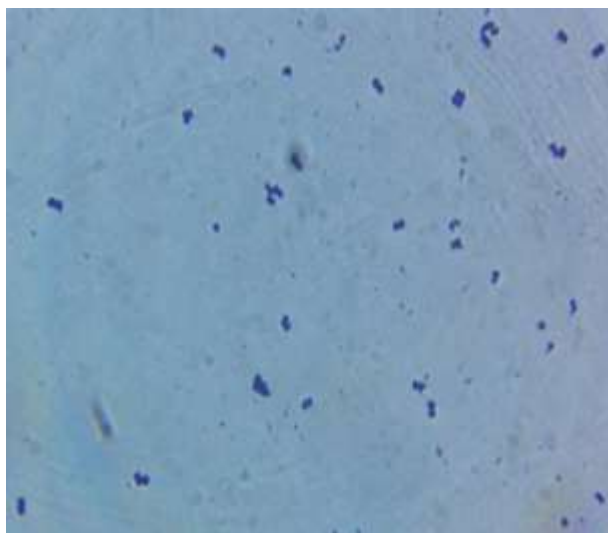


Figura 8

Observación microscópica (1000x) de cocos Gram positivos halófilos cultivados en agar MH₂, Lambayeque 2019.

**Figura 9**

Observación microscópica (1000x) de filamentos Gram positivos halófilos cultivados en agar MH₂, Lambayeque 2019.

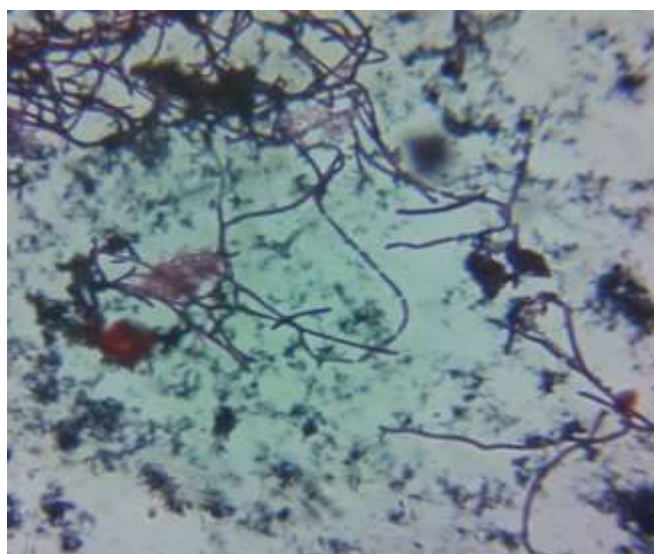


Tabla 3

Microorganismos halófilos según forma de células y reacción a la coloración de Gram aislados de suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019

Características diferenciales	Cultivos en agar nutritivo con 5 % NaCl	
	N °	%
Bacilos	453	84,67
Cocos	43	8,04
Filamentos	39	7,29
Bacilos Gram positivos	399	74,58
Bacilos Gram negativos	54	10,09
Cocos Gram positivos	43	8,04
Filamentos Gram positivos	39	7,29

Figura 10

Colonias de bacilos Gram positivos (a,b) y Gram negativos (c, d y e) halofilas desarrollados en agar MH₂, Lambayeque 2019.

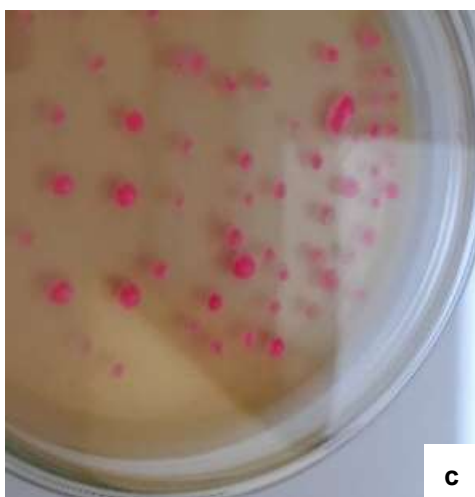
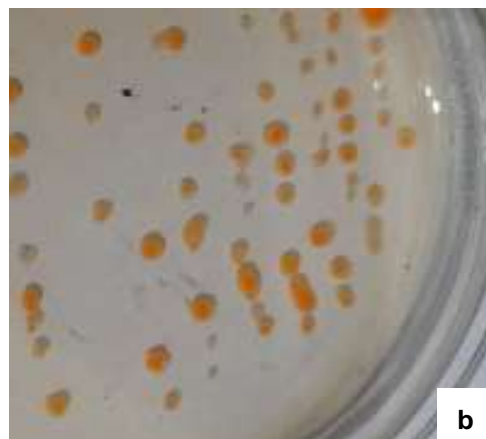
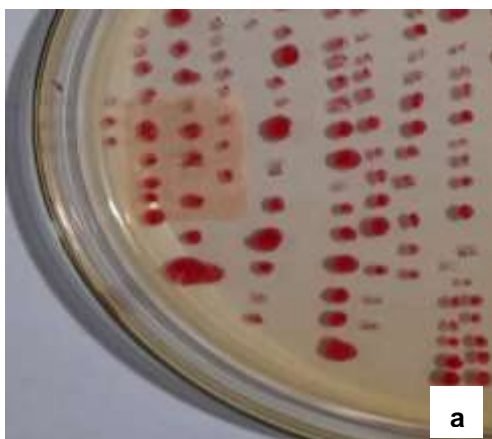


Figura 11

Película superficial de microorganismos halófilos en caldo MH₂, Lambayeque 2019.

**Tabla 4**

Características diferenciales del crecimiento de microorganismos halófilos en caldo MH₂, Lambayeque 2019

Características diferenciales	Cultivo en caldo nutritivo con 5 % NaCl	
	N °	%
Turbidez y película	301	56,26
Turbidez	230	42,99
Película superficial	4	0,75

En el 41 % de los microorganismos halófilos cultivados por 60 horas en caldo HM₂ con glucosa como fuente de carbono se observaron 1 - 150 gránulos negros o grisáceos, por lo que se calificaron como microorganismos productores y acumuladores de gránulos de PHA (Figuras 12, 13). Estos microorganismos fueron Gram positivos (89 %) y Gram negativos (11 %).

El número de microorganismos cuyas células presentaron gránulos de PHA disminuyó desde las 30 horas hasta las 60 horas. En este contexto, todos los microorganismos presentaron células con gránulos de PHA a las 30 horas y el 78,54 % a las 60 horas (Figura 14). Los bacilos Gram positivos fueron los microorganismos con el mayor número de células con gránulos de PHA a las 30, 45 y 60 horas (Tabla 5).

El 76,41 % de los microorganismos Gram positivos presentó 1 – 50 células con gránulos de PHA a las 30 horas y el 22,58 % a las 60 horas. El 54,17 % de los microorganismos Gram negativos presentó 1 – 50 células con gránulos de PHA a las 30 horas y el 23,53 % a las 60 horas. El 22,05 % de las microorganismos Gram positivos presentaron 51 – 100 células con gránulos de PHA a las 30 horas y el 57,42 % a las 60 horas. El 37,50 % de los microorganismos Gram negativos presentaron 51 – 100 células con gránulos de PHA a las 30 horas y el 47,06 % a las 60 horas (Figura 15, tablas 6, 7).

Los microorganismos seleccionados por presentar el mayor número de células con gránulos de PHA en el menor tiempo posible, fueron seis bacilos Gram positivos y cuatro bacilos Gram negativos. Los microorganismos con códigos 299, 475, 142, 179, 361, 267 y 144 alcanzaron 103 – 186 células con gránulos a las 30 horas, los microorganismos 84 y 73 alcanzaron 122 – 138 células con gránulos de PHA a las 45 horas y el microorganismo 169 alcanzó 140 células con gránulos de PHA a las 60 horas (Tabla 8). En todos los microorganismos a excepción del 169, el número de células con gránulos disminuyó conforme transcurrió el tiempo de incubación y se cuantificaron 103 – 186 células a las 30 horas y 46 – 140 células a las 60 horas.

Figura 12

Gránulos de polihidroxiclcanoatos en bacilos (a, b) y filamentos (c, d) de microorganismos halófilos, Lambayeque 2019.

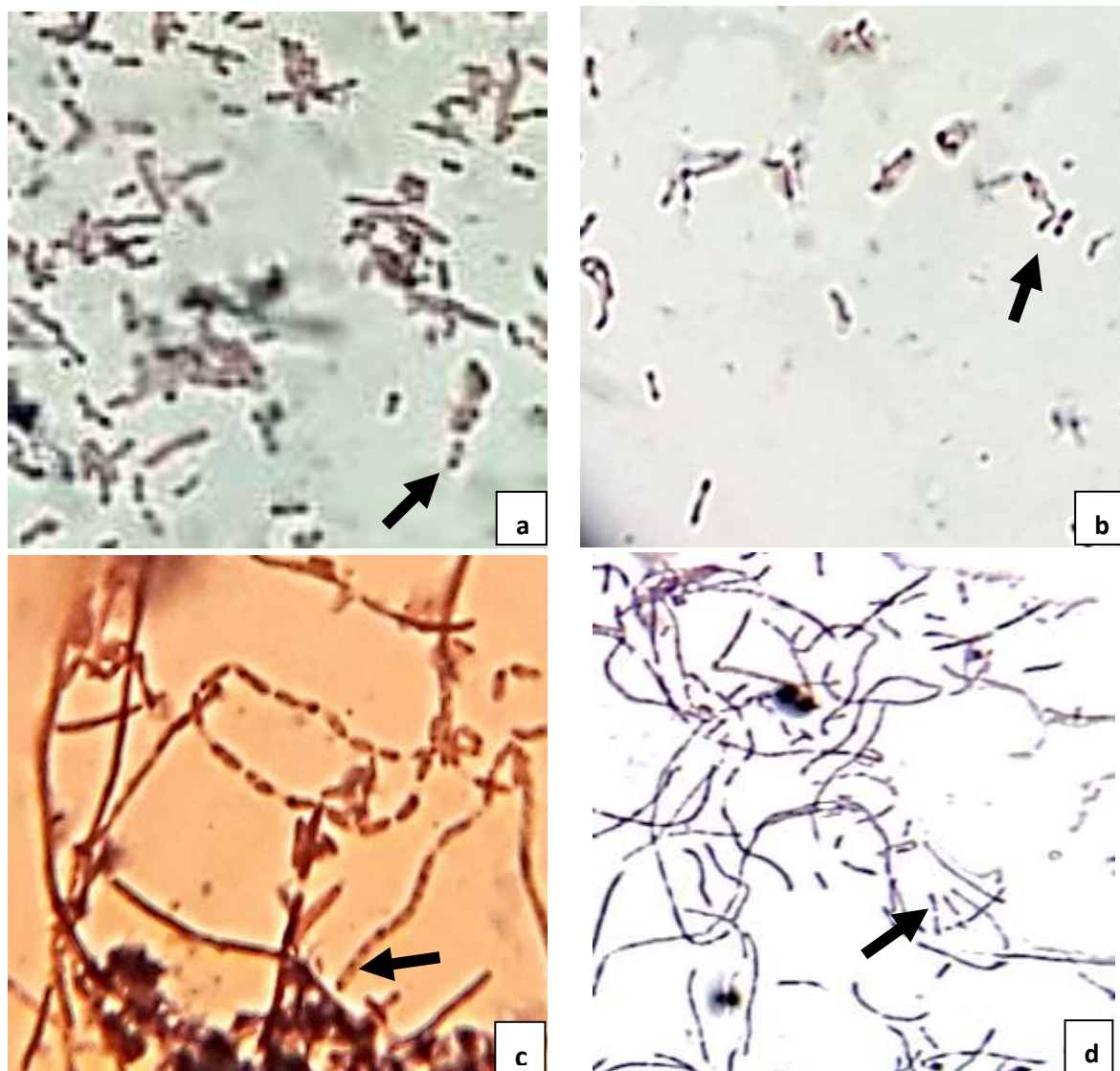
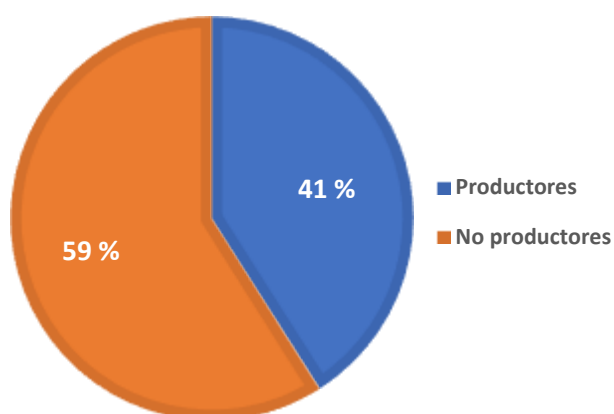


Figura 13

Frecuencia de microorganismos halófilos Gram positivos y Gram negativos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos aislados de suelos salino-sódicos, Lambayeque 2019.

**Figura 14**

Porcentaje de microorganismos halófilos con gránulos de polihidroxialcanoatos a las 30, 45 y 60 horas de crecimiento en caldo MH₂, Lambayeque 2019.

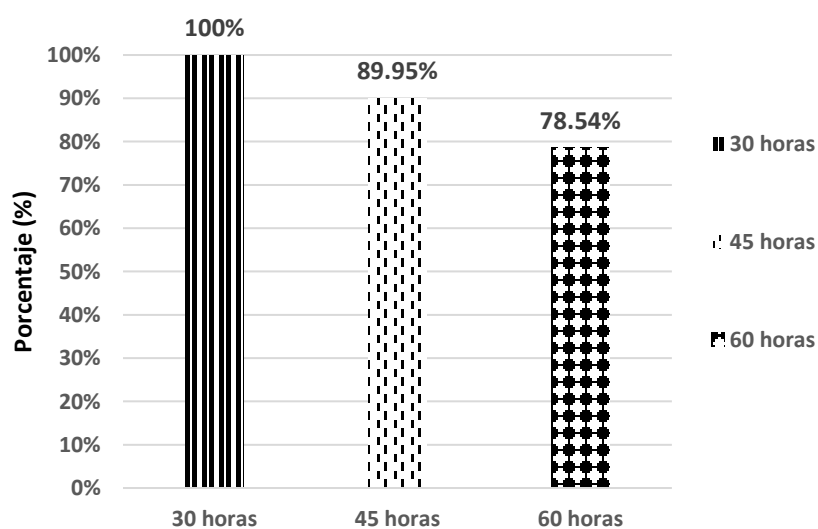


Tabla 5

Numero de células de microorganismos halófilos con gránulos de PHA a las 30, 45 y 60 horas de crecimiento en caldo MH₂, Lambayeque 2019

	Células con gránulos de PHA/ horas		
	30 h	45 h	60 h
Bacilos Gram positivos	181	165	145
Filamentos Gram positivos	14	11	10
Bacilos Gram negativos	24	21	17

Figura 15

Observación microscópica (1000x) de bacterias Gram positivas (a) y bacterias Gram negativas (b) con el rango de 1 – 50 células con gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.

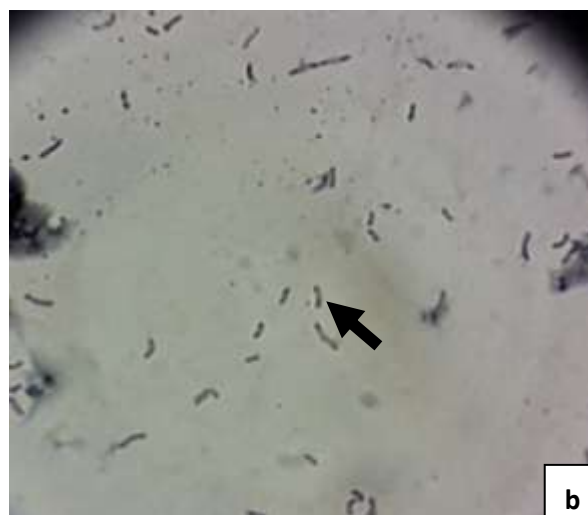


Tabla 6

Número de cultivos de microorganismos halófilos Gram positivos según el número de células con gránulos de PHA, Lambayeque 2019

Rango del número de células con gránulos de PHA	Cultivos de microorganismos Gram positivos					
	30 h		45 h		60 h	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
1 - 50	149	76,41	61	34,66	35	22,58
51 - 100	43	22,05	86	48,86	89	57,42
101 - 150	3	1,54	29	16,48	31	20,00

Tabla 7

Número de cultivos de microorganismos halófilos Gram negativos según el número de células con gránulos de PHA, Lambayeque 2019

Rango del número de células con gránulos de PHA	Cultivos de microorganismos Gram negativos					
	30 h		45 h		60 h	
	Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
1 - 50	13	54,17	6	28,57	4	23,53
51 - 100	9	37,50	10	47,62	8	47,06
101 - 150	2	8,33	5	23,81	5	29,41

Tabla 8

Bacilos halófilos productores y acumuladores de gránulos de PHA seleccionados, Lambayeque 2019

Microorganismos código	Coloración de Gram	Número de células con gránulos de PHA/horas		
		30	45	60
299	+	186	148	136
361	-	184	142	133
142	+	173	141	130
179	+	164	127	88
84	+	118	122	109
169	+	114	122	140
475	-	110	74	71
73	-	106	138	116
267	-	104	54	46
144	+	103	61	54

* Promedio de tres repeticiones

4.2 Comparación de la cinética de crecimiento de microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos seleccionados, Lambayeque 2019

La densidad óptica (600 nm) del caldo HM₂ cultivado con los microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos se incrementó gradualmente hasta alcanzar el valor máximo a las 30 horas (40 % de los microorganismos) y 40 horas (60 % de los microorganismos) y luego disminuyó. En este contexto, la densidad óptica (600 nm) osciló entre 0,005 (0 horas) a 1,761 (30 horas) y 0,002 (0 horas) a 1,576 (40 horas). La mayor densidad óptica (1,761) en el menor tiempo posible (30 horas) correspondió al microorganismo Gram negativo con código 475 (Tabla 9, figuras 16,17, anexo 1).

Todos los microorganismos presentaron un coeficiente de correlación mayor de 0,9 en la linealización de la fase exponencial y la mayor velocidad específica de crecimiento (μ) fue 0,3946 h⁻¹ alcanzada por el microorganismo Gram negativo con código C-361 (Figuras 18,19, tabla 10).

4.3 Género del microorganismo halófilo productor y acumulador de gránulos de polihidroxialcanoatos y seleccionado por la mayor velocidad específica de crecimiento, Lambayeque 2019

El microorganismo halófilo C-361 productor y acumulador de gránulos de polihidroxialcanoatos y seleccionado por la mayor velocidad específica de crecimiento se identificó en el género *Halomonas* (Tabla 11, figura 20)

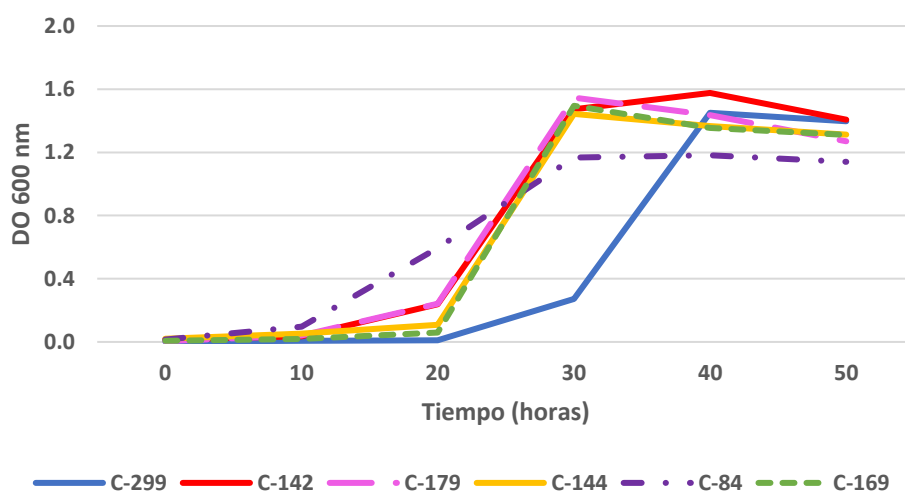
Tabla 9

Densidad óptica (600 nm) del caldo MH₂ cultivado con microorganismos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019

Código	Microorganismos		Densidad óptica (600 nm) /horas										
	Forma	Coloración de Gram	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
299	Bacilo	+	0,002	0,004	0,006	0,007	0,010	0,065	0,272	1,392	1,451	1,422	1,397
142	Bacilo	+	0,016	0,022	0,035	0,042	0,239	1,274	1,473	1,647	1,576	1,505	1,408
179	Bacilo	+	0,005	0,016	0,041	0,111	0,242	0,783	1,547	1,470	1,436	1,366	1,270
144	Bacilo	+	0,002	0,005	0,009	0,033	0,108	0,469	1,443	1,554	1,366	1,353	1,313
84	Bacilo	+	0,015	0,028	0,096	0,304	0,595	1,121	1,166	1,202	1,182	1,153	1,140
169	Bacilo	+	0,007	0,012	0,018	0,037	0,059	0,245	1,495	1,422	1,355	1,330	1,310
361	Bacilo	-	0,003	0,005	0,008	0,054	0,433	1,499	1,474	1,429	1,484	1,454	1,384
475	Bacilo	-	0,005	0,008	0,010	0,022	0,086	0,494	1,701	0,1667	1,525	1,492	1,502
267	Bacilo	-	0,003	0,011	0,040	0,060	0,180	0,381	0,949	1,370	1,436	1,363	1,315
73	Bacilo	-	0,012	0,018	0,021	0,043	0,089	0,373	1,066	1,182	1,251	1,240	1,225

Figura 16

Densidad óptica (600 nm) del caldo MH_2 cultivado con microorganismos Gram positivos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.

**Figura 17**

Densidad óptica (600 nm) del caldo MH_2 cultivado con microorganismos Gram negativos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.

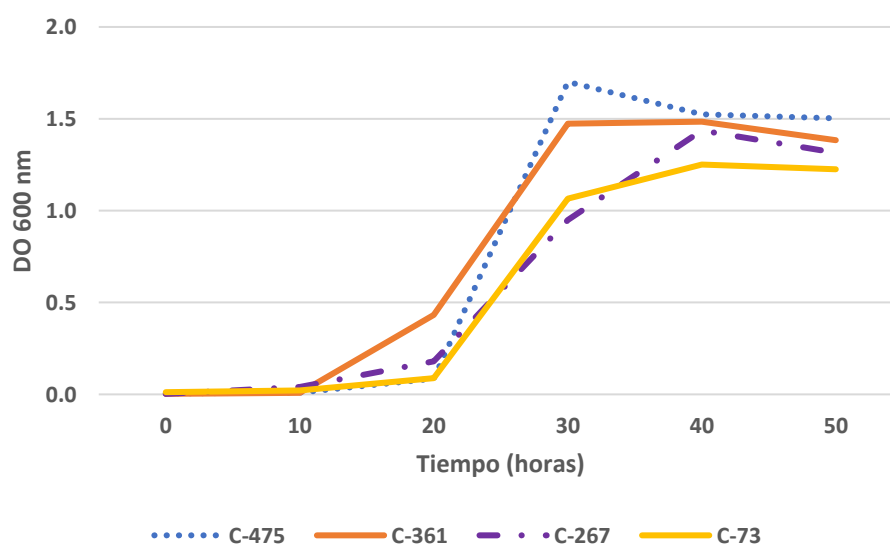


Figura 18

Linealización de la fase exponencial de crecimiento de microorganismos Gram positivos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.

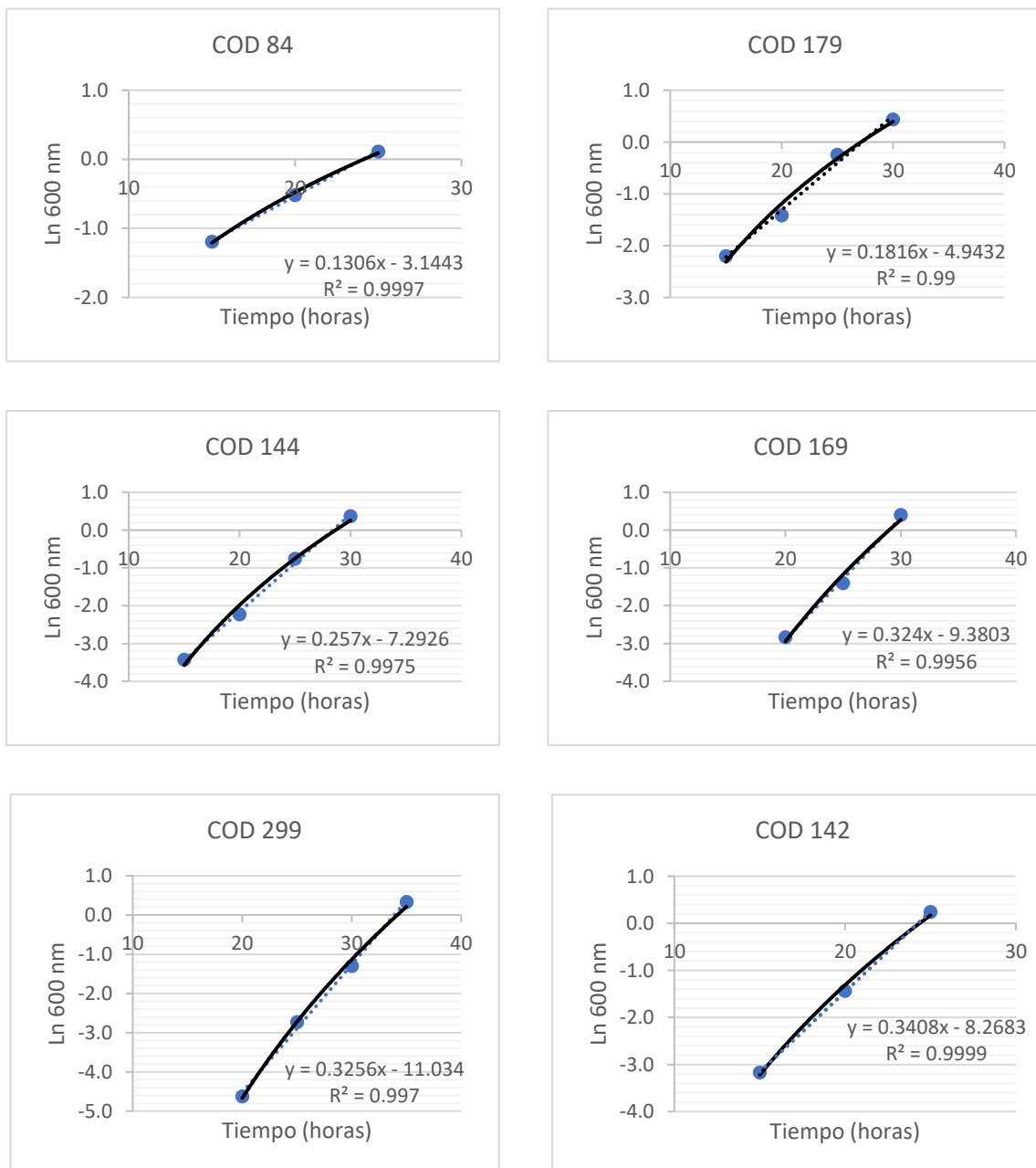


Figura 19

Linealización de la fase exponencial de crecimiento de microorganismos Gram negativos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2019.

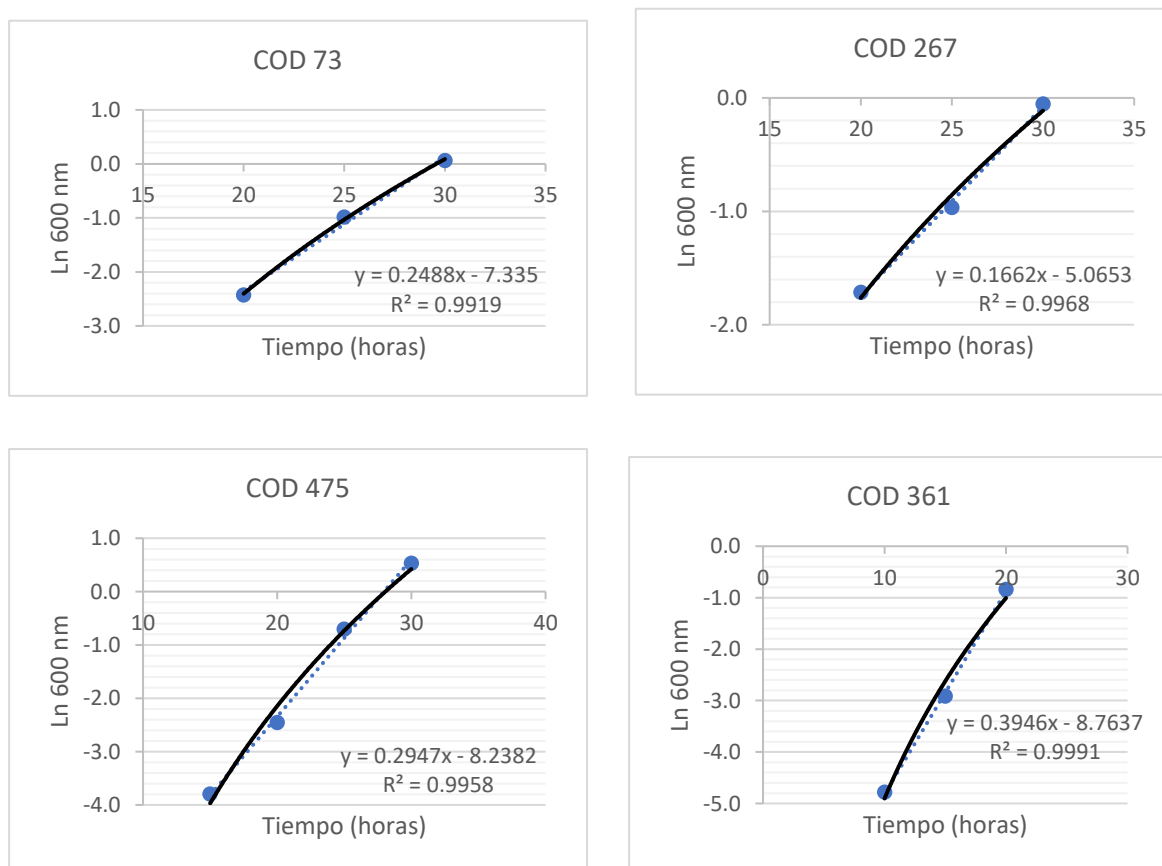


Tabla 10

Velocidad específica de crecimiento de microorganismos Gram positivos y Gram negativos productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoato, Lambayeque 2019

Código	Microorganismos	Velocidad específica de Crecimiento, μ (h ⁻¹)
	Coloración de Gram	
C-142	+	0,3408
C-299	+	0,3256
C-169	+	0,3240
C-144	+	0,2570
C-179	+	0,1816
C-84	+	0,1306
C-361	-	0,3946
C-475	-	0,2947
C-73	-	0,2488
C-267	-	0,1662

Tabla 11

Características morfológicas bioquímicas y fisiológicas del microorganismo halófilo productor y acumulador de gránulos de polihidroxialcanoatos aislado de suelo salino-sódico, Lambayeque 2019

Características	Resultado
Reacción a la coloración de Gram	-
Forma de la célula	Bacilo
Forma de la colonia	Circular
Color de la colonia	Crema
Formación de endosporas	-
Motilidad	+
Catalasa	+
Oxidasa	-
Producción de indol	+
Utilización de citrato	-
Rojo de metilo	+
Formación de acetoína	-
Fermentación del manitol	-
Reducción de nitratos	-
Hidrólisis de la urea	+
Rango de temperatura de crecimiento (25 – 45 °C)	+
Rango de pH de crecimiento (6 – 9)	+
Rango de NaCl de crecimiento (6 – 9 %)	+

Figura 20

Observación microscópica (1000x) de Halomonas sp. C-361 productora y acumuladora de gránulos de polihidroxialcanoatos coloreados con Sudan Negro B, Lambayeque 2019.



4.4 Rendimiento de polihidroxialcanoatos en relacion a la biomasa (Y p/x) de *Halomonas* sp. C-361, Lambayeque 2022

En el proceso fermentativo de *Halomonas* sp. C-361 en caldo HM₂ con glucosa (30 g L⁻¹) como fuente de carbono durante 40 horas se recuperó el polímero, cuya naturaleza de PHA se verificó al observar un pico máximo de absorbancia a 235 nm en el espectrofotómetro de luz ultravioleta. En el proceso fermentativo se alcanzaron 3,950 g L⁻¹ de biomasa celular (x); 3,090 g L⁻¹ de PHA (P), con un rendimiento de producto en relación a la biomasa formada (Y p/x) de 0,782 g g⁻¹, lo que significa que por cada gramo de biomasa se produjeron 0,782 g de PHA. El contenido de PHA fue de 78 % lo que significa que el 78 % de la biomasa correspondió al PHA (Figura 21, tabla 12).

Figura 21

Polihidroxiálcanoato producido por Halomonas sp. C-361, Lambayeque 2022.

**Tabla 12**

Parámetros del rendimiento de polihidroxiálcanoatos en relación a la biomasa (Y p/x) de Halomonas sp. C-361, en glucosa como fuente de carbono, Lambayeque 2022

Parámetros	Unidad	Valores			
		X ₁	X ₂	X ₃	\bar{X}
Biomasa celular (x)	g L ⁻¹	3,790	3,981	4,080	3,950 ± 0,14
Polihidroxiálcanoatos (P)	g L ⁻¹	2,843	3,078	3,350	3,090 ± 0,25
Rendimiento (Y p/x)	g g ⁻¹	0,750	0,773	0,821	0,782 ± 0,08
Contenido	%	75,0	77,3	82,1	78 ± 0,4

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los microorganismos de suelos salino-sódicos aislados en agar nutritivo modificado con 5 % NaCl y que desarrollaron en medio líquido con 5 % NaCl pero no con 0,85 % NaCl fueron considerados halófilos moderados que crecen con 25 - 200 NaCl g L⁻¹ (Daoud y Ben, 2020), pero no en ausencia de la sal porque la necesitan para mantener la integridad de las membranas y la estabilidad y actividad enzimática (Canfora et al., 2015). Además de los microorganismos halófilos se aislaron microorganismos halotolerantes que desarrollaron con y sin 5 % NaCl y que no son halofílicos, pero pueden tolerar más de 2,5 % NaCl (Daoud y Ben, 2020).

El aislamiento de microorganismos halofílicos en suelos salino-sódicos coincide con las investigaciones de Delgado et al. (2018) en suelos con 2,3-65,0 dSm⁻¹. Los habitats salinos en su mayoría son ambientes extremos debido a su elevada salinidad y los microorganismos que desarrollan son halófilos débiles (0,5-2,5 M sales), halófilos en el límite de los halófilos extremos (1,5-4,0 M sales), halófilos extremos (2,5-5,2 M sales) y halotolerantes (Daoud y Ben, 2020). El aislamiento de los microorganismos halófilos en agar nutritivo modificado con 5 % NaCl coincide con Halder et al. (2016); no obstante, estos microorganismos también pueden ser aislados con 1-30 % de sales (Boujida et al., 2018), 17,8-30 % NaCl (Rathakrishnan y Gopalan, 2022) y 25 % NaCl (Delgado et al., 2018).

Los microorganismos aislados de suelos salino-sódicos presentaron formas de bacilos, cocos y filamentos al igual que Rathakrishnan y Gopalan (2022) quienes observaron cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos. Al respecto, DasSarma y DasSarma (2017) concluyeron que los organismos halófilos agrupan una diversidad de formas microbianas que se encuentran en los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya, con predominio de los dos primeros dominios; sin embargo, Daoud y Ben (2020) informaron que se han estimado 1000 especies de microorganismos halofílicos identificados en los dominios Bacteria (50,1 %), Eukarya (27,9 %) y Archaea (21,9 %).

La predominancia de las formas microbianas Gram positivas entre los halofílicos aislados coincide con el reporte de Rathakrishnan y Gopalan (2022); no obstante, estos investigadores observaron en forma mayoritaria cocos Gram positivos,

a diferencia de la presente investigación donde los bacilos Gram positivos predominaron. Los resultados pueden ser explicados por la concentración de NaCl utilizada para el aislamiento microbiano: 5 y 18-30 % NaCl, respectivamente. Este último rango de NaCl selecciona halófilos extremos (Daoud y Ben, 2020). Al respecto, Canfora et al. (2015) identificaron los microorganismos en suelos con valores de CE_e 5,37 y 169,96 dSm^{-1} y diferenciaron 146 y 422 unidades taxonómicas operativas (OTU) de Bacterias y Archaea, respectivamente. La diversidad microbiana se agrupó según el rango de salinidad (0 - 40; 40 - 70 y > 70 dSm^{-1}) y se determinó que tanto la riqueza como la diversidad de las Archaea se incrementó con la salinidad. Por el contrario, las Bacteria disminuyeron con la salinidad. De igual manera, Quadri et al. (2016) demostraron que las Archaea son predominantes en los suelos hipersalinos con un rango de pH de 8,07 - 9,07 y 17,2 - 29,0 % de sales.

El aislamiento de colonias microbianas con diversas coloraciones coincide con Bin-Salman et al. (2018) quienes observaron colonias rosadas, anaranjadas y púrpuras. Rathakrishnan y Gopalan (2022) explicaron que la coloración de las colonias de los halófilos evidencia los carotenoides típicos de estos microorganismos. La pigmentación de la mayoría es blanca, amarilla, anaranjada y rosado-rojizo debido a la presencia de bacterioruberina, un carotenoide de 50 carbonos de la membrana celular que presenta propiedades antioxidantes y que protege a las células de la radiación ultravioleta.

Los microorganismos aislados de ambientes extremos como los halófilos son investigados para uso biotecnológico en la producción de enzimas (Rathakrishnan y Gopalan, 2022), exopolímeros con actividad emulgente y antioxidante (Boujida et al., 2018), biosurfactantes (Fariq y Yasmin, 2020), degradación de hidrocarburos totales de petróleo (Selvarajam et al., 2017) y PHA (Pernicova et al., 2020). En este contexto, el porcentaje (41 %) de microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de PHA aislados de suelos salino-sódicos fue superior a 10 %, reportado por El-malek et al. (2021) en bacterias aisladas de muestras de sedimento y agua de la costa marina y de un lago salado.

Los microorganismos productores y acumuladores de gránulos de PHA se aislaron de suelos con elevada salinidad como también lo reportaron Li et al. (2021), Flores et al. (2018) y Guzmán et al. (2017); no obstante, también pueden ser aislados de agua colectada en diferentes niveles de profundidad de un lago con 13 % de sales

(Rizki et al., 2023), de la superficie de algas verdes marinas del género *Ulva* (Gnaim et al., 2021), de agua y sedimento de mar (Mostafa et al., 2020), de lodos activados de aguas residuales (Li et al., 2018), de suelo y residuos orgánicos (Wala`a Shawkat et al., 2017) y de material en la fase termófila de compostaje (Pernicova et al., 2020).

La observación de los gránulos de PHA de color azul oscuro (coloración con Sudan Negro B) en el interior del citoplasma coloreado de rosado coincide con los reportes de Kingsly et al. (2020), Worch et al. (2019) y Alcaraz et al. (2019). Los PHA son gránulos de naturaleza poliéster formados y acumulados como gránulos en el interior de la células por diversos microorganismos (Albuquerque y Malafaia, 2017). El polímero debido a su naturaleza química es teñido por los colorantes lipofílicos Sudan Negro B (Flores et al., 2018), azul del Nilo A (Gnain, 2021; Mohamad et al., 2019) y Rojo Nilo A (Pungsungvorn y Wisetsing, 2021).

Los colorantes lipofílicos detectan los gránulos de PHA, pero también las ceras y triglicéridos por lo que es recomendable verificar para minimizar falsos positivos en la detección de microorganismos productores de PHA (Martínez, 2018). Los colorantes lipofílicos son inespecíficos y detectan los gránulos de PHA pero también los lípidos del citoplasma por lo que se propone utilizar más de una prueba para la detección de gránulos con el polímero, como por ejemplo el uso de medios selectivos suplementados con Rojo Nilo A o con Azul de Nilo A para diferenciar la fluorescencia rosada o anaranjada de las colonias bajo la luz ultravioleta (Martínez, 2020).

Al respecto, El-malek et al. (2021) detectaron los gránulos de PHA utilizando el Azul de Nilo A en bacterias aisladas la costa marina y de un lago salado. Los microorganismos productores mostraron una fluorescencia anaranjada brillante bajo la luz ultravioleta (460 nm). Los investigadores concluyeron que el azul del Nilo A presentó mayor sensibilidad que el Sudan Negro B para la detección; no obstante, para la detección este último colorante facilitó el conteo de los gránulos y la observación de la ubicación intracelular. Por su parte, Pernicova et al. (2020) propusieron el enriquecimiento de los microorganismos productores de PHA mediante la “estrategia osmoselectiva” basada en el cambio osmótico por exposición repentina de los microorganismos a condiciones hipertónicas y luego hipotónicas. De esta manera, los investigadores aislaron microorganismos termófilos y termotolerantes productores de PHA de los géneros *Bacillus*, *Aneurinibacillus* y *Chelatococcus*.

En las células de los microorganismos halófilos con forma de cocos no se observaron gránulos de PHA teñidos con Sudan Negro B, a diferencia de Ghosh y Chakraborty (2020) quienes demostraron en *Micrococcus aloeverae* acumulación de gránulos del polímero identificado como el copolímero de hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV): P (3HB-Co-3HV). La diferencia puede ser debido a que los investigadores mencionados aislaron las bacterias de aguas residuales y en la presente investigación a partir de suelos salino-sódicos.

La selección de los microorganismos con base al número de células con gránulos de PHA coincide con Altamirano et al. (2020), Mostafa et al. (2020) y Flores et al. (2018). Este parámetro depende del microorganismo investigado, como lo demostraron Flores et al. (2018) quienes seleccionaron microorganismos halófilos con 40 - 76 células con gránulos de PHA después de 144 horas de crecimiento en caldo HM₂ con 15 – 25 % de NaCl. Por su parte, Altamirano et al. (2020) seleccionaron bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Azospirillum* en las que se cuantificaron 40 - 300 células con gránulos a las 12 y 36 horas, respectivamente.

La densidad óptica que evidenció la biomasa microbiana y el PHA intracelular del caldo cultivado con los bacilos Gram positivos y Gram negativos seleccionados alcanzó el valor máximo a las 30-40 horas y luego disminuyó. Al respecto se ha demostrado que el crecimiento reduce la producción de PHA, resultado que puede ser explicado por la competencia por el carbono consumido tanto para la biomasa celular como para la producción del polímero (Hammami et al., 2022; Mostafa et al., 2020). El tiempo requerido para el alcanzar el valor máximo varía en forma significativa, como lo demostraron Alcaraz et al. (2019). Los investigadores determinaron que *Ralstonia eutropha* ST-60 alcanzó el valor máximo de 8,5 en la densidad óptica después de 24 horas y *R. eutropha* SB-34 el valor de 10,81 después de 50 horas de cultivo, diferencias que pueden ser atribuidas a diversos requerimientos de oxígeno o de nutrientes, aún cuando son bacterias de la misma especie.

En cuanto a los bacilos Gram positivos, Pajares y Zavaleta (2021) determinaron que *Bacillus megaterium* ingresó a la fase estacionaria después de 18-30 horas de cultivo y la producción y acumulación de PHA se mantuvo hasta las 21 horas, tiempo después del cual la concentración del polímero se redujo porque las bacterias al encontrarse en un medio limitado de nutrientes iniciaron la esporulación, para lo cual utilizaron el PHA como fuente de carbono y energía. Por su parte, González (2008)

determinó que *Bacillus* sp. alcanzó el valor máximo en la densidad óptica a las 48 horas y en la producción de PHA a las 24 horas en el medio mineral basal con sacarosa como fuente de carbono. En ambos casos, transcurridas las 36 horas (*B. megaterium*) y 48 horas (*Bacillus* sp.) la densidad óptica disminuyó hasta un valor mínimo.

Respecto a los microorganismos Gram negativos, Guzmán et al. (2017) determinaron que la biomasa de bacterias halófilas en glucosa aumentó hasta las 52 horas y el PHA hasta las 28 horas. Por su parte Bera et al. (2015) demostraron que *H. hydrothermalis* alcanzó el valor máximo en la densidad óptica a las 60 horas de cultivo con residuos de Biodiesel. Los investigadores diferenciaron la fase exponencial hasta las 48 horas y la fase estacionaria a las 48-96 horas. En las células microbianas coloreadas con Rojo Nilo se evidenció la acumulación de PHA durante la fase estacionaria.

El microorganismo halófilo productor y acumulador de gránulos de PHA seleccionado por la mayor velocidad específica de crecimiento se identificó en el género *Halomonas*. Este género agrupa bacilos cortos Gram negativos heterótrofos (DasSarma y DasSarma, 2017), halófilos moderados que crecen con 5 - 10 % de sales, sin crecimiento con 2 % NaCl o menos y más de 20 % NaCl (Boujida et al., 2018). Diversas especies de *Halomonas* productoras de PHA con diferentes fuentes de carbono (El-malek et al., 2021) han sido reportadas por El-malek (2021), Xiao et al. (2021), Dubey y Mishra (2021) y Ma et al. (2020). Estos microorganismos halófilos utilizan el PHA como reserva de carbono y energía bajo condiciones desfavorables como la presión osmótica generada por la salinidad (Kalia, 2019).

Los microorganismos halófilos producen PHA y la mayoría de éstos pertenecen a la familia Halomonadaceae. Las bacterias del género *Halomonas* son reconocidas por producir y acumular PHA scl, en caldo con 3-15 % NaCl para el crecimiento óptimo, a la vez que esta concentración previene la contaminación con otros microorganismos (Hammami et al., 2022). En diferentes hábitats salinos se han aislado especies de *Halomonas* productoras de PHA, entre las que se han reportado *Halomonas pacifica* y *H. salifodinae* (El-malek et al., 2021), *H. daqingensis* y *H. ventosae* (Dubey y Mishra, 2021), *H. venusta* (Stanley et al., 2017), *H. desertis* (Hammami et al., 2022), *H. halophila* (Kourilova et al., 2021), *H. elongata* (Liu et al., 2021) y *H. cupida* (Liu et al., 2022).

El caldo HM₂ para la producción de PHA por *Halomonas* sp. 254 presentó 50 g L⁻¹ (5 %) NaCl, porcentaje que no afecta el contenido del polímero en las células microbianas (Dubey y Mishra, 2021; Li et al., 2021; Hong et al., 2019). Al respecto, Li et al. (2021) investigaron el efecto de la concentración de NaCl (0 - 90 g L⁻¹) en el crecimiento y producción de PHB por *Vibrio alginolyticus* y determinaron que el crecimiento bacteriano fue muy pobre sin NaCl y no se observó acumulación de gránulos de PHA. Cuando se trabajó con 30 - 50 g L⁻¹ NaCl la biomasa microbiana fue de 8 g L⁻¹ y la concentración de PHA de 5,08 g L⁻¹. Asimismo, cuando la concentración de NaCl se incrementó, el PHA disminuyó gradualmente y solo se recuperaron 0,84 g L⁻¹ con 30 g NaCl L⁻¹. Por su parte, Hong et al. (2019) trabajaron con *V. proteolyticus* y también determinaron que la biomasa y el contenido de PHA disminuyó en forma significativa con más de 5 % NaCl. Los investigadores también determinaron que el crecimiento y producción de PHB fueron similares en caldos esterilizados y no esterilizados, con 40 % de contenido de PHA para ambos casos y 3,8 g PHA L⁻¹ (esterilizados) y 4,0 g PHA L⁻¹ (no esterilizados).

La utilización de hipoclorito de sodio y cloroformo para la extracción y recuperación del PHA fue reportada previamente por Ghosh y Chakraborty (2020), Flores et al. (2018) y Guzmán et al. (2017). De manera diferente, Álvarez (2022) para la extracción del PHA producido por *Halomonas salina* utilizó el cambio de presión osmótica y no el cloroformo. El investigador lavó la biomasa con agua destilada y con alcohol de 96 °C. El cambio en la concentración de sales afectó la integridad de las células, que se lisaron y el PHA intracelular se liberó al exterior. Esta técnica constituye una ventaja con las bacterias halófilas y favorece la disminución del costo en la recuperación del producto.

La naturaleza del polímero fue verificada mediante la digestión con ácido sulfúrico para transformarlo en ácido crotónico de color marrón con un pico máximo a 235 nm (Ghost y Chakraborty, 2020; Mostafa et al., 2020). Este método es específico para el P3HB que es el PHA más estudiado (Tupa, 2022). El PHA también es caracterizado mediante FTIR que diferencia los picos de absorbancia de los diversos grupos funcionales (Joshua et al., 2022), HPLC para detectar el pico del ácido crotónico producto de la hidrólisis del polímero (Xiao et al., 2021) y por resonancia magnética nuclear (NMR) para analizar la estructura química del polímero (Mostafa et al., 2020).

Los microorganismos productores acumuladores de gránulos de PHA fueron Gram positivos y Gram negativos como lo reportaron Wala'a Shawkat et al. (2017) y Kingsly et al. (2022). En cuanto a los microorganismos Gram positivos se ha reportado que predominan especies del género *Bacillus* (Gabr, 2018; Wala'a Shawkat et al., 2017; Ariel, 2016). Entre los microorganismos Gram negativos las especies de *Halomonas* son muy utilizadas en los procesos de fermentación para la obtención de PHA porque la elevada concentración de cloruro de sodio en la que crecen favorece el cultivo microbiano inclusive en medio no esterilizados (Ma et al., 2020). La ventaja de *Halomonas* spp. frente a *Bacillus* spp. es que la formación de endosporas está asociada a la utilización del PHA acumulado, con disminución significativa del rendimiento (Valappil et al., 2007). La desventaja de utilizar *Halomonas* spp. en la producción de PHA, así como de otras bacterias Gram negativas es que el polímero extraído se puede contaminar con el lipopolisacárido de la pared celular durante el proceso de extracción y purificación. Esta endotoxina ocasiona una severa respuesta inmune que limitaría el uso de los PHA en el sector salud (Singh et al., 2019).

El contenido de PHA (78 %) alcanzado por *Halomonas* sp. 274 con glucosa como fuente de carbono fue superior a 72,5 % reportado por Hammami et al. (2021), con *H. halophila*; 60 % reportado por Xiao et al. (2021) con *H. bluephagenesis* y 67 % registrado por El-malek et al. (2021) con *H. pacifica*; sin embargo, el valor del contenido de PHA es inferior a 86,3 % reportado por Guzmán et al. (2017) con *Halomonas* sp. M4C1. En cuanto al contenido (78 %) de *Halomonas* sp. 274 se coincide con el resultado de El-malek et al. (2021), quienes reportaron que el análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las células de *Halomonas* spp. cultivadas por 72 horas con 2 % de sacarosa demostró uno a siete gránulos de PHA de diferente tamaño en el citoplasma celular y un contenido del polímero de 71,9 - 80,0 % respecto a la biomasa microbiana deshidratada.

El rendimiento de PHA de *Halomonas* spp. varía según el sustrato utilizado como fuente de carbono (Flores et al., 2018), la concentración de NaCl (Liu et al., 2022), el tiempo de incubación y el sistema de cultivo (Stanley et al., 2017). En los diversos procesos fermentativos realizados con glucosa se ha cuantificado 5,47 g biomasa L⁻¹ (Stanley et al., 2017) a 6,75 g L⁻¹ (Liu et al., 2021), se han recuperado 0,95 g PHA L⁻¹ (Cristea et al., 2018) a 5,10 g L⁻¹ (Kourilova et al., 2021),

con un rango de contenido del 22,81 % (Liu et al., 2021) a 85,12 % (Kourilova et al., 2021), durante 24 horas (Stanley et al., 2017) a 72 horas (Kourilova et al., 2021).

El incremento en la producción del PHA y la disminución de los costos del polímero dependen de bioprocesos que integran la utilización de microorganismos silvestres con elevados rendimientos, fuentes de carbono no convencionales y el mejoramiento de estrategias de cultivo y recuperación del producto (Alcaraz et al., 2017). En este contexto, *Halomonas* sp. 361 seleccionada en la presente investigación tiene potencial para la producción PHA porque las especies de este género producen el polímero en sistemas de cultivo continuos, sin requerimiento de esterilización del medio (Liu et al., 2022; Ma et al., 2020) puesto que crecen hasta con 20 % NaCl, con un óptimo de 5 - 10 % NaCl (Hammami et al., 2022). Asimismo, las especies de *Halomonas* pueden producir PHA en sustratos de bajo costo como los hidrolizados lignocelulósicos (Kourilova et al., 2021), glicerol residual (Hammami et al., 2022), hidrolizado de algas (El-malek et al., 2021) y almidón de cáscara de papa (Guzmán et al., 2017).

VI. CONCLUSIONES

El 41 % de los microorganismos halófilos (89 % Gram positivos y 11 % Gram negativos) cultivados por 60 horas con glucosa como fuente de carbono demostraron ser productores y acumuladores de gránulos de polihidroxialcanoatos (PHA). Los microorganismos seleccionados fueron seis bacilos Gram positivos y cuatro bacilos Gram negativos que presentaron 103 - 186 células con gránulos de PHA coloreados con Sudán Negro B.

La densidad óptica (600 nm) del caldo HM₂ cultivado con los microorganismos productores y acumuladores de gránulos de PHA se incrementó hasta alcanzar el valor máximo de 1,761 a las 30 horas (40 % los microorganismos) y de 1,576 a las 40 horas (60 % de los microorganismos). La velocidad específica de crecimiento fue de 0,1662 - 0,3946 h⁻¹.

El microorganismo halófilo C-361 productor y acumulador de gránulos de PHA seleccionado por la mayor velocidad específica de crecimiento (0,3946 h⁻¹) se identificó en el género *Halomonas*.

En el proceso fermentativo con *Halomonas* sp. C-361 se alcanzaron 3,950 g L⁻¹ de biomasa celular (x); 3,090 g L⁻¹ de PHA (P), con un rendimiento de producto en relación a la biomasa formada (Y p/x) de 0,782 g g⁻¹, lo que significa que por cada gramo de biomasa se produjeron 0,782 g de PHA. El contenido de PHA fue de 78 % lo que significa que el 78 % de la biomasa correspondió al PHA.

VII. RECOMENDACIONES

Identificar a nivel molecular *Halomonas* sp. C-361.

Identificar las características físicas y químicas del polihidroxialcanoato producido por *Halomonas* sp. C-361 en glucosa como fuente de carbono.

Investigar sustratos residuales de bajo costo para la producción de polihidroxialcanoatos por *Halomonas* sp. C-361.

REFERENCIAS

- Albuquerque, P. y Malafaia, C. (2019). Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026>
- Alcaraz, W., Acosta, A. y Villa, A. (2017). Estrategias de fermentaciones aplicadas al mejoramiento de la producción de biopolímeros del tipo PHA. *Revista Colombiana de Materiales*, 12-15. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/materiales/article/view/328782>
- Alcaraz, W., Acosta, A. and Villa, A. (2019). Evaluation of polyhydroxyalkanoate (PHAs) production with a bacterial isolate using cassava flour hydrolysates as an alternative substrate. *DYNA*, 86(208), 75-81. DOI: <http://doi.org/10.15446/dyna.v86n208.72019>
- Altamirano, L., Ramos, E., Iglesias, S. y Carreño, C. (2020). Potentialities of polyhydroxyalkanoate (PHA) producing bacteria isolated from *Asparagus officinalis* L. *In SciELO Preprints*. <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.646>
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación* (2.^a ed.). Ciencia. <http://biblioteca.untumbes.edu.pe/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=36>
- Buendía, H., Cruz, F., Meza, C., y Arévalo, Z. (2014). Fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo. *Ciencias Sociales*, 1, 113-121. https://www.academia.edu/34233137/fitorremediacion_de_suelos_contaminados_por_hidrocarburos_de_petroleo_phytorremediation_of_soils_contaminated_land_by_petrolium_hydrocarbons_ciencias_sociales
- Bin-Salman, S., Amasha, R., Jastaniah, S., Aly, M. y Altaif, K. (2018). Isolation, molecular characterization and extracellular enzymatic activity of culturable halophilic bacteria from hypersaline natural habitats, *Biodiversitas*, 19(5), 1828-1834. DOI: 10.13057/biodiv/d190533

- Boujida, N., Palau, M., Charfi, S., Moussaoui, N., Manresa, A., Miñana, D., Senhaji, N. y Abrini, J. (2018). Isolation and characterization of halophilic bacteria producing exopolymers with emulsifying and antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 631-637, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.015>.
- Cao, D., Wang, X., Luo, X., Liu, G., y Zheng, H. (2017). Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 61. <https://sci-hub.se/10.1088/17551315/61/1/012148>
- Castro, L., Flores, A., Rodríguez, A., Aguilar, M., Aguilar, C., y Rodríguez, R. (2011). Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salino de cuatro ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(5), 1-11. <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/divulgacionAQM.html>
- Canfora, L., Papa, G., Antisari, L., Bazan, G., Dazzi, C. y Benedetti, A. (2015). Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in “extreme” hypersaline soils of a semiarid Mediterranean área. *Applied Soil Ecology*, 93, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.014>.
- Contreras, H., y Carreño, C. (2018). Eficiencia de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo por hongos filamentosos aislados de suelo contaminado. *Revista de Investigación Científica UNTRM*, 1(1), 27-33. <http://dx.doi.org/10.25127/ucni.v1i1.269>
- Cristea, A., Baricz, A., Leopold, N., Floare, C. G., Borodi, G. y Kacso, I. (2018). Polyhydroxybutyrate production by an extremely halotolerant *Halomonas Elongate* strain isolated from the hypersaline meromictic fără fund lake (Transylvanian Basin, Romania). *Journal of Applied. Microbiology*, 125, 1343–1357. doi:10. 1111/jam.14029
- DasSarma, S. y DasSarma, P. (2017). Halophiles. *John Wiley & Sons*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub4
- Daoud, L. y Ben, M. (2020). Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, 51-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00005-8>.

- Delgado, M., Contreras, S., Rodríguez, J., Mateos, J., Aguilar, C. y Camacho, R. (2018). Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. *Heliyon*, 4(11). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00954>
- Di Mauro, R., Kupchik, M. y Benfield, M. (2017). Abundant plankton-sized microplastic particles in shelf waters of the northern Gulf of Mexico. *The International Journal of Environmental Pollution*, 230, 798-809. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.030>
- Dorán, P. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Acribia Editores S.A. [https://www.biblio.uade.edu.ar/client/es_ES/biblioteca/search/detailnonmodal/ent:\\$002f\\$002fSD_ILS\\$002f0\\$002fSD_ILS:319956/ada?qu=BIOQUIMICA&ic=true&ps=300](https://www.biblio.uade.edu.ar/client/es_ES/biblioteca/search/detailnonmodal/ent:$002f$002fSD_ILS$002f0$002fSD_ILS:319956/ada?qu=BIOQUIMICA&ic=true&ps=300)
- Dubey, S. y Mishra, S. (2021). Efficient production of polyhydroxyalkanoate through halophilic bacteria utilizing algal biodiesel waste residue. *Biotechnology & Applied Microbiology*, 9, 624859. Doi:10.3389/fbioe.2021.624859
- Elías, R. (2015). Mar de plástico: Una revisión del plástico del mar. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero*, 27, 83-105. <https://www.oceandocs.org/handle/1834/10964>
- El-malek, F. A., Farag, A., Omar, S. y Khairy, H. (2021). Polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Halomonas pacifica* ASL10 and *Halomonas Salifodiane* ASL11 Isolated from Mariout Salt Lakes. *International Journal Biological Macromolecules*, 161, 1318–1328. doi:10. 1016/j.ijbiomac.2020.07.258
- Fariq, A. y Yasmin, A. (2020). Production, characterization and bioactivities of biosurfactants from newly isolated strictly halophilic bacteria. *Process Biochemistry*, 98, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.07.011>.
- Flores, A., Idrogo, E. y Carreño, C. (2018). Rendimiento de polihidroxialcanoatos (PHA) en microorganismos halófilos aislados de salinas. *Revista Peruana de Biología*, 25(2), 153-160. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i2.14249>
- Gabr, G. (2018). Isolation and identification of bacterial strains able to biopolymer polyhydroxybutyrate (phb) production from soil of Al-Kharj Probes, Saudi Arabia. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 21(6), 1-11. <http://dx.doi.org/10.9734/JPRI/2018/39532>

- Gasperi, J., Wright, S., Dris, R., Collard, F., Mandin, C., Guerrouache, M., Langlois, V., Kelly, F. y Tassin, B. (2017). Microplastics in air: Are we breathing it in?. *Environmental Science & Health*, 1, 1-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coesh.2017.10.002>
- Gnaim, R., Polikovsky, M., Unis, R., Sheviriyov, J., Gozin, M. y Golberg, A. (2021). Marine bacteria associated with the green seaweed *Ulva* sp. for the production of polyhydroxyalkanoates. *Bioresource Technology*, 328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124815>.
- Ghosh, S. y Chakraborty, S. (2020). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from aerobic granules of refinery sludge and *Micrococcus aloeverae* strain SG002 cultivated in oily wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 155. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105091>.
- González, Y., Meza, J., González, O. y Córdova, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano. *The International Journal of Environmental Pollution*, 29(1), 77–115. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018849992013000100007&lng=es&nrm=iso. ISSN 0188-4999.
- González, M. (2008). Producción de poli-hidroxialcanoatos por bacterias del género *Bacillus* de origen marino. *Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.* <http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/288>
- Google Earth. (2023). Buscador en tiempo real. <https://earth.google.com/web/search/chiclayo.+peru>. Consultado: agosto de 2022.
- Guevara, J., Arroyo, I., Bahera, Y., Román, B. y Vásquez, M. (2020). Suelos salinos: fuente de microorganismos halófilos asociados a plantas y resistentes a metales. *Alianzas y Tendencias*, 5(17), 29-51. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5093123>
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C. y Casos, I. (2017). Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. *Scientia Agropecuaria*, 8(2), 109-118. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03>
- Halder, D., Dutta, P. Mondal, A. y Basu, M. (2016). Isolation and characterization of halophilic bacteria from Sundarban soil. *International Journal of Life-Sciences Scientific Research*, 2(4), 442-450. DOI: 10.21276/ijlssr.2016.2.4.19

- Hammami, K., Yasmine, S., Amal, S., Awatef, O., Darine, E., Marwa, J., Habib, C., Amor, M., Ahmed, M. Ameer, C. y Mohamed, N. (2022). Extremophilic bacterium *Halomonas desertis* G11 as a cell Factory for Poly-3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate copolymer's production. *Bioengineering and Biotechnology*, 10. DOI=10.3389/fbioe.2022.878843
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6.^a ed.). Mc Graw Hill Interamericana Editores S.A. <http://observatorio.epacartagena.gov.co/wpcontent/uploads/2017/08/metodologia-de-la-investigacion-sexta-edicion.compressed.pdf>
- Hong, J., Song, H., Moon, Y., Hong, Y., Kant, S., Jung, H., Choi, T., Yang, S., Park, P., Choi, Y. y Yang, Y. (2019). Polyhydroxybutyrate production in halophilic marine bacteria *Vibrio proteolyticus* isolated from the Korean península. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42, 603–610. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-02066-6>
- Instituto Nacional de Defensa Civil, INDECI. (2003). Distrito de San José. http://bvpad.indeci.gob.pe/doc/estudios_CS/Region_lambayeque/lambayeque/sanjose_mp.pdf
- Johnston, B., Radecka, I., Hill, D., Chiellini, D., Ilieva, V., Sikorska, W., Musiol, M., Zieba, M., Marek, A., Keddie, D., Mendrek, B., Darbar, S., Adamus, G. y Kowalczyk, M. (2018). The microbial production of polyhydroxyalkanoates from waste polystyrene fragments attained using oxidative degradation. *Polymers*, 10(9), 1-22. <http://dx.doi.org/0.3390/polym10090957>
- Joshua, A., De Tata, D. y Simón, W. (2022). Source determination of homemade ammonium nitrate using ATR-FTIR spectroscopy, trace elemental analysis and chemometrics. *Forensic Chemistry*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2022.100411>.
- Kalia, V. (2019). *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Springer Nature. DOI:10.1007/978-981-13-3759-8
- Khatami, K., Perez, M. y Cetecioglu, Z. (2022). Pure cultures for synthetic culture development: Next level municipal waste treatment for polyhydroxyalkanoates production. *Journal of Environmental management*, 305. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.114337>

- Kingsly, j., Chathalingath, N., Parthiban, S., Sivakumar, D., Sambugan, S., Senniyappan, V., Vimal, D., Jasmine, A. y Gunasekar, A. (2022). Utilization of sugarcane molasses as the main carbon source for the production of polyhydroxyalkanoates from *Enterobacter cloacae*. *Energy Nexus*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100071>
- Kovalcik, A., Meixner, K., Mihalic, M., Zeilinger, W., Fritz, I., Fuchs, W., Kucharczyk, P., Stelzer, F. y Drosch, B. (2017). Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant, *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 497-504. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.054>.
- Kourilova, X., Novackova, I., Koller, M. y Obruca, S. (2021). Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, 325. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124704>
- Lamz, A., y González, M. (2013), Salinity as a problem in agriculture: plant breeding an immediate solution. *Cultivos Tropicales*, 34(4), 31-42. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362013000400005&lng=es&nrm=iso. ISSN 0258-5936.
- Li, H., Wang, M., Tian, L. y Li, Z. (2021). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Vibrio alginolyticus* strains isolated from salt fields. *Molecules*, 26(20), 6283; <https://doi.org/10.3390/molecules26206283>
- Liu, C., Wang, X., Yang, H., Liu, C., Zhang, Z. y Chen, G. (2021). Biodegradable polyhydroxyalkanoates production from wheat straw by recombinant *Halomonas elongata* A1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 675-682. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.137>.
- Liu, Y., Zhao, W., Wang, S., Huo, K., Chen, Y., Guo, H., Wang, S., Liu, R. y Yang, C. (2022). Unsterile production of a polyhydroxyalkanoate copolymer by *Halomonas cupida* J9. *International Journal of Biological Macromolecules*, 223, 240-251. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.275>.

- Li, R., Gu, P., Fan, X., Shen, J., Wu, Y., Huang, L. y Li, Q. (2018). Isolation and characterization of pha-producing bacteria from propylene oxide saponification wastewater residual sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186, 233–244. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2731-5>
- Li, Y., Wang, X., Fu, W., Xia, X., Liu, C., Min, J., Zhang, W. y Crittenden, J. (2019). Interactions between nano/micro plastics and suspended sediment in water: Implications on aggregation and settling. *Water Research*, 161, 486-495. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.018>.
- López, O. (2015). *Producción de PHA por bacterias aisladas del estado de Nuevo León, México* [tesis de maestría, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <http://eprints.uanl.mx/13989/>
- Ma, H., Zhao, Y., Huang, W., Zhang, L. Wu, F. y Ye, J. (2020). Rational flux-tuning of *Halomonas bluephagenesis* for co-production of bioplastic PHB and ectoine. *Nature Communication*, 11, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17223-3>
- Malagón, M., López, S. y Martínez, A. (2017). Síntesis de bioplásticos a partir de microorganismos. *Semilleros: Formación Investigativa*. 3(1), 127-135. <http://hdl.handle.net/20.500.11839/6446>
- Martínez, C., Latisnere, H., García, J., y López, A. (2018). Screening of polyhydroxyalkanoate producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, México. *Peer J-Life and Environment*, 1-19. <https://dx.doi.org/10.7717/peerj.4780>
- Martinez, M. (2020). *Búsqueda y selección de cepas bacterianas productoras de polihidroxicanoatos* [tesis de pregrado, Universidad Autónoma de Almería] <http://hdl.handle.net/10835/9884>
- Martinez, C. (2018). Aislamiento y analisis independiente del cultivo de comunidades productoras de polihidroxicanoatos y degradadoras de n-hexadecano en tapetes microbianos de tapetes Guerrero Negro, Mexico [tesis de maestría, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste s.c.]. <http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/894>

- Mostafa, Y., Alrumman, S., Alamri, S., Otaif, K., Mostafa, M. y Alfaify, A. (2020). Bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) production by the marine bacterium *Pseudodonghicola xiamenensis* through date syrup valorization and structural assessment of the biopolymer. *Scientific Reports*, 10, 8815. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65858-5>
- Mohamad, A., May, A., Wan, L., Nittami, T. y Koon, H. (2019). Enrichment of PHA-accumulators for sustainable PHA production from crude glycerol. *Process Safety and Environmental Protection*, 122, 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.12.002>.
- Możejko, J. y Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271-282. Doi: 10.1016/j.micres.2016.07.010.
- Muhammadi, S., Muhammad, S., y Shafqat, H. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3), 56-57. <https://dx.doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>
- Municipalidad Provincial de Lambayeque. (2015). Programa de segregación en la fuente y recolección selectiva de residuos sólidos domiciliarios en un 27% de las viviendas urbanas del distrito de Lambayeque. http://www.munilambayeque.gob.pe/documentos/DA_002_2015.pdf
- Nielsen, C. (2018). Investigations of Polyhydroxyalkanoate Secretion and Production Using Sustainable Carbon Sources. *Biological Engineering commons*, 7057. <https://doi.org/10.26076/d46e-ce6c>
- Oficina de Información Científica y Tecnología para el Congreso de la Unión (INCyTU). (2019). Plásticos en los océanos. *Foro Consultivo Científico y Tecnológico*, 34. https://foroconsultivo.org.mx/INCyTU/documentos/Completa/INCYTU_19-034.pdf
- O'Geen, A. (2018). Consejos sobre la sequía: Recuperar los suelos salinos, sódicos y salino-sódicos. *ANR Publicación*. <https://doi.org/10.3733/ucanr.8629>

- Orihuela, J. (2018). Un análisis de la eficiencia de la gestión municipal de los residuos sólidos en el Perú y sus determinantes. *Instituto Nacional de Estadística e Informática*, INEI. <https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/investigaciones/residuos-solidos.pdf>
- Otero, I. y Fernández, P. (2013). Bioprospección de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en el departamento de Nariño. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2(12-20), 1-9. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612013000300002
- Palmeiro, T., O'Flaherty, V. y Lens, P. (2022). Polyhydroxyalkanoate bio-production and its rise as biomaterial of the future. *Journal of Biotechnology*, 348, 10-25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.03.001>.
- Pajares, N. y Zavaleta, E. (2021). Identificación y cinética de crecimiento de bacterias productoras de polihidroxicanoato usando residuos de arándano [tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/17036>
- Park, S., Kim, T., Kim, M., Lee, S., y Lim, S. (2012). Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. *Biotechnology Advances*, 30, 1196-1206. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.007>
- Pernicova, I., Novackova, I., Sedlacek, P., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalcik, A., Koller, M., Nebesarova, J., Krzyzanek, V., Hrubanova, K., Masilko, J., Slaninova, E. y Obruca, S. (2020). Introducing the newly isolated *Bacterium aneurinibacillus* sp. h1 as an auspicious thermophilic producer of various polyhydroxyalkanoates (pha) copolymers—1. isolation and characterization of the bacterium. *Polymers*, 12(6), 1235. <https://doi.org/10.3390/polym12061235>
- Pinto, J., Santos, P., Duarte, A. y Rocha, T. (2016). Nanoplastics in the environment—Sources, fates and effects. *Science of the Total Environment*, 566, 15-26. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041>
- Prados, E. y Maicas, S. (2016). Bacterial production of hydroxyalkanoates (PHA). *Universal Journal of Microbiology Research*, 4(1), 23-30. <https://dx.doi.org/10.13189/ujmr.2016.040104>

- Pramila, R. y Vijaya, K. (2015). Potential biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Acinetobacter baumannii*. *African Journal of Bacteriology Research*, 7(3), 24-28. <https://doi.org/10.5897/JBR2015.0152>
- Pungsungvorn, N. y Wisetsing, A. (2021). Short Communication: Isolation and screening of polyhydroxylalkanoates producing microorganisms from Thailand. *Biodiversitas*, 22(11), 4963-4967. Doi: 10.13057/biodiv/d221131
- Qi, Y., Yang, X., Mejia, A., Huerta, E., Beriot, N., Gertsen, H., Gerbeva, O. y Geissen, V. (2018). Macro and micro plastics in soil plant system: Effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth. *Science of the Total Environment*, 645, 1048–1056. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718327219>
- Quadri, i., Hassani, I., l'Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H. y Jebbar, M. (2016). Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiological Research*, 119-131. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.003>.
- Rizki, W., Ratnaningsih, E. y Hertadi, R. (2023). Production of poly-(R)-3-hydroxybutyrate from halophilic bacterium *Salinivibrio* sp. utilizing palm oil mill effluent as a carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102558>.
- Sangkharak, K., y Prasertsan, P. (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *Journal of General and Applied Microbiology*, 58(3), 173-182. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22878735>
- Santoyo, B. y Noriega, B. (2017). Identificación de bacterias productoras de polihidroxiálcanoatos en muestras de agua del río cata en el estado de Guanajuato. *Jóvenes en la Ciencia*, 3(2). <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/4766>
- Selvarajan, R., Timothy, S., Memory, T., Hlengilizwe, N. y Stephen, M. (2017). Diversity analysis and bioresource characterization of halophilic bacteria isolated from a south african saltpan, *Molecules*, 22(4), 657. <https://doi.org/10.3390/molecules22040657>

- Singh, A., Srivastava, J., Chandel, A., Sharma, L., Mallick, N. y Singh, S. (2019). Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: An insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied of. Microbiology and Biotechnology*, 103, 2007–2032.
- Stanley, A., Kumar, P., Mutturi, S. y Vijayendra, S. (2017). Fed-batch strategies for production of pha using a native isolate of *Halomonas Venusta* KT832796 strain. *Applied. Biochemistry and Biotechnology*, 184, 935–952. doi:10.1007/ s12010-017-2601-6
- Strungaru, S., Mircea, R. y Caterina, G. (2019). Micro-(nano) plastics in freshwater ecosystems: Abundance, toxicological impact and quantification methodology. *Trends in Analytical Chemistry*, 110, 116-128. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.025>.
- Tupa, L. (2022). Estudio prospectivo de cepas nativas de *Azotobacter* sp. productoras de polihidroxialcanoato (PHA), insumo esencial en la síntesis de “bioplásticos”. [tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
- Urbina, M., Correa, F., Aburto, F. y Ferrio, J. (2018). Adsorption of polyethylene microbeads and physiological effects on hydroponic maize. *Science of the Total Environment*. <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140216>
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M. y Seeger, M. (2014). Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 208-213. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001>
- Valappil, S., Misra, S., Boccaccini, A., Keshavarz, T., Bucke, C. y Roy, I. (2007). Large-scale production and scient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal Biotechnology*, 132, 251–258.
- Wala’a Shawkat, A., Zaki, N. y Obiad, S. (2017). Production of bioplastic by bacteria isolated from local soil and organic wastes. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 1012-1017. https://www.researchgate.net/publication/315375411_Production_of_bioplastic_by_bacteria_isolated_from_local_soil_and_organic_wastes
- Worch, J., Prydderch, H., Jimaja, S., Bexis, P., Becker, M. y Dove, A. (2019). Stereochemical enhancement of polymer properties. *Nature Reviews Chemistry*, 3, 514-535. <https://doi.org/10.1038/s41570-019-0117-z>

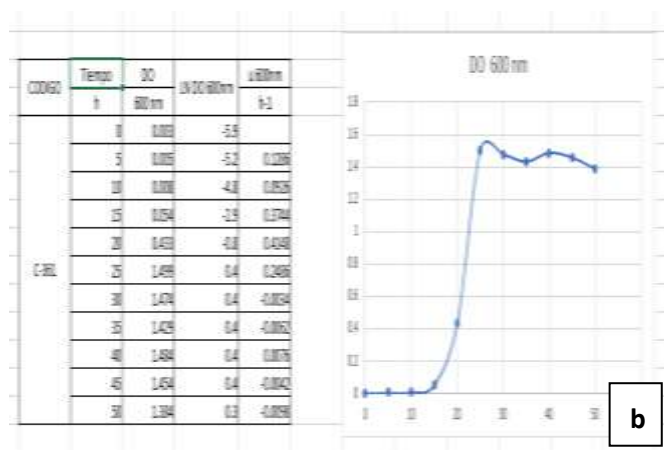
- Xiao, J., Yan, X., Yu, L., Liu, X. y Chen, G. (2021). Hyperproduction of 3-hydroxypropionate by *Halomonas bluephagenesis*. *Nature Communications*, 12, 1513. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21632-3>
- Ye, j., Hu, D., Che, X., Jiang, X., Li, T., Chen, J., Zhang, H. y Chen, G. (2018). Engineering of *Halomonas bluephagenesis* for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucosa. *Metabolic Engineering*, 47, 143-152. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.03.013>.

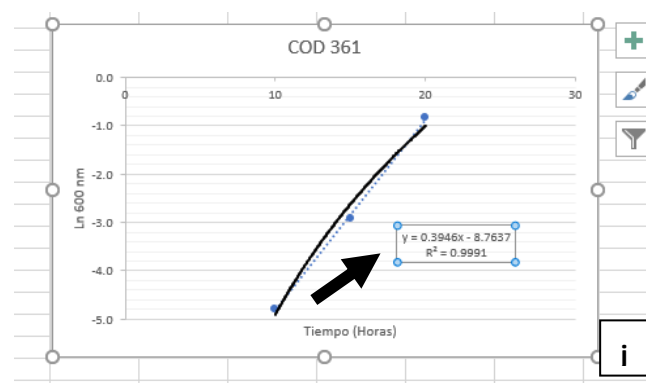
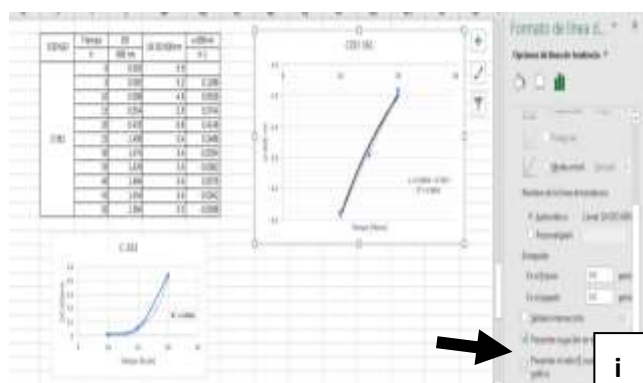
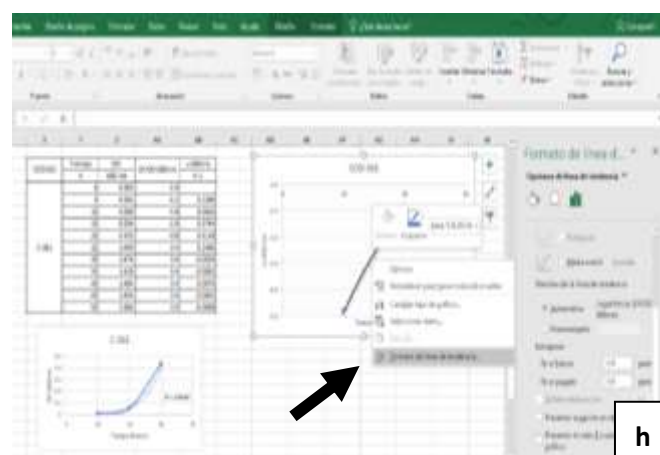
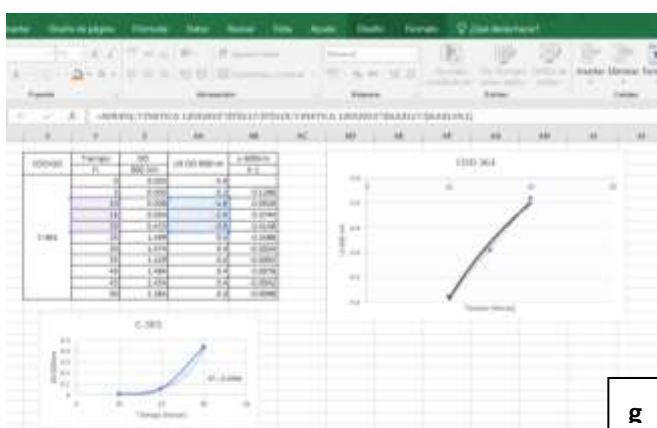
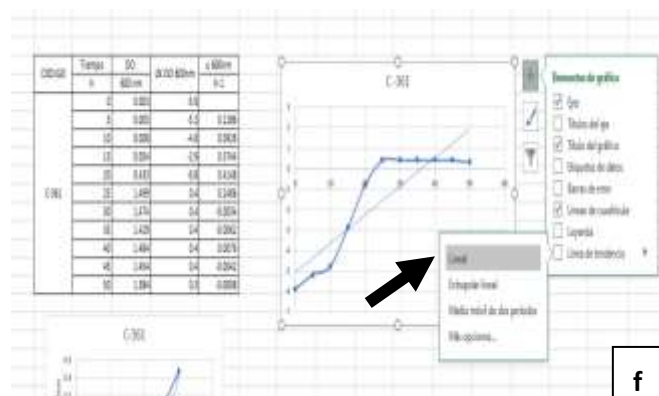
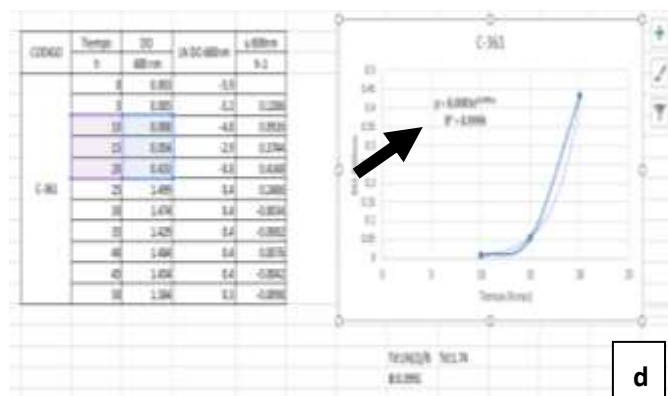
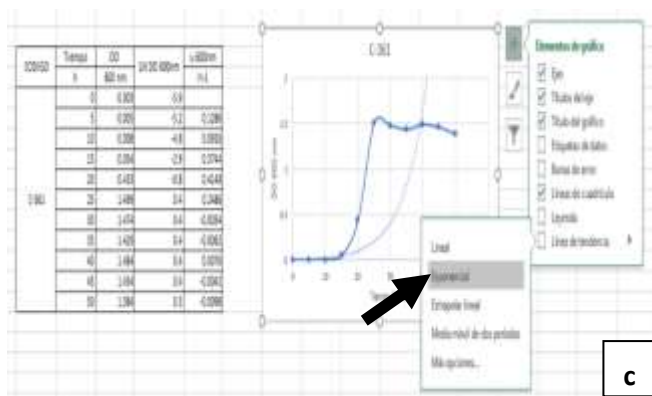
Anexo 1

Linealización de la fase exponencial de crecimiento del bacilo halófilo

C-361 (Según Khatami et al., 2022)

Los valores de Absorbancia de la densidad óptica (600 nm) registrados cada 5 horas con el bacilo C-361 se ingresaron al programa Excel versión 2013 y con la función Gráficos de Dispersión (Figura a) se visualizó la curva de crecimiento (Figura b). A continuación, con la opción Elementos Gráficos se añadió la línea de Tendencia Exponencial (Figura c), con esta se observó el inicio y termino de la fase exponencial, se eliminaron los valores no congruentes a la fase exponencial y se conservaron aquellos de esta fase (Figura d). Con los valores seleccionados, se ejecutó la función Gráficos de Dispersión (Figura e), se visualizó la curva de crecimiento respecto al Logaritmo Natural de las Densidades Ópticas (600 nm), se añadió la línea de Tendencia Lineal (Figura f, g). Con la opción Formato de Línea de Tendencia (Figura h), se linealiza la fase exponencial (Figura i), se obtuvo la velocidad específica de crecimiento (μ) y el Coeficiente de Variación Lineal (R^2) mayor a 0.9 (lo más cercano a 1) (Figura j).







UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN

ACTA DE SUSTENTACION N° 005-2023-FCCBB-UI



Siendo las 9:00 horas del día 07 de julio de 2023, se reunieron los Miembros del Jurado evaluador de la tesis titulada **"Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el distrito de San José en Lambayeque, 2019"**, designados por Resolución N° 064-2019-UI-FCCBB de fecha 30 de octubre de 2019, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza
Dra. Gianina Llontop Barandiaran
Lic. Julio César Silva Estela
Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

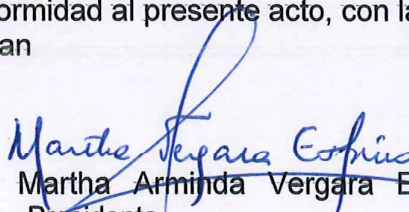
Presidenta
Secretaria
Vocal
Asesora


Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 166-2023-VIRTUAL-FCCBB/D, de fecha 03 de julio de 2023.

La Tesis presentada y sustentada por el **Bachiller JHONATTAN JHOSEPH CANTOS CHÁVEZ**, tuvo una duración de 30 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurados; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de (EXCELENTE) (20,00) en la escala vigesimal.

Por lo que el Bachiller **JHONATTAN JHOSEPH CANTOS CHÁVEZ** queda **APTO** para obtener el título profesional de Licenciado en Biología – Microbiología - Parasitología de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 11:00 se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.
Firman


Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza
Presidenta


Dra. Gianina Llontop Barandiaran
Secretaria


Lic. Julio César Silva Estela
Vocal


Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
Asesora

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Carmen Rosa Carreño Farfán, Asesor de Tesis del bachiller Jhonattan Jhoseph Cantos Chávez Titulada: Rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el distrito de San José en Lambayeque, 2019, luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud de 16 % verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

La suscrita analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 2 de julio de 2023



Apellidos y nombres:
DNI:16494424
ASESOR

Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el distrito de San José en Lambayeque, 2019



INFORME DE ORIGINALIDAD

16%	15%	6%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	10%
2	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	idoc.pub Fuente de Internet	1%
5	repositorio.unprg.edu.pe:8080 Fuente de Internet	<1%
6	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1%
7	Submitted to University of Wales Swansea Trabajo del estudiante	<1%
8	repositorio.unprg.edu.pe Fuente de Internet	<1%

9	1library.co Fuente de Internet	<1 %
10	www.aytbuap.mx Fuente de Internet	<1 %
11	García Romero Andrés. "Producción de poli-β-hidroxibutirato en cultivos multietapas y en lote alimentado usando cepas mutantes de Azotobacter vinelandii", TESIUNAM, 2013 Publicación	<1 %
12	biblioteca.udenar.edu.co:8085 Fuente de Internet	<1 %
13	Castillo Marengo Tania. "La acetilación de los alginatos sintetizados por Azotobacter Vinelandii en función de la tensión de oxígeno disuelto y la velocidad específica de crecimiento", TESIUNAM, 2013 Publicación	<1 %
14	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
15	ri.unsam.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
16	Vargas Tah Ana Alejandra. "Producción de ácidos cinámico y p-hidroxicinámico en cepas de escherichia coli pts+ y pts-glc+, empleando azúcares simples y una mezcla de éstas", TESIUNAM, 2015	<1 %

Publicación

17	doku.pub Fuente de Internet	<1 %
18	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
19	digi.usac.edu.gt Fuente de Internet	<1 %
20	repositorio.unapiquitos.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
21	Submitted to Pontificia Universidad Catolica del Peru Trabajo del estudiante	<1 %
22	foristom.org Fuente de Internet	<1 %
23	Submitted to Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Trabajo del estudiante	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo




Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.


La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Jhonattan Jhoseph Cantos Chávez
Título del ejercicio: Tesis pregrado
Título de la entrega: Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por micro...
Nombre del archivo: VERDADERA_ULTIMA_TESIS_PHA_Cantos_Chavez_-_16_-_05_-2...
Tamaño del archivo: 41.04M
Total páginas: 72
Total de palabras: 14,450
Total de caracteres: 83,940
Fecha de entrega: 22-may.-2023 05:38p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 2099597607

1



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



**Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por
microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el
distrito de San José en Lambayeque, 2019**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

PRESENTADA POR:

Br. Jhonattan Jhoseph Cantos Chávez

LAMBAYEQUE, PERÚ
2023