



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



Rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por
bacterias aisladas de bagazo de *Saccharum*
***officinarum* L. en Lambayeque, 2015**

TESIS

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

PRESENTADO POR:

Br. Leonardo Franco Garnique Capuñay

Br. Juan Luis Sandoval Sánchez

LAMBAYEQUE, PERÚ

2016

**Rendimiento de polihidroxiclcanoatos producidos por
bacterias aisladas de bagazo de *Saccharum officinarum* L. en
Lambayeque, 2015**

TESIS

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

APROBADO POR:

M.Sc. Clara Cueva Castillo

PRESIDENTE

Dr. Antero Vásquez García

SECRETARIO

Lic. Julio Silva Estela

VOCAL

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADOR

LAMBAYEQUE, PERÚ

2016

Agradecimiento

En primer lugar a Dios por darnos la fuerza y paciencia para terminar satisfactoriamente esta Tesis.

A nuestros padres por el apoyo constante, por ser el motivo para seguir en cada reto propuesto.

A nuestra asesora de tesis Dra. Carmen Carreño Farfán, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para la culminación de este logro, nos sentiremos en deuda por todo el tiempo dedicado en esta Tesis.

DEDICATORIA

A:

Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, este trabajo realizado gracias a él.

Mis padres Teodoro Garnique Chumioque y Martha Capuñay Salazar, por darme la vida, quererme mucho, creer en mi y porque siempre me brindaron su apoyo, gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto se lo debo a ustedes.

Mis hermanos, Daniel y Maricielo Garnique Capuñay, por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

Mis abuelos Tomas, Feliciano, Victoria e Isabel (QEPD), y tíos Garnique Chumioque (QEPD), por quererme y apoyarme siempre, esto también se lo debo a ustedes.

Mis tíos de la Familia Garnique y Capuñay por brindarme su confianza, así como amigos y mejores amigos del código 2010-I que no recordare a todos al momento de escribir esto. Ustedes saben quiénes son.

Aquella amiga que siempre tendré presente Marleny Mija Huaman (QEPD), gracias por aquella amistad esto también va para ti.

Leonardo Franco Garnique Capuñay

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, el que me dio fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

A mis padres Juan Sandoval Ventura y María Sabina Sánchez Siesquen, por hacer de mí una mejor persona a través de sus consejos, esperanza y amor.

A mis hermanos por estar siempre conmigo presente y acompañándome.

A mis compañeros y amigos, que sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías y tristezas que durante cinco años estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

Juan Luis Sandoval Sánchez

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1:	66
Cálculo de número de muestras de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. para el aislamiento de bacterias productoras de PHA.....	66
ANEXO 2	67
Medios de cultivo (g/L).....	67
ANEXO 3	70
Preparación de Sudán Negro B.....	70

I. INTRODUCCIÓN

Los plásticos tienen cualidades muy versátiles entre las que destacan su durabilidad y resistencia, por lo que se usan en una amplia variedad de productos imprescindibles para el estilo de vida actual, sin embargo, al ser resistentes a la biodegradación, su uso extensivo genera residuos que se acumulan en el ambiente a una tasa de 25 millones de toneladas al año, 40 % de las cuales son dispuestas en rellenos sanitarios y cientos de miles de toneladas son arrojadas al suelo y ambientes marinos, contaminando el ambiente y causando muerte de animales que los ingieren accidentalmente (González *et al.*, 2013). Un informe del programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente señaló que el 2005 se encontraron más de 13000 fragmentos de residuos plásticos flotando sobre cada kilómetro cuadrado del océano (Serrano, 2010).

El problema de la disponibilidad y el precio del petróleo, que es la materia prima para la producción de plásticos comerciales se une a la contaminación causada por los petroplásticos. El 5% del petróleo disponible mundialmente se utiliza para fabricar 200 millones de toneladas de plásticos por año; sin embargo, para el 2100 se estima que la demanda será de 2000 millones de toneladas anuales, para la cual será requerido el 50 % del petróleo disponible en ese momento, con el consecuente impacto en los precios y disponibilidad de los plásticos (González *et al.*, 2013).

La síntesis y uso de plásticos biodegradables como los polihidroxialcanoatos (PHA) en reemplazo de los derivados del petróleo, se presenta como una solución efectiva. Los PHA son poliésteres lineales de ácidos (R)-3 hidroxicarboxílicos (R)-HA, sintetizados por las bacterias en condiciones de desequilibrio nutricional, constituyendo reservas de carbono y energía, que pueden ser utilizadas por las células en ambientes desfavorables. Dependiendo del organismo, la producción de PHA puede alcanzar más del 90% del peso seco de la célula (Khanna & Srivastava, 2005). Los PHA no son tóxicos, son biodegradables, son biocompatibles y presentan

características físico – químicas similares a los petroplásticos o derivados del petróleo; no obstante, los costos de producción son relativamente altos. El costo del PHB, uno de los PHA más estudiados es estimado en 2,13-6,25 dólares Kg⁻¹, superando ampliamente 1,45 dólares kg⁻¹ de petroplástico (Gómez, 2013).

El bagazo es el subproducto del procesamiento de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar”, en el que permanecen el jugo residual y la humedad provenientes de la extracción. Las empresas agroindustriales azucareras en Lambayeque procesan diariamente 11 t de caña de azúcar y el bagazo representa el 30 % de los tallos verdes molidos (Collazos & Ortiz, 2014). Este residuo de las empresas agroindustriales es rico en carbono presentando desbalance con respecto al nitrógeno. Debido a que la síntesis de PHA está relacionada con el desbalance nutricional, es posible que en el bagazo se encuentren bacterias con alto rendimiento de PHA; sin embargo en Lambayeque no se han realizado investigaciones para aislarlas y caracterizarlas, con la perspectiva de utilizarlas en la producción de PHA con bajo costo.

La investigación de bacterias productoras de PHA no solo contribuirá al conocimiento de la microbiota presente en los residuos de la industria azucarera, sino que también permitirá el aislamiento de bacterias con un gran potencial biotecnológico en la obtención de biopolímeros y otros productos de interés económico, con miras al potenciamiento de la industria biotecnológica local.

Por lo expuesto se planteó el siguiente problema: ¿Cuál es el rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por bacterias aisladas de bagazo de *Saccharum officinarum* L. en Lambayeque, 2015?. El objetivo general fue: Determinar el rendimiento de polihidroxicanoatos producido por bacterias aisladas de bagazo de caña de azúcar en Lambayeque. Los objetivos específicos fueron: Aislar bacterias en bagazo de caña de azúcar en Lambayeque, detectar gránulos de PHA en las bacterias, utilizando la tinción de Sudan Negro B, seleccionar e identificar fenotípicamente los tres cultivos de bacterias con el mayor número de células con gránulos de PHA y determinar el rendimiento de PHA. La hipótesis planteada fue: Las bacterias aisladas de bagazo de caña de azúcar, alcanzan un rendimiento de PHA mayor al 70% de su peso seco.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

La producción de polímeros biodegradables es una estrategia del sector azucarero mundial. En este contexto, se investigó una metodología para el aislamiento y caracterización del poli-B-hidroxibutirato producido por *Bacillus megaterium*. La bacteria fue cultivada en caldo miel de caña o remolacha 1% (p/v); pH 7,0; 0,7 vvm de aire; 30°C, durante 20 horas. El crecimiento bacteriano se monitoreó por espectrofotometría a 660 nm y con la biomasa se obtuvo PHB por tratamiento con hipoclorito de sodio, surfactante dodecil sulfato de sodio y solvente cloruro de metileno, destacando con más de 95 % de pureza y recuperación, la digestión con hipoclorito de sodio. El polímero se caracterizó por cromatografía de filtración en gel y Colorimetría Diferencial de Barrido, presentando un PM de 400 kDa, temperatura de fusión de 175 °C y temperatura de transición vítrea de 7 °C. Se demostró la posibilidad de utilizar a escala industrial un procedimiento barato para la purificación de PHB (Bello *et al.*, 2008).

Con el objetivo de determinar la concentración de PHA de *Azospirillum* spp. se colectaron muestras de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz”. Las bacterias se aislaron de fragmentos de raíces previamente desinfectados y sembrados en medio NFb semisólido, donde las bacterias fijadoras de nitrógeno se reconocieron por una película blanquecina bajo la superficie y el viraje del indicador al azul. Se aislaron 96 colonias, 48 de tomate y 48 de arroz, identificándose *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Se realizó un proceso de fermentación en lote alimentado discontinuo, utilizando como medio de producción caldo *Azotobacter* modificado. El cultivo se alimentó con una solución saturada de ácido málico cada 12 horas y se realizaron tinciones con Sudan Negro B, para seleccionar las bacterias con mayor número de gránulos de PHA. La concentración de PHA

alcanzó un máximo de $0,661\text{gL}^{-1}$ con *A. lipoferum* aislada de tomate y $0,738\text{gL}^{-1}$ con *A. brasilense* de tomate. Se demostró que estas bacterias son promisorias para la producción de PHA (Baca *et al.*, 2010).

La producción de PHA se incrementa en condiciones desfavorables. En este contexto, se obtuvieron 17 aislados bacterianos en áreas urbanas contaminadas y 13 en áreas montañosas no contaminadas. Las 30 bacterias fueron Gram negativas y se identificaron como *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* y *Enterobacter*. Mediante la tinción con Sudan Negro B se demostró la presencia de gránulos de PHA y en la cuantificación, los mayores valores alcanzados con las bacterias de áreas urbanas fueron de 50,4; 40,6 y 37% en comparación con 45,8; 42,4 y 37,6% de las áreas no contaminadas. Los genes *pha C*₁/*C*₂ fueron amplificados en las bacterias, obteniendo un fragmento de 540 pares de bases, correspondiente al gen responsable de la síntesis de PHA (Razzaq *et al.*, 2010).

La agroindustria del aceite de *Olea europea L.* “olivo” genera residuos como el alpeorujo. Éste fue investigado para la producción de PHA por las bacterias fijadoras de nitrógeno, *Azotobacter chroococcum* y *Azotobacter vinelandii* cepas 1 y 2. El 25 % de las bacterias que sintetizaron gránulos de PHA, teñidos con Sudan Negro B y Azul Nilo II se cultivaron en medio Burk’s sin nitrógeno, alcanzándose $0,56\text{gL}^{-1}$ de PHA con *A. chroococcum*. Con adición de NH_4Cl 0,12 % se obtuvieron $2,3\text{gL}^{-1}$ de PHA con *A. vinelandii* (67 % del peso de la biomasa), después de 72 horas de incubación. Esta bacteria fue cultivada en alpeorujo previamente digerido en anaerobiosis es y suplementado con micronutrientes, cuantificándose $1,063\text{gL}^{-1}$ de PHA, correspondiente a 33% del peso de la biomasa (Cerrone, 2011).

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

dándole un valor agregado y reduciendo su condición contaminante (Sánchez *et al.*, 2012).

En los lodos de una planta de tratamiento de aguas residuales se realizó una bioprospección para identificar bacterias con potencial para la producción de PHA. Muestras de lodo recirculado o de retorno (LAR) y de licor mixto (LM) o lodo activado del tanque de aireación mezclado con aguas residuales en el tanque de sedimentación, se colectaron, diluyeron y sembraron en Agar Mac Conkey. Las colonias de bacterias no fermentadoras de lactosa se aislaron, se cultivaron en medio mínimo de sales (MSM) con glucosa, a 30°C, durante las 72 horas y se realizaron tinciones de las células con Sudan Negro para observar gránulos de PHA. Se obtuvieron 11 colonias de bacterias no fermentadoras, observándose gránulos en el 45%, con 2–25% de acumulación. Se identificaron *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila* y *Sphingomonas paucimobilis*, considerándolas con potencial para la producción de PHA (Arroyave *et al.*, 2013).

En la búsqueda de sustratos de bajo costo para producción de PHA se investigó glicerol USP y residuos de la producción de biodiesel como fuentes de carbono. En una primera fase *Stenotrophomonas* sp. y *Burkholderia cenocepacia* se cultivaron en medio de fermentación, seleccionándose esta última bacteria por el mayor rendimiento $Y_{x/s}$ de 0,693gg⁻¹ en glicerol USB; 1,81gg⁻¹ en BioD con 33,6% de glicerol y 0,288gg⁻¹ en Ecodiesel con 82,3% de glicerol. Con el residuo BioD, en biorreactores de 5L y la estrategia de fermentación con alimentación continua, durante 24 horas se alcanzaron rendimientos $Y_{x/s}$ de 0,883gg⁻¹ ; $Y_{p/x}$ 0,590gg⁻¹, $Y_{p/s}$ 0,556 gg⁻¹ y se cuantificó hasta 0,301 g/L *h del polímero caracterizado como PHB por cromatografía de gases y calorimetría diferencial de barrido (Becerra, 2013).

Los polihidroxicanoatos son bioplásticos termoestables sintetizados por algunas bacterias. Con el objetivo de identificarlas se procesaron muestras de lactosuero, melaza, cachaza y bagazo de caña de azúcar. El aislamiento se realizó en medio mínimo de sales suplementado con glucosa al 2% y 16 mL⁻¹ de Rojo Nilo (0,1%). Las colonias que presentaron fluorescencia a 340 nm se investigaron nuevamente mediante microscopía de fluorescencia con azul nilo. Las bacterias positivas en ambas pruebas fueron consideradas productoras de PHA, se identificaron por secuenciación de la región 16S del ADN ribosomal y en algunas seleccionadas se investigó la presencia del gen Pha C, mediante PCR. Se detectaron 38 cepas de bacterias productoras de PHA, identificándose *Lactococcus*, *Klebsiella*,

Pseudomonas, *Enterobacter* y *Enterococcus* en lactosuero, así como *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Klebsiella* y *Gluconobacter* en los subproductos de caña de azúcar. El gen Pha C se detectó en 16 bacterias que presentaron los arreglos genéticos I y IV. Se concluyó que estas bacterias son promisorias para la producción de PHA (Cardona *et al.*, 2013).

En la implementación de un sistema de tratamiento de efluentes industriales se investigaron bacterias productoras de PHA y expolisacáridos (EPS). Las bacterias se aislaron de aguas residuales y se cultivaron en medio de enriquecimiento con sacarosa. El polímero se recuperó, cuantificándose 33,33-96,67 mgL⁻¹ con los aislados de efluentes de empresas de lácteos y procesadoras de maíz; 73,3–80,0 mgL⁻¹ con aislados de empresas de alimentos –sector confitería y 3,86 – 5,24 mgL⁻¹ con aislados de aguas residuales. En el tratamiento de aguas residuales se demostró que a mayor producción de PHA y EPS, menor fue la tendencia a la remoción de DBO₅, DQO y SST. Se cuantificó 1667 mgL⁻¹ de PHA, demostrándose el potencial de las bacterias como productoras de PHA (Cuesta, 2014).

2.2 Base teórica

Los plásticos son polímeros obtenidos por la condensación orgánica de diferentes monómeros, con pérdida de una molécula de agua. Se agrupan en termoplásticos, elastómeros y termoestables. Los termoplásticos como cloruro de polivinilo (PVC) polietileno de alta densidad (HDPE) y el polipropileno (PP) tienen capacidad de deformación y moldeo estable por tiempo indefinido, una vez calentados por encima del punto de fusión y tras el cual adquieren un estado viscoso-líquido, que se mantiene hasta que se enfrían, a un estado sólido, con un comportamiento vidrioso. Los elastómeros y plásticos termoestables una vez calentados no tienen la plasticidad referida. Los elastómeros se deforman bajo determinadas situaciones pero tienden a volver a su aspecto inicial. Los termoestables son rígidos y presentan escasa capacidad de extensión ante una situación de ruptura, tienen consistencia dura a temperatura ambiente y no pueden ser moldeados una vez calentados, resultando imposible el reciclado (Cerrone, 2011).

Bioplásticos son todos los polímeros con propiedades plásticas, parecidas a las de un polímero termoplástico, pero no proceden del petróleo sino de una fuente orgánica renovable. El protocolo EN13432 establecido por la “International Standard Organization” (ISO) describe las características que un plástico debe cumplir para ser

considerado biodegradable. En el ensayo químico todos los constituyentes deben reducirse a moléculas de estructura más sencillas y fácilmente metabolizables, manteniéndose el contenido de metales pesados, por debajo del valor umbral. En la biodegradabilidad en medio acuoso 90% de todo el material debe ser transformado en dióxido de carbono después de 6 meses. En el proceso de compostaje, después de 3 meses debe permanecer como máximo 10% de residuo en el tamizado en malla de 2mm, no debe producirse algún defecto negativo inhibidor del compostaje y en el ensayo agrónomico el compost resultante no presentará fitotoxicidad (Cerrone, 2011).

Los polímeros biodegradables se dividen en tres grandes grupos. Un primer grupo procede de cultivos agrícolas o de animales, mencionándose la celulosa, almidón, gluten y caseína. El proceso térmico de extrusión es el más apropiado para su industrialización y se aplica con éxito en la obtención de diversos materiales termoplásticos. En el segundo grupo se incluyen los polímeros extraídos de la biomasa, mediante síntesis química. Es el caso del ácido láctico, procedente de la fermentación del almidón de maíz y que se trata químicamente para formar cadenas largas, con una estructura molecular parecida a los derivados del petróleo, denominada ácido poliláctico, PLA, con excelentes propiedades mecánicas y físicas. Este bioplástico se utiliza para botellas de refrescos, envases para alimentos, textiles y productos médicos. Otro ejemplo es el quitosano, derivado de la quitina, procedente del exoesqueleto de crustáceos. El tercer grupo de bioplásticos es el sintetizado por microorganismos o polihidroxialcanoatos (Hernández & Guzmán, 2009).

2.2.1 Definición, estructura y propiedades de los PHA

Los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos o poliésteres lineales de ácidos (R)-3-hidroxicarboxílicos (R) – HA que algunas bacterias y arqueas acumulan intracelularmente como material de reserva, para usarlo posteriormente como fuente de carbono y energía. Los PHA (Figura 1) están compuestos de monómeros de (R)-B- hidroxiaácidos, en los cuales el grupo “R” varía desde metil (C₁) hasta tridecil (C₁₃) (Gómez, 2013).

La polimerización de los ácidos hidroxialcanoicos, por acción de enzimas intracelulares tiene lugar mediante condensación del grupo carboxilo de un monómero (ácido hidroxialcanoico) con el grupo hidroxilo del siguiente, formándose un enlace éster, de allí que también se les conozca como biopoliésteres. Los PHA tienen alto

grado de polimerización, 60–80 % de cristalinidad y son activos ópticamente porque presentan un carbono quiral, son isotácticos, es decir están conformados por unidades repetidas estereoquímicamente regulares y son insolubles a agua (Cerrone, 2011; González *et al.*, 2013).

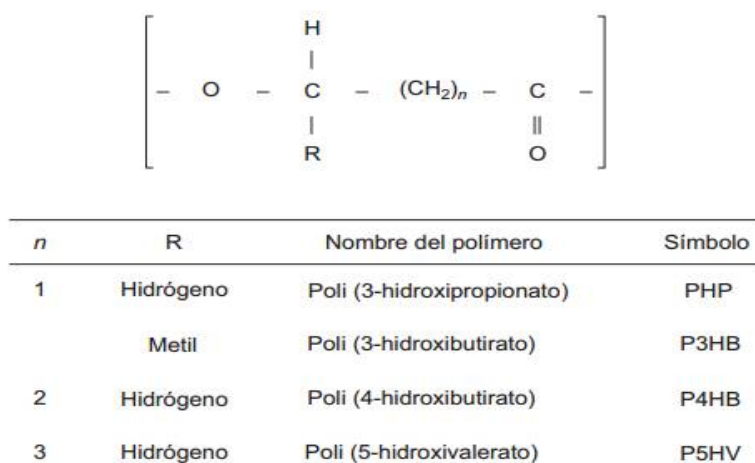


Figura 1. Estructura química de polihidroxicanoatos producidos por bacterias (Gómez, 2013)

Dependiendo del número de carbonos en cada monómero, los PHA pueden ser de cadena corta (scl, short-chain-length) con 3-5 átomos de carbono, como el Poli-3-hidroxivalerato [P (3 HV)] y el Poli – 3 – hidroxibutirato [P(3HB)] ; PHA de cadena media (mcl, medium-chain-length) con 6 – 14 carbonos como el copolímero poli – 3 (HB – co –HV) y PHA de cadena mixta (PHAMCM), que combinan monómeros de cadena corta y cadena media como el Poli (3HB- co- 3HV – CO-3HHX). Dependiendo del número de carbonos, los PHA presentan diferentes niveles de cristalinidad y elasticidad. Los PHAscl son demasiado rígidos y frágiles, mientras que los PHAmcl son más elásticos, pero con menos fuerza mecánica. Los PHA se pueden presentar como homopolímeros o copolímeros. Dependiendo del microorganismo y las fuentes de carbono usadas, se han descrito más de 100 unidades monoméricas (Tabla 1), como constituyentes de los PHA (Gómez, 2013; González *et al.*, 2013).

Tabla 1. Principales monómeros que conforman los PHA producidos por microorganismos*

Símbolo	Monómero	N° de carbonos	Posición del grupo carboxilo
3HP	Acido 3-hidroxi-propiónico	3	3
3HB	Acido 3-hidroxi-butírico	4	3
3HV	Acido 3-hidroxi-valérico	5	3
3HHx	Acido 3-hidroxi-hexanoico	6	3
3HHp	Acido 3-hidroxi-heptanoico	7	3
3HO	Acido 3-hidroxi-octanoico	8	3
3HN	Acido 3-hidroxi-nonanoico	9	3
3HD	Acido 3-hidroxi-decanoico	10	3
3HUD	Acido 3-hidroxi-undecanoico	11	3
3HDD	Acido 3-hidroxi-dodecanoico	12	3
3HTD	Acido 3-hidroxi-tetradecanoico	14	3
3HHxD	Acido 3-hidroxi-hexadecanoico	16	3
4HB	Acido 4-hidroxi-butírico	4	4
4HV	Acido 4-hidroxi-valérico	5	4
4HHx	Acido 4-hidroxi-hexanoico	6	4
4HHp	Acido 4-hidroxi-heptanoico	7	4
4HO	Acido 4-hidroxi-octanoico	8	4
4HD	Acido 4-hidroxi-decanoico	10	4
5HV	Acido 5-hidroxi-valérico	5	5
5HHv	Acido 5-hidroxi-hexanoico	6	5
6HDD	Acido 6-hidroxi-dodecanoico	12	6

*Fuente : González *et al.*(2013)

Los PHA tienen características físicas similares a los plásticos derivados del petróleo como el polipropileno y polietileno de baja densidad (PEBD). Son poliésteres insolubles en agua, termoplásticos y elastómeros. La mayoría son polímeros parcialmente cristalinos y por lo tanto sus propiedades térmicas y mecánicas se reportan en términos de la temperatura de transición (Tg) o de temperatura de fusión, Tm (Tabla 2). Las propiedades mecánicas y físico – químicas como rigidez, fragilidad, cristalinidad, elasticidad, punto de fusión, temperatura de transición vítrea y resistencia a solventes orgánicos dependen de la composición monomérica (Fernández., 2012; Becerra, 2013).

Tabla 2. Propiedades físicas de diferentes tipos de PHA y su comparación con las observadas en plásticos derivados del petróleo

Polímero	Temperatura de fusión(°C)	Módulo de Young(Gpa)	Fuerza tensil (Mpa)	Elongación (%)	Temperatura de transición(°C)
P(3HB)	179	3,5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3 mol % 3HV	170	2,9	38	*	*
14 mol % 3HV	150	1,5	35	*	*
25 mol % 3HV	137	0,7	30	*	*
P(3HB-co-4HV)					
3 mol % 4HV	166	*	28	45	*
10 mol % 4HV	150	*	24	242	*
64 mol % 4HV	50	30	17	591	*
P(4HB)	53	149	104	1000	*
P(3HHx-co-3HO)	61	*	10	300	*
P(3HB-co-3HHx)	52	*	20	850	-4
Polipropileno	170	1,7	34,5	400	45
Polietileno				7300	
Teraftalato	262	2,2	56		3400
Poliestireno	110	3,1	50	*	21
Nylon-6,6	265	2,8	83	60	*

Fuente: González *et al.*(2013)

Los PHA de cadena corta son polímeros termoplásticos, que pueden ser moldeables arriba de su punto de fusión. La temperatura de fusión es relativamente alta (180°C) y su temperatura de transición es de -5 a 20 °C. Este tipo de PHA tiene un grado de cristalinidad de 60 – 80 %, el cual disminuye a 30- 40%, a medida que el contenido de 3HV se incrementa a 30 mol %. La incorporación de 3HV en el polímero provoca que tanto la T_m como la T_g disminuyan, por lo que copolímeros de cadena corta son más versátiles que los homopolímeros. En cuanto a los PHA de cadena media, son amorfos con una T_g de -62 a -26°C y T_m de 42 – 58 °C, por lo cual se clasifican como elastómeros. En líneas generales los PHAscl son rígidos y quebradizos con alto grado de cristalinidad y con propiedades mecánicas y térmicas similares al polipropileno, aunque éste es algo menos quebradizo. Por el contrario, los PHAmcl presentan temperatura de fusión y de transición vítrea más bajas, una cristalinidad limitada y una gran flexibilidad (Fernández, 2012; González *et al.*, 2013).

El poli (3-hidroxibutirato) [PHB] es el polímero más estudiado; sin embargo, su aplicación está limitada por su relativo alto punto de fusión (179 °C), que además está cercano a su temperatura de descomposición (210°C). El PHB, es un material muy frágil, característica relacionada con una cristalización secundaria que ocurre durante el almacenaje. La incorporación de unidades de mayor peso molecular como unidades monoméricas de 6–14 carbonos, mejora las características físicas y mecánicas de los polímeros alcanzando menor cristalinidad, menor punto de fusión, mayor resistencia a la ruptura y mayor dureza. Ejemplo: la incorporación del hidroxivalerato (HV) al PHB origina poli (3-hidroxibutirato- co- 3- hidroxivalerato) [PHBV], copolímero que es menos rígido y quebradizo que el homopolímero (Vergara, 2006).

2.2.2 Biosíntesis de PHA

Los PHA se han definido como biopolímeros de reserva de fuente de carbono y energía: sin embargo, también se relacionan con la adaptación y supervivencia en nichos ecológicos muy competitivos, como la resistencia a condiciones desfavorables: frío, calor, radiación UV, desecación, presión osmótica y diferentes compuestos químicos. También se relacionan con señales que desencadenan la formación de esporas y quistes, en las interacciones entre microorganismos, en la formación de biopelículas y en la relación tipo simbiote entre plantas y microorganismos rizosféricos (Fernández, 2012).

En la naturaleza han evolucionado vías diferentes para la síntesis de PHA, cada una adaptada al nicho ecológico de los microorganismos productores. Para la designación de los genes involucrados en la biosíntesis de gránulos, proteínas estructurales auxiliares de unión a los gránulos y enzimas degradadoras del polímero, existen diversas nomenclaturas. Con la más utilizada, los genes son nombrados en orden alfabético como phaA (B-cetotiolasa), phaB (acetoacetil-CoA reductasa), phaC (PHA sintasa), phaG (proteína transportadora de 3- hidroxiaclil- acil Coenzima A transferasa) y pha J (enoil – CoA hidratasa), entre otros (Becerra, 2013).

Los PHA se acumulan como polímeros líquidos, móviles y amorfos en forma de gránulos, que se alojan en el citoplasma microbiano, rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene polimerasas y despolimerasas (Gonzalez *et al.*, 2013). Los PHA se disponen formando gránulos de naturaleza hidrofóbica rodeados por una membrana lipídica, en la que se encuentran ancladas proteínas implicadas en su metabolismo, denominadas GAP (granule associated protein). En las especies de *Pseudomonas* las GAP caracterizadas son polimerasas y despolimerasas, involucradas en la síntesis y degradación del polímero, respectivamente, fasinas que son las GAP más abundantes, con una función estructural y reguladora y la acil-CoA sintasa, encargada de activar los productos de la despolimerización convirtiéndolos de nuevo en moléculas de (R)-3 hidroacil-CoA [(R)-HA-CoA] (Fernández, 2012).

El número de gránulos por célula se define en las primeras etapas de acumulación y la producción del polímero cesa cuando su contenido alcanza cerca del 80% del peso celular en base seca, concluyéndose que existen restricciones físicas que impiden a la célula acumular más polímeros, a pesar de disponibilidad del sustrato y actividad de la PHA polimerasa (González *et al.*, 2013). El diámetro promedio de los gránulos es de 0,2 – 0,5 μm , con un número aproximado de 8-10 gránulos por célula y un peso molecular de 2×10^5 - 3×10^6 daltons. Estas inclusiones pueden visualizarse claramente por microscopía de fases, debido a su alta refractabilidad y por microscopía de fluorescencia al teñir las células con colorantes específicos (Becerra, 2013). Intracelularmente el PHA se acumula en estado amorfo, como inclusiones celulares y su cristalización ocurre cuando es extraído de la célula (Serrano, 2010).

2.2.3 Rutas metabólicas

La biosíntesis de PHA se puede resumir en ocho vías. En la vía I las enzimas clave son β - cetotiolasa, acetoacetil- CoA reductasa dependiente de NADPH y la PHA

sintasa. La vía II usa 3-cetoacil- CoA reductasa, epimerasa, (R)-enoil- CoA hidratasa acil-CoA oxidasa y enoil- CoA hidratasa I. La vía III involucra la 3-hidroxiacil-ACP-CoA transferasa (phaG) y malonil-CoA-ACP transacilasa (FabD). La vía IV usa la acetooacetil-CoA reductasa dependiente de NADH para oxidar (S)-(+)-3-hidroxiacil-CoA. La vía V usa la succínico semialdehído deshidrogenasa (SucD) y 4-hidroxiacil-CoA. La vía VI emplea una lactonasa putativa y la hidroxiacil-CoA sintasa. La vía VII se basa en la acohol deshidrogenasa putativa. Las vías VII y VIII usan 4- hidroxiacil-CoA y 6 - hidroxiacil-CoA para la síntesis de PHA, respectivamente (Chen, 2010, mencionado por Becerra, 2013).

El acetil CoA es clave para el suministro de 3- hidroxialcanoil- CoA de diferente longitud, como sustrato de la PHA sintasa codificada por el gen phaC. Este gen y otros involucrados en la biosíntesis de PHA están organizados en operones, en los que se han identificado cuatro arreglos básicos. Las sintasas tipo I, representadas en *Cupriavidus necator* presentan un operón Pha CAB que incluye los genes PHA sintasa (phaC), β - Cetotiolasa (pha A) y acetooacetil -CoA reductasa (pha B). Las sintasas PHA tipo II representadas en *P. aeruginosa*, contienen los genes sintasa pha C₁ y pha C₂ separados por el gen pha Z, cuyo producto enzimático actúa en la despolimerización de estos compuestos. En el tercer sistema tipo III, la enzima PHA sintasa consiste de dos subunidades codificadas por los genes phaE y phaC, en *Chromatium*, *Synechocystis* y *Thyocystis*. El cuarto arreglo tipo IV es típico de *Bacillus spp.* con una PHA sintasa conformada por dos subunidades phaC y phaR , ambas codificadas por el operón pha RBC (Serrano, 2010; Cardona *et al.*, 2013).

Los PHA provienen básicamente de tres vías metabólicas: la degradación de azúcares mediante la obtención de acetil CoA, la degradación de ácidos grasos (β - oxidación) y la biosíntesis de ácidos grasos. El proceso metabólico en *Cupriavidus necator* para la producción de PHA de cadena corta a partir de carbohidratos (Figura 2) comienza con el acetil - CoA, en una secuencia de tres reacciones catabolizadas por las enzimas 3 - cetotiolasa, acetooacetil - CoA y la poli (3 - hidroxiacil) sintasa. En primer lugar la condensación de dos moléculas de acetil CoA origina acetooacetil CoA mediante un β - cetoacil CoA tiolasa (acetil CoA acetiltransferasa, EC 2.3.1, 9). En esta ruta, el piruvato no va hacia el ciclo de Krebs y es derivado hacia la formación de acetil CoA. A continuación, éste es reducido de manera estereoselectiva a (R)-3- hidroxiacil CoA dehidrogenasa, EC1.1.1.36). Por último, los monómeros de (R) -3-

hidroxibutiril-CoA son polimerizados por la polimerasa de PHB o poli (3-hidroxibutirato) sintasa (Serrano, 2010, Gómez, 2013).

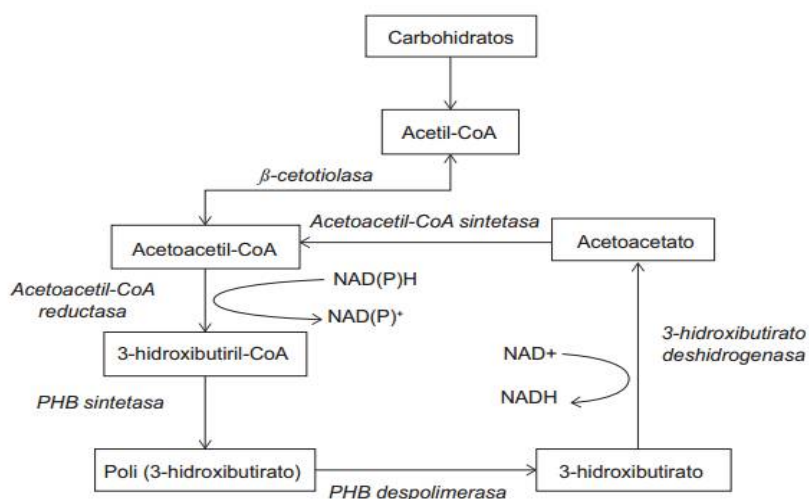


Figura 2. Ruta metabólica para la síntesis y degradación intracelular de P3HB a partir de carbohidratos (González *et al.*, 2013).

Respecto a la ruta para la biosíntesis de PHA de cadena media, la más estudiada es la de *Pseudomonas* sp. En *P. oleovorans* los genes están en el operón pha C1zC2D, que codifica para dos polimerasas, Pha C1 y Pha C2, una despolimerasa (Paz) y la proteína Pha D. Las despolimerasas catalizan la condensación en PHA de varios derivados de 3 –hidroxiacil –CoA en cadenas de 6 -14 carbonos. La mayoría de los intermediarios para la síntesis de PHA de cadena media se obtienen a partir de la β- oxidación (Figura 3), aunque algunos monómeros pueden obtenerse de otras rutas (González *et al.*, 2013).

En distintas especies de *Pseudomonas* existe una estrecha relación entre la estructura de los ácidos grasos utilizados como fuente de carbono y la composición del PHA producido: los monómeros del polímero presentan cadenas laterales de igual longitud que el ácido graso utilizado como sustrato o acortados en un número par de átomos de carbono. Esta correlación estructural sugiere que los ácidos grasos puedan incorporarse al PHA directamente a través de intermediarios de la β – oxidación, sin necesidad de ser completamente oxidados a acetil – CoA. Por tanto, en estos microorganismos la ruta de síntesis de PHA es una rama de la β – oxidación y la PHA polimerasa debe competir por sustratos con enzimas del catabolismo de los ácidos

grasos (Rodríguez, 2012). Las enzimas involucradas son : acil-CoA ligasa o transferasa que genera la formación de una molécula de acil- CoA que posteriormente es reducida por la acil-CoA deshidrogenasa- FADH dependiente, con pérdida de una molécula de agua y formación de trans- 2- enoil-CoA. Éste será sustrato de la enoil-CoA hidratasa formándose (S)-3-hidroxiacilCoA, que gracias a una epimerasa cambia su conformación, sintetizándose (R)- 3- hidroxiacilCoA (Cerrone, 2011).

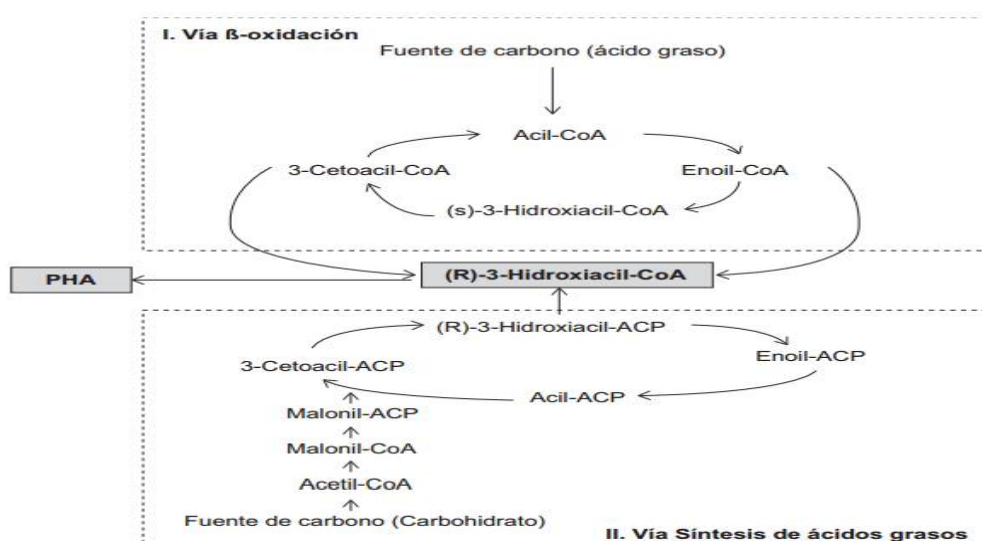


Figura 3. Ruta para la síntesis de PHA de cadena media en *Pseudomonas* sp. a partir de ácidos grasos y carbohidratos (González *et al.*, 2013).

La síntesis de PHA desde la biosíntesis de novo de los ácidos grasos representa un desvío hacia la obtención del monómero necesario (Figura 3). El inicio involucra al acetilCoA que gracias a la acetil CoA carboxilasa se convierte en malonil-CoA, el cual por acción de la ACP- maloniltransferasa se adiciona al grupo ACP, convirtiéndose en malonil-ACP, siendo así transformado en 3-ketoacil-ACP por la 3-cetoacil-ACP sintasa dependiente de NADPH. Finalmente, una reducción por la 3-cetoacil-ACP reductasa genera el ®-3-hidroxiacil-ACP-CoA transacilasa, originando ®-3hidroxiacilCoA, para su posterior polimerización (Cerrone, 2011).

La regulación de la producción de PHB a nivel enzimático ha sido estudiada en *R. eutropha*. Las concentraciones intracelulares de CoA y acetil – CoA tienen un papel esencial en la síntesis, el CoA libre inhibe la B – cetiolasa. La síntesis de PHB es estimulada por niveles elevados de NAD (P) H o de la tasa NAD (P)/NAD (P), lo cual

parece estar conectado con un enlentecimiento del ciclo de Krebs del CAT, vía una inhibición de la citrato sintasa por NAD. En cuanto a la regulación a nivel transcripcional la expresión de los genes Pha A, Pha B, Pha C, Pha R y Pha Z es constitutiva, porque se transcriben en todas las etapas de crecimiento, producción y degradación de PHB. Por su parte, la producción de la fasina Pha P parece regulada porque no se detecta fasina libre en la célula, sino que se produce en los niveles requeridos para la unión del gránulo. Esta regulación parece estar mediada por Pha R (Fernández, 2012).

2.2.4 Proceso de fermentación para la producción de PHA

Existen más de 300 especies de bacterias productoras de PHA, mencionándose *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Cupriavidus*, *Enterobacter*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Serratia*, *Halomonas*, *Haloferax*, entre otras. Las bacterias productoras de PHA se agrupan según las condiciones para la síntesis del polímero. El primer grupo requiere la limitación de un nutriente esencial (N, P, S, Mg, O₂) para sintetizar PHA a partir de un exceso de carbono. Se incluyen *Cupriavidus necator*, *Bacillus* spp. *Protomonas extorquens* y *P. oleovorans.*, entre otras. El segundo grupo de bacterias pueden acumular polímero en grandes cantidades durante la fase de crecimiento. Se incluyen *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* y *E. coli* recombinante (González et al., 2013).

Las estrategias de cultivo para la obtención de alta concentración de un producto de interés son: cultivo en lote, lote alimentado y continuo. En el cultivo en lote se constituye un volumen fijo de medio, en el que los nutrientes y el inóculo son adicionados al inicio de la fermentación. Las únicas líneas de entrada y de salida son las de aeración y las etapas de crecimiento, consumo de sustrato y producción se limitan a un intervalo de tiempo determinado. En un cultivo continuo se busca mantener las células en etapa de producción adicionando constantemente nutrientes al medio de cultivo y retirando células y producto. Por su parte, en el cultivo con lote alimentado, los nutrientes son continua o semi-continuamente alimentados y el producto es removido discontinuamente. Este sistema es utilizado para disminuir los efectos de inhibición por sustrato o represión catabólica, obteniéndose una alta densidad de biomasa conteniendo la mayor cantidad posible de PHA (Cerrone, 2011; Becerra, 2013).

En la producción de PHA se puede alcanzar una alta productividad mediante cultivo por lote alimentando y cultivo continuo. Para el cultivo por lote alimentado de bacterias que requieren limitación de algún nutriente para sintetizar PHA, se utiliza un sistema en dos etapas. En la primera, se obtiene una concentración de biomasa deseada sin limitación de nutrientes y en la segunda etapa se promueve la síntesis de PHA, manteniendo en concentración limitante algún nutriente esencial. En esta segunda etapa la concentración de biomasa sin PHA permanece casi constante y el incremento en biomasa se debe a la acumulación intracelular del polímero. Para el cultivo de bacterias con producción de PHA asociada al crecimiento se puede alcanzar alta productividad en un sistema de lote alimentado en una sola etapa. La estrategia de alimentación es muy importante para obtener una densidad celular alta y no tiene que ver con la limitación de nutrientes, por lo que se usan fuentes de nitrógeno complejas para mejorar el crecimiento (González *et al.*, 2013).

2.2.5 Técnicas para la detección, cuantificación y caracterización de PHA

Tradicionalmente la detección de gránulos de PHA en células microbianas se ha llevado a cabo por medio de la tinción con el colorante lipofílico negro, Sudan B. Actualmente existen otros colorantes con mayor afinidad y especificidad por compuestos lípidos, entre los que destaca al azul Nilo A (cloruro de 5-amino-9-dietilaminobenzo [alfa] fenazonio), que pertenece a la familia de las oxazinas y que presenta una fluorescencia naranja a una longitud de onda de 640 nm. El rojo Nilo (7-diethylamino-3,4-benzofenoxazina-2-ona) es también un colorante para detención de inclusiones intracelulares lipídicas, que una vez teñidas presentan fluorescencia que va del amarillo–dorado (excitación de 450–500 nm) al rosa-rojo (excitación de 515–560 nm). La detección de PHA intracelular también puede llevarse a cabo mediante espectroscopía de infrarrojo (FT –IR). Los espectros de PHA obtenidos con esta técnica exhiben un pico alrededor de los 1730 nm, correspondientes al enlace éster carbonilo característico de los PHA (Cardona *et al.*, 2013, González *et al.*, 2013; Gómez, 2013).

La metodología más frecuentemente para la extracción de PHA de la biomasa microbiana es el uso de hidrocarburos clorados especialmente la técnica que utiliza hipoclorito y cloroformo. La solución de PHA resultante se concentra y el polímero se precipita con metanol o etanol. Con esta técnica, los lípidos de bajo peso molecular, se quedan en la solución y no interfieren en la determinación (González *et al.*, 2013).

Respecto a la cuantificación de PHA uno de los métodos que más se utiliza es el gravimétrico que usa cloroformo como solvente para extraer el polímero de la biomasa liofilizada, para posteriormente precipitarlo con dietil éter o acetona y finalmente secarlo y pesarlo. Otra metodología se basa en que el material celular excepto los gránulos de P3HB, se disuelven en una solución alcalina de hipoclorito de sodio de manera que el polímero se libera y es recuperado por centrifugación y posteriormente secado y pesado. Por su parte, la técnica espectrofotométrica se basa en la conversión de P3HB en ácido crotonico mediante el uso de ácido sulfúrico concentrado y calor. Este ácido se cuantifica por espectrofotometría UV, leyendo la absorbancia a 230 nm. Otras técnicas utilizadas son la cromatografía de gases (CG), espectroscopía de fluorescencia bidimensional y citometría de flujo y cromatografía iónica (González *et al.*, 2013; Gómez, 2013).

2.2.6 Biodegradación de PHA

Las enzimas de la despolimerización del PHA son despolimerasas extracelulares e intracelulares. Algunos microorganismos no productores de PHA poseen despolimerasas intracelulares que les permiten obtener carbono y energía por hidrólisis del PHA exógeno, proveniente de la lisis de microorganismos acumuladores. Esta es la degradación extracelular, en la que los gránulos son liberados al entorno e hidrolizados hasta oligómeros solubles en agua y monómeros (Fernández, 2012) y está ampliamente distribuida entre bacterias incluyendo actinomicetos y hongos, sin estar limitada únicamente a productores de PHA. Los microorganismos utilizan como fuente de carbono exógena estos polímeros extracelulares liberados por células muertas acumuladoras de PHA. Las enzimas clave son las despolimerasas intra y extracelulares específicas de PHA (desp PHA), las cuales son carboxiesterasas. El proceso de hidrólisis tiene de dos pasos en la interfase sólido-líquido: primero la enzima enlaza al polímero-sustrato y subsecuentemente cataliza el rompimiento hidrolítico (Serrano *et al.*, 2010; González *et al.*, 2013).

Las bacterias productoras de PHA realizan la degradación intracelular del polímero acumulado gracias a la acción de despolimerasas intracelulares ancladas en la superficie del gránulo de PHA. Esta degradación es una respuesta endógena de la bacteria que le permite hidrolizar sus reservas de carbono. En el caso del P3HB, es hidrolizado a 3HB, a su vez oxidado a acetoacetato por una deshidrogenasa dependiente de NAD y éste es convertido a acetoacetyl-CoA por la succinato

deshidrogenasa (Fernández, 2012; González *et al.*, 2013). La biodegradación del PHA puede diferenciarse entre la realizada al interior y exterior de la célula, a partir del hecho que dicho polímero puede estar presente en dos de sus conformaciones biofísicas. En la biodegradación intracelular los gránulos de PHA se acumulan *in vivo* y presentan una capa superficial intacta compuesta de proteínas y fosfolípidos. En la degradación extracelular la pérdida de dicha capa, después de la lisis celular o de la extracción del polímero, provoca la coalescencia de los gránulos y la formación de cristales de la estructura amorfa previa del polímero (González *et al.*, 2013).

2.2.7 Bagazo de caña de azúcar

El procesamiento de 70 millones de toneladas de caña, produce 20,5 millones de toneladas de bagazo y una cantidad similar de residuos agrícolas cañeros (RAC), que incluyen paja, cogollos y hojas. El bagazo representa 30 % de los tallos verdes molidos y se obtiene con 50% de humedad, lo que significa que por cada hectárea cosechada es posible obtener al año 13,5 t de bagazo residuo que contiene 47 % de carbono, 65% de hidrógeno, 44% de oxígeno y 2,5% de cenizas (Reyes *et al.*, 2003).

El bagazo es el subproducto o residuo de la molienda de la caña, la fibra leñosa de la caña, en la que permanecen el jugo residual y la humedad provenientes del proceso de extracción. En la práctica aproximadamente la mitad es fibra y la mitad es jugo residual, con variaciones que resultan de los procesos de la molienda y variedad y calidad de la caña. Es considerado un residuo agroindustrial que contiene 45,51-45,66 % de fibra bruta; 90,95-90,98% de fibra neutro detergente (FND); 59,88-59,92% de fibra ácido detergente (FAD); 47,49-47,88% de celulosa y 31,07-31,98% de hemicelulosa. También contiene 27,22% \pm 0,8% de lignina (Mesa *et al.*, 2009). En su composición se ha determinado 24,8% de carbono; 2,53% de hidrógeno; 24,43% de oxígeno; 0,25% de azufre; 2,03% de cenizas; 44,42% de humedad; 4,17% de carbono fijo; 97,27 de volátiles y 2,15% de cenizas (Díaz, 2008).

Los campos agroindustriales azucareras en Lambayeque procesan diariamente 11t de caña de azúcar (APPAB, 2014). La gran mayoría del bagazo producido sirve como combustible, para la generación de vapor en los campos productores de azúcar, tal que 1t de bagazo fresco equivale a 2,2 barriles de aceite combustible o 92,4 galones o 350 L (Reyes *et al.*, 2013; Díaz, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material biológico

Muestras de bagazo de caña de azúcar y bacterias productoras de PHA.

3.1.2 Población y muestra de estudio

En la primera fase de la investigación la población estuvo constituida por el bagazo de caña de azúcar acopiado en las Agroindustrias de Producción Azucarera Tumán S.A.A. y Pucalá S.A.C. en Lambayeque y se investigaron 54 muestras, colectadas durante enero - marzo de 2016. El número de muestras fue calculado según la fórmula mencionada por Alvitres (2000), con una prevalencia de 90%, determinada en un estudio piloto por los investigadores (Anexo 1).

En la segunda fase de la investigación, la población estuvo constituida por los cultivos de bacterias productoras de PHA aisladas de bagazo de caña de azúcar y se investigaron diez cultivos bacterianos seleccionados. En ambas fases, el muestreo fue no probabilístico y por conveniencia (Hernández et al., 2013).

3.2 Métodos

3.2.1 Variables cuantitativas

Número de células con gránulos de PHA, concentración de biomasa y PHA, rendimiento de PHA.

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación fue descriptivo y la hipótesis se contrastó con el diseño no experimental “Solo Después” (Hernández *et al.*, 2013). La investigación se realizó en dos fases, en la primera se aislaron bacterias de bagazo de caña de azúcar y se detectaron y seleccionaron las productoras de PHA. En la segunda fase se

determinó el rendimiento de PHA producido por diez cultivos de bacterias seleccionadas.

3.2.3 Lugar de muestreo

Las muestras del bagazo de caña de azúcar se colectaron en los montículos acopiados en las Agroindustrias de producción azucarera Tumán S.A.A. y Pucalá S.A.C. en Lambayeque (Figuras 4 a 9). La Empresa Agroindustrial Tumán está ubicada en el distrito de Tumán, entre las coordenadas 6°44'47" latitud sur y 79°42'16" longitud oeste (MDT, 20016). La Empresa Agroindustrial Pucalá está en el distrito de Pucalá entre las coordenadas 6°35'6" latitud sur y 79°21'4" latitud oeste (MDP, 2016).

3.2.4 Obtención de muestras de bagazo de caña de azúcar

En las montículos de bagazo de caña de azúcar, a 25 cm de profundidad, se colectaron aproximadamente 50g de residuos, se depositaron en bolsas de polietileno (Figuras 10,11), debidamente identificadas e inmediatamente se transportaron en una caja térmica ($10 \pm 1^{\circ}\text{C}$) para su procesamiento en la sección Biotecnología Microbiana del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

3.2.5 Pretratamiento de las muestras

El bagazo de caña de azúcar fue deshidratado (Collazos & Ortiz 2014) bajo sombra, durante 3 días, fue cortado en fragmentos de 0,5 cm² (Figura 12) y del material obtenido se tomaron 5g y se depositaron en frascos con 45 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,87% p/v) más Tween 80 al 0,1%. La suspensión obtenida o dilución 10⁻¹ se homogenizó manualmente durante 15 minutos para favorecer el desprendimiento de las células bacterianas y después se realizaron dos diluciones adicionales hasta 10⁻³ (Figura 13).

3.2.6 Aislamiento de bacterias

En las diluciones 10⁻² y 10⁻³ se tomaron alícuotas y se sembraron mediante la técnica de agotamiento y estría (Collazos & Ortiz, 2014) en agar nutritivo y agar Mac Conkey (Anexo 2), suplementados con 45mg de Fluconazol para inhibir el crecimiento de hongos (Alvarado & Valderrama, 2014).



Figura 4. Ubicación geográfica Distrito de Tumbes, provincia de Chiclayo, región Lambayeque 2016 (<https://maps.google.com.pe/>).



Figura 5. Entrada a la Empresa Agroindustrial Tumbes S.A.A. de la región Lambayeque, 2016.



Figura 6. Ubicación geográfica del distrito de Pucalá, provincia de Chiclayo, región Lambayeque 2016 (<https://maps.google.com.pe/>).



Figura 7. Entrada a la Empresa Agroindustrial Pucalá S.A.C de la región Lambayeque, 2016.



Figura 8. Montículo de bagazo de *Saccharum officinarum* L en la Empresa Agroindustrial Tumán S.A.A. , 2016.



Figura 9. Montículo de bagazo de *Saccharum officinarum* L en la Empresa Agroindustrial Pucalá S.A.C., 2016.



Figura 10. Obtención de muestra de bagazo de *Saccharum officinarum* L.



Figura 11. Muestras de bagazo de *Saccharum officinarum* L.



Figura 12. Fragmentado de bagazo de *Saccharum officinarum* L.



Figura 13. Suspensiones del bagazo de *Saccharum officinarum* L en solución salina esterilizada con Tween 80.

Después de la incubación a 30°C hasta por 48 horas las colonias de bacterias desarrolladas se agruparon según su morfología, se seleccionó una representante de cada morfotipo, se realizaron tinciones de Gram y se cultivaron en agar tripticasa soya (TSA) a 30°C durante de 24 horas, constituyendo los cultivos puros de bacterias Gram positivas y Gram negativas que se guardaron en refrigeración (8°C).

3.2.7 Detección y selección de bacterias productoras de gránulos de PHA

Las bacterias se cultivaron por triplicado en 5 mL de caldo para la producción de PHA: caldo Fermentación (Becerra, 2013) para las Gram positivas y caldo Mínimo de Sales (Arroyave *et al.*, 2013) para Gram negativas (Anexo 2), a 30 °C en aerobiosis, con agitación constante (125 rpm) durante 48 horas. A continuación, se tomaron alícuotas de los caldos cultivados, se realizaron extensiones en láminas portaobjetos, se fijaron al calor (frotis) y se colorearon con Sudan Negro B (Figura 14, anexo 3) y se calentaron suavemente sin ebullición, durante 5 minutos. Después de la decoloración con xilol (20 segundos), se secaron a temperatura ambiente (25 - 28 °C) y se colorearon con safranina durante 1 minuto (Cerrone, 2011).

La presencia de gránulos grisáceos en el interior de las células bacterianas rosadas se consideró positivo para la detección de gránulos de PHA (Baca & Sánchez, 2010). Se cuantificó el número de células con gránulos de PHA en cinco campos microscópicos por cultivo bacteriano y se seleccionaron los diez cultivos que presentaron el mayor número de células con gránulos de PHA por campo microscópico.

3.2.8 Determinación del tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA

Los diez cultivos bacterianos seleccionados se llevaron al caldo correspondiente para la producción de PHA, a 30 °C, en aerobiosis, con agitación constante (125rpm) y se realizaron frotis y coloración con Sudan Negro B a las 24, 36, 48 y 72 horas. De esta manera, se determinó el tiempo óptimo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA (Flores & Idrogo, 2015).



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 14. Tinción de bacterias con Sudan Negro B, (a) Adición del colorante, (b) Decoloración con xilol, (c) Tinción con safranina, (d) Lavado.

3.2.9 Rendimiento de polihidroxiclcanoatos de bacterias nativas

Con los diez cultivos de bacterias seleccionadas se determinó la concentración de biomasa y PHA y se calculó el rendimiento $Y (p/x)$.

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

Para cuantificar la biomasa por turbidimetría (Guzmán & Hurtado, 2011), las bacterias productoras de PHA, Gram positivas (5) reactivadas en caldo Fermentación y las Gram negativas (5) en caldo Mínimo de Sales se cultivaron en 4 mL del mismo caldo por el tiempo requerido para observar turbidez (tubo 1 del nefelómetro de Mc Farland). A continuación, se inocularon (5%: 1 mL) en frascos de 100 mL de capacidad con 19 mL de caldo correspondiente (Figura 15), a 30°C, durante el tiempo requerido para alcanzar el mayor número de células con gránulos de PHA, previamente determinado y se tomaron por triplicado 2 mL, uno para determinar la absorbancia a 600 nm (tubo 1) y otro para realizar diluciones decimales hasta 10^{-3} (tubos 2, 3, 4), a los que también se les determinó su absorbancia (Figura 16). Los 140 mL restantes de caldo correspondiente, se centrifugaron a 3500 rpm, durante 20 minutos. El sedimento o biomasa se lavó rápidamente con solución salina (NaCl 0,87% p/v) esterilizada, se centrifugó y deshidrató a 45°C, hasta obtener peso constante.

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

b. Proceso fermentativo

En el proceso fermentativo (Guzmán & Hurtado, 2011) las bacterias productoras de PHA reactivadas en caldo Fermentación (Gram positivas) y caldo Mínimo de Sales (Gram negativas) se cultivaron en 5 mL del caldo correspondiente por tiempo suficiente para observar turbidez (tubo 1 del nefelómetro de Mc Farland), constituyendo el inóculo bacteriano. A continuación, se inocularon (5%: 1 mL) por triplicado en frascos de 100 mL de capacidad con 19 mL de caldo Fermentación para Gram positivas y caldo Mínimo de Sales para Gram negativas y se incubaron a 30°C, por el tiempo óptimo requerido para alcanzar el mayor número de células bacterianas con gránulos



Figura 15. Inoculación de bacterias en caldo Mínimo Sales minerales.



Figura 16. Lectura de absorbancia en espectrofotómetro de luz visible.

de PHA previamente determinado. Posteriormente, se cuantificó la biomasa y PHA producidos.

c. Determinación de la concentración de biomasa y PHA

La concentración de biomasa de cada bacteria fue determinada por turbidimetría a las 24, 36, 48 horas. Se tomó 1 mL de cada cultivo, se registró la absorbancia a 600nm y los valores de biomasa se calcularon en la ecuación de regresión de la curva patrón entre absorbancia y biomasa seca, previamente obtenida.

Para cuantificar el PHA, los 19 mL de caldo se centrifugaron a 3500rpm, durante 20 minutos. El sedimento o biomasa celular obtenida se lavó rápidamente con solución salina (NaCl 0,87% p/v), se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos y se deshidrató en estufa a 42°C, hasta obtener un peso constante, el cual se determinó con una balanza analítica. Con la biomasa, se recuperó el PHA producido por cada bacteria (Figura 17). Según el protocolo de Law & Slepecky (1961), descrito por Cholula (2005), en el tubo con la biomasa deshidratada se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio al 5%, para debilitar la membrana celular y facilitar el proceso de extracción (Figura 18) y después de 2 horas, se adicionó 1 mL de cloroformo para separar la biomasa del polímero. Se observaron dos fases: una inferior transparente y una superior amarillenta (Figura 19).

Transcurridos 20 minutos los tubos se centrifugaron a 3000rpm, durante 5 minutos y nuevamente se observaron dos fases (Figura 20), una superior constituida por hipoclorito con restos celulares y una inferior conteniendo el cloroformo con el polímero PHA. Con una pipeta Pasteur se extrajo el cloroformo con el polímero (Figura 21), se depositó en un tubo de 10x100mm, previamente pesado (P_i) en una balanza de precisión y se llevó a estufa a 40°C, por tiempo suficiente para la evaporación del cloroformo. El tubo conteniendo el PHA se pesó (P_f) y la diferencia entre este peso menos el peso inicial (P_i) constituyó el PHA obtenido (Figuras 22, 23).

Para verificar la naturaleza del polímero obtenido las muestras se diluyeron en 1,5 mL de H₂SO₄ 80%, se calentaron por 30 minutos a 90°C en baño maría, se enfriaron a temperatura ambiente (28°C), se depositaron en celda de cuarzo y se realizó un “barrido” en el espectrofotómetro de luz ultravioleta UNICO S-2150, en el rango de 220 a 250 nm. La absorbancia de un pico máximo a 235nm fue considerada positiva para el PHA. A continuación, se leyó la absorbancia de cada muestra de PHA a 235 nm.



Figura 17. Pesado de biomasa bacteriana.

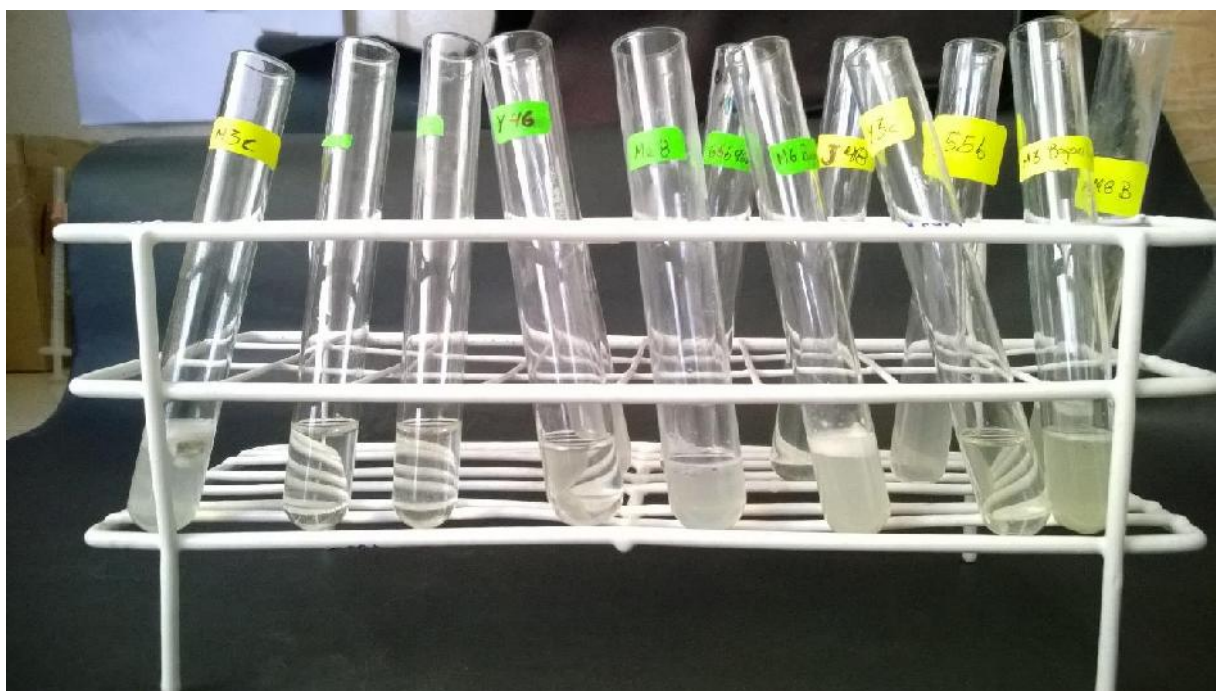


Figura 18. Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio.

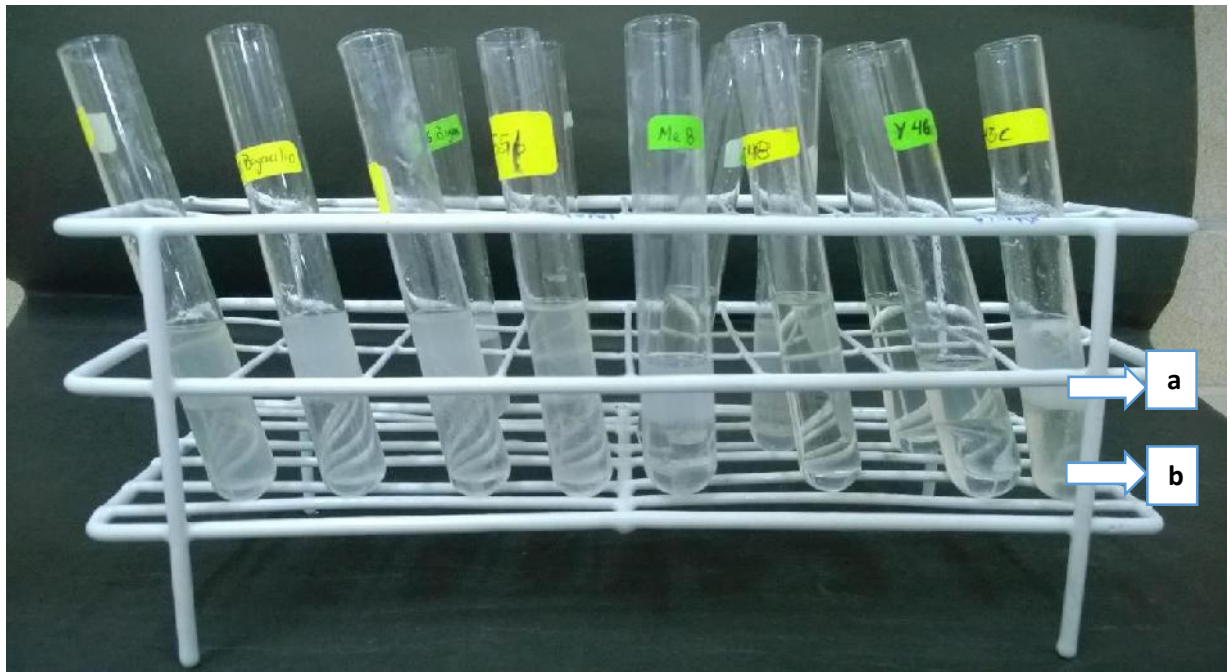


Figura 19. Biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio(a) y cloroformo (b).

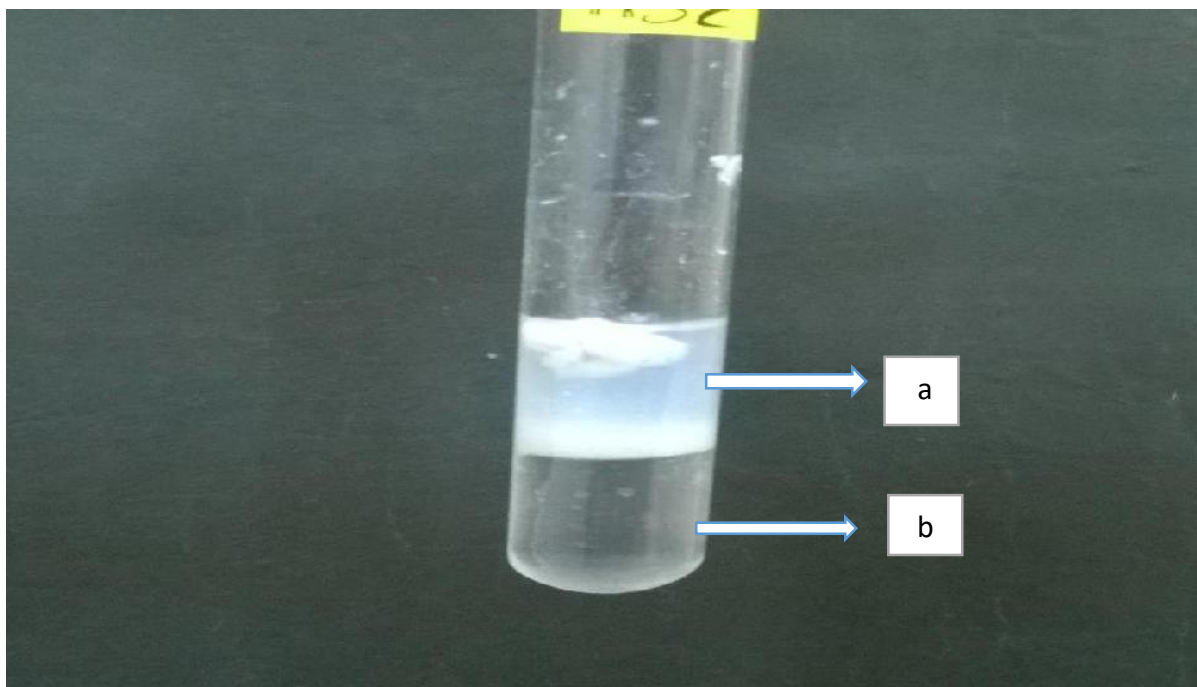


Figura 20. Observación de dos fases en biomasa bacteriana tratada con hipoclorito de sodio(a) y cloroformo (b).



Figura 21. Extracción del cloroformo conteniendo el PHA.

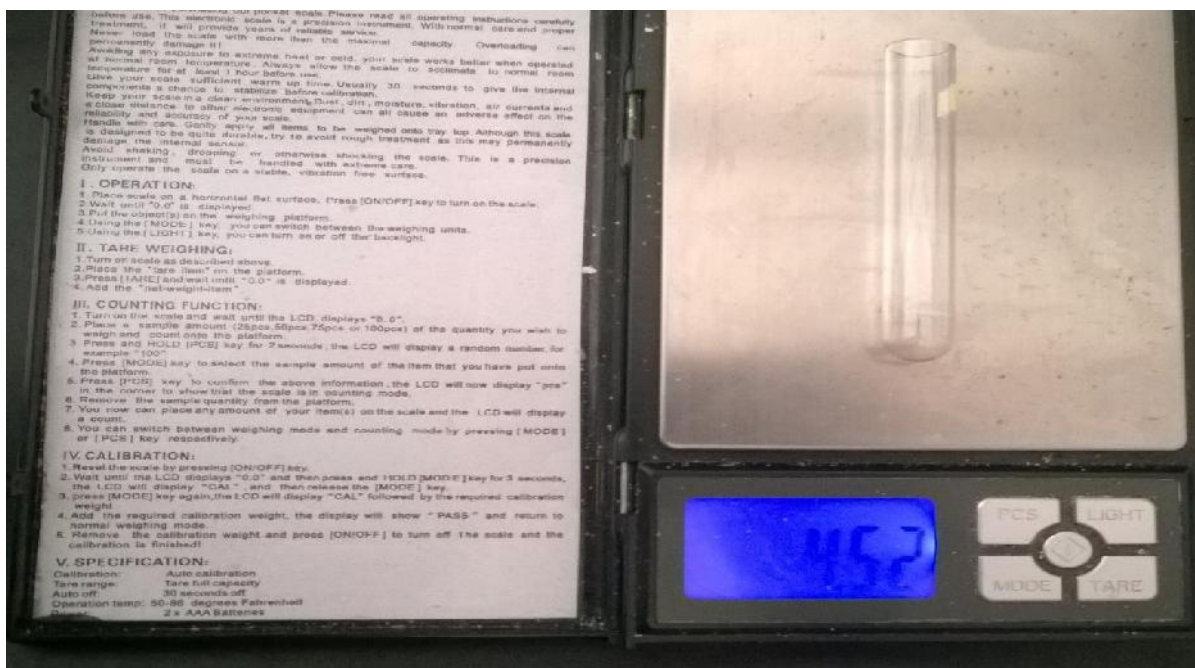


Figura 22. Pesado del tubo de ensayo conteniendo el PHA.



Figura 23. Polihidroxialcanoato adherido en la pared del tubo de ensayo.

d. Cálculo del rendimiento de PHA

El $Y (p/x)$ es el coeficiente de rendimiento del producto en relación a la biomasa o cantidad del producto obtenido por cantidad de biomasa formada ($g\ g^{-1}$) y se calculó dividiendo los gramos de PHA entre los gramos de biomasa (Dorán, 1998):

$$Y \left(\frac{p}{x} \right) = \frac{P - P_o}{X - X_o} = \frac{P}{X}$$

3.2.10 Identificación fenotípica de bacterias

La identificación del género de los tres cultivos de bacterias con el mayor rendimiento de PHA se realizó en función de las características morfológicas y fisiológicas, según el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa (Holt *et al.*, 1994).

3.2.11 Análisis de los datos

Los valores obtenidos en la concentración de biomasa y PHA y rendimiento de las bacterias se ordenaron en tablas y figuras que permitieron analizar la cinética de la producción, durante un determinado tiempo. Se utilizaron los programas Microsoft Office Word y Microsoft Office Excel 2010.

IV. RESULTADOS

4.1 Bacterias aisladas de bagazo de caña de azúcar

En todas las muestras de bagazo de caña de azúcar se aislaron bacterias, en agar nutritivo (68) y en agar Mc Conkey (70), obteniéndose 138 cultivos puros, entre los que 57,25%(79) fueron Gram negativas y 42,75%(59) fueron Gram positivas (Figuras 24, 25). Entre los cultivos de bacterias Gram negativas el 25%(17) se aisló en agar nutritivo y el 88,57%(62) en agar Mc Conkey. Entre los cultivos de bacterias Gram positivas el 75%(51) se aisló en agar nutritivo y el 11,43%(8) en agar Mc Conkey

4.2 Bacterias productoras de gránulos de PHA

En el 76,42% (107) de los cultivos bacterianos teñidos con Sudan Negro B se observaron gránulos de PHA (Figuras 26, 27), correspondiendo el 59,81%(64) a bacterias Gram negativas y 40,19%(43) a Gram positivas. En todas las bacterias, los gránulos se observaron negros en el interior de las células vegetativas rosadas. Después de 48 horas de cultivo, en las bacterias Gram negativas se cuantificaron en promedio 91 – 118 células con gránulos de PHA por campo microscópico (Tabla 1) y en las Gram positivas 79 - 113 células con gránulos de PHA por campo microscópico (Tabla 2), seleccionándose los diez cultivos bacterianos que presentaron el mayor número de células con gránulos de PHA en un rango de 79-118 (Tabla 3).

4.3 Bacterias seleccionadas e identificadas fenotípicamente

En las bacterias Gram positivas seleccionadas se identificó (Tabla 4) el género *Bacillus* (BA08P, BA03P,BA06P, BA27P,BA16P) y en las Gram negativas (Tabla 5) se identificaron *Cupriavidus* (BA67N,BA60N), *Pseudomonas* (BA67N, BA44N) y *Azotobacter* (BA61N).

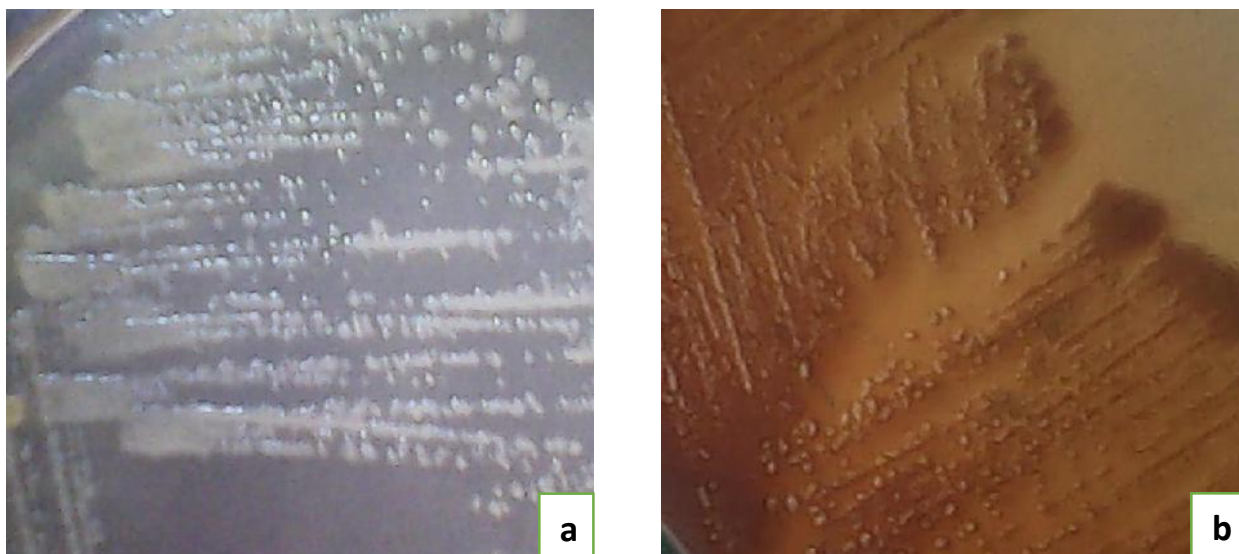


Figura 24. Bacterias desarrolladas en agar nutritivo (a) y Mc Conkey (b).

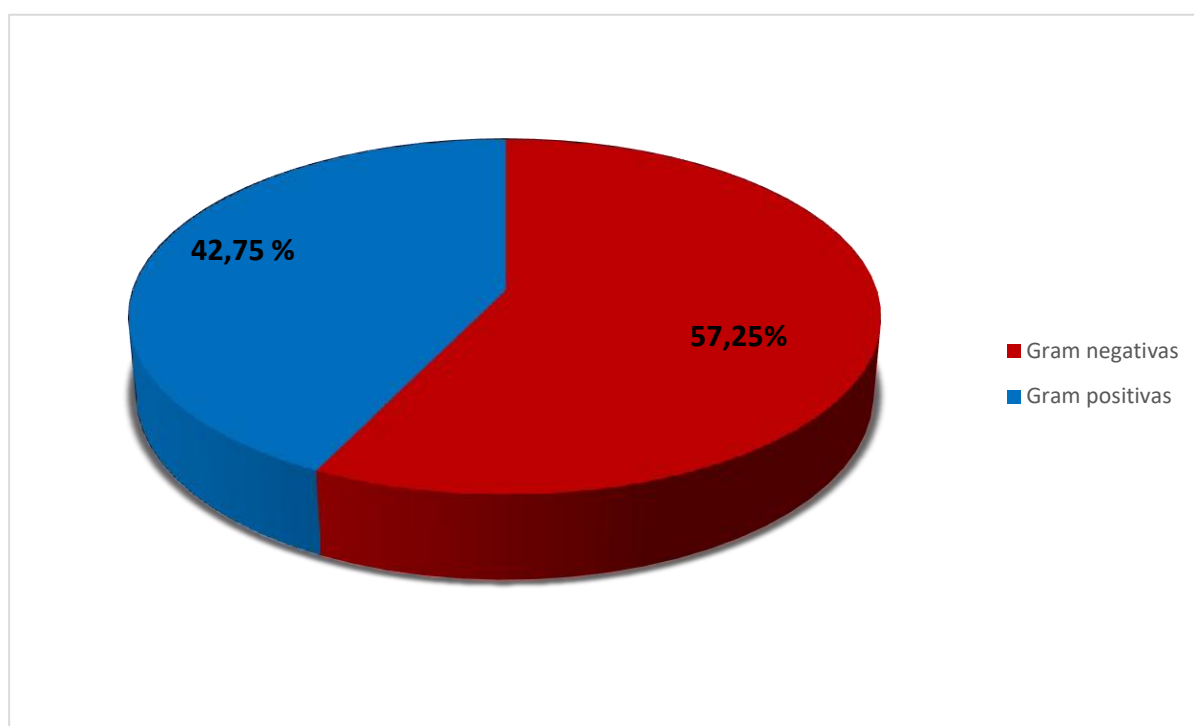


Figura 25. Frecuencia de bacterias positivas y negativas aisladas de bagazo de *Saccharum officinarum* L.



Figura 26. Gránulos de polihidroxiálcanoatos en bacterias teñidas con Sudan Negro B.

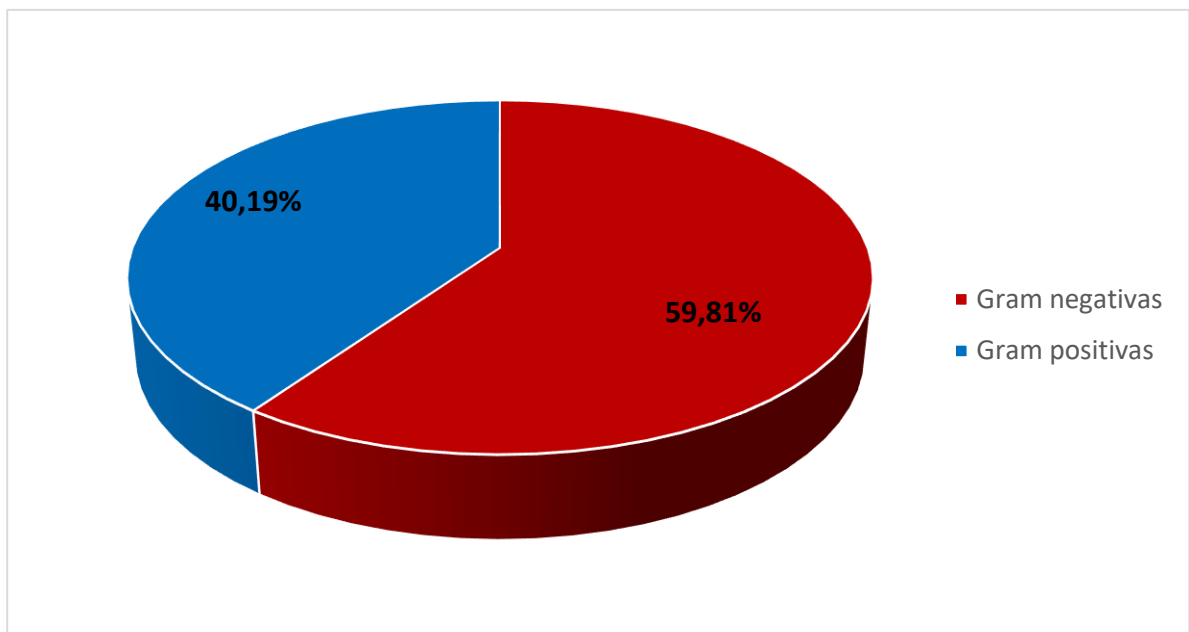


Figura 27. Frecuencia de bacterias Gram positivas y negativas productoras de gránulos de polihidroxiálcanoatos.

Tabla 1. Número de células con gránulos de PHA en bacterias Gram negativas cultivadas en caldo sales minerales por 48 horas

Bacteria código	Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico					
	r1	r2	r3	r4	r5	\bar{x}
BA67N	109	112	118	131	120	118
BA61N	112	121	114	116	122	117
BA14N	101	109	120	110	115	111
BA66N	95	96	85	88	101	93
BA44N	89	93	88	91	95	91
BA27N	79	88	86	84	83	84
BA31N	78	76	81	71	79	77
BA25N	72	81	80	75	77	77
BA19N	56	51	55	58	60	56
BA29N	52	48	55	57	58	54
BA20N	55	46	50	51	48	50
BA01N	48	47	46	38	46	45
BA06N	42	51	43	40	39	43
BA26N	35	34	38	33	35	35
BA21N	31	38	34	29	33	33
BA24N	29	31	35	28	27	30
BA18N	26	31	34	27	32	30
BA17N	31	28	30	29	32	30
BA09N	29	22	31	25	28	27
BA12N	31	29	27	19	24	26
BA13N	22	25	28	23	22	24
BA03N	19	21	24	25	26	23
BA08N	22	21	24	20	23	22
BA07N	20	16	25	25	19	21
BA28N	22	17	18	21	22	20
BA16N	19	16	20	23	22	20
BA06N	14	22	25	13	21	19
BA23N	16	15	21	19	24	19
BA05N	15	12	18	20	15	16
BA15N	16	20	13	16	15	16
BA11N	12	15	14	13	11	13
BA04N	12	14	15	11	13	13
BA02N	10	13	12	11	9	11
BA22N	10	8	9	12	11	10

Bacteria	Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico					
código	r1	r2	r3	r4	r5	\bar{x}
BA62N	86	74	77	80	83	80
BA63N	80	86	73	79	82	80
BA65N	88	78	81	74	79	80
BA51N	76	80	81	76	82	79
BA72N	80	83	77	74	76	78
BA50N	78	75	68	65	79	73
BA38N	53	60	54	56	57	56
BA36N	43	44	38	41	39	41
BA49N	42	33	31	46	28	36
BA48N	31	28	30	29	32	30
BA46N	27	30	33	28	27	29
BA42N	33	27	29	31	25	29
BA45N	27	20	19	34	25	25
BA39N	21	24	19	23	18	21
BA41N	13	10	15	11	16	13
BA69N	7	11	12	15	10	11
BA55N	11	9	8	10	7	9
BA80N	8	6	7	10	14	9
BA58N	8	9	11	7	5	8
BA43N	14	11	7	5	3	8
BA47N	5	8	7	9	6	7
BA57N	5	6	4	8	7	6
BA37N	6	7	4	5	8	6
BA35N	3	5	7	4	6	5
BA79N	4	5	3	7	6	5
BA35N	3	5	7	4	6	5
BA76N	3	4	5	3	5	4

Tabla 2. Número de células con gránulo de PHA en bacterias Gram positivas cultivadas en caldo Fermentación por 48 horas

Bacteria		Número de células con gránulos de PHA/campo microscópico				
Código	r1	r2	r3	r4	r5	\bar{x}
BA08P	111	121	115	102	116	113
BA03P	112	110	109	117	102	110
BA06P	83	75	88	75	79	80
BA27P	74	77	83	82	79	79
BA16P	80	77	75	81	82	79
BA55P	68	75	77	73	69	72
BA54P	66	72	73	77	68	71
BA53P	52	58	62	66	72	62
BA41P	56	63	64	66	56	61
BA48P	58	61	66	62	58	61
BA32P	54	62	58	61	55	58
BA36P	50	56	55	61	62	57
BA07P	53	60	54	56	57	56
BA51P	52	54	52	56	62	55
BA26P	45	55	58	57	58	55
BA50P	51	53	55	49	52	52
BA38P	38	44	45	43	39	42
BA05P	41	44	40	37	38	40
BA29P	32	33	43	44	48	40
BA02P	45	43	38	39	30	39
BA12P	37	38	30	41	44	38
BA09P	42	33	31	46	28	36
BA01P	26	31	27	32	34	30
BA10P	33	27	22	29	39	30
BA45P	27	26	29	31	37	30
BA42P	34	35	30	26	25	30
BA11P	27	30	33	28	27	29
BA39P	24	27	27	25	27	26
BA04P	26	31	28	23	22	26
BA59P	22	27	30	31	20	26
BA21P	13	9	8	14	11	11
BA15P	8	9	15	11	7	10
BA31P	7	11	9	12	11	10
BA18P	8	6	7	15	14	10
BA57P	5	7	9	14	10	9
BA17P	10	11	8	6	5	8
BA22P	2	4	9	7	8	6
BA23P	6	7	4	5	8	6
BA24P	2	3	5	7	8	5
BA25P	4	6	5	3	7	5
BA46P	4	4	6	5	6	5
BA28P	4	3	2	4	7	4
BA30P	5	7	3	2	3	4
BA34P	2	3	2	4	2	3
BA35P	2	2	2	3	3	2

Tabla 3. Cultivos de bacterias seleccionadas con el mayor número de gránulos de PHA

Bacterias código	Tinción de Gram	N° de células con gránulos
BA67N	Negativa	118
BA61N	Negativa	117
BA08P	Positiva	113
BA14N	Negativa	111
BA03P	Positiva	110
BA66N	Negativa	93
BA44N	Negativa	91
BA06P	Positiva	80
BA27P	Positiva	79
BA16P	Positiva	79

Tabla 4. Características diferenciales del género *Bacillus*

Características	<i>Bacillus</i> sp.
Células	Bacilos rectos
Coloración de Gram	+
Motilidad	+
Oxidasa	-
Catalasa	+
Utilización de citrato	+
Acidez en glucosa	+
Acidez en manitol	+
Acidez en xilosa	-
Acidez en arabinosa	-
Hidrolisis de almidón	+
Hidrolisis de lecitina	-

Tabla 5. Características diferenciales de los géneros *Cupriavidus*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*

Características	<i>Cupriavidus sp.</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Azotobacter sp.</i>
Células	Bacilos	Bacilos	Bacilos
Tinción de Gram	—	—	—
Motilidad	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Catalasa	+	+	+
Descarboxilación arginina	—	+	—
Reducción nitratos	—	+	+
Acidificación:			
➤ Glucosa	—	+	+
➤ Maltosa	—	—	+
➤ Sacarosa	—	+	+
➤ Manitol	—	+	+

En el cultivo de las bacterias seleccionadas, se determinó un tiempo óptimo de incubación de 24 horas (Tabla 6), en el cual se diferenciaron claramente las células con gránulos de PHA y después del cual el número de estas células disminuyó. El número de células con gránulos de PHA fue de 72- 114 (24 horas), 67- 110 (36 horas), 47- 100 (48 horas) y 32- 82 (60 horas).

4.4 Rendimiento de PHA

Con los valores de absorbancia (Tabla 7) obtenidos con diferentes concentraciones de biomasa de las bacterias cultivadas en los medios: Caldo Fermentación (Gram positivas) y caldo Mínimo de Sales (Gram negativas) se obtuvo la ecuación $Y=0,5001x + 0,0585$ (Figura 28) y debido a que el valor R^2 fue mayor de 0,9 se aceptó como patrón de referencia para el cálculo de la concentración de biomasa (Mantilla, 2007).

En el proceso fermentativo, la absorbancia de la biomasa bacteriana osciló entre 0,150 con *Bacillus* sp. BA16P y 0,901 con *Cupriavidus* sp.BA67N a las 36 horas (Tabla 8), valores correspondientes a 0,183 y 1,721 gL⁻¹ de biomasa (Tabla 9), respectivamente. Con la biomasa tratada se recuperó el polímero PHA (Figura 29), cuya naturaleza fue verificada, obteniendo un pico máximo de absorbancia a 235 nm. La concentración de PHA fue de 0,160 gL⁻¹ con *Bacillus* sp.BA16P y 0,380 gL⁻¹ con *Bacillus* sp. BA27P (Tabla 10). El rendimiento $Y_{p/x}$ fue de 0,087 gg⁻¹ *Bacillus* sp. BA16P y 0,789 gg⁻¹ con *Bacillus* sp.BA27P, valores correspondientes a 8,74 y 78,97%, de acumulación de PHA respectivamente (Tabla 10).

Tabla 6. Número de células bacterianas con gránulos de PHA en diferentes tiempos de incubación

Bacterias código	Tiempo (horas)			
	24	36	48	60
<i>Cupriavidus</i> sp. BA67N	114	110	100	82
<i>Azotobacter</i> sp. BA61N	111	100	88	77
<i>Bacillus</i> sp. BA08P	110	102	75	63
<i>Pseudomonas</i> sp. BA14N	108	105	83	76
<i>Bacillus</i> sp. BA03P	103	100	95	77
<i>Cupriavidus</i> sp. BA66N	90	82	75	68
<i>Pseudomonas</i> sp. BA44N	89	79	70	53
<i>Bacillus</i> sp. BA06P	80	72	66	52
<i>Bacillus</i> sp. BA27P	75	70	52	41
<i>Bacillus</i> sp. BA16P	72	67	47	32

Tabla 7. Valores de absorbancia (600nm) de biomasa de bacterias productoras de PHA.

Biomasa (gL⁻¹)	Absorbancia (600nm)
1,985	1,052
0,1985	0,150
0,01985	0,076
0,001985	0,059

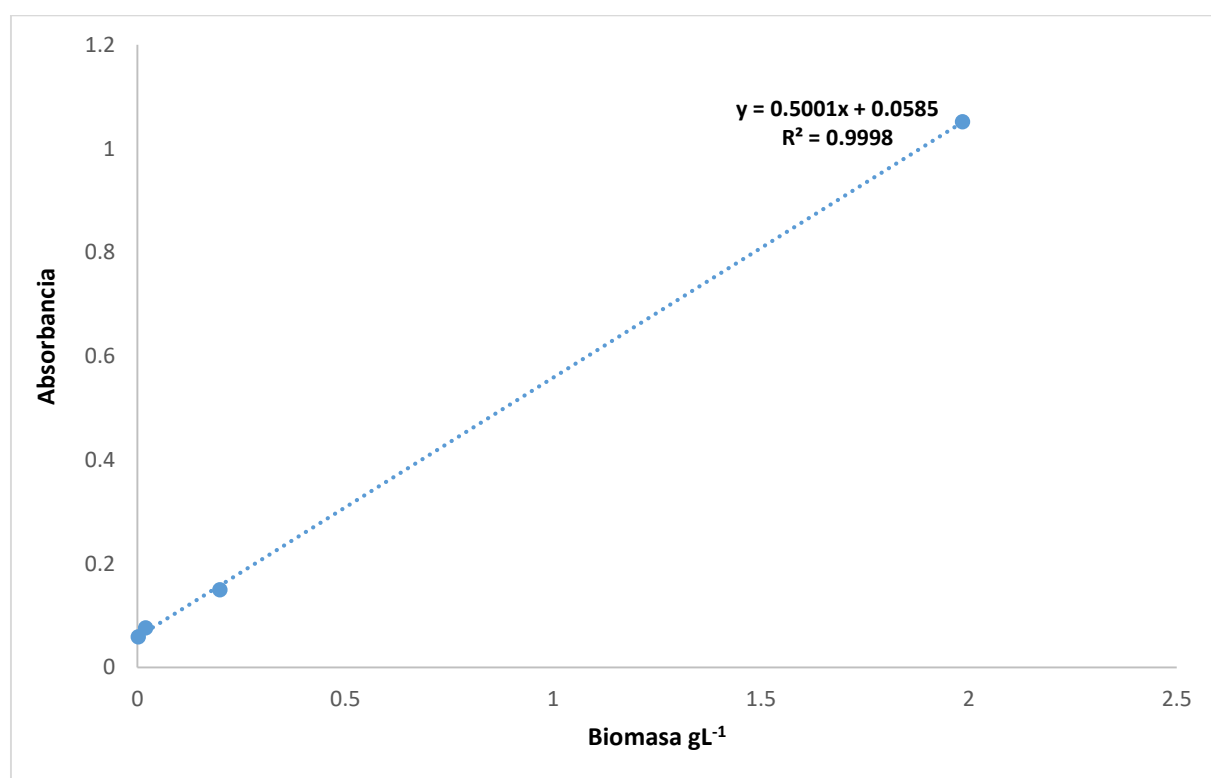


Figura 28. Curva patrón para determinar la concentración de biomasa de bacterias productoras de PHA.

Tabla 8. Absorbancia (600nm) de biomasa de bacterias productoras de PHA

Bacteria código	Absorbancia 600nm(horas)		
	24	36	48
<i>Cupriavidus</i> sp. BA67N	0,883	0,901	0,889
<i>Azotobacter</i> sp. BA61N	0,873	0,882	0,878
<i>Pseudomonas</i> sp. BA14N	0,711	0,812	0,807
<i>Cupriavidus</i> sp. BA66N	0,542	0,612	0,610
<i>Bacillus</i> sp. BA27P	0,237	0,253	0,221
<i>Pseudomonas</i> sp. BA44N	0,189	0,250	0,247
<i>Bacillus</i> sp. BA03P	0,148	0,168	0,162
<i>Bacillus</i> sp. BA06P	0,144	0,164	0,163
<i>Bacillus</i> sp. BA08P	0,150	0,154	0,152
<i>Bacillus</i> sp. BA16P	0,142	0,150	0,149

Tabla 9. Concentración (gL⁻¹) de biomasa de bacterias productoras de PHA

Bacteria código	Biomasa(gL⁻¹) /horas		
	24	36	48
<i>Cupriavidus</i> sp. BA67N	1,509	1,721	1,105
<i>Azotobacter</i> sp. BA61N	1,629	1,647	1,634
<i>Pseudomonas</i> sp. BA14N	1,305	1,507	1,497
<i>Cupriavidus</i> sp. BA66N	0,967	1,107	1,103
<i>Bacillus</i> sp. BA27P	0,358	0,390	0,325
<i>Pseudomonas</i> sp. BA44N	0,261	0,383	0,377
<i>Bacillus</i> sp. BA03P	0,179	0,219	0,207
<i>Bacillus</i> sp. BA06P	0,171	0,211	0,209
<i>Bacillus</i> sp. BA08P	0,183	0,191	0,187
<i>Bacillus</i> sp. BA16P	0,163	0,183	0,181



Figura 29. Polihidroxicanoato, PHA, producido por bacterias aisladas de bagazo de *Saccharum officinarum* L.

Tabla 10. Rendimiento Y (p/x) de polihidroxicanoatos por bacterias aisladas del bagazo de *Saccharum officinarum* L.

Código bacteria	Biomasa (g L ⁻¹)	PHA (g L ⁻¹)	Rendimiento Y(p/x)	
			(g g ⁻¹)	(%)
<i>Bacillus</i> sp. BA27P	0,390	0,308	0,789	78,97
<i>Bacillus</i> sp. BA03P	0,219	0,125	0,570	57,07
<i>Bacillus</i> sp. BA06P	0,211	0,110	0,521	52,13
<i>Cupriavidus</i> sp. BA66N	1,107	0,170	0,443	44,39
<i>Pseudomonas</i> sp. BA44N	0,383	0,170	0,154	15,40
<i>Cupriavidus</i> sp. BA67N	1,721	0,205	0,119	11,91
<i>Pseudomonas</i> sp. BA14N	1,507	0,175	0,116	11,61
<i>Azotobacter</i> sp. BA61N	1,647	0,180	0,109	10,93
<i>Bacillus</i> sp. BA08P	1,910	0,185	0,096	9,68
<i>Bacillus</i> sp. BA16P	1,830	0,160	0,087	8,74

V. DISCUSIÓN

La bioprospección es definida como la búsqueda sistemática de componentes naturales y orgánicos completos de la biodiversidad, con el fin de otorgarles un valor comercial (Mora, 2010). Según el Instituto de Recursos Naturales (World Resource Institute, WRI) “la bioprospección” es la exploración de fuentes bioquímicas y genéticas con valor comercial (Gairola & Biswas, 2008). En este contexto, se aislaron bacterias Gram positivas y negativas en el bagazo de caña de azúcar, para investigar la producción de polihidroxialcanoatos, PHA, coincidiendo con Cardona et al. (2013).

Las bacterias se aislaron en agar nutritivo y Mac Conkey, coincidiendo con Flores & Benites (2015). El agar nutritivo es un medio de cultivo para el aislamiento de microorganismos poco exigentes, en lo que se refiere a requerimiento nutricionales y no contiene inhibidores del crecimiento microbiano (Llanos, 2012). El agar Mac Conkey es un medio selectivo y diferencial que permite aislar y diferenciar bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Estas últimas fueron seleccionadas para investigarlas porque agrupan especies reportadas como productoras de PHA como *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Ralstonia*, *Alcaligenes* (Arroyave et al., 2013) *Cupriavidus* y *Burkholderia* (González et al., 2013).

Las bacterias productoras de PHA se agrupan según las condiciones para la síntesis del polímero. El primer grupo requiere la limitación de un nutriente esencial (N, P, S, Mg, O₂) para sintetizar PHA a partir de un exceso de carbono en la fase estacionaria de crecimiento (Lisboa & Segura 2010). En el segundo grupo, las bacterias acumulan PHA durante la fase de crecimiento, sin necesidad de que agote un nutriente esencial. Estas bacterias acumulan grandes cantidades del polímero durante la fase exponencial de crecimiento (>50%), a diferencia del primer grupo que acumula mínima concentración del polímero durante esta fase (González et al., 2013). En este contexto, las bacterias investigadas se cultivaron en medios con exceso de

carbono y deficiencia de nitrógeno previamente utilizados por Becerra (2013) y Arroyave *et al.* (2013) para bacterias Gram positivas y negativas productoras de PHA, respectivamente.

La técnica microscópica: tinción bacteriana con Sudan Negro fue utilizada para la detección de gránulos de PHA, que se observaron grisáceos o negruzcos en las células rosadas de las bacterias productoras, coincidiendo con Cerrone (2011), Arroyave *et al.* (2013), Jara & Tafur (2015). El Sudan Negro colorea los lípidos intracelulares, entre los que se encuentran los gránulos lipídicos de PHA (Gómez, 2013). También existen otros colorantes con mayor afinidad y especificidad como el Azul Nilo A y Rojo Nilo, con los que los gránulos de PHA son reconocidos por una fluorescencia naranja (460nm) y amarillo dorado (450nm) o rosa – rojiza (515-560nm), respectivamente (González *et al.*, 2013); sin embargo, estos colorantes también pueden formar cuerpos fluorescentes con otros compuestos lipídicos afines a los PHA (Sánchez *et al.*, 2012) y la observación requiere microscopio de fluorescencia (Cerrone, 2011).

Para evitar los inconvenientes de la microscopía se recomiendan pruebas moleculares como la amplificación por PCR del gen *phaC*, el cual codifica para la enzima PHA sintetasa. Esta prueba permite seleccionar específicamente los microorganismos productores de PHA, minimizando los posibles falsos positivos de las coloraciones tradicionales, que por su inespecificidad pueden teñir otros lípidos celulares (Sánchez *et al.*, 2012).

En las bacterias Gram positivas y Gram negativas aisladas de bagazo de caña de azúcar se detectaron gránulos de PHA, considerándose productoras de este polímero, coincidiendo con Cardona *et al.* (2013). Estos investigadores no solo detectaron las bacterias productoras de PHA, sino que también las identificaron molecularmente y detectaron el gen *phaC*, determinando dos de los cuatro tipos de operones de biosíntesis de PHA. Los residuos industriales tiene una diversidad de bacterias productoras de PHA (Naheed *et al.*, 2012), por el desbalance que presentan, con alto contenido de carbono y bajo de nitrógeno (residuos de caña de azúcar) o de fósforo como el lactosuero (Cardona *et al.*, 2013).

Los PHA son polímeros producidos por un grupo amplio de bacterias (Matías *et al.*, 2009), reportándose formas Gram positivas y negativas aisladas de alimentos

lácteos, maíz y confitería (Cuesta, 2014), suelo y agua de salinas (Flores & Idrogo, 2015); Gram positivas aisladas de suelos contaminados de residuos del beneficio de *Furcraea bedinghausii* “fique” (Sánchez *et al.*, 2012), suelo (Matías *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2005), efluentes lácteos (Banacore & Martinez, 2014) y Gram negativas aisladas de subproductos del proceso de obtención de aceite de oliva (Cerrone, 2011) lodos activados (Arroyave *et al.*, 2013), suelo rizosférico (Jara & Tafur, 2015) y lactosuero (Cardona *et al.*, 2013).

Los PHA son poliésteres sintetizados y acumulados en forma de gránulos en el citoplasma por una variedad de procariotas, siendo utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes, por lo que constituyen una estrategia desarrollada para incrementar la supervivencia (López, 2010). En este contexto, bacterias productoras de PHA se han aislado de ambientes extremos con elevada salinidad (Luque *et al.*, 2010; Guzmán & Hurtado, 2011; Llontop, 2012), suelo contaminado (Sánchez *et al.*, 2012), residuos industriales (Cerrone, 2011) aunque también se han aislado de suelo rizosférico de maíz (Lisboa & Segura, 2010), arroz y tomate (Baca *et al.*, 2010) y agua de mar (Ríos & Rivera, 2012).

El número máximo de células con gránulos de PHA a las 24 horas de incubación fue de 114 y éste disminuyó conforme transcurrió el tiempo siendo de 82 a las 60 horas, coincidiendo con Jara & Tafur (2015). La disminución de gránulos de PHA es explicada por la degradación intracelular como respuesta endógena de las bacterias para hidrolizar sus reservas de carbono acumuladas en forma de PHA, con la participación de despolimerasas intracelulares de la superficie de los gránulos (Segura *et al.*, 2007). En *P. oleovorans* se demostró que antes que se complete la utilización de la fuente de carbono, la concentración de polimerasa disminuye en 12-20% y la despolimerasa se incrementa en 10–15%. La acción coordinada de la polimerasa, despolimerasa y sintetasa da lugar al ciclo del PHA que actúa como un “ciclo metabólico amortiguador” que canaliza los intermediarios metabólicos hacia la síntesis de PHA o hacia otros destinos, en función de la demanda celular (Fernández, 2012).

Las bacterias investigadas desarrollaron y acumularon gránulos de PHA en glicerol como fuente de carbono, coincidiendo con Banacore & Martinez (2014) y Becerra (2013), aunque también se puede utilizar glucosa (Arroyave *et al.*, 2013),

sucrosa (El-Raheem *et al.*, 2013), miel de caña (Bello *et al.*, 2009), aguas residuales (Cuesta, 2014) y subproductos agroindustriales oleaginosos (Gómez, 2013). El mayor número de células con gránulos se determinó en las células bacterianas cultivadas durante 24 horas; no obstante, también se ha reportado que la mayor concentración de PHA se alcanzó a las 24-48 horas en bacterias aisladas de alimentos del sector confitería y 48 – 72 horas en bacterias aisladas de alimentos lácteos y maíz (Cuesta, 2014).

Entre las bacterias Gram positivas se identificó *Bacillus*, género en el que por primera vez se reconocieron los gránulos de PHA (González *et al.*, 2013). Se han reportado como productores de PHA: *B. megaterium* (Bello *et al.*, 2008, Sánchez *et al.*, 2012), *B. mycoides* (Fernández *et al.*, 2005) y *B. sphaericus* (González *et al.*, 2013). Entre las bacterias Gram negativas se identificó *Cupriavidus*, *Pseudomonas* y *Azotobacter* géneros reconocidos por agrupar especies productoras de PHA como *C. necator* (Lisboa & Segura, 2010), *P. putida* (Castillo, 2008; Fernández, 2012), *P. oleovorans* (Berlanga *et al.*, 2006) *A. chroococcum* (Cerrone, 2011) y *A. vinelandii* (Peña *et al.*, 2014)

La biomasa de las bacterias productoras de PHA se cuantificó por turbidimetría, coincidiendo con Flores & Idrogo (2015) y Jara & Tafur (2015). El valor de la DO₆₀₀ permite monitorear el crecimiento bacteriano, pero hay que tomar en cuenta que en condiciones de producción de PHA, es afectado no solo por el número de células, sino también por la cantidad de polímero acumulado (Fernández, 2012). La concentración máxima de biomasa alcanzada por las bacterias en glicerol como fuente de carbono fue 1,721 gL⁻¹ superando 1,6 gL⁻¹ alcanzado por *Bacillus* sp. cultivado en 5 gL⁻¹ de glicerol (Banacore & Martinez 2014) no obstante, el valor es inferior a 2,825 gL⁻¹ alcanzado por *Burkholderia cepacia* en el mismo sustrato (Revelo, 2005).

En la extracción y recuperación del PHA se utilizó la técnica de hipoclorito de sodio y cloroformo para digerir la membrana celular y solubilizar el PHA intracelular, respectivamente (Baca *et al.*, 2010). El hipoclorito de sodio disuelve los componentes celulares, excepto los gránulos de PHA (Salmiati *et al.*, 2009) y el solvente orgánico cloroformo solubiliza el polímero (Naranjo, 2010; Cerrone, 2011). El método de extracción y purificación del PHA sintetizado y almacenado intracelularmente es fundamental en la efectividad y costo de cualquier proceso de obtención de

bioplásticos. Se requiere eliminar de forma selectiva la masa celular que no es PHA, encontrándose dificultad porque ambas materias son sólidas y están íntimamente ligadas (Cerrone, 2011).

La naturaleza del polímero recuperado fue verificada con la técnica espectrofotométrica, basada con la determinación de la absorbancia (230nm) del ácido crotónico, producto de la conversión del PHA por acción del ácido sulfúrico concentrado y la aplicación del calor (González et al., 2013) aunque también se puede verificar por cromatografía de fases, CG (Fernández et al., 2005) y cromatografía de gases con detector selectivo de masas, operado en el modo de monitoreo de ion selectivo GC- MS/SIM (Gómez, 2013).

La concentración máxima de PHA alcanzada por *Bacillus* sp.BA27P en glicerol como fuente de carbono fue de 0,308 gL⁻¹, superando 0,095 y 0,096 gL⁻¹ reportadas por Sánchez *et al.* (2012) y Cuesta (2014), respectivamente, para bacterias cultivadas en glucosa como fuente de carbono. Según Fernández et al. (2005) bacterias con más de 0,3 gL⁻¹ de PHA se consideran con potencial industrial para la producción de PHA, teniendo en cuenta que las bacterias no han sido modificadas y el medio de cultivo aún no ha sido optimizado. El Y p/x máximo o gramos de PHA por gramos de biomasa fue 0,79 gg⁻¹ valor superior a 0,751 gg⁻¹ alcanzado por *B. cenocepacia* en Ecodiesel como fuente de carbono (Becerra, 2013).

El mayor rendimiento de PHA (0,79 gg⁻¹) no correspondió a *Cupravidus* sp. BA67N que alcanzó la mayor biomasa (1,721 gL⁻¹), coincidiendo con Guzmán & Hurtado (2011), Llontop (2012) y Ríos & Rivera (2012). Al respecto, Gómez (2013) cultivó bacterias en lactosuero, alcanzando valores de biomasa de 0,88 gL⁻¹ con *Lactococcus lactis* a las 24 horas; 0,58 gL⁻¹ con *B. megaterium* a las 48 horas y 0,22 gL⁻¹ con *Bacillus* sp a las 48 horas y en la producción de PHA: 0,2; 0,4 y 0,2 gL⁻¹, con rendimientos Y p/x de 0,23; 0,68 y 0,91 gg⁻¹, respectivamente. Por su parte, Fernández (2012) investigó *P. putida* KT2442 y su mutante en el gen que codifica para la polimerasa phaC1 y determinó que las células normalmente utilizan parte de su materia y energía para la producción de PHA, alcanzando menor masa celular, en comparación con la biomasa del mutante no acumulador del polímero.

Bacillus sp. BA27P alcanzó el mayor porcentaje (79%) de acumulación de PHA superando 58,6 y 62,4% reportados por Vishnuvordham *et al.* (2009) para

B. megaterium cultivado en glucosa y glicerol, respectivamente. Esta especie produce el homopolímero Poli(3-hidroxibutarato)P3(HB)[P(3HB)], un poliéster termoplástico que se acumula cerca a la membrana celular bacteriana, representando hasta el 80% del peso seco de la célula (Gómez, 2013). La ventaja de las especies de *Bacillus* es su rápido crecimiento sobre diferentes sustratos (Perleche & Rentería, 2013); sin embargo, presentan el inconveniente que los mismos desbalances nutricionales (C_{vsN} ; C_{vsP}) asociados a la producción de PHA inducen su esporulación, reduciendo su eficiencia en la síntesis del biopolímero (Wu *et al.*, 2001). El inconveniente puede superarse controlando la concentración de amonio como se demostró en *B. megaterium* que produjo 65% de PHB en peso seco (Sabra & Aboud, 2008).

Bacillus sp. BA27P, es una bacteria considerada con potencial industrial, cuyo rendimiento aumentará con la optimización del medio de cultivo (Fernández *et al.*, 2005), condiciones de cultivo (Gómez, 2013) y recuperación del producto. Para que el proceso sea rentable es necesario que la bacteria acumule por lo menos 60% de masa celular con PHA. El rendimiento y pureza en el proceso de extracción son dependientes del contenido de PHA y cuando mayor es éste, menor es el costo de los insumos requeridos (Dalcanton, 2006) y por lo tanto disminuye el costo de producción de este polímero biodegradable y no contaminante del ambiente.

VI. CONCLUSIONES

- En el bagazo de caña de azúcar se aislaron 138 cultivos de bacterias.
- En el 76,42% de los cultivos bacterianos teñidos con Sudan Negro B se detectaron gránulos de Polihidroxialcanoatos.
- En las bacterias con el mayor número de células con gránulos de PHA se identificaron fenotípicamente *Bacillus* spp. *Cupriavidus* spp., *Pseudomonas* spp. y *Azotobacter* sp.
- El rendimiento de producto en función de la biomasa bacteriana, osciló desde 0,087 hasta 0,788gg⁻¹, de polihidroxialcanoatos por cada gramo de biomasa.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización físico-química del PHA producido por *Bacillus* sp.BA27P
- Producir PHA con *Bacillus* sp.BA27P cultivado en biorreactores con sistemas discontinuo y semicontinuo.
- Identificar a nivel molecular *Bacillus* sp.BA27P.

VIII. RESUMEN

Los polihidroxicanoatos, PHA son polímeros termoplásticos, biodegradables, no contaminantes y sintetizados por bacterias en diferentes ambientes. Se aislaron bacterias del bagazo de *Saccharum officinarum* L., con el objetivo de determinar su rendimiento de PHA. Las bacterias aisladas se cultivaron con caldo Fermentación con glicerol (Gram positivas) y caldo Mínimo de Sales con glucosa (Gram negativas) a 30° C, durante 48 horas para detectar gránulos de PHA en las células bacterianas coloreadas con Sudan Negro B. Los diez cultivos de bacterias con el mayor número de células con gránulos de PHA se seleccionaron para determinar el rendimiento. En el 74, 42 % de los cultivos bacterianos se detectaron gránulos de PHA, seleccionándose *Bacillus* spp. BA27P, BA03P, BA06P, BA08P, BA16P; *Cupriavidus* spp.BA66N, BA67N; *Pseudomonas* spp.BA44N, BA14N y *Azotobacter* sp.BA61N. El rendimiento Y p/x fue de 0,087-0,788 gg⁻¹, correspondiendo el mayor valor a *Bacillus* sp.BA27P. Se demostró que esta bacteria tiene potencial para la producción de PHA.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, P. & Valderrama, M, (2014). *Caracterización de los géneros Burkholderia y Pseudomonas solubilizadoras de fosfato aisladas de Zea mays L. en el distrito de Reque en Lambayeque*, Marzo-mayo, 2014. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Alvitres, V. (2000). Método Científico *Planificación de la Investigación*. (2da ed). Lambayeque, Perú: Editorial Ciencia.
- Arroyave, A., Cardona, M & Agudelo, L. (2013). *Identificación de cepas nativas con potencial para obtención de polihidroxicanoatos–(PHAs) en lodos activados. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2, 69-76.
- Baca, K., Sánchez, M., Carreño, C. & Mendoza, G. (2010). Polihidroxicanoatos de cepas de *Azospirillum spp.* aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. "tomate" y *Oryza sativa* L. "arroz" en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 1, 213-224.
- Banacore, A. & Martinez, G. (2014). *Estudio de la producción de polihidroxicanoatos (PHA) por Bacillus sp. utilizando glicerol como fuente de carbono*. (Tesis de Licenciatura).Universidad de la República, Uruguay.
- Becerra, M. (2013). *Producción de un polímero tipo polihidroxicanoato (PHA) empleando residuos de la producción de biodiesel* (Tesis de Maestría) Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

- Bello, D., Zinn, M., Brandl, H. & Otero, M. (2008). Aislamiento y caracterización de Poli-B-hidroxibutirato obtenido por vía fermentativa a partir de *Bacillus megaterium*. *ICIDCA. Sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, XLII (1-3), 101-105.
- Bello, D., Otero, M., Ortega, G. & Carrera, E. (2009). Estado del arte en la producción microbiológica de Polihidroxialcanoatos. *ICIDCA. Sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, XLIII (2), 3-13.
- Berlanga, M., Montero, M., Hernández, J. & Guerrero, R. (2006). Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *International Microbiology*, 9, 95-102.
- Cardona, A., Mora, A. & Marín, M. (2013). Identificación molecular de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos en subproductos de lácteos y caña de azúcar. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 66 (2), 7129-7140.
- Castillo, D (2008). *Efecto del gen fadH1 en la producción de PHA conteniendo monómeros insaturados por Pseudomonas putida*. (Tesis de Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, SP, Brasil.
- Cerrone, F. (2011). *Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alpeorujos por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno*. (Tesis de Doctorado) Universidad de Granada, España.
- Cholula, L. 2005. *Estudio de la producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) en Azospirillum brasilense Sp7*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, México.
- Collazos, L. & Ortiz, R. (2014). *Hongos filamentosos nativos en la hidrólisis del bagazo de Saccharum officinarum L., caña de azúcar, para la producción de etanol celulósico en Lambayeque, 2012*. (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

- Cuesta, F. (2014). *Evaluación de los niveles de remoción en demanda química y bioquímica de oxígeno y sólidos suspendidos totales de efluentes industriales con bacterias productoras de polihidroxialcanoatos y exopolisacáridos a escala de laboratorio en empresas del sector de alimentos de la ciudad de Manizales*. (Tesis de Maestría) Universidad de Manizales, Colombia.
- Dalcanton, F. (2006). *Produção, extração e caracterização de Poli (3-hidroxibutirato) por Ralstonia eutropha em diferentes substratos*. (Tesis de Maestría). Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil.
- Díaz, R. (2008). Caracterización energética del bagazo de caña de azúcar del ingenio Valdez, Ecuador. Curso Internacional Producción y aprovechamiento energético de biomasa. Riobamba Ecuador.
- Dorán, P. (1988). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. España: Editorial Acribia, S.A.
- El- Raheem, A., El-Shanshoury, Kenawy, E., Amara, A., Salama, A. & Kishk, S. (2013). Optimization of Polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Azotobacter vinelandii* using experimental design. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(11), 227-241.
- Fernández, P., Ortiz, F. & Edmundo, J. (2005). Caracterización de poli (hidroxibutarato-co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides* FLB2. *Revista Centro de Estudios en Salud*, 1(6), 5-12.
- Fernández, I. (2012). *Estudio del metabolismo de polihidroxialcanoatos con Pseudomonas putida: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de plásticos funcionalizados*. (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Flores, A. & Idrogo, E. (2015). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos, PHA, de bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambayeque, 2014*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.

- Flores, S. & Benites, J. (2015). *Efecto del estiércol de cuy, porcino y vacuno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos de diésel en terrarios* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Gairola, Y. & Biswas, S. (2008). *Bioprospecting in Garhwal Himalayas, Uttarakhand. Current Sciencie*, 94 (9),1139-1143.
- Gómez, J. (2013). *Producción y caracterización de polihidroxicanoatos, sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos*. (Tesis de Maestría) Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- González, Y., Meza. J., González, O. & Córdova, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista International de Contaminación Ambiental*, 29 (1) 77-115.
- Guzmán, C. & Hurtado, A. (2011). *Rendimiento de polihidroxicanoatos de bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de Solanum tuberosum*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Hernández, M. & Guzmán, B. (2009). Biopolymers used in the manufacture of food packaging. *Revista Publicaciones e Investigación*, 3(1), 103- 122.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. (2013). *Metodología de la Investigación*. (2da ed.). México: Mc Grand Hill Interamericana, Editores S.A.
- Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. & Williams, S. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. (9th ed.). Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins.
- Jara, I. & Tafur, J. (2015). *Rendimiento de polihidroxicanoatos de Azotobacter spp. aisladas de suelo rizosférico de Zea mays L. en Lambayeque, agosto-octubre, 2014*.(Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Khanma S. & Srivastaba A. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxycanoates. *Process Biochemistry*, 40, 607-619.

- Lisboa, C. & Segura, S. (2010). *Rendimiento de polihidroxicanoatos de cepas de Cupriavidus necator aisladas de rizósfera de Zea mays L. "maíz", en Reque, Lambayeque, 2010.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Llanos, C. (2012). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas en el distrito de Pimentel, departamento de Lambayeque, 2011.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Llontop, M. (2012). *Rendimiento de polihidroxicanoatos de bacterias halófilas extremas aisladas de salinas en Lambayeque, 2012.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- López, A. (2010). Bioprospección de bacterias marinas productoras de polihidroxicanoatos en tapetes microbianos contaminados. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, México.
- Luque, R., Quesada, E., Béjar, V. & Llamas, I. (2010). *Aislamiento de cepas del género Halomonas con interés biotecnológico en Rambla Salada (Murcia).* *Ars Pharmaceutica*, 51(3), 453-462.
- Matías, F., Bonatto, D., Padilla, G., de Andrade, M. & Pegas, J. (2009). Polyhydroxyalkanoates production by actinobacteria isolated from soil. *Canadian Journal Microbiology*, 55, 790-800.
- Mesa, L., Gónzales, E., Castro, E., Ruiz, E., Romero J. & Cara, C. (2009). Evaluación de componentes accesorios en la hidrólisis energética del bagazo de caña de azúcar pretratado para la producción de etanol. *Revista Cubana de Química*, 21(2), 80-87.
- Mora, W. (2010). *Contribución a la bioprospección de un polímero proveniente de la biodiversidad Colombiana y desarrollada por el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia: Caso PHAs en la Plasticultura.* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Municipalidad Distrital de Pucallá, MDP. (2016). Recuperado de: http://www.peru.gob.pe/directorio/pep_directorio_detalle_institucion.asp?cod_institucion=11420.

- Municipalidad Distrital de Tumbán, (2016). Recuperado de: http://www.peru.gob.pe/directorio/pep_directorio_detalle_institucion.asp?cod_institucion=11421.
- Naheed, N., Jamil, N., Hasnain, S. & Abbas G. (2012). Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in *Enterobacter* spSEL2 and Enterobacteriaceae *Bacterium* sp. PFW1 using sugar cane molasses as media. *African Journal of Biotechnology*, 11(16), 3321-3332.
- Naranjo, J. (2010). *Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Peña, C., López, S., García, A., Espín, G., Romo, A. & Segura, D. (2014). Biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) with a high molecular mass by a mutant strain of *Azotobacter vinelandii* (OPN). *Annals of Microbiology*, 64, 39-47.
- Perleche, C. & Rentería, M. (2013). *Determinación del potencial como promotoras del crecimiento de plantas de las especies de Bacillus aisladas de la rizósfera de malezas asociadas a Zea mays L. "maíz" en Lambayeque, 2013*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Razzaq, A., Jasmil, N., Naheed, N. & Hasnain, S. (2010). Bacteria from contaminated urban and hilly areas as a source of polyhydroxyalkanoates production. *African Journal of Biotechnology*, 9(13), 1919-1925.
- Revelo, D. (2005). *Diseño de iniciadores y validación de una metodología molecular para la selección de bacterias de diferentes géneros acumuladores de polihidroxialcanoatos (PHAs)*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Reyes, J., Perez, R. & Betancourt, J. (2003). Uso de la biomasa cañera como alternativa para el incremento de la eficiencia energética y la reducción de la contaminación ambiental. *Centro de Estudios de Termoenergética*, 30(2), 14-20.

- Ríos, D. & Rivera, M. (2012). *Rendimiento de polihidroxiclcanoatos (PHAs) producidos por bacterias halófilas aisladas de agua de mar en los distritos de Pimentel y Santa Rosa en Lambayeque, 2011*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú.
- Sabra, W. & Aboud, Z. (2008). *Improving feeding strategies for maximizing polyhydroxybutyrate yield by Bacillus megaterium*. *Research Journal of Microbiology*, 3 (5), 308- 318.
- Salmiati, Z., Salim, R. & Olsson, G. (2009). *Recovery of polylhydroxyalkanoates (PHAs) from mixed microbial cultures by simple digestion and saponification*. Malaysia: University Teknologi, Institute of Environmental and Water Resource Management.
- Sánchez, S., Marín, M., Mora, A. & Yepe, M. (2012). Identificación de bacterias productoras de polihidroxiclcanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología*, XIV (2), 89-100.
- Segura, D., Noguez, R. & Espin, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14,361-372.
- Serrano, J. (2010). Polihidroxiclcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Teoría y Praxis Investigativa*, 5 (2), 79-85.
- Vergara, (2006). *Degradación de compositos basados en PHB de acuerdo con la Norma ASTM G 21-90 complementada con estudios respirométricos y morfológicos*. (Tesis de Maestría). Universidad de México, México.
- Vishnuvardhan, S. Thirumala, M. & Mahmood, S. (2009). Production of PHB and P (3HB- co- 3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OV303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 391-397.
- Wu, Q., Huang, H., Hu., G., Chen, J., Ho, K. & Chen, G. (2001). *Production of poly-3-hydroxybutyrate by Bacillus sp. JM.5 cultivated in molasses media*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 80(2) 111-118.

ANEXO 1

Cálculo de número de muestras de bagazo de *Saccharum officinarum* L. para el aislamiento de bacterias productoras de PHA (Alvitres, 2000)

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

Donde:

n = Tamaño de muestra

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

p = Prevalencia de bacterias productoras de PHA en el bagazo de caña de azúcar
(0,90)

q = Ausencia (0,10)

t = Error permitido (8%)

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

$$n = 54,02 \text{ muestras}$$

ANEXO 2

Medios de cultivo (g/L)

a. Agar Nutritivo (Flores & Benites, 2015)

Componentes	g/L
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Cloruro de sodio	8,0
Agar agar	15,0

* pH : 7,3 ± 0,2

b. Agar Mc Conkey (Flores & Benites, 2015)

Componentes	g/L
Peptona de carne	1,5
Peptona de gelatina	17,0
Tripteina	1,5
Lactosa	10,0
Sales biliares	1,5
Cloruro de sodio	5,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar agar	13,5

* pH : 7,1 ± 0,2

c. Caldo Fermentación (Becerra, 2013)

Componentes	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,08g
Na_2HPO_4	1,6g
KH_2PO_4	2g
MgSO_4	0,5g
Solución de microelementos	1mL
Glicerol	5mL

-Solución de microelementos:

Componentes	g/L
FeSO_4	2,0g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,0g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01g
$\text{NiCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1g
H_2BO_4	0,3g
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,03g

d. Caldo Mínimo de Sales (Arroyave et al., 2013)

Componentes	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6,7g
KH_2PO_4	1,5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2g
Citrato de hierro y amonio	0,06g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01g
Glucosa	10,0g
Microelementos	1mL

-Solución de microelementos:

Componentes	g/L
H_3BO_3	0,3g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03g
$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,03g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01g

ANEXO 3

Preparación de Sudán Negro B

(Guzmán & Hurtado, 2011)

- Pesar 0,3 de Sudán Negro B.
- Disolver en 75 mL de etanol al 95%.
- Enrasar a 100 mL con agua destilada.
- Filtrar.