



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON MENCIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

---



**Rendimiento de microorganismos halófilos y halotolerantes  
productores de polihidroxicanoatos en tres concentraciones de  
azúcares de cáscaras de Ipomoea batatas L.**

**TESIS**

**Presentada para optar el Grado Académico de Maestro en  
ciencias con mención en Ingeniería Ambiental**

**AUTOR:**

Bach. Arnaldo Vladimir Mondragón Vera

**ASESORA:**

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

**CO-ASESORA:**

Dra. Ada Patricia Barturén Quispe

**LAMBAYEQUE - PERU**

**2024**



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**ESCUELA DE POSGRADO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**  
**CON MENCIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**



**Rendimiento de microorganismos halófilos y halotolerantes productores de polihidroxialcanoatos en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de Ipomoea batatas L.**

Bach. Arnaldo Vladimir Mondragón Vera  
AUTOR

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán  
ASESORA

Dra. Ada Patricia Barturen Quispe  
CO-ASESORA

Proyecto de Tesis presentado a la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo para optar el Grado Académico de: **MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL**

Aprobado por:

Dra. Graciela Olga Albino Cornejo  
Presidenta del jurado

Dra. Consuelo Rojas Idrogo  
Secretaria del jurado

Dra. Josefa Ecurra Puicón  
Vocal del jurado

Fecha de Sustentación: 21 de noviembre de 2024

### **Dedicatoria**

A mis hijos Cristian y Kristy por su compañía, a mi esposa Adita Hernández por su paciencia.

A mis padres Vitelio y Rosa y a mis hermanos Kike, Charo y Jhon.

### **Agradecimiento**

A Dios todopoderoso, por darnos vida, salud y la oportunidad de culminar satisfactoriamente la investigación.

A la Dra. Carmen Carreño Farfán por acompañarme en todo el proceso de la investigación.

## Índice general

Dedicatoria.....	3
Agradecimiento.....	4
Índice General.....	5
Índice de Tablas.....	7
Índice de Figuras.....	9
Resumen.....	11
Abstract.....	12
I. Introducción.....	13
II. Diseño teórico.....	17
2.1 Antecedentes.....	17
2.2 Bases teóricas.....	20
2.3 Operacionalización de Variables .....	28
2.4 Hipótesis.....	28
III. Diseño metodológico .....	29
3.1 Tipo de investigación.....	29
3.2 Método de investigación.....	29
3.3 Diseño de contrastación.....	29
3.4 Población, muestra y muestreo.....	29
3.5 Técnica, instrumento y procedimiento.....	31
IV. Resultados.....	42
4.1 Características morfológicas de los microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA aislados de suelo en los humedales de San José, Lambayeque 2023.....	42
4.2 Microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA seleccionados con base a la cinética de crecimiento en glucosa, Lambayeque 2024.....	52
4.3 Rendimiento de polihidroxialcanoatos de dos microorganismos halófilo y halotolerante en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de <i>Ipomoea batatas</i> L. “camote”.....	58
4.4 Identificación fenotípica y molecular del género del microorganismo con el mayor rendimiento de PHA en azúcares de cáscaras de <i>I. batatas</i> .....	68
V. Discusión de los resultados.....	69

VI. Conclusiones .....	75
VII. Recomendaciones.....	76
VIII. Referencias .....	77
Anexos.....	86

## Índice de Tablas

Tabla 1. Ubicación georeferencial de tres zonas de muestreo en los Humedales de San José, Lambayeque 2023.....	34
Tabla 2. Conductividad eléctrica y porcentaje de sodio intercambiable en zonas de muestreo de los Humedales de San José, Lambayeque 2023 .....	35
Tabla 3. Caldo de fermentación en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de <i>I. batatas</i> , Lambayeque 2024.....	38
Tabla 4. Frecuencia de microorganismos aislados en agar nutritivo modificado a partir del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.....	43
Tabla 5. Microorganismos aislados en agar nutritivo con 6 % NaCl a partir del suelo de muestreo en Humedales de San José, Lambayeque 2023.....	43
Tabla 6. Microorganismos halófilos y halotolerantes aislados en tres zonas de los Humedales de San José, Lambayeque 2023.....	44
Tabla 7. Número de células con gránulos de polihidroxicanoatos en microorganismos halófilos Gram positivos y Gram negativos cultivados en glucosa como fuente de carbono durante 24-48 horas, Lambayeque 2023.....	50
Tabla 8. Número de células con gránulos de polihidroxicanoatos en microorganismos Gram positivos y Gram negativos halotolerantes cultivados en glucosa como fuente de carbono durante 24-48 horas, Lambayeque 2023.....	51
Tabla 9. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA, Lambayeque 2024.....	54
Tabla 10. Número de gránulos en microorganismos halófilo y halotolerante cultivados en caldo de fermentación en glucosa como fuente de carbono durante 4-44 horas.....	57
Tabla 11. Biomasa celular, producto y coeficiente de rendimiento de polihidroxicanoatos por microorganismos halófilo y halotolerante en glucosa y azúcares de cáscaras de <i>I. batatas</i> , como fuente de carbono.....	59
Tabla 12. Análisis de varianza de los valores del rendimiento de polihidroxicanoatos producidos por microorganismos halófilos y halotolerantes en dos fuentes de carbono y tres concentraciones de azúcares de cáscaras de <i>I. batatas</i> .....	61
Tabla 13. Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de polihidroxicanoatos producido por microorganismos halófilos y halotolerante....	62
Tabla 14. Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de	

polihidroxicarboxilatos producido en dos fuentes de carbono.....	63
Tabla 15. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del rendimiento de polihidroxicarboxilatos producido en tres concentraciones de la fuente de carbono...	64
Tabla 16. Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de polihidroxicarboxilatos producido por microorganismos halófilos y halotolerante en dos fuentes de carbono.....	65
Tabla 17. Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de polihidroxicarboxilatos producido por microorganismos halófilos y halotolerante en tres concentraciones de la fuente de carbono.....	66
Tabla 18. Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de polihidroxicarboxilatos producido en dos fuentes de carbono con tres concentraciones.....	67



## Índice de Figuras

Figura 1. Diseño aleatorio con arreglo factorial para determinar el rendimiento de microorganismos halófilo y halotolerante productores de polihidroxialcanoatos en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de <i>I. batatas</i> .....	30
Figura 2. Ubicación de los Humedales de San José, en el distrito San José, Lambayeque 2023.....	32
Figura 3. Zona de muestreo en dunas de los Humedales de San José, distrito San José, Lambayeque 2023.....	32
Figura 4. Zona de muestreo en gramadal de los Humedales de San José, distrito San José, Lambayeque 2023.....	33
Figura 5. Zona salicornial de muestreo en los Humedales de San José, distrito San José, Lambayeque 2023.....	33
Figura 6. Preparación del caldo con <i>I. batatas</i> , a) cáscaras deshidratadas, b) pulverizado c) cocción, d) caldo de fermentación, Lambayeque 2024.....	38
Figura 7. Biomasa microbiana (a) mezclada con hipoclorito de sodio y cloroformo para la recuperación de polihidroxialcanoato, Lambayeque 2024.....	39
Figura 8. Frecuencia de halófilos y halotolerantes en microorganismos aislados de suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.....	44
Figura 9. Morfología de colonias de microorganismos halófilos aislados de suelo de los Humedales de San José, Lambayeque 2023 .....	45
Figura 10. Frecuencia de formas Gram positivas y Gram negativas en los microorganismos halófilos aislados del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.....	46
Figura 11. Frecuencia de formas Gram positivas y Gram negativas en los microorganismos halotolerantes aislados del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.....	46
Figura 12. Frecuencia de microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA, Lambayeque 2023.....	47
Figura 13. Gránulos de polihidroxialcanoatos teñidos con Sudan Negro B en microorganismos halófilos aislados del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.....	48
Figura 14. Gránulos de polihidroxialcanoatos teñidos en Sudan Negro B en microorganismos halotolerantes aislados del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.....	48
Figura 15. Frecuencia de microorganismos Gram positivos y Gram negativos halófilos acumuladores de gránulos de PHA, Lambayeque 2023.....	49
Figura 16. Frecuencia de microorganismos Gram positivos y Gram negativos	

halotolerantes acumuladores de gránulos de PHA, Lambayeque 2023.....	49
Figura 17. Densidad óptica (600 nm) del caldo HM <sub>2</sub> cultivado con bacterias halófilas acumuladoras de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2024.....	53
Figura 18. Densidad óptica (600 nm) del caldo HM <sub>2</sub> cultivado con bacterias halotolerantes acumuladoras de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2024.....	53
Figura 19. Fase exponencial linealizada de microorganismos halófilos con capacidad para producir y acumular gránulos de PHA, Lambayeque 2024.....	55
Figura 20. Fase exponencial linealizada de microorganismos halotolerantes con capacidad para producir y acumular gránulos de PHA, Lambayeque 2024.....	56
Figura 21. Polihidroxialcanoato producido por microorganismo halófilo en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de <i>I. batatas</i> como fuente de carbono.....	60
Figura 22. Pico máximo de absorbancia a 235 nm del polihidroxialcanoato producido por microorganismo halófilo en azúcares de cáscaras de <i>I. batatas</i> como fuente de carbono.....	60
Figura 23. Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos de microorganismos halófilo y halotolerante.....	62
Figura 24. Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos en glucosa y cáscaras de <i>I. batatas</i> como fuentes de carbono.....	63
Figura 25. Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos en tres concentraciones de azúcares.....	64
Figura 26. Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos en la interacción del factor microorganismos (A) y el factor fuente de carbono (B).....	65
Figura 27. Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos en la interacción del factor microorganismos (A) y el factor concentración de azúcares (C).....	66
Figura 28. Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos en la interacción del factor fuente de carbono (B) y el factor concentración de azúcares (C).....	67

## Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHA) biodegradables y obtenidos en recursos renovables constituyen una alternativa para los plásticos derivados del petróleo. El objetivo de la investigación fue determinar el rendimiento de los microorganismos halófilos y halotolerantes productores de PHA en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de *Ipomoea batatas* L. “camote”. Para ello, se diferenciaron las características morfológicas de los microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA aislados de suelo en los Humedales de San José; se seleccionaron estos microorganismos con base a la cinética crecimiento en glucosa, se comparó el rendimiento de PHA de dos microorganismos halófilo y halotolerante en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de camote y se identificó a nivel fenotípico y molecular el género y especie del microorganismo con el mayor rendimiento de PHA. En 54 muestras de suelo de los humedales de San José se aislaron 205 microorganismos (61 % halófilos y 39 % halotolerantes,) entre los cuales el 15, 12 % demostró ser productor y acumulador de gránulos de PHA. La densidad óptica (600nm) por el crecimiento microbiano con glucosa fue de 0,18- 1,870 con los halófilos y 0,15- 1,778 con los halotolerantes. Se seleccionaron el halófilo 40 y halotolerante 19 por alcanzar los mayores valores en la velocidad específica de crecimiento: 0,3828 y 0,3284/h respectivamente. El rendimiento del PHA del halófilo fue de 2,8883; 3,0060 y 1,9910 g/L en 11,2; 20,11 y 30, 22 g/L de azúcares de cáscaras de camote. El rendimiento de PHA del microorganismo halotolerante fue de 1,6933; 2,1726 y 1,1656 g/L, respectivamente. El microorganismo halófilo con el mayor rendimiento de PHA se identificó como *B. infantis* 40.

Palabras clave: Polihidroxicanoatos; halófilo; halotolerante; cáscaras de camote; *Bacillus infantis*

### Abstract

Biodegradable polyhydroxyalkanoates (PHA) obtained from renewable resources are an alternative to petroleum-derived plastics. The objective of the research was to determine the performance of halophilic and halotolerant PHA-producing microorganisms in three concentrations of sugars from *Ipomoea batatas* L. "sweet potato" peels. For this purpose, the morphological characteristics of halophilic and halotolerant microorganisms, producers and accumulators of PHA granules isolated from soil in the San José Wetlands were differentiated; These microorganisms were selected based on their growth kinetics in glucose, the PHA yield of two halophilic and halotolerant microorganisms was compared in three concentrations of sweet potato peel sugars, and the genus and species of the microorganism with the highest PHA yield were identified at the phenotypic and molecular level. In 54 soil samples from the San Jose wetlands, 205 microorganisms were isolated (61 % halophilic and 39 % halotolerant), among which 15.12 % were shown to be producers and accumulators of PHA granules. The optical density for microbial growth with glucose was 0.18- 1.870 with halophiles and 0.15- 1.778 with halotolerants. Halophil 40 and halotolerant 19 were selected for achieving the highest values in specific growth rate: 0.3828 and 0.3284 h<sup>-1</sup> respectively. The PHA yield of the halophile was 2.8883; 3.0060 and 1.9910 g/L on 11.2; 20.11 and 30, 22 g/L sweet potato peel sugars. The PHA yield of the halotolerant microorganism was 1.6933; 2.1726 and 1.1656 g/L, respectively. The halophilic microorganism with the highest PHA yield was identified as *B. infantis* 40.

Key words: polyhydroxyalkanoates; halophilic; halotolerant; sweet potato peels; *Bacillus infantis*.

## I. INTRODUCCIÓN

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son poliésteres lineales constituidos por monómeros de ácidos hidroxilos (HA) unidos por enlaces éster que se forman por la unión del grupo carboxílico de un monómero con el grupo hidroxilo del siguiente (Mozejko y Kiewisz, 2016). Los PHA son biopolímeros, sintetizados por los microorganismos como inclusiones lipídicas bajo condiciones aerobias y anaerobias y constituyen una fuente de reserva de energía. Los PHA son poliésteres sintetizados y acumulados en forma de gránulos (0,2 -0,5  $\mu\text{m}$  diámetro) o inclusiones insolubles en el citoplasma. En la estructura general de los PHA, el grupo R define el nombre. Por ejemplo si  $n=1$  entonces  $R=\text{CH}_3$  el polímero es poli(-3-hidroxibutirato),  $R=\text{hidrógeno}$  [poli (-3-hidroxipropionato)],  $R=\text{propilo}$  [poli(-3- hidroxihexanoato)],  $R=\text{nonilo}$  [poli(-3-hidroxiclodecanoato)],  $R=\text{etilo}$  [poli(-3- hidroxivalerato)],  $R=\text{pentilo}$  [poli(-3- hidroxioctonato)], si  $n=2$ , entonces  $R=\text{hidrógeno}$  es poli(-3- hidroxibutirato) y si  $n=3$ , entonces  $R=\text{hidrógeno}$  es poli (-5- hidroxivalerato) (Raza et al., 2018).

Las propiedades de los PHA varían según sean homopolímeros o heteropolímeros (Raza et al., 2018). En general los PHA son biodegradables, biocompatibles, no tóxicos, insolubles en agua y solubles en cloroformo. La temperatura de transición al vidrio ( $T_g$ ) varía de  $-50$  a  $4^\circ\text{C}$  y la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de  $40^\circ$  a  $180^\circ\text{C}$ ; no obstante, dependiendo del tipo de PHA, la composición y peso molecular estas propiedades varían de forma significativa (Garcia et al., 2020).

Los PHA tiene aplicaciones en la industria, medicina, acuicultura, como agentes antiincrustantes o inhibidores de la colonización y acumulación de microorganismos en las superficies (Behera et al., 2022). Los PHA presentan biocompatibilidad por lo que se usan en los implantes, como portadores terapéuticos, como matrices para la propagación *in vitro* de células humanas y en reemplazo de huesos en animales. Los PHA tienen aplicación en el campo de la nanotecnología como enlaces con otros polímeros y materiales “andamio” en los tejidos obtenidos por ingeniería genética (Raza et al., 2018). Los PHA también se usa para la reconstrucción de regiones afectadas del corazón y para la obtención de “graphs” vasculares y nervios artificiales (Pandey et al., 2022).

Los PHA constituyen una alternativa de reemplazo a los plásticos derivados del petróleo o petroplásticos que son un material esencial en la vida de los humanos, porque son ligeros, de bajo costo y resistentes a la biodegradación (Sagong et al., 2018); sin

embargo, se acumulan, contaminan el ambiente y para su producción se utilizan recursos no renovables por lo que son considerados un problema significativo a nivel mundial (Patel et al., 2022). La producción global de estos plásticos alcanzó 299 millones de toneladas (Mt) en el 2013 (Mozejko y Kiewisz, 2016) y 359 Mt en el 2018 (Behera et al., 2022). Se ha estimado que el 2035 la cifra de plástico producido se duplicará y el 76-79 % se convertirá en residuos (Ali et al., 2021; Kaushal et al., 2021).

La mayoría de los plásticos de un solo uso termina en los océanos, en los que se han identificado dos zonas de mayor acumulación en el Atlántico y en el Pacífico y una zona en el océano Índico. Se ha estimado que 12,7 Mt de plásticos ingresan cada año al océano. Las especies marinas se atragantan o ingieren los plásticos que causan una falsa “saciedad”, los animales dejan de alimentarse y mueren por inanición. Asimismo, los plásticos acarrearán en su superficie otros contaminantes como los policlorobifenilos, hidrocarburos totales de petróleo y metales pesados que afectan a los seres vivos cuando son ingeridos (Chawla et al., 2022). En Estados Unidos se ha determinado que el 94,4 % de agua de grifo contiene en promedio 4,8 fibras plásticas; en Europa el 72 % del agua tiene 1,9 fibras plásticas y en la India el 92,4 % presenta 4,0 fibras de petroplásticos. Esta contaminación se relaciona con cáncer, impotencia sexual e inflamación respiratoria (Jefferson, 2019).

Los PHA son una alternativa emergente para los petroplásticos, son obtenidos de recursos renovables, con reducción de las emisiones de dióxido de carbono (Behera et al., 2022). Los PHA son sintetizados y acumulados por diversos microorganismos como los halófilos que necesitan iones de sodio para su crecimiento o los halotolerantes que crecen en ausencia o en presencia del sodio (Stanley et al., 2018; DasSarma y Das Sarma, 2017). Los PHA tienen características semejantes a los petroplásticos, pero son biodegradables (Raza et al., 2018); sin embargo, el alto costo es el mayor problema para la producción industrial de estos polímeros. El PHA es 15 veces más caro que los petroplásticos como el polipropileno (Mozejko y Kiewisz, 2016). El rendimiento de los microorganismos y la fuente de carbono están entre los principales factores que afectan la producción de los PHA. El contenido de PHA en la biomasa microbiana es muy importante para que el proceso de extracción del polímero resulte económico. Por ejemplo, se ha demostrado que el costo de 1 kg de polihidroxibutirato (PHB) que es el PHA más estudiado varía entre 2,6; 5,37 y 6,69 dólares dependiendo si el microorganismo productor es *Alcaligenes latus*, *Escherichia coli* y *Methylobacterium organophilum*, respectivamente (Raza et al., 2018).

El cultivo de *Ipomoea batatas* “camote” es conocido desde tiempos ancestrales. Sus raíces contienen almidón, celulosa, pectina, minerales y alto contenido de provitamina A y carotenoides. A nivel industrial se utiliza para la elaboración de hojuelas (chips), producción de jugos, cervezas y colorantes para alimentos (Arguedas et al., 2015). La pulpa así como las cáscaras de camote presentan compuestos fenólicos (324,75 mg/100g), flavonoides (160,17 mg/100g) y antocianinas (17,63 mg/100g) que evidencian que los residuos son fuente potencial de fitoquímicos además de nutrientes (Pereira et al., 2020). Las cáscaras de camote así como otros residuos agroindustriales pueden ser transportados por empresas que manejan los residuos sólidos para la producción de compost (Ipenza, 2021); sin embargo, en la mayoría de los casos no son aprovechados para la obtención de nuevos productos y pueden ser dispuestos de manera inadecuada, con una descomposición no controlada que contamina el ambiente (Vargas y Perez, 2018).

La fuente de carbono, constituye en promedio el 50 % del costo de la producción del PHA, por lo que la elección del sustrato es un factor crucial que afecta el rendimiento del polímero (Raza et al., 2018). Se ha investigado la producción de PHA en sustratos residuales como efluentes de la obtención de aceite de palma (Rizki et al., 2023), glicerol subproducto de la obtención de Biodiésel (Hammami et al., 2022), hidrolizados lignocelulósicos (Kaurilova et al., 2021) y paja de *Triticum* sp. “trigo” (Liu et al., 2021), pero se han reportado diferencias significativas en el contenido de PHA acumulado, que varía entre 8 a 89 % (g/g de biomasa seca), así como también se presenta la desventaja que en algunos residuos se encuentra impurezas y la composición química varía mucho, por lo que se requiere investigar la producción de PHA a escala de laboratorio con microorganismos previamente seleccionados (Raza et al., 2018), como los halófilos y halotolerantes, utilizando los residuos agroindustriales cáscaras de camote para garantizar un polímero de calidad y de bajo costo. Con estos microorganismos se han reportado contenido de PHA de 68 % (Hammami et al., 2022); 73,48 % (Kourilova et al., 2021); 75,52 % (Flores et al., 2018) y 77,52 % (Tau et al., 2021).

El costo del PHA depende en su mayoría de la fuente de carbono para el crecimiento microbiano además del gasto para la recuperación del polímero. Las cáscaras de camote constituyen un residuo de la industria, es biomasa renovable de bajo costo, de fácil disponibilidad en la región y es rico en carbono, requisito para una producción eficiente del polímero. La investigación del rendimiento de PHA en microorganismos halófilos y halotolerantes que puedan utilizar los azúcares de las cáscaras de camote como

fuelle de carbono permitirá disponer del material biológico necesario para la producción del polímero a bajo costo, con la ventaja que se le da un valor agregado al residuo y se disminuye la contaminación del ambiente.

En este contexto, se planteó la siguiente investigación cuyo problema fue: ¿Cuál es el rendimiento de los microorganismos halófilos y halotolerantes productores de polihidroxialcanoatos en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de *Ipomoea batatas* L.? El objetivo general de la investigación fue: Determinar el rendimiento de los microorganismos halófilos y halotolerantes productores de polihidroxialcanoatos, (PHA) en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de *Ipomoea batatas* L. “camote”. Los objetivos específicos fueron: Diferenciar las características morfológicas de los microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA aislados de suelo en los Humedales de San José, Lambayeque 2023; seleccionar los microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA por el crecimiento en glucosa, comparar el rendimiento de PHA de dos microorganismos halófilo y halotolerante en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de *Ipomoea batatas* L. “camote”; identificar a nivel fenotípico y molecular el género y especie del microorganismo con el mayor rendimiento de PHA en azúcares de cáscaras de *I. batatas*.



## II. DISEÑO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes

Rizki et al. (2023) investigaron la producción de poli-(R)-3-hidroxi-butarato por la bacteria halófila moderada *Salinivibrio* sp. en el efluente de la obtención de aceite de palma (POME). Las colonias de las bacterias formadoras de gránulos de PHB se reconocieron por la fluorescencia anaranjada, bajo luz ultravioleta (312 nm) y la bacteria con la mayor intensidad se cultivó en medio HM con 2 % de POME como fuente de carbono, a 37 °C por 24 horas, se recuperó la biomasa y se determinó el rendimiento del polímero. Asimismo, se realizó el cultivo con 1-20 % v/v POME y 1-20 % p/v NaCl, se caracterizó el PHB y se identificó a nivel molecular la bacteria seleccionada. Se obtuvieron tres bacterias formadoras de gránulos de PHB, entre las que se seleccionó *Salinivibrio* sp. Esta bacteria con 15 % POME y 5 % NaCl alcanzó 0,17 g/L de biomasa; 0,07 g/L de PHB y 40 % de rendimiento. En el polímero mediante Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se reconocieron las bandas de absorción de los enlaces carbonilos similares al estándar PHB y el análisis térmico determinó las temperaturas máximas de descomposición (442,4 °C) y degradación (289,9°C). *Salinivibrio* sp. puede transformar el POME en PHB y así disminuye la contaminación por el residuo industrial.

Hammami et al. (2022) determinaron el rendimiento del copolímero poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato (PHBV) por *Halomonas desertis* con glicerol, un subproducto de la obtención del Biodiésel. La bacteria extremófila aislada de sedimento hipersalino se cultivó en medio HM con 1-5 % glicerol, 120 rpm, a 30 °C, se determinó el rendimiento de PHA, se optimizó la producción del polímero mediante el método de superficie de respuesta, se caracterizó el polímero por FTIR y se identificaron los genes relacionados con la síntesis de PHA. La bacteria desarrolló y acumuló gránulos de PHA con glicerol como fuente de carbono. Los valores predictivos fueron de 2,25 g/L biomasa; 1,54 g/L PHA y 68 % de rendimiento con 3 % de inóculo, 5 % de glicerol y 4 días de incubación. En el experimento bajo condiciones óptimas se alcanzaron 2,23 g/L biomasa y 1,51 g/L PHA. La presencia de grupos funcionales determinados por FTIR identificó al copolímero PHBV y el análisis molecular identificó los genes involucrados en el metabolismo del PHBV que incluyeron *phaA*, *phaB*, *phaC*, *phaP*, *phaZ* y *par*. Se evidenció el potencial del *H. desertis* para la conversión del residuo glicerol en PHBV.

Dubey y Mishra (2021) investigaron el potencial de bacterias halófilas para la producción de PHA en glicerol residual de la obtención de Biodiésel a partir de algas. Las bacterias se aislaron en agar con glicerol, suplementado con Rojo Nilo y se seleccionaron las dos bacterias con mayor fluorescencia para optimizar los parámetros concentración de Biodiésel (1,2,3,4 y 5 %), cloruro de sodio (5,10, 15, 20 y 25 %), pH (5,6,7,8,9), temperatura (30,32,35,37 y 40 °C), condición estática y de agitación (120 rpm) y tamaño de inóculo (5, 10, 15 y 20 % v/v). Los caldos cultivados se centrifugaron, se obtuvo la biomasa y en el pellet se recuperó el PHA, el cual fue caracterizado por FTIR y Cromatografía por permeación de gel (GPC). Las concentraciones de Biodiésel 30 y 40 g/L fueron óptimas para la producción de PHA por *Halomonas daqingensis* y *H. ventosae* con 5 % NaCl; pH 7, 35 °C; con agitación y 15 % de inóculo (0,362 g de biomasa y 0,236 g PHA). En la optimización, la máxima productividad se alcanzó con 2,41 % de glicerol; 2,02 % NaCl y pH 6. El polímero mostró similares propiedades térmicas y mecánicas que el estándar PHB (Sigma Aldrich). *H. daqingensis* resultó promisorio para la producción de PHA a bajo costo.

Kourilova et al. (2021) realizaron la comparación del rendimiento del PHA por la bacteria mesófila *Burkholderia sacchari*, termofílica *Schlegelella thermodepolymerans* y halófila *Halomonas halophila* en un medio con residuos lignocelulósicos hidrolizados como fuente de carbono. Las bacterias se cultivaron en medio mineral con cinco residuos lignocelulósicos hidrolizados y con glucosa o xilosa como control a 30 °C (*B. sacchari* y *H. halophila*) y 55 °C (*S. thermodepolymerans*), 180 rpm y después de 72 horas se determinó por gravimetría la biomasa y el PHA. Los mayores rendimientos de PHA correspondieron a *H. halophila* en madera blanda con 6,47 g/L (biomasa); 4,75 g/L (PHB) y 73,48 % de rendimiento; *S. thermodepolymerans* en paja de arroz con 5,24 g/L (biomasa); 3,94 g/L (PHB) y 75,32 % de rendimiento y *B. sacchari* en bagazo de caña de azúcar con 3,02 g/L (biomasa); 1,52 g/L (PHB) y 49,64 % de rendimiento en comparación con 72,35; 72,03 y 53,86 % en los controles respectivamente. *H. halophila* y *S. thermodepolymerans* fueron considerados ideales para la producción sostenible de PHA.

Li et al. (2021) determinaron el rendimiento de PHA en dos cepas de *Vibrio alginolyticus* en una diversidad de azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos que pueden constituir subproductos de la industria. Las bacterias se aislaron de muestras de suelo con salinidad, se identificaron a nivel molecular y se determinó la tasa de crecimiento y la producción de PHA con 2 % de los diversos sustratos. La biomasa y el PHA se recuperaron y el polímero se caracterizó mediante GPC. Se obtuvieron 50 colonias con

células formadoras de gránulos de PHA, entre las que se seleccionaron *V. alginolyticus* 01 y 02. La bacteria 01 sintetizó PHA utilizando glucosa, sacarosa, almidón soluble, acetato, butirato, glicerol, ácidos oleico y linoleico. La bacteria 02 solo produjo PHA a partir del almidón soluble y glicerol. Los mayores rendimientos de PHA correspondientes a 1,87 g/L y 1,36 g/L respectivamente se alcanzaron con glicerol. La bacteria 02 desarrolló con acetato, succinato, citrato y ácido mirístico, pero no sintetizó PHA. El polímero recuperado en el caldo con 20 g/L de glicerol presentó un peso molecular de 201 kDa (bacteria 01) y 1380 kDa (bacteria 02). Cuando la concentración de NaCl se incrementó a 30-50 g/L el peso de la biomasa fue de 8g/L, el contenido de PHB mayor de 50 % y el contenido de PHB de 5,08 g/L. Se demostró el potencial de *V. alginolyticus* cepa 01 para la producción de PHA en un residuo de barato y de fácil disponibilidad como el glicerol.

Liu et al. (2021) realizaron la comparación de la producción de PHA por *H. elongata* y tres de sus recombinantes en hidrolizados de paja de trigo. Las bacterias se aislaron de suelo y residuos vegetales de un lago salado. La bacteria con mayor rendimiento de PHA se identificó a nivel molecular y se construyeron tres recombinantes. Las cuatro bacterias se cultivaron en caldo mínimo con 50 g/L NaCl y las fuentes de carbono hidrolizado de paja de trigo, ácido oleico e hidrolizado + ácido oleico con glucosa como control. Se obtuvieron 56 colonias de bacterias halófilas entre las que 21,43 % produjo PHA. En el cultivo con glucosa se alcanzaron 6,75 g/L biomasa; 2,39 g/L y un contenido de 22,85 %. El recombinante 2 de *H. elongata* cultivado en paja de trigo alcanzó 8,47 g/L de biomasa; 0,44gPHB/L y un contenido de 5,15 %; con la paja de trigo mezclada con ácido oleico alcanzó 7,76 g/L de biomasa; 1,28gPHB/L y un contenido de 16,49 % y con ácido oleico 5,76 g/L de biomasa; 1,81 gPHB/L y 27,42 % de contenido. Se demostró que la cepa recombinante incrementó cuatro veces la concentración de PHB.

Flores et al. (2018) determinaron el rendimiento de PHA en microorganismos halófilos aislados de suelo y aguas de salinas. Los microorganismos de las muestras se enriquecieron en caldo HM<sub>1</sub> con 1,5 % de glucosa y 15, 20 y 25 % de NaCl y se aislaron en agar HM<sub>1</sub> con similar concentración de glucosa y NaCl que el enriquecimiento. La detección de gránulos de PHA se realizó con los microorganismos halófilos cultivados en caldo HM<sub>2</sub> con 3 % de glucosa y tinciones de Sudan negro B a los 144 - 216 horas para establecer el tiempo óptimo o requerido para alcanzar el mayor número de células microbianas con gránulos. Los cinco microorganismos seleccionados se cultivaron en caldo HM<sub>2</sub>, a 30 °C por el tiempo óptimo previamente establecido, se pesó la biomasa, se recuperó el PHA y se calculó el coeficiente de rendimiento del producto con relación

a la biomasa. Se obtuvieron 234 aislados de microorganismos, de los cuales el 38,74 % acumuló gránulos de PHA y se seleccionaron los 20 microorganismos con 40-85 células con gránulos de PHA. La biomasa fue de 0,005 g/L a las 72 horas y 3,211 g/L a las 240 horas. El rendimiento  $Y (p/x)$  fue de 0,270-0,725 g/g y el contenido de PHA fue de 60,73-75,52 %. Estos microorganismos tienen potencial para la producción de PHA.

Guzmán et al. (2017) determinaron el rendimiento de PHA por bacterias halófilas en almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* como fuente de carbono. Las bacterias se aislaron de agua de ocho salinas en agar HM1 con 1% glucosa y 5-30 % NaCl, se cultivaron en caldo HM2 con 2 % y 5-30 % NaCl y se realizaron coloraciones con Sudan negro B para diferenciar los gránulos de PHA. Las 20 bacterias con el mayor número de células con gránulos de PHA se cultivaron en caldo HM<sub>2</sub>, se recuperó la biomasa y el PHA y las tres bacterias con el mayor rendimiento de PHA se cultivaron en almidón de cáscaras de papa (5,10,15,20 g/L) durante 48 horas. Se obtuvieron 203 bacterias halófilas entre las que 38,92 % acumuló gránulos de PHA teñidos con Sudan negro B. Las 20 bacterias seleccionadas por presentar el 65-95 % de las células con gránulos de PHA alcanzaron 0,174-0,889 g/g de rendimiento ( $Y p/x$ ). Las tres bacterias seleccionadas desarrollaron y produjeron PHA en almidón de cáscaras de papa. *Halomonas* sp. M4C1 alcanzó 0,019; 0,016; 0,007 y 0,006 g/L PHA con 0,77; 0,111; 0,056 y 0,066 g/L de biomasa después de 20, 40, 24 y 16 horas respectivamente. El mayor  $Y (p/x)$  correspondió a 10 g/L de almidón y así se demostró que es factible la producción de PHA en los residuos amiláceos.

## 2.2 Bases teóricas

Los plásticos son agrupados en siete categorías: polietileno de tereftalato (polyethylene terephthalate, PETE), polietileno de alta densidad (high density polyethylene, HDPE), polietileno de baja densidad (low density polyethylene, LDPE), cloruro de polivinilo (polyvinyl chloride, PVC), polipropileno (polypropylene, PP), poliestireno (polystyrene o Styrofoam, PS) y policarbonato o polycarbonate (Patel et al., 2022), con predominio del PP (16 %) y del LDPE con 12 % (Kutralam et al., 2020). Estos plásticos utilizados para envolturas y botellas de agua se denominan de un solo uso (single-use plastics, SUPs). Los SUPs se biodegradan muy lentamente y por acción de la radiación ultravioleta, calentamiento o estrés mecánico se fragmentan en pequeñas piezas con menos de 5 mm de diámetro, denominadas microplásticos (MP), las cuales se

dispersan de forma rápida en el suelo (Awet et al., 2018), en el agua (Syakti et al., 2019) y en la atmósfera (Deghani et al., 2017).

Dependiendo del número de carbonos constituyentes de las unidades monoméricas los PHA son de cadena corta (short chain length, SCL) y de cadena media (medium – chain length, MCL). Los PHA<sub>SCL</sub> tienen tres a cinco átomos de carbono como por ejemplo el 3- hidroxibutirato, el poli 4- hidroxibutirato y el poli 3- hidroxivalerato. Los PHA<sub>MCL</sub> tiene seis -14 átomos de carbono como el poli (3- hidroxihexanoato) y el poli (3- hidroxi octanoato). También se considera un tercer grupo de PHA, denominado de cadena larga (long chain length, LCL) por tener más de 14 átomos de carbono (Behera et al., 2022; Raza et al., 2018). Los PHA pueden ser sintetizados como homopolímeros, copolímeros al azar, copolímeros en bloque y copolímeros funcionales que tienen doble o triple enlaces grupos epoxi, carbonilos, ciano, fenilos o halógenos (Tan et al., 2021).

Los PHA son parcialmente cristalinos. Las propiedades térmicas de la fase amorfa son estudiadas en términos de T<sub>g</sub> y las propiedades de la fase cristalina en términos de T<sub>m</sub> que está relacionada de forma directa con el número de átomo de carbono en la cadena del polímero. Por lo contrario, la T<sub>g</sub> es inversamente proporcional a la longitud de la cadena. Los PHA<sub>SCL</sub> tienen menor T<sub>g</sub> que los PHA<sub>MCL</sub>, lo que contribuye al incremento de la cristalinidad y brillantez. Ejemplo el 3 PHB, altamente cristalino tiene una T<sub>g</sub> de 4 °C y una T<sub>m</sub> de 180 °C. A su vez, un PHA<sub>MCL</sub> menos cristalino tiene una T<sub>g</sub> de -25 – 65 °C y una T<sub>m</sub> de 42 -75 °C. La T<sub>g</sub> y la estructura cristalina son responsables de la propiedad de la elastomérica de los polímeros. Solo los PHA<sub>MCL</sub> tienen propiedades similares a los elastómeros termoplásticos (Behera et al., 2022).

Las propiedades mecánicas (elongación a la ruptura y resistencia a la atracción) varían de acuerdo a la longitud de la cadena del polímero con algunas excepciones. La flexibilidad del PHA puede ser mejorada por la adición de comonomeros. Por ejemplo, las propiedades mecánicas del P3HB como dureza, rigidez y flexibilidad difieren en forma significativa del copolímero P(3HB-CO-3HH). Los PHA<sub>MCL</sub> son menos cristalinos que los PHA<sub>SCL</sub> que tienen 60- 80 % de cristalinidad (Behera et al., 2022). Los PHA son altamente cristalinos (55-80 %) con un rango en la T<sub>m</sub> de 173-180 °C y T<sub>g</sub> de 5-9 °C. Los PHA<sub>MCL</sub>, con 25 % de cristalinidad tiene un rango de T<sub>m</sub> de 39-61 °C y T<sub>g</sub> -43 a 25 °C y son más flexibles y elásticos PHA<sub>SCL</sub> (Mozejko y Kiewisz, 2016).

#### **a. Microorganismos productores de PHA**

Los PHA son sintetizados y acumulados por procariotas y eucariotas (Raza et al., 2018). Los PHA son sintetizados por bacterias (Tan et al., 2021), arqueas, algas (Behera et al., 2022) y levaduras (Ojha y Das, 2020) en diferentes nichos ecológicos. Las Bacterias constituyen el mayor grupo de microorganismos productores de PHA e incluyen *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Halomonas* sp., *Haloferax* sp. y *Streptomyces* sp. También son productoras de PHA microalgas *Chlorogloea fritsch* y especies de *Spirulina*, *Gloeotheca*, *Aphanothece* y *Synechococcus*, así como también los hongos *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula minuta*, *Yarrowia lipolytica* y *Wickerhamomyces anomalus* (Behera et al., 2022).

Las bacterias productoras de PHA se dividen en dos grupos. El primer grupo (*Ralstonia eutropha* y *Pseudomonas oleovorans*) requieren limitación de nutrientes como el fósforo, nitrógeno, oxígeno o magnesio para acumular PHA y no acumulan el polímero durante la fase de crecimiento. El segundo grupo (*Escherichia coli* recombinante) acumula PHA durante la fase de crecimiento y no requiere limitación de nutrientes (Raza et al., 2018). Los PHA son sintetizados en la fase exponencial y estacionaria de crecimiento. En la fase exponencial los gránulos de PHA son producidos bajo condiciones favorables de crecimiento y en la fase estacionaria bajo limitación de nutrientes como nitrógeno, fósforo, oxígeno y exceso de carbono, el cual es indispensable para la síntesis del polímero. Cuando la fuente de carbono se agota el PHA es despolimerizado y los productos de su degradación son utilizados como fuente de carbono y energía (Behera et al., 2022; Mozejko y Kiewisz, 2016).

El PHA más estudiado en el polihidroxibutirato (PHB) que es sintetizado por tres posibles vías. En la vía I utilizada por *Ralstonia eutropha* el acetil -CoA generado por la glicólisis o por la vía de las pentosas fosfato es convertido en acetoacetil-Co (enzima beta-cetotiolasa) el cual es reducido a 3- hidroxibutiril- CoA (enzima acetoacetil – CoA deshidrogenasa) y luego es polimerizado a PHB en una reacción catalizada por la P(3HB) polimerasa. En esta vía las tres enzimas importantes beta- (cetotiolasa acetil CoA acetiltransferasa); acetoacetil-CoA reductasa, dependiente del NADPH y PHA sintasa o polimerasa son codificadas por los genes *phaA*, *phaB* y *phaC* respectivamente (Behera et al., 2022; Sagong et al., 2018). En la vía II utilizada por *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* y *Aeromonas hydrophila*, el acil -CoA producto de la beta oxidación de los ácidos grasos se utiliza por la síntesis del PHA y con la vía III utilizada por *P. mendocina* se parte del malonil -CoA para la síntesis del PHA (Sagong et al., 2018).

Para la síntesis del polímero se han descrito hasta ocho vías involucradas, la vía IV por *Rhizobium* spp., la vía V por *Clostridium Kluyveri*, la vía VI por mutantes y recombinantes de *Alcaligenes eutrophus*, la vía VII por *Acinetobacter* sp. y la vía VIII por *Brevibacterium epidermidis* (Behera et al., 2022). En todas las vías biosintéticas de PHA reportadas el acetil CoA es el precursor de la mayoría de los PHA<sub>SCL</sub> y PHA<sub>MCL</sub>. En resumen, la tiolasa cataliza la condensación de dos moléculas de acetil CoA para formar aceto acetil CoA que a su vez es convertido en R-3-hidroxi butiril- CoA el cual es polimerizado en PHB (Sagong et al., 2018).

Los microorganismos acumulan los gránulos de PHA como fuente de nutrientes (carbono) y energía requerida para las actividades fisiológicas durante condiciones desfavorables de nutrientes (Behera et al., 2022). La producción de PHA esta conectada a las estrategias desarrolladas por los microorganismos para sobrevivir. Los gránulos de PHA pueden constituir más del 90 % del peso de la biomasa seca y además de servir como reserva de energía, este polímero aumenta la tolerancia al estrés por calentamiento, osmótico y radiación ultravioleta (Garcia et al., 2020).

Los microorganismos más utilizados para la producción de PHA son *Ralstonia eutropha*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli* recombinante. Los microorganismos productores de PHA son seleccionados por su capacidad para producir en forma significativa el polímero intracelular, por la flexibilidad de poder ser cultivados con un amplio rango de fuentes de carbono incluyendo recursos agrícolas y por ser lo suficientemente flexibles a la manipulación genética. De esta manera, diversas especies producen PHA; no obstante, solo un pequeño número de bacterias son adecuadas para el proceso fermentativo industrial (Pandey et al., 2022).

El contenido de PHA producido por las bacterias varía entre 5 % de PHB (*Arthrospira maxima* con acetato); 74 % de poli (3HB) (*Ralstonia eutropha* con glucosa) y 88 % de poli (3HB) (*Alcaligenes eutrophus* con sacarosa). El contenido de PHA alcanzado con residuos de la industria de biodiésel es 79 % (*Enterococcus* sp.), industria de alimentos es 89 % (*Bacillus firmus*), industria láctea es de 89 % (*Cupriavidus necator*) y con papel molido de 76 % (*Alcaligenes eutrophus*). *Cupriavidus necator* producen PHA<sub>SCL</sub> y *Pseudomonas* sp. PHA<sub>MCL</sub> *C. necator* puede acumular hasta 89 % de PHA respecto a la biomasa seca con una producción de 3 gg/(Lh) (Pandey et al., 2022; García et al., 2020).

#### **b. *Ipomoea batatas* “camote”**

*Ipomoea batatas* [L] Lam “camote” es una especie de la familia Convolvulaceae, cuyo cultivo se ha posicionado en el sexto lugar en el mundo y es el quinto producto alimentario esencial en términos de peso fresco en los países en desarrollo, junto con *Oryza sativa* L. “arroz”, *Triticum aestivum* L. “trigo”, *Zea mays* L. “maíz”, *Manihot esculenta* “yuca” (Xiong et al., 2023). En el Perú cada año se siembran más 16 mil ha de camote y se alcanza una producción anual de 276 000 t, con un rendimiento promedio de 17,2 t/ha (Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, [MIDAGRI] 2024; Cantoral et al., 2020). Las principales regiones productoras de camote son Lima, Ica, Ancash y Piura donde se cosecha todo el año (MIDAGRI, 2024). Las plantas de camote son perennes, con raíces tuberosas que se desarrollan en los nudos de los tallos enterrados (Vidal et al., 2018). Las raíces reservantes del camote se cosechan a diversas altitudes, desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm de altura, requiere menos insumos y mano de obra que otros cultivos y tolera períodos de sequía y suelos con baja fertilidad. Las variedades de camote tienen diversos colores en la cáscara y pulpa; blanco, amarillo, anaranjado y morado entre otros (Cantoral et al., 2020; International Potato Center, s.f).

El almidón contenido en el camote se transforma en sacarosa que es el mayor componente, seguido de la fructuosa y glucosa. Su contenido (unidad/100g) es agua (64-74 g); fibra (1,2-3,5g); lípidos (0,5-2,1g), proteínas (1,2-7,2 g), grasas (0,4-3 g) y carbohidratos (20,19-27,3 g). El camote contiene además ácido ascórbico, retinol, tiamina, riboflavina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, folato, sodio, potasio, fósforo, calcio, selenio, cobre, manganeso y los aminoácidos triptófano, trionina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, cisteína, tirosina, arginina, alanina, ácido glutámico y glicina entre otros. En los tubérculos frescos se ha determinado (unidad/100g) 63,9-64,9g de almidón; 2,73-4,68 mg de glucosa; 1,13 -4 mg de fructosa y 59,94-59,97 mg de sacarosa, a diferencia de los tubérculos hervidos donde se cuantificaron 49,22- 57,43 g de almidón; 1,34-3,94 mg de glucosa; 1,42-3,75 mg de fructosa y 48,99-61,50 mg de sacarosa (Vidal et al., 2018).

Las raíces del camote contienen 18,15 % de almidón el cual desciende después del calentamiento a 7,23 % (vapor), 7,10 % (hervido) y 7,84 % (horneado). El contenido de azúcares totales solubles en el camote fresco es de 12,0 % y se incrementa a 39,33 % (horneado); 36,98 % (hervido) y 35,24 % (en el camote cocinado al vapor). El camote en fresco tiene (ug/g de peso seco) glucosa (9,03), fructuosa (8,61), sacarosa (37,27), maltosa (0,47) y galactosa (0,15) valores que se incrementan con el calentamiento a 12,24



(glucosa); 10,51 (fructuosa); 24,76 (sacarosa); 85,51 (maltosa) y 0,08 de galactosa (Yao et al., 2023). El camote anaranjado hervido contiene maltosa (3,88), sacarosa (2,72 ), glucosa (0,92), fructosa (0,46 ) y un total de azúcares de 8,0. El camote morado hervido contiene 10,78; 4,74; 2,84; 0,43; 0,31 y 8,3 respectivamente. El contenido de maltosa es bajo en los camotes frescos, pero se incrementa con el calentamiento. En ambos camotes cocinados la maltosa es el azúcar más abundante seguido de la sacarosa, fructuosa y glucosa (Guclu et al., 2023; Yao et al., 2023).

El camote es considerado una fuente rica (rich source) de B- caroteno (pro-vitamina A) y una fuente buena (good source) de minerales (magnesio, fierro, cobre, manganeso, calcio, potasio, vitaminas (B6, B1, C, E) y fibras dietéticas porque contiene más de 20 % y 10-19 % del valor diario de un nutriente en particular respectivamente. El camote contiene polifenoles, terpenoides, saponinas, glicósidos, alcaloides, esteroides y otros compuestos activos funcionales con propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antidiabéticas, anticancerígenas, antiinflamatorias, hepatoprotectores, neuroprotectores y cardioprotectores entre otras (Xiong et al., 2023). El consumo del camote incrementa el nivel de vitamina A, disminuye la glucosa, el peso corporal, los triglicéridos, la presión arterial, los biomarcadores de la hepatitis y aumenta la absorción de hierro. La ingestión del camote beneficia en forma significativa la salud de los humanos y el alimento también tiene uso industrial con novedosos productos al alcance de la mayoría (Alam, 2021).

### **c. Humedales**

El término humedales se refiere a diversos ambientes que tienen como característica principal el agua como elemento básico del ecosistema. La Convención Ramsar en el 2016, estableció que los “humedales son extensiones de pantanos, lagos, marismas, manglares, arrecifes de coral, turberas y cuerpos de agua con régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas e incluyen las extensiones de agua marina cuya profundidad durante la marea baja no es mayor a 6 m” (RAMSAR, 2016). Las humedades son ecosistemas para el 40 % de las especies en el mundo, constituyen filtros de agua, absorben dióxido de carbono, regulan el ciclo hidrológico y proveen de agua y recursos a las comunidades cercanas (Rodríguez et al., 2022).

Los principales humedales pueden ser marinos (humedales costeros, lagunas costeras, costras rocosas y arrecifes de coral), estuarinos (deltas, marismas y manglares), lacustres (asociados a lagos), ribereños (adyacentes a ríos y arroyos) y palustres (pantanos, ciénagas y marismas). Según la convención de Ramsar existen 42 tipos de humedales agrupados en tres categorías: marinos y costeros; continentales y artificiales (RAMSAR, 2016). Los humedales costeros pueden tener origen natural y antrópico por la intrusión marina o por filtraciones de terrenos agrícolas y otras actividades como el dragado. En los humedales costeros entran en contacto el agua continental y el agua marina y se forman diversos ambientes que se diferencian por la composición y concentración salina. Los más importantes son los estuarios, las deltas, las marismas y albuferas, las lagunas costeras y las salinas. Las salinas son zonas encharcadas temporalmente de agua de mar con alternancia de períodos de sequía e inundación (Díaz et al., 2021).

En el mundo los humedales constituyen hábitats para la biota; sin embargo, la actividad antrópica y los cambios climáticos los están impactando y deteriorando en forma irreversible. Los humedales son afectados en su mayoría por la urbanización, construcción de represas, labores de labranza, pastoreo, inundación extrema, sequía, cambios en el régimen hidrológico, plantas invasoras, aumento de la temperatura e incendios forestales (Xiong et al., 2023). Los humedales están desapareciendo tres veces más rápido que los bosques. En el Perú los habitantes cercanos a los humedales arrojan los residuos domiciliarios y material de construcción, queman los tifales, totorales y juncuales, crían animales y extienden sus campos agrícolas para cultivos como *Oryza sativa* L. “arroz” (Rodríguez et al., 2022).

El Perú tiene 13 humedales categorizados como Sitios Ramsar, diez de ellos ubicados en nueve áreas naturales protegidas (MINAM, 2019). Los humedales costeros tienen clima cálido muy seco, con una temperatura promedio de 24 °C y una precipitación anual de 25-100 mm en Tumbes y un clima semicálido y muy seco, con una temperatura promedio de 18-20 °C y una precipitación anual de 0-50 mm en Lambayeque y Tacna. El humedal La Bocana, incluyendo el área agrícola, urbana y ganadera que influye sobre éste, presenta 237,6 ha y se encuentra al noroeste del distrito de San José que es uno de los doce distritos de la provincia de Lambayeque. El humedal es un ecosistema marino costero que cuenta con cuerpos de agua y diversas especies de flora y fauna. En el 2002 el área urbana correspondía a 52,9 ha; en el 2010 a 78,6 ha y en el 2021 a 143,9 ha lo que

evidencia una alta expansión urbana que se irá incrementando en forma constante (Pérez, 2021; INEI, 2020).

En el 2002 de las 327,6 ha en estudio en el bofedal La Bocana y alrededores, 23,01 ha correspondieron a cuerpos de agua o lagunas alimentadas por la infiltración de agua de los canales de regadío e infiltraciones de agua marina; el 87,72 % correspondió al área compuesta por vegetación como *Distichlis spicata* “grama salada”, *Eleusine indica* “grama”, *Sesuvium portulacastrum* “plátano” y *Salicornia fruticosa* “Salicornia”, entre otras plantas silvestres; el área de cultivo fue de 1,85 ha con 0,42 ha de área con viviendas y las dos lagunas de oxidación con 1,13 ha. En el 2021 el área ocupada por los cuerpos de agua fue de 18,97 ha; vegetación con 82,43 ha; cultivo y ganadería con 15,34 ha y viviendas con 18,09 ha. Como consecuencia del crecimiento urbano se observa disposición inadecuada de los residuos sólidos en las orillas de las lagunas del humedal y entre las coordenadas 613173 E, 9253109 N las aguas residuales de la laguna de oxidación se mezclan con las lagunas del humedal y en las imágenes satelitales el agua se aprecia de color rojizo (Pérez, 2021).

El Perú cuenta con una normativa legal para la protección de los humedales; sin embargo, la mayoría de los documentos (37) no presentan sanción y solo en siete documentos se impusieron sanciones. Los humedales cuentan con un panorama legal para su protección y uso sostenible; sin embargo, se requiere dar funcionalidad a las leyes para hacer efectiva la estricta protección de estos valiosos ecosistemas (Toledo et al., 2023).

### 2.3 Operacionalización de Variables

Variables	Definición de la variable	Indicadores	Instrumento
Variable dependiente:  -Rendimiento de PHA	Gramos de producto PHA en relación a los gramos de biomasa microbiana producido (Guzmán et al., 2017).	Biomasa ( g/L) PHA (g/L) $Y_{p/x}(g\ g^{-1})$	Balanza de precisión Balanza de precisión Cálculo
Variables Independientes:  -Microorganismos (halófilo y halotolerante)  -Concentración de azúcares de cáscaras de camote	Microorganismos que se han adaptado en ambientes con elevada concentración de NaCl (Guevara et al., 2020).  Aumento en diferentes proporciones de los azúcares de las cáscaras de camote (Vidal et al., 2018).	Crecimiento en 6 % NaCl y 0,85 % NaCl  Grados Brix ( $^{\circ}\text{Bx}$ )  Concentración de azúcares (10, 20, 30 g/L)	Espectrofotometría de luz visible

### 2.4 Hipótesis

Los microorganismos halófilos y halotolerantes presentan más de 70 % de rendimiento de polihidroxialcanoatos en una de las tres concentraciones de azúcares de cáscaras de camote.

### III. DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación fue aplicada, con un diseño experimental para la contrastación de la hipótesis. El enfoque de la investigación fue cuantitativo y el alcance o nivel de profundidad explicativo (Hernández et al., 2014).

#### 3.2 Método de investigación

Experimental con enfoque cuantitativo (Hernández et al., 2014).

#### 3.3 Diseño de contrastación

La investigación fue experimental bajo un diseño completamente aleatorio (DCA), con arreglo factorial  $2 \times 2 \times 3$ . Los factores fueron el microorganismo (A) con dos niveles (halófilo y halotolerante), la fuente de carbono (B) con dos niveles (glucosa y azúcares de cáscaras de camote) y la concentración de azúcares (C) con tres niveles (1, 2 y 3 % o 11,20; 20,11 y 30,22 g/L de sacarosa). Los tratamientos fueron 12 con tres repeticiones cada uno y un total de 36 unidades experimentales (Figura 1).

#### 3.4 Población, muestra y muestreo

En la investigación de las características morfológicas de los microorganismos halófilos y halotolerantes productores de gránulos de PHA la población correspondió al suelo de los Humedales de San José en Lambayeque y se investigaron, 54 muestras no probabilísticas y por conveniencia, colectadas durante abril de 2023. En la determinación del rendimiento de PHA de dos microorganismos halófilo y halotolerante la población y muestra de estudio no probabilístico y por conveniencia correspondió a 36 unidades experimentales.

**Figura 1**

*Diseño aleatorio con arreglo factorial para determinar el rendimiento de microorganismos halófilo y halotolerante productores de polihidroxialcanoatos en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de I. batatas.*



### 3.5 Técnica, instrumento y procedimiento

**3.5.1 Técnica:** Observacional cuantitativa (Hernández et al., 2014).

**3.5.2 Instrumento:** Ficha de registro de datos (Hernández et al., 2014).

#### 3.5.3 Procedimiento

##### a. Lugar de muestreo y obtención de muestras de suelo

El muestreo de suelo se realizó en el humedal La Bocana, Humedales de San José en Lambayeque, entre las coordenadas 6° 75'52. 50' de latitud Sur y 79° 97'01.55' de longitud Oeste. En las zonas denominadas Dunas, Gramadal y Salicornial (Perez, 2021) por la mayor cobertura de *Sesuvium portulacastrum*, *Distichlis spicata*, *Salicornia fruticosa* respectivamente (Figuras 2 a 5, tabla 1) se seleccionaron 54 puntos de muestreo de suelo (18 en cada zona), se delimitaron cuadrados de 1 m<sup>2</sup>, se eliminaron los 5 cm de suelo superficial y se colectaron 0,500 kg hasta los 20 cm de profundidad.

Las muestras de suelo se homogenizaron, se colectaron submuestras de 10 g y el suelo restante de las muestras de cada una de las tres zonas se mezcló para obtener tres muestras compuestas en las que se determinó la conductividad eléctrica del extracto de saturación (CE<sub>e</sub>) con un conductímetro (INOLAB) y se calculó el porcentaje de sodio intercambiable (PSI) con la concentración de sodio y la relación de adsorción de sodio (RAS) en el Laboratorio Agrícola Análisis de Suelos y Aguas (CYSAG). Según los resultados el suelo de las zonas Dunas y Salicornial fue salino y en la zona Gramadal fue salino-sódico (Tabla 2).

##### b. Caracterización morfológica de microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA aislados de suelo en los Humedales de San José, Lambayeque 2023

Las submuestras (10 g) de suelo se depositaron en 90 mL de una solución salina esterilizada (NaCl 5 % p/v), se homogenizaron, se tomaron alícuotas, se sembraron por duplicado en agar nutritivo modificado (Anexo 1) con NaCl 6 % p /v (Liu et al., 2021) y se incubaron a 30 °C por 120 horas. Las colonias microbianas desarrolladas se agruparon en morfotipos con base a la forma, borde, elevación, aspecto y color y se seleccionó una colonia representativa de cada morfotipo. Las colonias microbianas se cultivaron en caldo nutritivo con 6 % NaCl (Rizki et al., 2023) y 0,85 % NaCl y se incubaron a 30 °C por 120 horas.



**Figura 2**

*Ubicación de los Humedales de San José, en el distrito San José, Lambayeque 2023.*

**Figura 3**

*Zona de muestreo en dunas de los Humedales de San José, distrito San José, Lambayeque 2023.*





**Figura 4**

*Zona de muestreo en gramadal de los Humedales de San José, distrito San José, Lambayeque 2023.*

**Figura 5**

*Zona salicornial de muestreo en los Humedales de San José, distrito San José, Lambayeque 2023.*



**Tabla 1**

*Ubicación georeferencial de tres zonas de muestreo en los Humedales de San José, Lambayeque 2023*

Muestras N°	Zona de muestreo	Posición georeferencial	Muestras N°	Zona de muestreo	Posición georeferencial
1	Dunas	17M 0613985 UTM 9252966	10	Gramadal	17M 0613744 UTM 9253540
2	Dunas	17M 0613980 UTM 9252963	11	Gramadal	17M 0613731 UTM 9253541
3	Dunas	17M 0613985 UTM 9252960	12	Gramadal	17M 0613731 UTM 9253545
4	Dunas	17M 0613975 UTM 9252963	13	Gramadal	17M 0613737 UTM 9253522
5	Dunas	17M 0613975 UTM 9252966	14	Gramadal	17M 0613741 UTM 9253521
6	Dunas	17M 0613976 UTM 9252973	15	Gramadal	17M 0613746 UTM 9253525
7	Dunas	17M 0613985 UTM 9252970	16	Gramadal	17M 0613740 UTM 9253525
8	Dunas	17M 0613978 UTM 9252959	17	Gramadal	17M 0613750 UTM 9253553
9	Dunas	17M 0613979 UTM 9252963	18	Gramadal	17M 0613731 UTM 9253552
10	Dunas	17M 0613980 UTM 9252965	1	Salicornial	17M 0613762 UTM 9253530
11	Dunas	17M 0613984 UTM 9252965	2	Salicornial	17M 0613753 UTM 9253518
12	Dunas	17M 0613980 UTM 9252961	3	Salicornial	17M 0613759 UTM 9253520
13	Dunas	17M 0613982 UTM 9252962	4	Salicornial	17M 0613759 UTM 9253533
14	Dunas	17M 0613983 UTM 9252966	5	Salicornial	17M 0613762 UTM 9253534
15	Dunas	17M 0613988 UTM 9252971	6	Salicornial	17M 0613759 UTM 9253522
16	Dunas	17M 0613980 UTM 9252979	7	Salicornial	17M 0613762 UTM 9253536
17	Dunas	17M 0613983 UTM 9252968	8	Salicornial	17M 0613760 UTM 9253537
18	Dunas	17M 0613985 UTM 9252973	9	Salicornial	17M 0613768 UTM 9253540
1	Gramadal	17M 0613731 UTM 9253521	10	Salicornial	17M 0613761 UTM 9253548
2	Gramadal	17M 0613737 UTM 9253527	11	Salicornial	17M 0613761 UTM 9253543
3	Gramadal	17M 0613731 UTM 9253525	12	Salicornial	17M 0613753 UTM 9253548
4	Gramadal	17M 0613733 UTM 9253525	13	Salicornial	17M 0613755 UTM 9253543
5	Gramadal	17M 0613734 UTM 9253521	14	Salicornial	17M 0613755 UTM 9253520
6	Gramadal	17M 0613738 UTM 9253537	15	Salicornial	17M 0613757 UTM 9253538
7	Gramadal	17M 0613740 UTM 9253558	16	Salicornial	17M 0613761 UTM 9253530
8	Gramadal	17M 0613742 UTM 9253538	17	Salicornial	17M 0613758 UTM 9253515
9	Gramadal	17M 0613744 UTM 9253539	18	Salicornial	17M 0613761 UTM 9253527

**Tabla 2**

*Conductividad eléctrica y porcentaje de sodio intercambiable en zonas de muestreo de los Humedales de San José, Lambayeque 2023*

Zona de muestreo	Conductividad eléctrica (CEe)	Porcentaje de sodio intercambiable (PSI)	Tipo de suelo*
	dS/m	%	
Dunas	16, 33	14, 20	Salino
Gramadal	44, 34	23, 33	Salino-sódico
Salicornial	97, 44	5, 37	Salino

\*Laboratorio Agrícola Análisis de Suelos y Aguas (CYSAG)

Los microorganismos halófilos fueron aquellos que crecieron en caldo nutritivo con 6 % NaCl pero no con 0,85 % NaCl y los microorganismos halotolerantes los que crecieron en ambos caldos. Los microorganismos se cultivaron nuevamente en agar nutritivo modificado con NaCl 6 % p/v (Liu et al., 2021) y en colonias desarrolladas se realizaron coloraciones de Gram para determinar la reacción a la coloración. Los cultivos puros de los microorganismos halófilos y halotolerantes se llevaron a refrigeración a 8 °C (Guzmán et al., 2017).

Los microorganismos halófilos y halotolerantes se cultivaron en 10 mL de caldo HM<sub>2</sub> con glucosa (10 g/L) como fuente de carbono 5 % NaCl, a 30 °C, 180 rpm, durante 48 horas. A continuación, se realizaron coloraciones en Sudán negro B (Flores et al., 2018) y se observaron bajo el microscopio óptico. Los microorganismos productores y acumuladores fueron aquellos que presentaron gránulos oscuros en su citoplasma coloreado de rosado. Estos microorganismos se cultivaron nuevamente en el mismo caldo y se realizaron coloraciones con Sudán negro B a las 24, 36 y 48 horas para contar el número de células con gránulos en tres campos microscópicos, obtener un promedio y seleccionar los cinco microorganismos halófilos y cinco halotolerantes con el mayor número de células con gránulos de PHA en el menor tiempo posible.

### **c. Selección de los microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA con base a la cinética de crecimiento en glucosa, Lambayeque 2023**

El inóculo (5 %) de los diez microorganismos seleccionados se cultivó por triplicado en Erlenmeyers con 90 mL de caldo HM<sub>2</sub> con glucosa (20 g/L) y NaCl (50 g/L), a 30 °C, 180 rpm (Romero et al., 2021) y cada 4 horas durante 40 horas se tomaron muestras de 1 mL para determinar la densidad óptica con el espectrofotómetro de luz visible (600 nm), incluyendo un control sin bacterias. La curva de crecimiento se estableció con el promedio de los valores de la densidad óptica de los caldos HM<sub>2</sub> cultivados por 40 horas, la fase exponencial de cada microorganismo se linealizó y se calculó la velocidad específica de crecimiento (u) y el coeficiente de correlación (Llumigusín, 2018). Los dos microorganismos (halófilo y halotolerante) con la mayor velocidad específica de crecimiento se seleccionaron para determinar el rendimiento de PHA.

**d. Comparación del rendimiento de polihidroxialcanoatos de dos microorganismos halófilo y halotolerante en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de camote**

El ensayo correspondió a un diseño completamente aleatorio, bajo un arreglo factorial, 2x2x3: El factor A correspondió a los microorganismos: halófilo y halotolerante; el factor B a la fuente de carbono: glucosa y azúcares; y el factor C a la concentración de azúcares: 1, 2 y 3 % (11,20; 20,11 y 30,22 g/L sacarosa). Los tratamientos fueron doce, cada uno con tres repeticiones y un total de 36 unidades experimentales.

El caldo de fermentación o HM2 modificado se obtuvo a partir 2 kg de camote amarillo, los cuales se lavaron con agua potable, se pelaron y las cáscaras se deshidrataron a 40°C durante 7 días. Las cáscaras se pulverizaron, se pesaron 100 g y se cocinaron con 900 mL de agua destilada durante 15 minutos y en el filtrado o extracto obtenido (300 mL) se midieron los °Brix (14° Bx). El caldo HM2 se preparó con las sales requeridas, glucosa como fuente de carbono (control) y 1, 2 y 3 % (11, 2; 20,11 y 30, 22 g/L) del extracto de cáscaras de camote (tratamientos) previamente obtenido (Figura 6, tabla 3, anexo 2).

El inóculo (5 %) de cada uno de los dos microorganismos seleccionados (halófilo y halotolerante), cuya concentración se estandarizó previamente  $10^6$  células mL se cultivó por triplicado en 97 mL de caldo HM<sub>2</sub> modificado (5 % NaCl p/v), se incubó a 30 °C (180 rpm), por el tiempo establecido previamente como óptimo por la producción y acumulación de gránulos de PHA. Al finalizar el proceso fermentativo, el caldo cultivado se centrifugó (3500 rpm) por 5 minutos, la biomasa celular se enjuagó con solución salina (NaCl 5 % p/v), se centrifugó (3500 rpm) por 5 minutos y se deshidrató a 45 °C hasta alcanzar un peso constante, el cual se determinó en una balanza analítica (Modelo, A&D Weighing HR-200) y correspondió al peso de la biomasa microbiana (Flores et al., 2018).

En la biomasa microbiana deshidratada se recuperó el PHA, para lo cual ésta se mezcló con igual volumen de hipoclorito de sodio al 5 %, en agitación por 2 horas y luego se agregó cloroformo para capturar al polímero (Figura 7). Después de 1 hora en agitación (150 rpm), la mezcla se centrifugó (3500 rpm por 5 minutos), con una jeringa se extrajo el contenido de la capa inferior, se depositó en una placa de Petri, se deshidrató a 45 °C y se pesó en una balanza analítica (Mostafa et al., 2020). Con el peso de la biomasa y el PHA obtenidos se calculó la concentración en g/L (Romero et al., 2021). El coeficiente de rendimiento (Y p/x) de PHA en relación a la biomasa se calculó mediante la división de los gramos del PHA entre los gramos de la biomasa y el resultado se expresó en g de PHA por g de biomasa formada,  $\text{g g}^{-1}$  (Flores et al., 2018) y en porcentaje (Riski et al., 2023).



**Figura 6**

*Preparación del caldo con I. batatas, a) cáscaras deshidratadas, b) pulverizado, c) cocción, d) caldo de fermentación, Lambayeque 2024.*

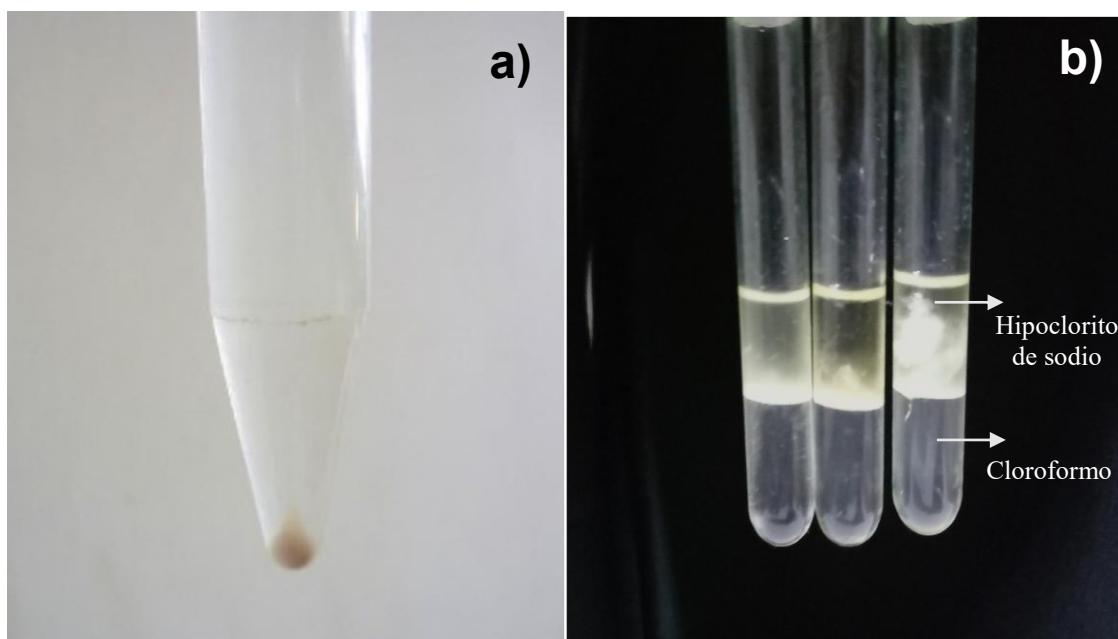
**Tabla 3**

*Caldo de fermentación con tres concentraciones de azúcares de cáscaras de I. batatas, Lambayeque 2024*

Extracto de cáscaras de <i>I. batatas</i>	Agua destilada	Grados Brix (°Bx)	Concentración de sacarosa (%)	g/L
21, 43	278,57	1,0	1,12	11,20
38,57	261,43	1,8	2,011	20,11
57,85	242,15	2,7	3,02	30,22

**Figura 7**

*Biomasa microbiana (a) mezclada con hipoclorito de sodio y cloroformo para la recuperación de polihidroxiclcanoato, Lambayeque 2024.*



La naturaleza del PHA se verificó con un “barrido” en el espectrofotómetro de luz ultravioleta (UNICO S-2150), para la observación del pico máximo de absorbancia a 235 nm (Guzmán et al., 2017).

**e. Identificación a nivel fenotípico y molecular del género y especie del microorganismo con el mayor rendimiento de PHA en azúcares de cáscaras de camote**

La identificación del género del microorganismo con el mayor rendimiento de PHA se realizó con base a la coloración de Gram, forma y color de las colonias, forma de las células, formación de endosporas, las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa, indol, Voges Proskauer, utilización del citrato, rojo de metilo, fermentación de manitol, hidrólisis de la urea, hidrólisis del almidón y las pruebas fisiológicas de rango de tolerancia al NaCl 5-8 % NaCl y pH (Rejisha y Murugan, 2021; Flores et al., 2018; Guzmán et al., 2017; Massilamany et al., 2016). La identificación molecular se realizó en el Laboratorio de Micología y Biotecnología (LMB) de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

**3.5.4 Procesamiento y análisis de datos**

Los valores del rendimiento de PHA obtenido por dos microorganismos en dos fuentes de carbono y tres concentraciones de azúcares de cáscaras de camote fueron analizados para verificar la significancia de la variable en estudio mediante el ANOVA ( $p < 0,05$ ) y establecer las diferencias estadísticas entre ellos mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, ambos con un nivel de confianza de 95 %. Se utilizaron los programas SPSS v.24.1, Excel y Word Office, 2016.

Fueron sometidos a prueba las siguientes hipótesis:

a) Factor microorganismo (A)

$$H_0: \mu A_1 = \mu A_2$$

$$H_1: \mu A_1 \neq \mu A_2$$

b) Factor fuente de carbono (B)

$$H_0: \mu B_1 = \mu B_2$$

$$H_1: \mu B_1 \neq \mu B_2$$



c) Factor concentración de azúcares (C)

$$H_0: \mu C_1 = \mu C_2 = \mu C_3$$

$$H_1: \mu C_1 \neq \mu C_2 \neq \mu C_3$$

d) Interacción microorganismos vs fuente de carbono (A x B)

$$H_0: \mu A_1 (\mu B_1, \mu B_2) = \mu A_2 (\mu B_1, \mu B_2)$$

$$H_1: \mu A_1 (\mu B_1, \mu B_2) \neq \mu A_2 (\mu B_1, \mu B_2)$$

e) Interacción microorganismos vs concentración (A x C)

$$H_0: \mu A_1 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3) = \mu A_2 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3)$$

$$H_1: \mu A_1 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3) \neq \mu A_2 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3)$$

f) Interacción fuente de carbono vs concentración (B x C)

$$H_0: \mu B_1 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3) = \mu B_2 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3)$$

$$H_1: \mu B_1 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3) \neq \mu B_2 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3)$$

g) Interacción microorganismos vs fuente de carbono vs concentración (A x B x C)

$$H_0: \mu A_1 \mu B_1 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3), \mu B_2 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3) = \mu A_2 \mu B_1 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3), \mu B_2 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3)$$

$$H_1: \mu A_1 \mu B_1 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3), \mu B_2 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3) \neq \mu A_2 \mu B_1 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3), \mu B_2 (\mu C_1, \mu C_2, \mu C_3)$$

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Características morfológicas de los microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA aislados de suelo en los humedales de San José, Lambayeque 2023

En las 54 muestras de suelo de las tres zonas de los humedales de San José se aislaron 205 colonias que se desarrollaron en agar nutritivo modificado con 6 % NaCl. Los microorganismos formaron colonias que se agruparon en siete morfotipos, entre los que predominó el morfotipo 1 con 34, 63 % (Tabla 4). El mayor porcentaje de microorganismos se aislaron de la zona gramadal, cuyo suelo se calificó como salino-sódico (Tabla 5). El 61 % de los microorganismos aislados de los humedales se calificaron como halófilos porque crecieron en caldo nutritivo con 6 % NaCl pero no con 0,85 % NaCl. El 39 % de los mismos se calificaron como halotolerantes porque crecieron con 6 % y 0,85 % NaCl (Figura 8).

El 56,35 % de microorganismos halófilos se aisló de la zona de muestreo salicornial y el 56,96 % microorganismos halotolerantes se aislaron de la zona dunas (Tabla 6). En los microorganismos halófilos se diferenciaron los siete morfotipos de colonias (Figura 9) y en los halotolerantes tres morfotipos de colonias. Los microorganismos Gram positivos predominaron y correspondieron al 71 % de los halófilos y 65 % de los halotolerantes (Figuras 10, 11). El 15,12 % de los microorganismos demostraron ser productores y acumuladores de PHA, entre los que el 54,84 % fueron halófilos y 45,16 % halotolerantes (Figuras 12). En ambos microorganismos se observaron los gránulos de color oscuro en el citoplasma rosado de las células y se contaron uno a ocho gránulos por célula (Figuras 13, 14).

Los microorganismos Gram positivos predominaron entre los productores y acumuladores de gránulos de PHA y correspondieron al 52,94 % de los halófilos y 71,43 % de los halotolerantes (Figuras 15, 16). El número de células de microorganismos halófilos con gránulos de PHA fue de 77-198 a las 24 horas; 51-181 a las 36 horas y 27-152 a las 48 horas (Tabla 7). El número de células de microorganismos halotolerantes con gránulos de PHA fue de 32-130 a las 24 horas; 19-169 a las 36 horas y 16-148 a las 48 horas (Tabla 8).

**Tabla 4**

*Frecuencia de microorganismos aislados en agar nutritivo modificado a partir del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023*

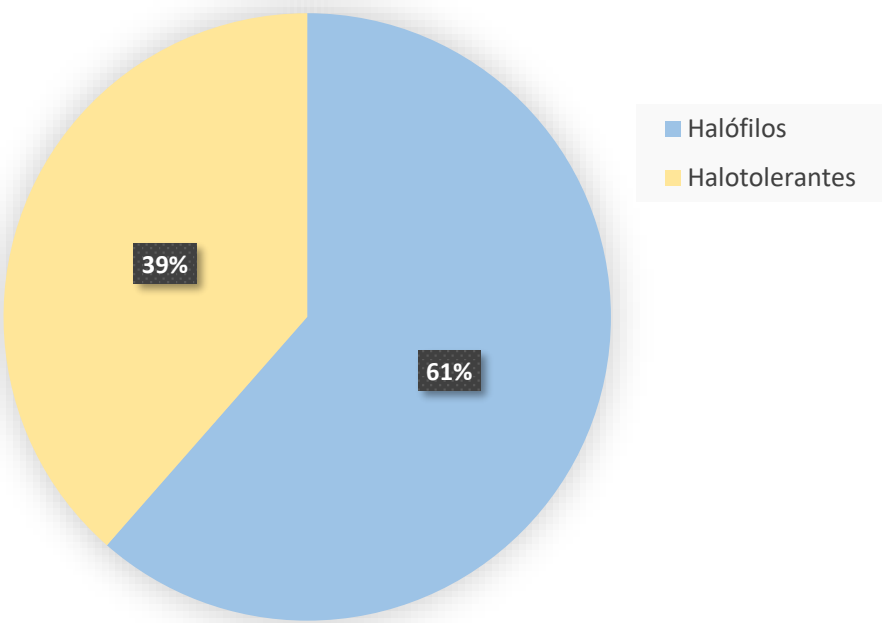
Morfortipos	Características de las colonias de microorganismos					Frecuencia	
	Forma	Borde	Elevación	Aspecto	Color	N°	%
1	Circular	Entero	Convexa	Mucosa	Rosado	71	34,63
2	Irregular	Entero	Convexa	Mucosa	Amarillo	35	17,07
3	Circular	Entero	Convexa	Mucosa	Anaranjado	30	14,63
4	Irregular	Entero	Cóncava	Mucosa	Crema	26	12,69
5	Circular	Entero	Convexa	Pastosa	Rojizo	17	8,29
6	Circular	Entero	Convexa	Pastosa	Traslúcido	17	8,29
7	Circular	Entero	Convexa	Mucosa	Melón	9	4,40
Total						205	100

**Tabla 5**

*Microorganismos aislados en agar nutritivo con 6 % NaCl a partir del suelo de muestreo en Humedales de San José, Lambayeque 2023*

Zona de muestreo en Humedales	Conductividad eléctrica (CEe) dS/m	Porcentaje de sodio intercambiable (PSI) %	Tipo de suelo	Microorganismos aislados	
				N°	%
Dunas	16, 33	14, 20	Salino	37	18,05
Gramadal	44, 34	23, 33	Salino-sódico	104	50,73
Salicornial	97, 44	5, 37	Salino	64	31,22

**Figura 8**  
*Frecuencia de halófilos y halotolerantes en microorganismos aislados de suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.*

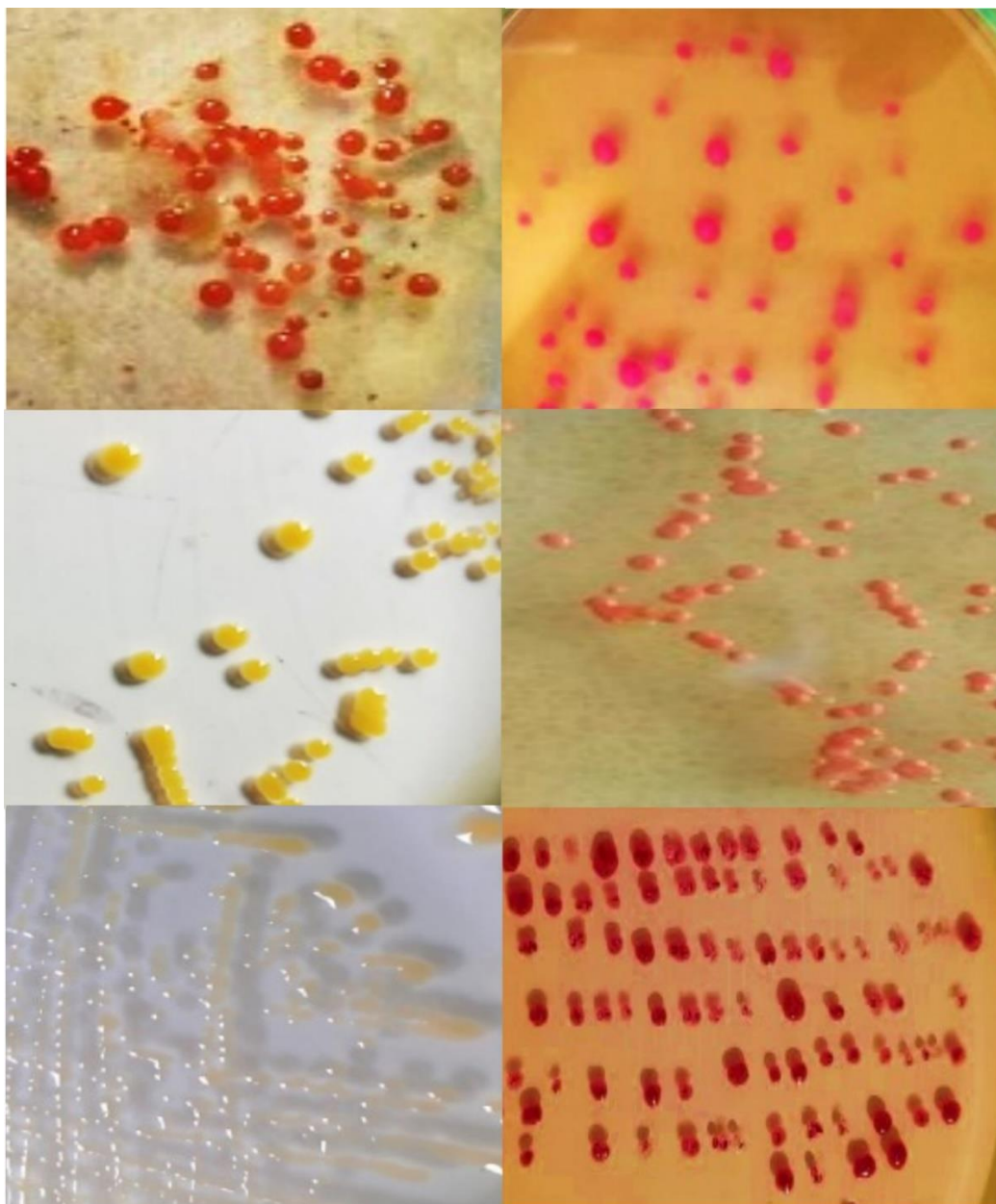


**Tabla 6**  
*Microorganismos halófilos y halotolerantes aislados en el suelo de tres zonas de los Humedales de San José, Lambayeque 2023*

Zona de muestreo en Humedales	Microorganismos			
	Halófilos		Halotolerantes	
	Nº	%	Nº	%
Dunas	22	17,46	45	56,96
Gramadal	33	56,35	24	12,66
Salicornial	71	26,19	10	30,38

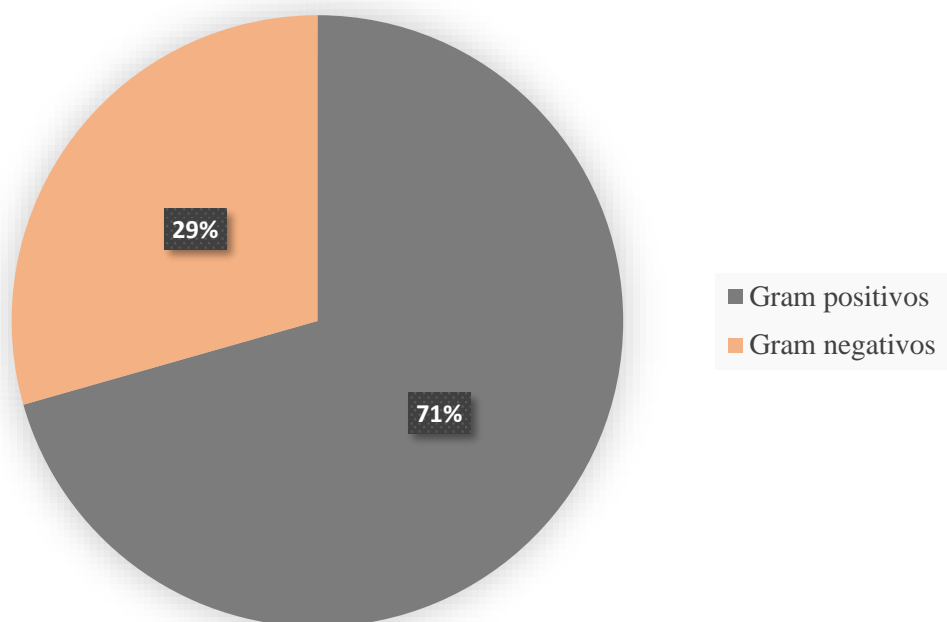
**Figura 9**

*Morfología de colonias de microorganismos halófilos aislados de suelo de los Humedales de San José, Lambayeque 2023.*

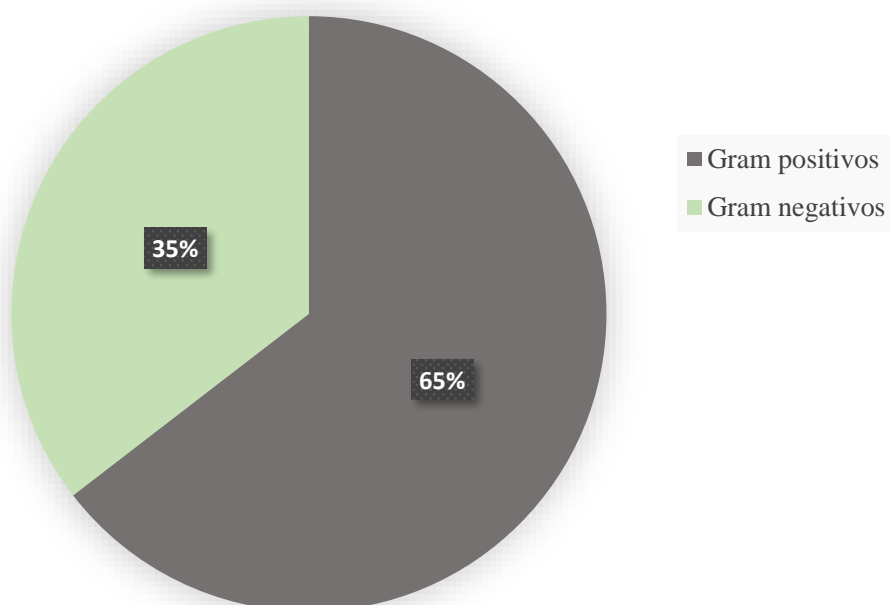


**Figura 10**

*Frecuencia de formas Gram positivas y Gram negativas en los microorganismos halófilos aislados del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.*

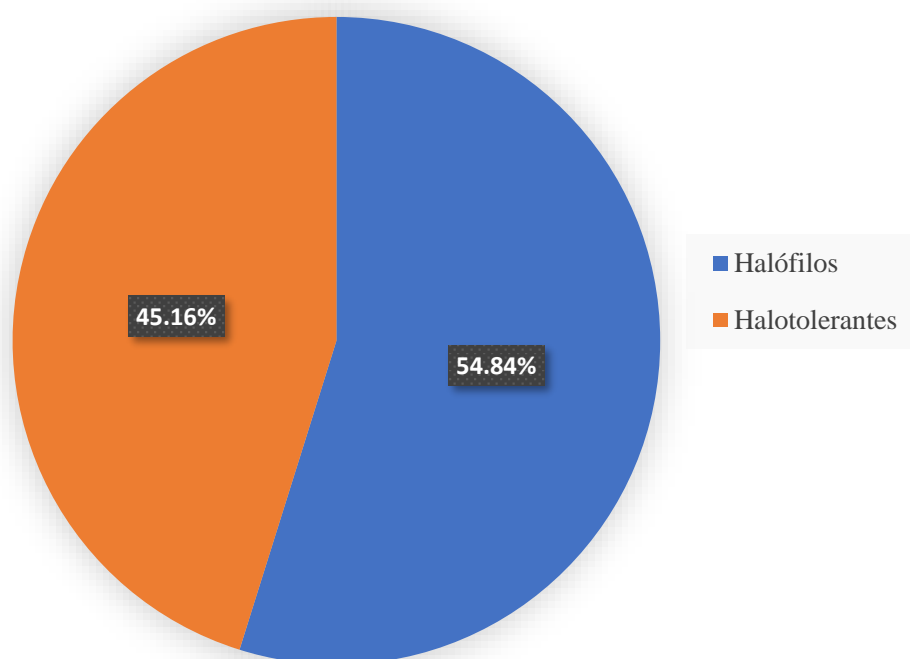
**Figura 11**

*Frecuencia de formas Gram positivas y Gram negativas en los microorganismos halotolerantes aislados del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.*



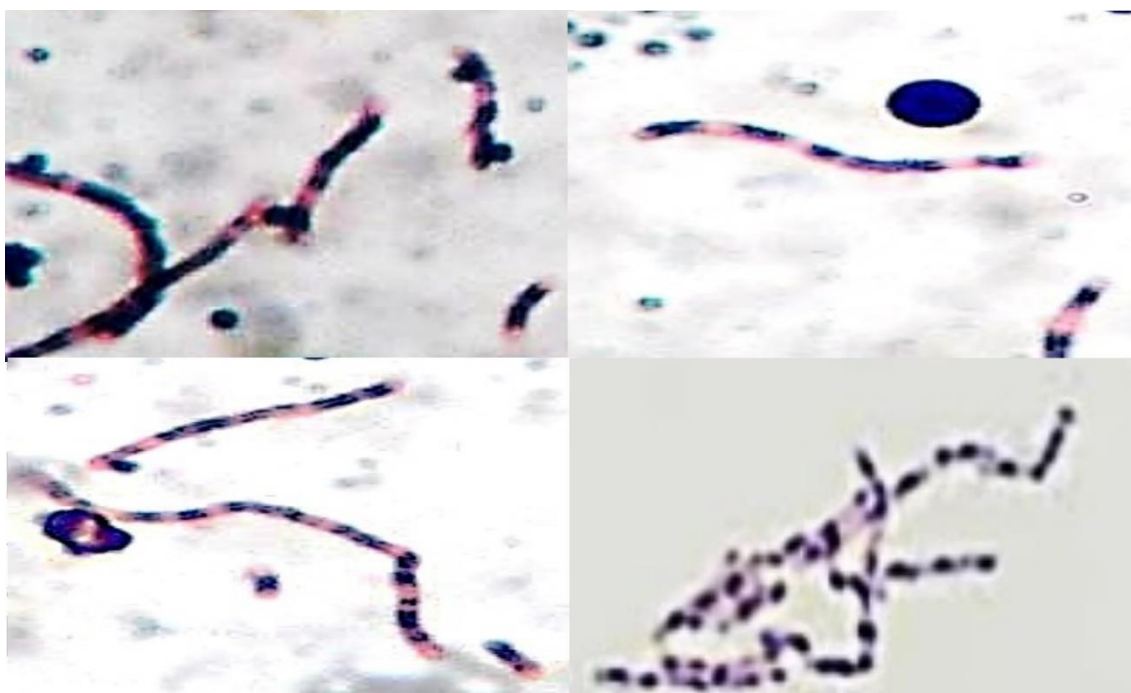
**Figura 12**

*Frecuencia de microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA, Lambayeque 2023.*

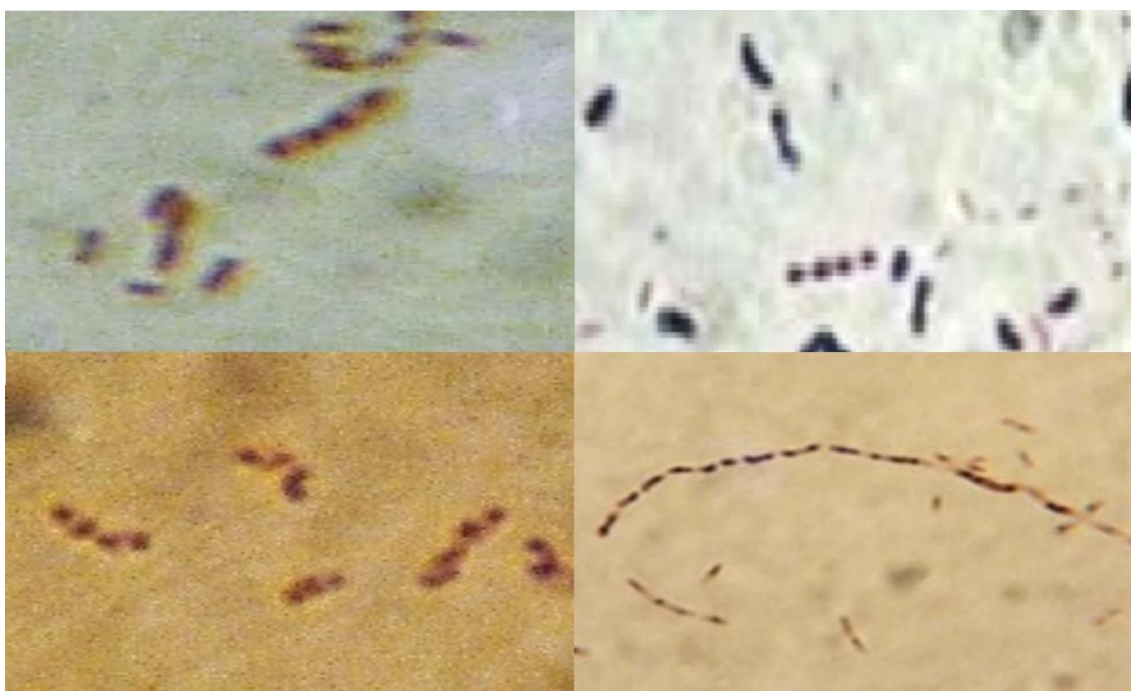


**Figura 13**

*Gránulos de polihidroxialcanoatos teñidos con Sudan Negro B en microorganismos halófilos aislados del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.*

**Figura 14**

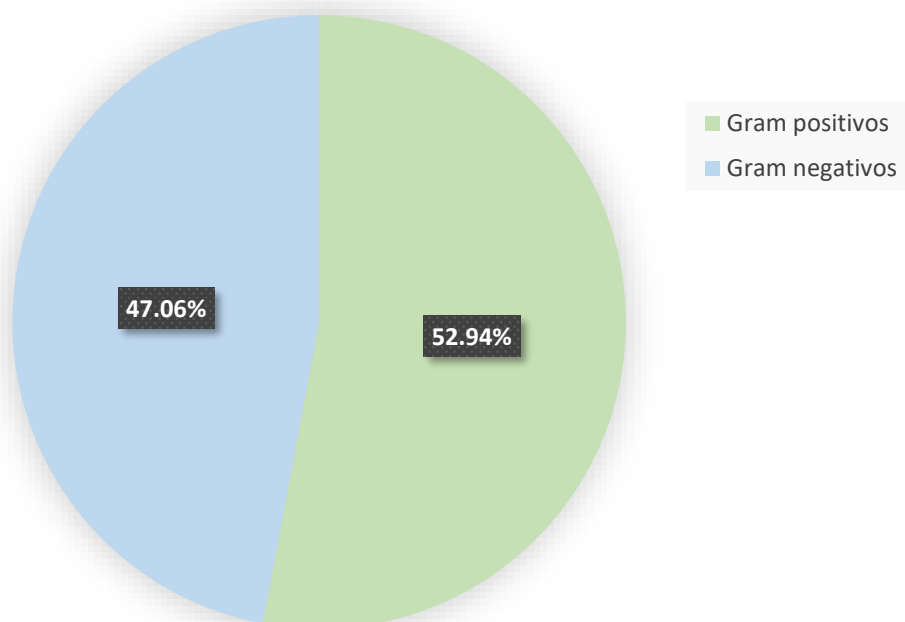
*Gránulos de polihidroxialcanoatos teñidos en Sudan Negro B en microorganismos halotolerantes aislados del suelo de Humedales de San José, Lambayeque 2023.*



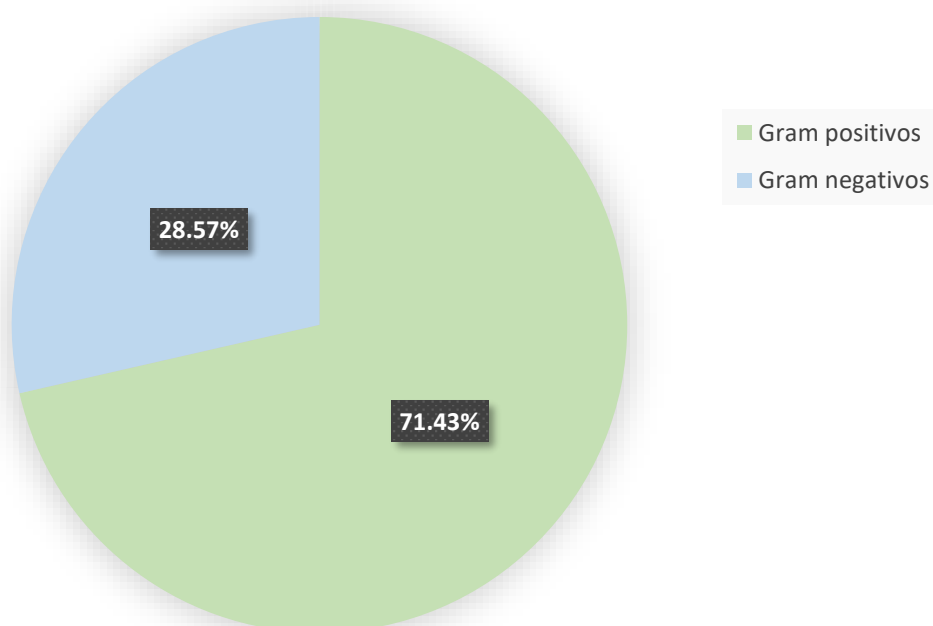


**Figura 15**

*Frecuencia de microorganismos Gram positivos y Gram negativos halófilos acumuladores de gránulos de PHA, Lambayeque 2023.*

**Figura 16**

*Frecuencia de microorganismos Gram positivos y Gram negativos halotolerantes acumuladores de gránulos de PHA, Lambayeque 2023.*



**Tabla 7**

*Número de células con gránulos de polihidroxialcanoatos en microorganismos halófilos Gram positivos y Gram negativos cultivados en glucosa como fuente de carbono durante 24-48 horas, Lambayeque 2023*

Microorganismos halófilos código	Coloración de Gram	Número de células con gránulos/horas		
		24	36	48
Halófilo 40	Gram positivo	198± 1,74	181± 2,51	152± 0,93
Halófilo 12	Gram positivo	187± 2,51	152± 1,74	139± 0,93
Halófilo 05	Gram negativo	179± 1,74	156± 0,93	132± 1,12
Halófilo 29	Gram positivo	177± 2,78	141± 0,93	129± 1,74
Halófilo 15	Gram negativo	163± 2,51	142± 1,12	122± 1,74
Halófilo 03	Gram negativo	149± 3,04	132± 1,74	100± 3,04
Halófilo 07	Gram negativo	147± 2,31	121± 0,93	99± 1,12
Halófilo 31	Gram positivo	143± 1,12	114± 2,51	91± 1,74
Halófilo 18	Gram negativo	132± 2,78	110± 2,51	101± 2,51
Halófilo 04	Gram negativo	130± 0,87	106± 3,04	82± 0,93
Halófilo 11	Gram positivo	126± 1,74	102± 0,93	81± 1,12
Halófilo 10	Gram positivo	121± 2,78	90± 0,93	80± 1,12
Halófilo 22	Gram negativo	115± 2,78	86± 0,93	84± 1,74
Halófilo 19	Gram positivo	104± 2,51	98± 1,12	78± 1,74
Halófilo 27	Gram positivo	83± 3,04	76± 1,74	63± 3,04
Halófilo 32	Gram positivo	80± 1,12	71± 2,51	56± 1,74
Halófilo 28	Gram negativo	77± 2,31	51± 0,93	27± 1,12

\*Promedio de tres repeticiones

**Tabla 8**

*Número de células con gránulos de polihidroxialcanoatos en microorganismos Gram positivos y Gram negativos halotolerantes cultivados en glucosa como fuente de carbono durante 24-48 horas, Lambayeque 2023*

Microorganismos halófilos código	Coloración de Gram	Número de células con gránulos/horas		
		24	36	48
Halotolerante 45	Gram positivo	130± 2,78	169± 0,54	148± 1,51
Halotolerante 50	Gram negativo	121± 2,51	160± 1,74	141± 0,93
Halotolerante 06	Gram positivo	107± 1,74	139± 0,93	132± 1,12
Halotolerante 14	Gram positivo	102± 2,51	135± 0,93	130± 1,74
Halotolerante 19	Gram positivo	99± 2,51	129± 0,54	131± 1,74
Halotolerante 31	Gram positivo	83± 0,94	110± 1,74	115± 1,09
Halotolerante 33	Gram negativo	72± 2,31	104± 0,93	109± 1,12
Halotolerante 28	Gram positivo	69± 1,12	101± 2,51	99± 1,74
Halotolerante 29	Gram positivo	67± 2,78	78± 1,78	80± 2,51
Halotolerante 34	Gram positivo	61± 0,97	56± 1,78	54± 1,93
Halotolerante 02	Gram negativo	54± 1,74	57± 0,93	55± 1,12
Halotolerante 09	Gram positivo	43± 1,78	50± 0,54	48± 1,12
Halotolerante 37	Gram positivo	40± 0,54	38± 0,93	33± 0,54
Halotolerante 30	Gram negativo	32± 0,54	19± 1,12	16± 0,54

\*Promedio de tres repeticiones

Los microorganismos halófilos 40, 12, 5, 29, 15 y halotolerantes 45, 50, 6, 14, 19 que alcanzaron los mayores valores en el número de células con gránulos de PHA se seleccionaron para continuar con la investigación (Tablas 7, 8).

#### **4.2 Microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA seleccionados con base a la cinética de crecimiento en glucosa, Lambayeque 2024**

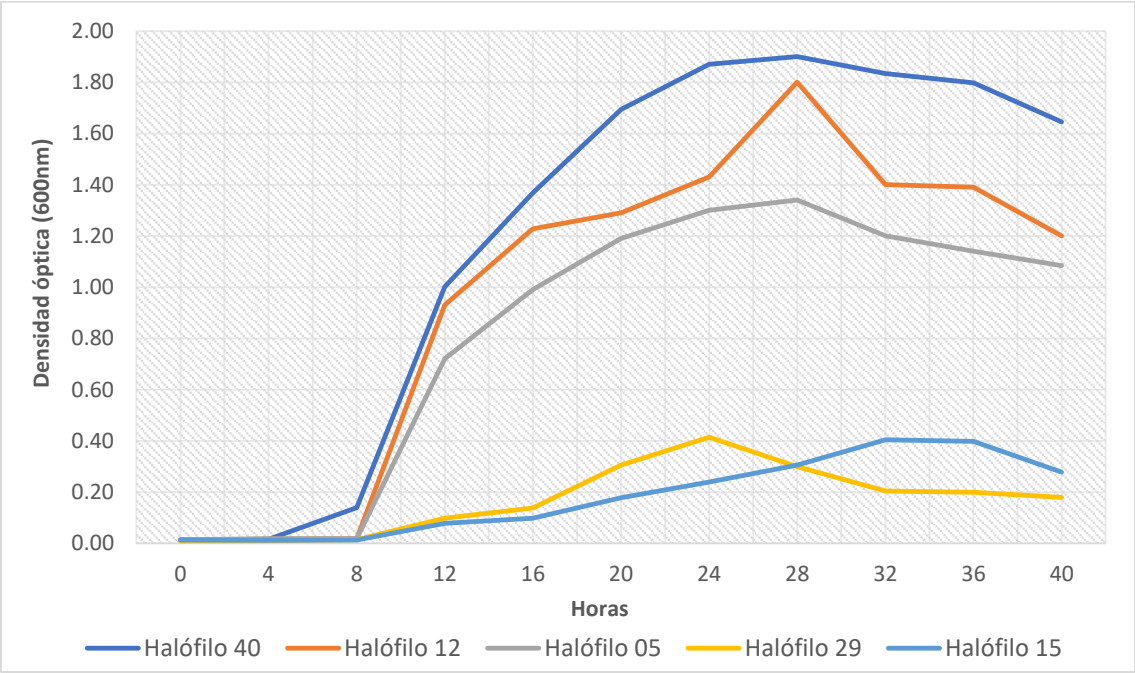
La densidad óptica de caldo HM2 con glucosa como fuente de carbono se incrementó gradualmente hasta alcanzar el valor máximo 1,870 a las 24 horas con el microorganismo halófilo 40; a las 28 horas con los microorganismos halófilos 12 y 5 y 32 horas con los microorganismos halófilos 15 y 29 (Figura 17). Con todos los microorganismos halotolerantes el mayor valor en la densidad óptica (1,091- 1,778) se alcanzó a las 32 horas (Figura 18, anexo 3).

La velocidad específica de crecimiento de la fase exponencial de los microorganismos halófilos fue de 0,2004-0,4196/h, con valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,8309-0,9237 y de los microorganismos halotolerantes fue de 0,2303-0,3284 /h con valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,8883-0,9760 (Tabla 9, figuras 19, 20). Los microorganismos seleccionados fueron el halófilo 40 y el halotolerante 19 debido a que presentaron la mayor velocidad específica de crecimiento con el mayor coeficiente de determinación de 0,9237 (halófilo) y 0,9692 (halotolerante) lo que significa que el 92,37 y 96,92 % de las variaciones en la densidad óptica del caldo cultivado con los dos microorganismos son explicados por el factor tiempo de incubación.

El valor máximo en el número de células con gránulos de PHA en los microorganismos halófilos se alcanzó a las 24 horas (microorganismos 40, 12 y 5), 28 horas (microorganismos 15 y 29) y en los halotolerantes a las 40 horas (microorganismo 19) y 36 horas (microorganismos 45, 6, 14 y 50). Este tiempo fue considerado como óptimo para la producción y acumulación de gránulos de PHA en glucosa y azúcares de cáscaras de camote por dos microorganismos seleccionados. Transcurrido el tiempo en el que se alcanzó el valor máximo en el número de gránulos éste disminuyó en todos los microorganismos (Tabla 10).

**Figura 17**

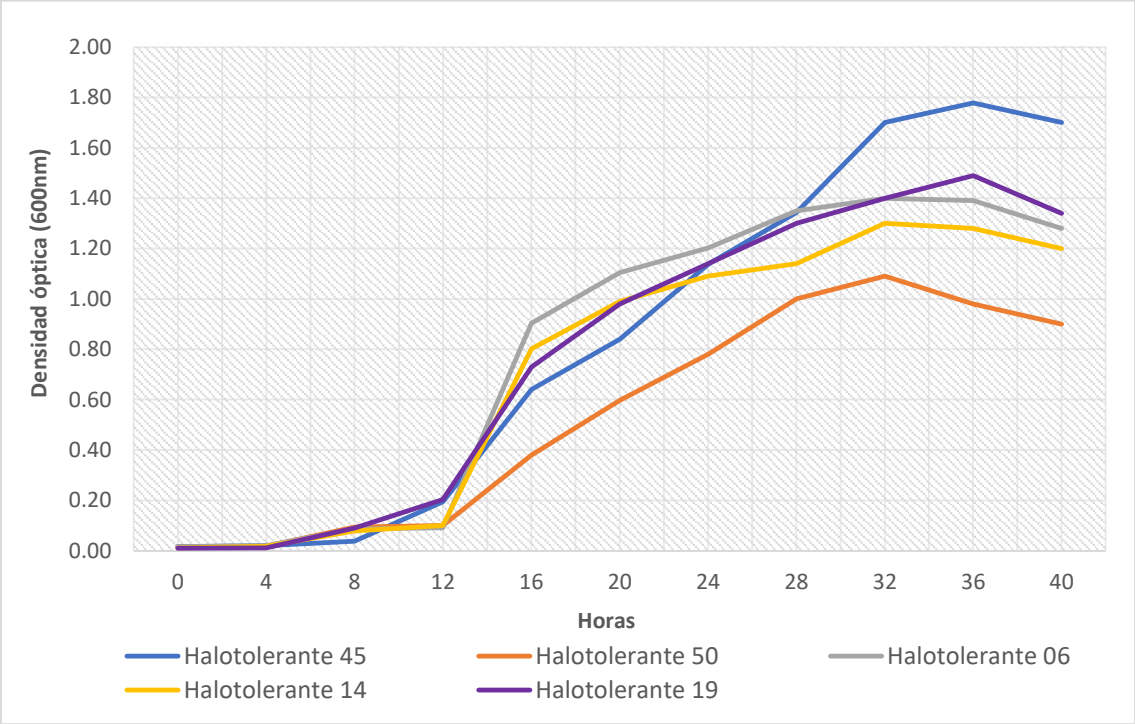
*Densidad óptica (600 nm) del caldo HM2 cultivado con bacterias halófilas acumuladoras de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2024.*



\* Control: medio de cultivo (0,012)/ Temperatura: 30 °C

**Figura 18**

*Densidad óptica (600 nm) del caldo HM2 cultivado con bacterias halotolerantes acumuladoras de gránulos de polihidroxialcanoatos, Lambayeque 2024.*



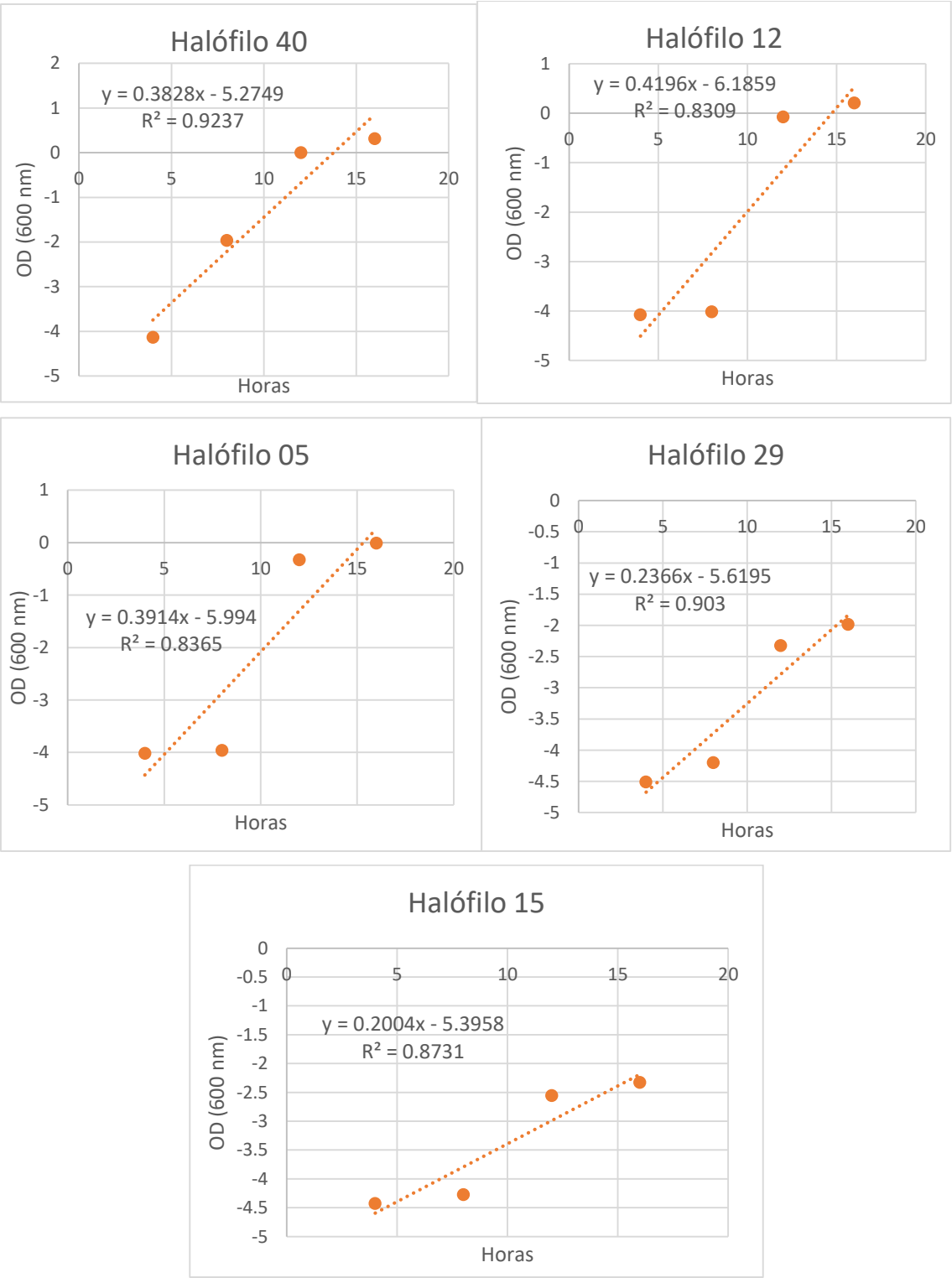
\* Control: medio de cultivo (0,012)/ Temperatura: 30 °C

**Tabla 9**

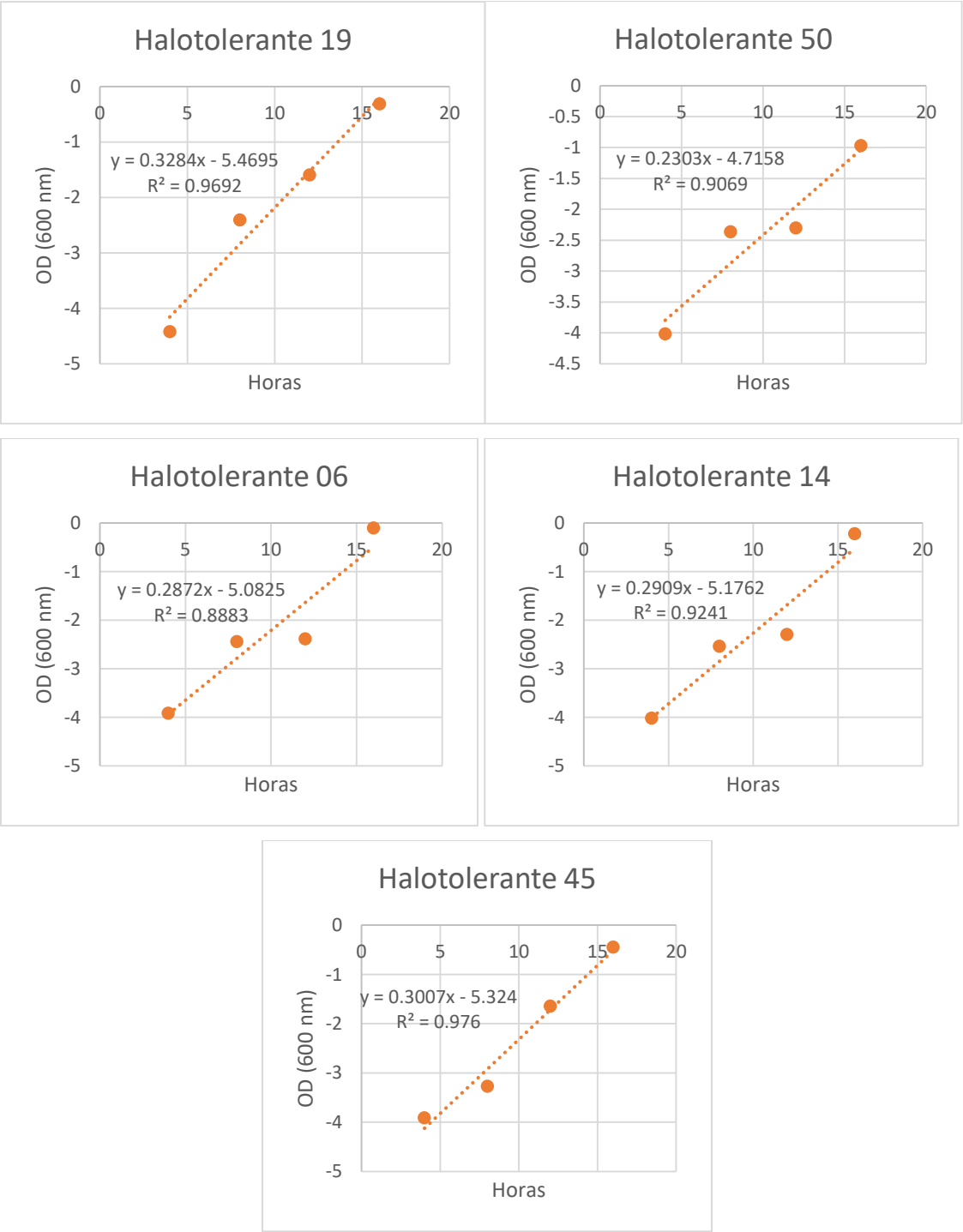
*Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de microorganismos halófilos y halotolerantes productores y acumuladores de gránulos de PHA, Lambayeque 2024*

Microorganismos Códigos	Coloración de Gram	$\mu$ (h)	$R^2$
Halófilo 40	Gram positivo	0,3828	0,9237
Halófilo 12	Gram positivo	0,4196	0,8309
Halófilo 05	Gram negativo	0,3914	0,8365
Halófilo 29	Gram positivo	0,2366	0,9030
Halófilo 15	Gram negativo	0,2004	0,8731
Halotolerante 19	Gram positivo	0,3284	0,9692
Halotolerante 50	Gram negativo	0,2303	0,9069
Halotolerante 06	Gram positivo	0,2872	0,8883
Halotolerante 14	Gram positivo	0,2909	0,9241
Halotolerante 45	Gram positivo	0,3007	0,9760

**Figura 19**  
*Fase exponencial linealizada de microorganismos halófilos con capacidad para producir y acumular gránulos de PHA, Lambayeque 2024.*



**Figura 20**  
*Fase exponencial linealizada de microorganismos halotolerantes con capacidad para producir y acumular gránulos de PHA, Lambayeque 2024.*





**Tabla 10**

*Número de gránulos en microorganismos halófilo y halotolerante cultivados en caldo de fermentación en glucosa como fuente de carbono durante 4- 24 horas.*

Microorganismo	Tiempo/horas											
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44
Halófilo 40	0	15	44	98	170	175	181	171	168	165	148	143
Halófilo 12	0	9	28	80	110	125	143	140	137	131	119	115
Halófilo 5	0	11	40	67	101	108	110	105	99	83	80	73
Halófilo 29	0	7	23	46	55	59	65	69	50	45	43	32
Halófilo 15	0	8	25	37	62	76	80	83	68	65	59	25
Halotolerante 19	0	10	15	39	57	73	91	100	142	144	154	139
Halotolerante 45	0	5	19	29	50	58	70	75	80	84	74	68
Halotolerante 6	0	7	11	28	31	38	60	111	128	138	133	120
Halotolerante 14	0	8	16	18	38	43	57	99	102	115	113	101
Halotolerante 45	0	11	17	23	26	31	38	50	67	72	70	54

#### 4.3 Rendimiento de polihidroxialcanoatos de dos microorganismos halófilo y halotolerante en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de *Ipomoea batatas* L. “camote”

En el proceso fermentativo los mayores valores en la biomasa celular, PHA y rendimiento se alcanzaron con el microorganismo halófilo y la glucosa como fuente de carbono, superando al microorganismo halotolerante y los azúcares de cáscaras de camote (Tabla 11). Con 2,01 % (20,11 g/L) de glucosa se alcanzaron 3,8426 g/L de biomasa celular (X); 3,1970 g/L de PHA (P) y un coeficiente de rendimiento de producto en relación a la biomasa ( $Y_{P/X}$ ) de 0,8360 g/g con un contenido de PHA de 83,60 %, lo que significa que por cada gramo de biomasa se produjeron 0,8360 g de PHA y el 83,60 % de la biomasa deshidratada correspondió al PHA. Con 2,01 % (20,11 g/L) de azúcares de cáscaras de camote se alcanzaron 3,7960 g/L de biomasa celular (X); 3,0826 de PHA (P), un coeficiente de rendimiento ( $Y_{P/X}$ ) de 0,8183 g/g con un contenido de PHA de 81,83 %. Con 2,01 % de glucosa se registraron los mayores valores en el PHA y rendimiento y con 2,01 % de azúcares de cáscaras de camote se registraron los mayores valores en la biomasa, PHA y rendimiento. La naturaleza del polihidroxialcanoato producido (Figura 21) por los microorganismos halófilos y halotolerante en glucosa y azúcares de cáscaras de camote como fuente de carbono se verificó al observar un pico máximo de absorbancia a 235 nm en el espectrofotómetro de luz ultravioleta (Figura 22).

Respecto al rendimiento la prueba “F” del análisis de varianza del factorial 2 x 2 x 3 demostró significancia entre los microorganismos (A), fuente de carbono (B) y concentraciones (C), así como las interacciones A x B, A x C y B x C lo que evidenció que existió efecto de los tratamientos en el rendimiento. No se encontró significancia en la interacción A x B x C (Tabla 12). La prueba de diferencia mínima significativa, DMS ( $p < 0,05$ ) demostró que el mayor rendimiento correspondió al microorganismo halófilo (Tabla 13, figura 23), en el sustrato glucosa (Tabla 14, figura 24). La prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $p < 0,05$ ) demostró que el mayor rendimiento se alcanzó con la concentración 2,01 % (20,11 g/L) con diferencias significativas frente a las demás concentraciones (Tabla 15, figura 25). Respecto a la interacción A x B el mayor rendimiento se alcanzó en el microorganismo halófilo en glucosa (Tabla 16, figura 26), en cuanto a la interacción A x C el mayor rendimiento correspondió al microorganismo halófilo en la concentración 2,01 % (20,11 g/L) de la fuente de carbono (Tabla 17, figura 27) y respecto a la interacción B x C el mayor rendimiento correspondió al sustrato glucosa y la concentración 2,01 % o 20 g/L (Tabla 28, figura 18).

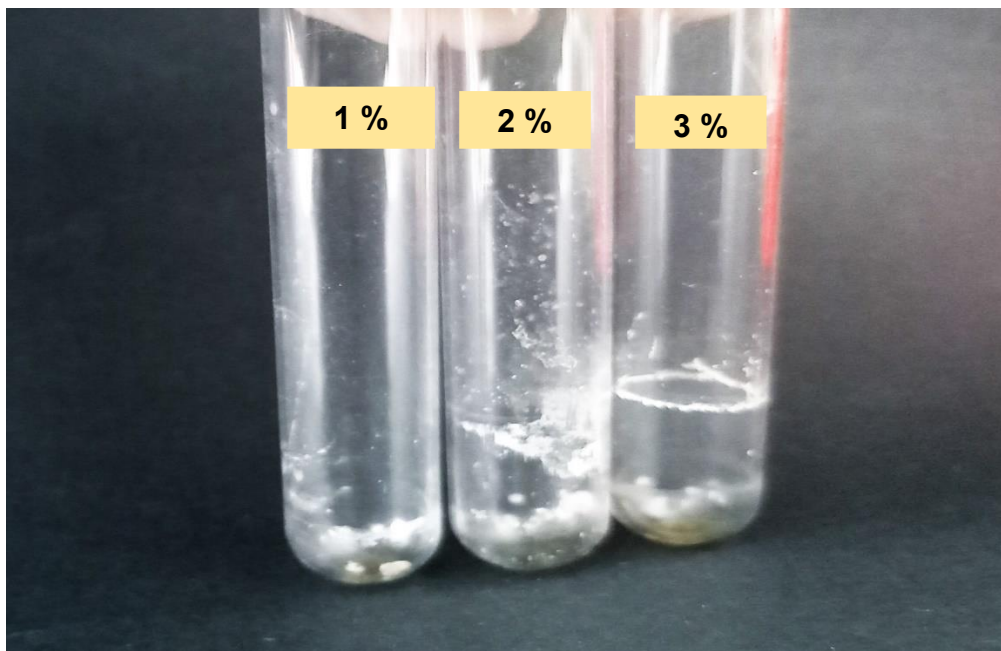
**Tabla 11**

*Biomasa celular, producto y coeficiente de rendimiento de polihidroxialcanoatos por microorganismos halófilo y halotolerante en glucosa y azúcares de cáscaras de I. batatas, como fuente de carbono*

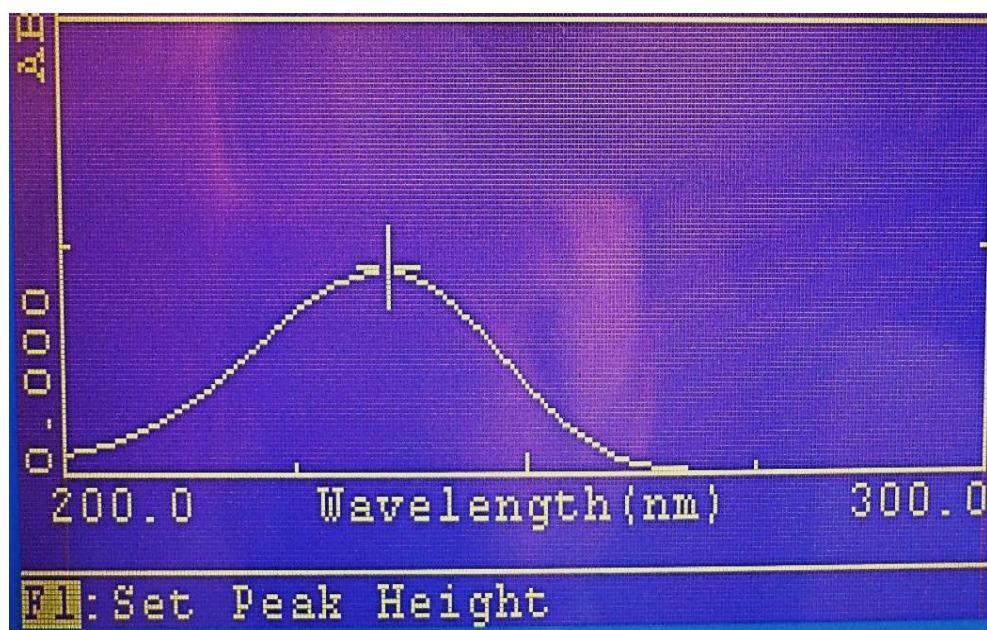
Microorganismo	Fuente de carbono	Concentración (%)	(g/L)	X Biomasa celular (g/L)	P Producto PHA (g/L)	(Y <sub>p/x</sub> ) Rendimiento (g/g)	Contenido (%)
Halófilo 40	Glucosa	1,12	11,2	4,0130	3,0890	0,7698	76,98
Halófilo 40	Glucosa	2,01	20,1	3,8426	3,1970	0,8360	83,60
Halófilo 40	Glucosa	3,02	30,2	3,6073	2,6196	0,7261	72,61
Halotolerante 19	Glucosa	1,12	11,2	3,6860	2,8146	0,7635	76,35
Halotolerante 19	Glucosa	2,01	20,1	3,7960	3,0826	0,8183	81,83
Halotolerante 19	Glucosa	3,02	30,2	4,0170	1,6013	0,3987	39,87
Halófilo 40	Camote	1,12	11,2	3,9026	2,8883	0,7464	74,64
Halófilo 40	Camote	2,01	20,1	3,8230	3,0060	0,7822	78,22
Halófilo 40	Camote	3,02	30,2	2,9530	1,9910	0,6739	67,39
Halotolerante 19	Camote	1,12	11,2	2,6846	1,6933	0,6276	62,76
Halotolerante 19	Camote	2,01	20,1	3,3783	2,1726	0,6431	64,31
Halotolerante 19	Camote	3,02	30,2	3,0963	1,1656	0,3765	37,65

**Figura 21**

*Polihidroxiclcanoato producido por microorganismo halófilo en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de I. batatas como fuente de carbono.*

**Figura 22**

*Pico máximo\* de absorbancia a 235 nm del polihidroxiclcanoato producido por microorganismo halófilo en azúcares de cáscaras de I. batatas como fuente de carbono.*



\*Espectrofotómetro de luz ultravioleta

**Tabla 12**

*Análisis de varianza de los valores del rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por microorganismos halófilos y halotolerantes en dos fuentes de carbono y tres concentraciones de azúcares de cáscaras de I. batatas*

Fuente de variación	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,752 <sup>a</sup>	11	,068	340,600	,000
Intersección	16,670	1	16,670	83087,070	,000
Microorganismos (A)	,204	1	,204	1017,726	,000
Fuente de carbono (B)	,032	1	,032	157,157	,000
Concentración (C)	,347	2	,173	864,083	,000
<b>Interacciones de primer orden</b>					
Interacción A x B	,023	1	,023	116,070	,000
Interacción A x C	,118	2	,059	294,772	,000
Interacción B x C	,027	2	,013	66,735	,000
<b>Interacciones de segundo orden</b>					
Interacción A x B x C	,001	2	,000	2,235	,129 <sup>b</sup>
Error	,005	24	,000		
Total	17,426	36			
Total corregido	,756	35			

a. R al cuadrado = ,994 (R al cuadrado ajustada = ,991)

b.  $p > 0,05$  estadísticamente no significativo

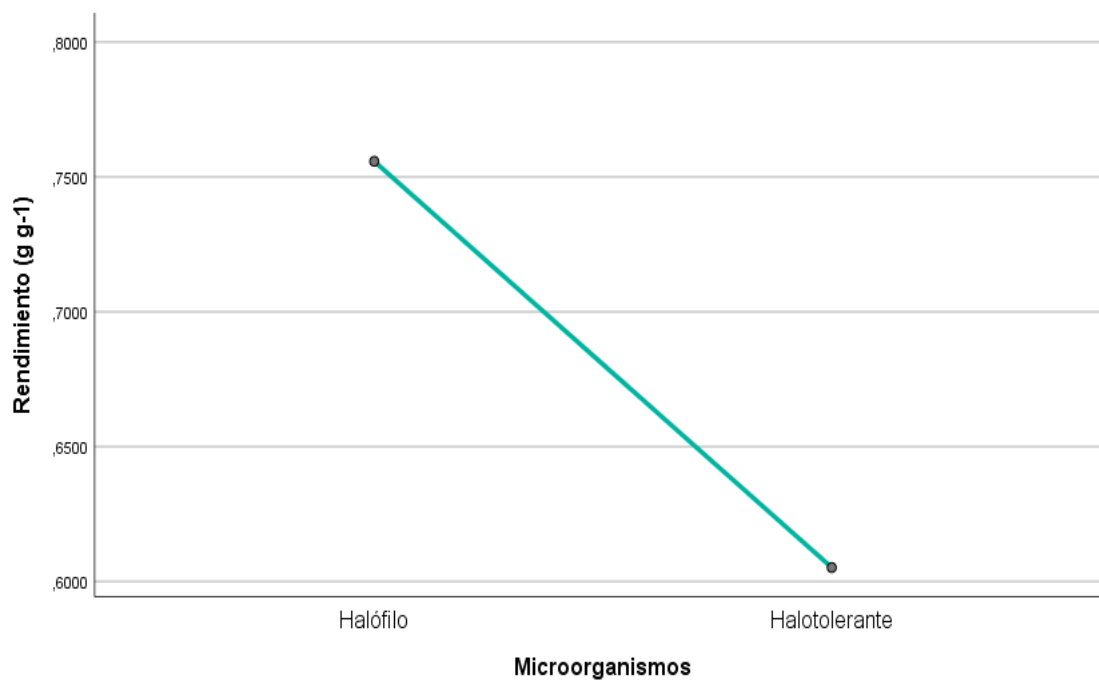
**Tabla 13**

*Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de polihidroxialcanoatos producido por microorganismos halófilos y halotolerante*

(I) Microorganismo	(J) Microorganismo	Diferencias entre		
		medias (I-J)	Desv. Error	Sig.
Halófilo	Halotolerante	0,151	0,027	0,000
Halotolerante	Halófilo	-0,151	0,027	0,000

**Figura 23**

*Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos de microorganismos halófilo y halotolerante.*



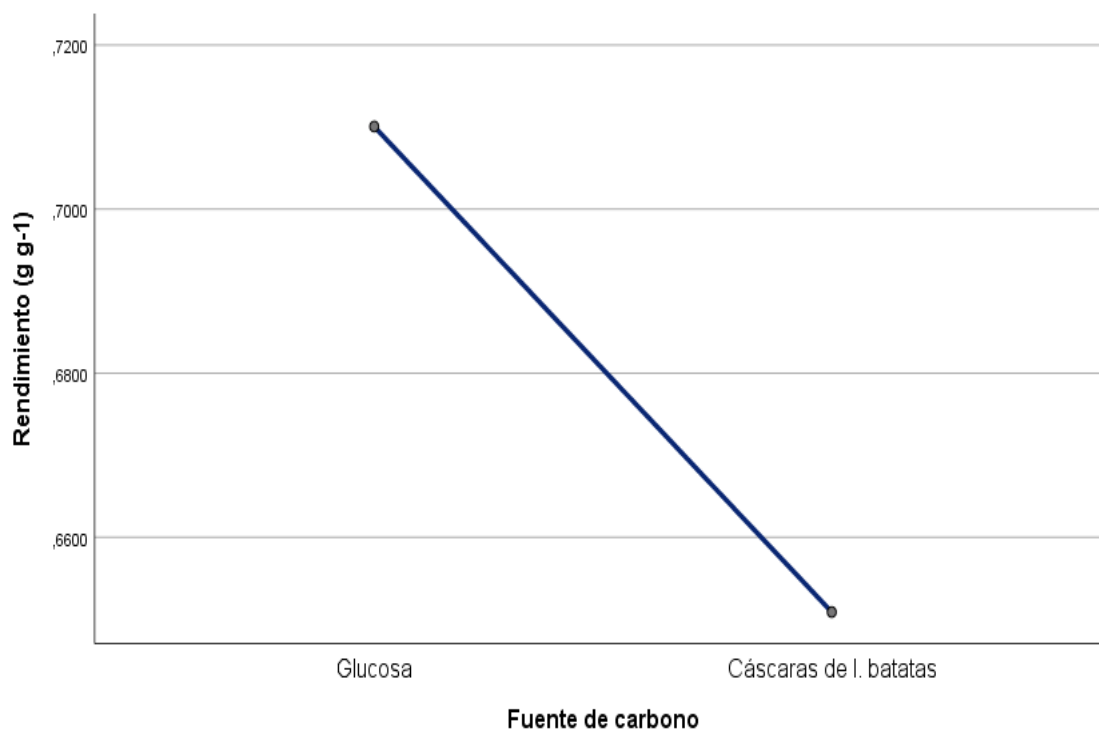
**Tabla 14**

*Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de polihidroxialcanoatos producido en dos fuentes de carbono*

(I) Fuente de carbono	(J) Fuente de carbono	Diferencias entre		
		medias (I-J)	Desv. Error	Sig.
Glucosa	Cáscaras de <i>I. batatas</i>	0,059	0,005	0,000
Cáscaras de <i>I. batatas</i>	Glucosa	-0,059	0,005	0,000

**Figura 24**

*Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos en glucosa y cáscaras *I. batatas* como fuentes de carbono.*



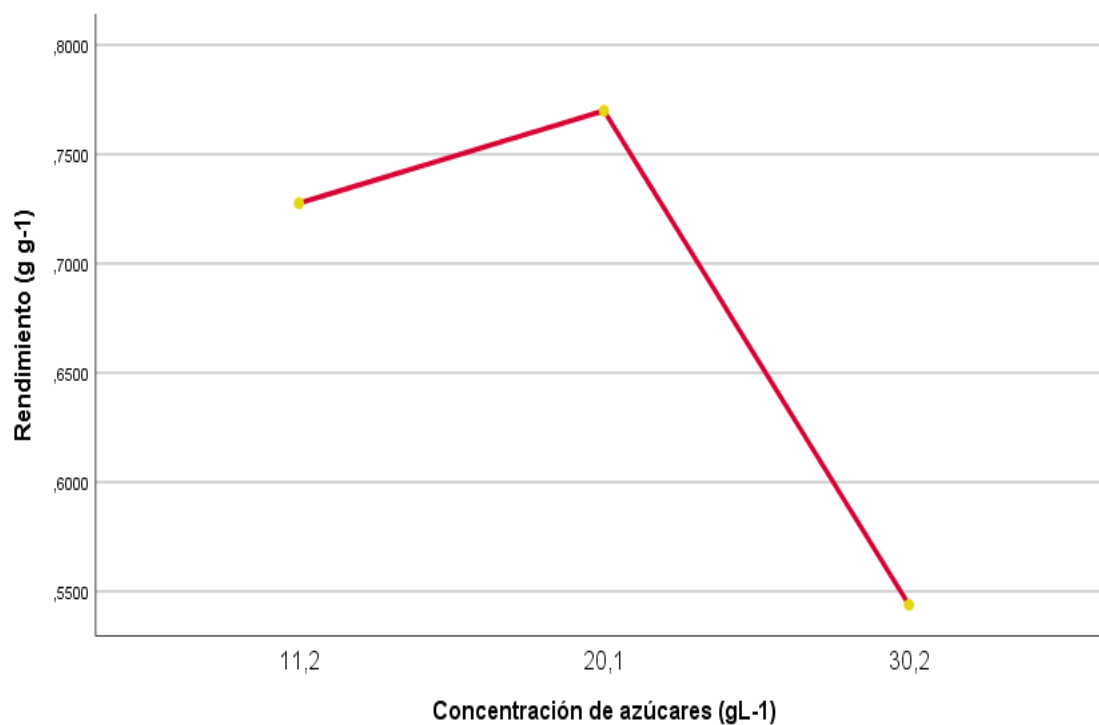
**Tabla 15**

*Prueba de comparaciones múltiples de Tukey del rendimiento de polihidroxicanoatos producido en tres concentraciones de la fuente de carbono*

Concentración		N	Subconjunto			Sig.
(%)	g/L		1	2	3	
3,02	30,2	12	,543850			c
1,12	11,2	12	,727633			b
2,01	20,11	12	,769933			a

**Figura 25**

*Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxicanoatos tres concentraciones de azúcares*





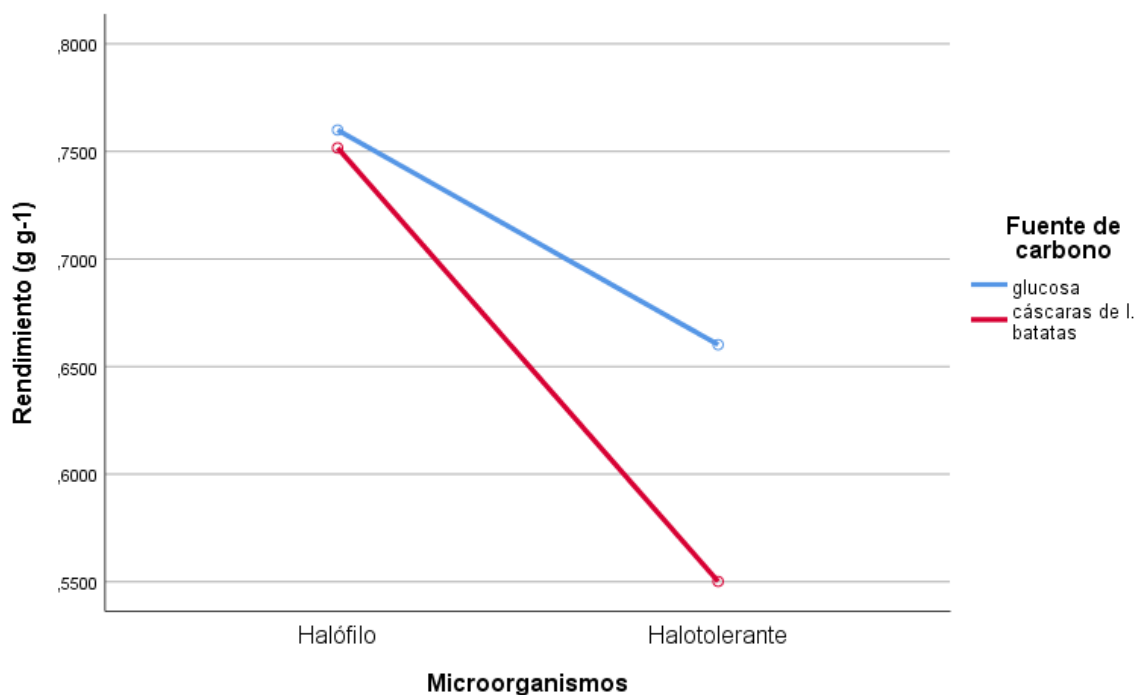
**Tabla 16**

*Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de polihidroxialcanoatos producido por microorganismos halófilos y halotolerante en dos fuentes de carbono*

(I) Microorganismos	(J) Fuente de carbono	Media	Desv. Error	Sig.
Halófilo	Glucosa	0,760	0,005	0,000
	Cáscaras de <i>I. batatas</i>	0,752	0,005	0,000
Halotolerante	Glucosa	0,660	0,005	0,000
	Cáscaras de <i>I. batatas</i>	0,550	0,005	0,000

**Figura 26**

*Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos en la interacción del factor microorganismos (A) y el factor fuente de carbono (B).*



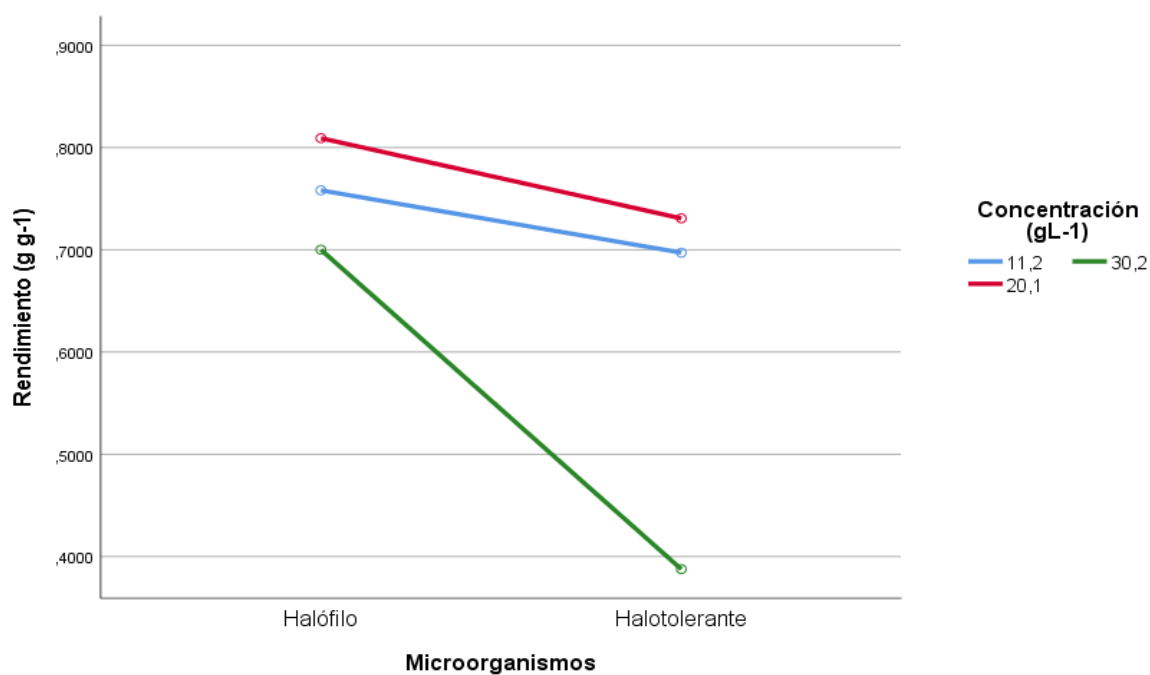
**Tabla 17**

*Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de polihidroxialcanoatos producido por microorganismos halófilos y halotolerante en tres concentraciones de la fuente de carbono*

(I) Microorganismos	(J) Concentración		Media	Desv. Error	Sig.
	(%)	g/L			
Halófilo	1,12	11,2	0,758	0,006	0,000
	2,01	20,1	0,809	0,006	0,000
	3,02	30,2	0,700	0,006	0,000
Halotolerante	1,12	11,2	0,697	0,006	0,000
	2,01	20,1	0,731	0,006	0,000
	3,02	30,2	0,388	0,006	0,000

**Figura 27**

*Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxialcanoatos en la interacción del factor microorganismos (A) y el factor concentración de azúcares (C).*



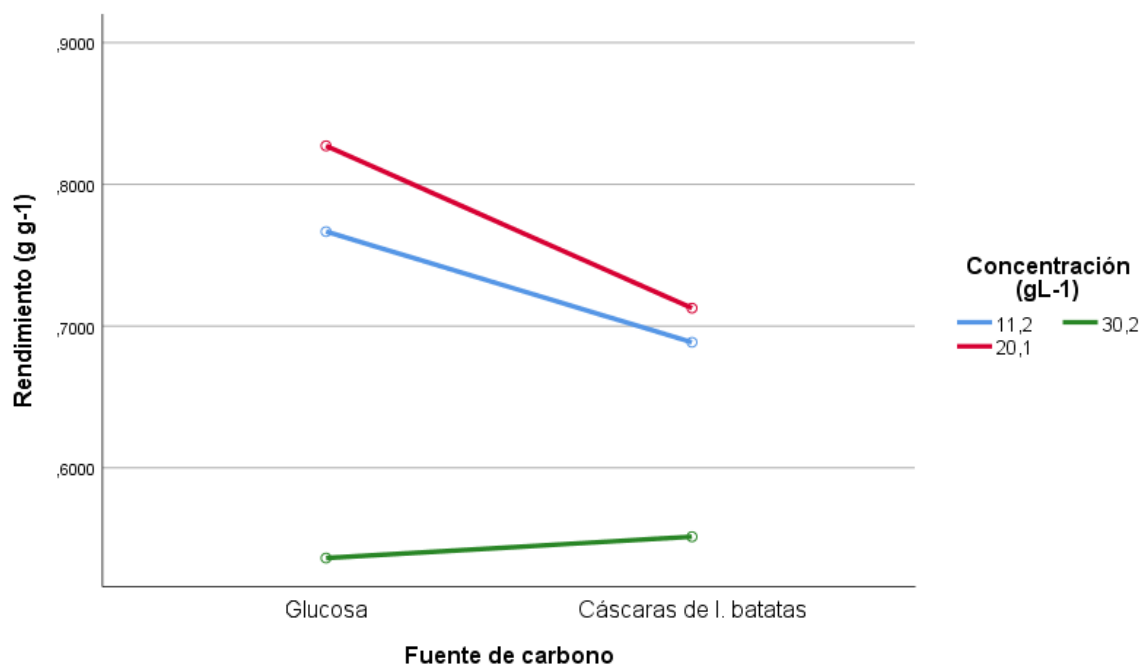
**Tabla 18**

*Prueba de la Diferencia Mínima Significativa (DMS) del rendimiento de polihidroxiclcanoatos producido en dos fuentes de carbono con tres concentraciones*

(I) Concentración					
(%)	(g/L)	(J) Fuente de carbono	Media	Desv. Error	Sig.
1,12	11,2	Glucosa	0,767	0,006	0,000
		Cáscaras de <i>I. batatas</i>	0,689	0,006	0,000
2,01	20,1	Glucosa	0,827	0,006	0,000
		Cáscaras de <i>I. batatas</i>	0,713	0,006	0,000
3,02	30,2	Glucosa	0,536	0,006	0,000
		Cáscaras de <i>I. batatas</i>	0,551	0,006	0,000

**Figura 28**

*Medias marginales estimadas del rendimiento de polihidroxiclcanoatos en la interacción del factor fuente de carbono (B) y el factor concentración de azúcares (C).*



#### 4.4 Identificación fenotípica y molecular del género del microorganismo con el mayor rendimiento de PHA en azúcares de cáscaras de *I. batatas*

La bacteria halófila 40 presentó células bacilares Gram positivas, con esporas no deformantes, catalasa positiva, oxidasa negativa, citrato positivo, rojo de metilo positivo, Voges Proskauer negativo, hidrólisis del almidón positivo, indol negativo, ureasa positiva, manitol positivo, esculina positiva, sorbitol negativo y tolerancia a 8 % NaCl (Anexo 4).

El análisis realizado en el Laboratorio de Micología y Biotecnología (LMB) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Anexo 5), contra las bases de datos nucleotídicos NCBI y EZBioCloud indicaron que la bacteria es *Bacillus infantis* cepa 40, ya que los alineamientos obtenidos contra la secuencia de la región 16S analizada tiene 100 % de identidad en los 782 bp de longitud y sin la presencia de gaps o mismatches.

a) Secuencia consenso: la secuencia consenso de 782 bp de la región 16S obtenida a partir de los dos cromatogramas fue la siguiente:

>16S

```
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAG
CAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTCAG
GGAAGAACAAGTGCCGGAGTAACTGCCGGCACCTTGACGGTACCTGACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGG
ACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACT
GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTA
GTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGG
CTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTCCTGAC
AACCCTAGAGATAGGGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGGATGACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTGATCTTA
```

## V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los humedales con suelos salinos y sódico, la variación estacional de la salinidad y temperatura ejerce una presión selectiva significativa en las poblaciones de organismos y la mayoría presentan gran tolerancia y capacidad de adaptación a las condiciones ambientales adversos. En este contexto, es posible encontrar microorganismos halófilos productores y acumuladores de gránulos de PHA, como mecanismo de sobrevivencia en ambientes desfavorables (Behera et al., 2022)

La diferenciación de microorganismos halófilos y halotolerantes en los suelos salinos y salino sódico coincide con Cantos (2023), quien reportó microorganismos halófilos aislados en agar nutritivo modificado con 5 % NaCl, que desarrollaron en medio líquido con 5 % NaCl. Al respecto, Stanley et al. (2018) concluyeron que los microorganismos halófilos son extremófilos que habitan diversos ambientes salinos y con base a la concentración óptima de NaCl requerida son calificados como débiles (1-5 % NaCl), moderados (5-20 % NaCl) y extremos (20-30 % NaCl), a diferencia de los halotolerantes que pueden crecer con y sin elevado contenido de sal. Los microorganismos halotolerantes pueden tolerar más de 2,5 %NaCl (Daoud y Ben, 2020). Los microorganismos halófilos aislados en el presente estudio fueron calificados como halófilos moderados porque crecieron con 6 % NaCl. Según Rizki et al. (2023) y Tan et al. (2021) estos microorganismos crecen con un amplio rango de contenido de NaCl inclusive mayor de 10 %.

En medios con una menor concentración de NaCl los microorganismos halófilos no crecen o forman muy poca biomasa como lo demostraron Rizki et al. (2023) con 0,01 g/L (1 % NaCl) y 0,19 g/L (5 % NaCl) y El-malek et al. (2020) con una densidad óptica (600 nm) de 1,70 (0,5 %NaCl) y 12,57 (17 % NaCl). Al respecto, Rizki et al. (2023) evaluaron el crecimiento de *Salinivibrio* sp. en 1, 5, 10, 15 y 20 % NaCl y demostraron que 5 % era la concentración óptima con la que se alcanzaron 0,19 g/L de biomasa.

Los microorganismos halófilos requieren al menos 2,5 % NaCl para el crecimiento celular y 4,5 -5 % NaCl para el crecimiento óptimo y producción de polímeros de interés biotecnológico como el PHA. El aislamiento de microorganismos halófilos para investigar la producción de PHA fue realizado previamente en agua de lagos salados (Rizki et al., 2023; El-malek et al., 2020), suelo y residuos vegetales de un lago salino – alcalino (Liu et al., 2021), lodos activados (Li et al., 2021); suelo y agua de salinas (Flores

et al., 2018), agua de salinas (Guzmán et al., 2017) y suelo salino-sódico (Cantos, 2023), ambientes donde la CEE alcanzó hasta 558 dS/m, con un promedio de 27,9 % NaCl (Flores et al., 2018); 25 % NaCl (Guzmán et al., 2017) y 120,67 dS/m con 25,93 % en el PSI (Cantos, 2023).

La predominancia (71 y 65 %) de formas Gram positivas entre los microorganismos halófilos y halotolerantes respectivamente coincide con el reporte de Cantos (2023) quien registró una predominancia de 90 % de Gram positivos en los microorganismos halófilos aislados en agar con 5 % NaCl, porcentaje superior al encontrado en los microorganismos de los humedales (71-65 %). Esta diferencia puede ser explicada por la concentración de NaCl utilizada en el aislamiento, por cuanto los microorganismos halófilos se incluyen en los dominios Bacteria, Archaea y Eukarya; no obstante, la riqueza y la diversidad de las Arquea se incrementa con la salinidad y por lo contrario las especies de Bacteria disminuyen (Canfora et al., 2015).

El porcentaje (15,12 %) de los microorganismos que demostraron ser productores y acumuladores de gránulos de PHA fue superior a 10 % reportado por EL- malek (2020) con bacterias aisladas de agua de un lago salado y 4 % registrado por Liu et al. (2021) en bacterias aisladas de suelo salino. El porcentaje de microorganismos acumuladores de gránulos de PHA fue inferior a 28,8 % de bacterias aisladas de agua de un lago salado (Tao et al., 2021) y 38,74 % de bacterias aisladas de suelo y agua de salinas (Flores et al., 2018).

Los gránulos de PHA se observaron mediante la coloración Sudan negro B, coincidiendo con los reporte de El-malek et al. (2020), Flores et al. (2018) y Guzmán et al. (2017). La coloración con Sudan negro B es la de mayor uso para la detección de gránulos de PHA, los cuales se observan de color oscuro en el fondo rosado del citoplasma celular e inclusive se diferencia la posición y el número de gránulos intracelulares (El-malek et al., 2020). El número máximo de 198 células microbianas con gránulos de PHA fue superior a 76 reportado por Flores et al. (2018) en microorganismos halófilos cultivados con 15-25 % NaCl durante 144 horas, pero fue inferior a 300 células registradas por Altamirano et al. (2021) en bacterias fijadoras de nitrógeno cultivadas por 36 horas.

El número de gránulos de PHA disminuyó conforme transcurrió el tiempo de incubación, debido a que éstos son despolimerizados para ser utilizados como fuente de carbono y energía por los microorganismos productores (García et al., 2020). El PHA es sintetizado por una variedad de microorganismos como un material de reserva en

condiciones adversas como escasez de nutrientes (nitrógeno, fósforo) u oxígeno (Behera et al., 2022) y exceso de carbono (Sagong et al., 2018). Cuando el carbono se agota el PHA es despolimerizado y los productos de la degradación son metabolizados (Behera et al., 2022; Mozejko y Kiewisz, 2016).

El incremento en la densidad óptica ( $DO_{600}$ ) del caldo HM2 cultivado con los microorganismos acumuladores de gránulos de PHA evidenció el crecimiento con formación de biomasa y PHA intracelular con el sustrato glucosa como fuente de carbono. El valor máximo de la  $DO_{600}$  (1,870) superó 1,16 (equivalente a una biomasa de 0,31 g/L) alcanzado por *Salinivibrio* sp. en el sustrato residual constituido por efluentes de la extracción de aceite de palma (Rizki et al., 2023).

La velocidad específica de crecimiento (0,2004 -0,4196/h) de la fase exponencial de los microorganismos halófilos fue mayor que 0,1662 -0,3408/h reportada por Cantos (2023) en microorganismos halófilos aislados de suelo salino-sódico. Se ha demostrado que diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como Arqueas sintetizan y acumulan PHA; sin embargo, la mayoría no puede ser considerada para la producción industrial porque la concentración del polímero es mínima (Mozejko y Kiewisz, 2016). Por esta razón, para seleccionar los microorganismos acumuladores de PHA se utilizan parámetros de la cinética de crecimiento como la velocidad específica. El crecimiento microbiano se califica en función de la cinética de crecimiento que describe una curva en la que se distinguen las fases de latencia, exponencial, estacionaria y de muerte. En la fase exponencial las células están muy activas en el metabolismo, se multiplican en fase logarítmica y en esta fase se determina la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), que permite conocer en que medida un microorganismo aumenta la población y es definida como el cambio en el máximo de células o número de células por unidad de tiempo o rapidez (h) del crecimiento poblacional (Castillo et al., 2022).

El proceso fermentativo para la producción de PHA se realizó con 5 % NaCl al igual que en la investigación de Rizki et al. (2023), quienes evaluaron seis concentraciones de NaCl: 1-20 % y determinaron que 5 % NaCl favoreció en forma significativa la producción de PHA. A diferencia 15 % NaCl fue la mejor concentración para la formación de biomasa. A su vez, la bacteria halófila moderada *Yangia* sp. alcanzó 3,12 g/L de biomasa con 2,5 % NaCl y 3,78 g/L de biomasa con 5 % NaCl, con rendimientos de 664 y 1200 mg PHA/L y contenidos de 21 y 31 % respectivamente (Romero et al., 2021). Por su parte, la bacteria halofílica *Vibrio alginolyticus* se cultivó en 0-90 g/L de NaCl y se determinó que con 30 -50 g/L la biomasa fue mayor de 8 g/L y

con 50 g/L se alcanzaron 5, 8 g/L con 60 % de contenido. Con una concentración mayor de NaCl la biomasa y el PHA disminuyeron con y sin la presencia de NaCl, el crecimiento fue extremadamente pobre y sin PHA acumulado (Li et al., 2021).

La producción de PHA a gran escala requiere superar problemas como el elevado costo de la fuente de carbono (Behera et al., 2022), que es el principal factor limitante de la aplicación industrial (Pandey et al., 2022; Raza et al., 2018) y en promedio representa el 50 % de los costos de producción del biopolímero (Raza et al., 2018). En este contexto, se investigaron los azúcares de las cáscaras de camote, un subproducto agroindustrial, como un sustrato para la producción de PHA a un bajo costo, al igual que en las investigaciones previas de Rizki et al. (2023) con residuos de la extracción de aceite de palma; Dubey y Mishra (2021) y Hammami et al. (2022) con glicerol subproducto de la obtención de biodiésel; Kourilova et al. (2021) con residuos lignocelulósicos hidrolizados y Guzmán et al. (2018) con cáscaras de papa.

La concentración (1,12 %) del sustrato con la que se alcanzó la mayor biomasa celular de los microorganismos halófilos y halotolerante no fue la misma con la que se obtuvo la mayor concentración de PHA, coincidiendo con el reporte de Romero et al. (2021). Estos investigadores demostraron que *Yangia* sp. una halófila moderada cultivada en sacarosa alcanzó 3,63 g/L de biomasa y 1109,6 mg/L de PHA, en comparación con el cultivo en fructuosa donde alcanzó 3,46 g/L de biomasa y 2638,5 mg/L de PHA. El flujo del carbono dirigido a la síntesis de biomasa y no a la producción de PHA explica el mayor peso en la biomasa microbiana (Stanley et al., 2018) y también se puede atribuir a que mayor biomasa genera más acidez como producto del metabolismo condición que desfavorece la síntesis de los biopolímeros como el PHA (Romero et al., 2021). Por lo contrario, Stanley et al. (2018) determinaron una relación positiva entre la biomasa y el PHA de *H. venusta*, la cual cultivada en fructuosa alcanzó 1,933 g/L de biomasa y 0,748 g/L de PHA, en comparación con el cultivo en sacarosa donde alcanzó menos biomasa (1,615 g/L) y menos PHA (0,704 g/L).

La naturaleza del PHA se verificó mediante espectrofotometría con luz ultravioleta y con la técnica utilizada, por la adición de ácido sulfúrico el PHA se convirtió en ácido crotónico, con un valor máximo de absorbancia a 205 nm (Behera et al., 2022), al igual que en la investigación de Altamirano et al. (2021); Flores et al. (2018) y Guzmán et al. (2017).

Los azúcares de cáscaras de camote constituyeron un sustrato de carbono para la producción de PHA; no obstante, los mayores valores en la biomasa celular, PHA y



rendimiento se alcanzaron con la glucosa. Esta superioridad de la glucosa frente a otros sustratos alternativos de bajo costo también fue reportada por Liu et al. (2021) con glicerol subproducto de la obtención de biodiésel y Guzmán et al. (2017) con almidón de cáscaras de papa; sin embargo, también existe investigaciones en las que la producción de PHA en los sustratos alternativos superó a la glucosa. Al respecto, Kourilova et al. (2021) demostraron que *H. halófila* alcanzó 4,75 g/L de PHA en azúcares de residuo lignocelulósico de madera blanda superando 4,59 g/L del polímero obtenido en glucosa como fuente de carbono.

La mayor concentración de PHA (3,1970 g/L) se alcanzó con el microorganismo halófilo 40 cultivado con 2,01 % de glucosa, superando 3,090 g/L con *Halomonas* sp. (Cantos, 2023); 2,39 g/L con *H. elongata* (Liu et al., 2021); 2,91 g/L con *H. cupida* (Liu et al., 2022); 1,201 g/L con *Yangia* sp. (Romero et al., 2021) y 0,866 g/L con *H. venusta* (Stanley et al., 2018); sin embargo, el producto PHA obtenido fue menor a 4,59g/L con *Halomonas halófila* (Kourilova et al., 2021) y 6,84 g/L con *Salinivibrio* sp. (Tao et al., 2021). La producción y acumulación de PHA depende del microorganismo, fuente de carbono, relación carbono: nitrógeno (Stanley et al., 2018), tiempo de incubación (Liu et al., 2021), concentración del sustrato, tamaño de inóculo (Hamammi et al., 2022), pH (El-malek et al., 2020), fuente de nitrógeno y concentración de NaCl entre otros factores (Romero et al., 2020). Por esta razón, es diversa la concentración de PHA obtenida en el proceso fermentativo con bacterias halófilas cultivadas con glucosa como fuente de carbono y se han registrado valores muy extremos como 0,866 g/L (Stanley et al., 2018) a 6,840 g/L (Tao et al., 2021).

El contenido de PHA respecto a la biomasa deshidratada del microorganismo halófilo fue de 83,60 % en glucosa y 81,83 % en azúcares de cáscara de camote, en ambos sustratos superior a 77,52 % con *Salinivibrio* sp. (Tao et al., 2021); 72,75 % alcanzado con *H. halophila* (Hamammi et al., 2021); 72, 35 % con *H. halophila* (Kourilova et al., 2021); 67,0 % con *H. pacifica* (El – malek et al., 2021) y 60, 0 % con *H. bluephagenesis* (Xiao et al., 2021). El contenido de PHA en la biomasa celular es muy importante para que el proceso de extracción del polímero sea económico (Raza et al., 2018). Los gránulos insolubles de PHA pueden constituir el 90 % de la biomasa celular (García et al., 2020) en bacterias recombinantes y con glucosa como sustrato con elevado costo (Tan et al., 2021). En la presente investigación el mayor contenido de PHA (81,83 %) alcanzado con azúcares de cáscaras de camote evidenció la ventaja del sustrato residual para la producción de PHA, así como la del microorganismos halófilo, cuya tolerancia a elevadas

concentraciones de NaCl minimiza los requerimientos de esterilidad, inhibe los contaminantes y su rendimiento puede ser incrementado con la optimización del cultivo y recuperación del producto (Hamammi et al., 2022, Liu et al., 2022; El-malek et al., 2020).

La identificación de *Bacillus* sp. en la bacteria halófila 40 coincide con reportes previos de especies de este género como productoras de PHA (Lee et al., 2022) incluyendo *B. megaterium* (Sachan et al., 2024), *B. altitudinis* (Li et al., 2024), *B. tequilensis* (Yasin y Al- Mayaly, 2021) y *B. cereus* (Yong et al., 2024) entre otras especies. *B. infantis* es una bacteria aislada inicialmente (Massilamany et al., 2016) del agua de mar a 10 m de profundidad y también de suelo (Jeon et al., 2023). Su genoma ha sido secuenciado y está relacionada con especies marinas de los géneros *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Geobacillus* y *Paenibacillus*. El bacilo puede crecer con elevada concentración de sal (8 % NaCl), presenta genes que codifican para factores de virulencia y para la enzima poli (3-hidroxibutirato) polimerasa, requerida para la degradación del bioplástico PHB (Massilamany et al., 2016) y obtención de 3 hidroxibutirato como una fuente de carbono y energía intracelular, bajo condiciones limitadas o desbalanceadas de disponibilidad de nutrientes. Se hipotetiza que la D-polimerasa PHB es utilizada para la sobrevivencia en condiciones desfavorables (Jeon et al., 2023 Massilamany et al., 2016). En este contexto, *Bacillus infantis* 40 tiene potencial para la producción de PHA en residuos de bajo costo como las cáscaras de camote.

## VI. CONCLUSIONES

6.1 En 54 muestras de suelo de los humedales de San José se aislaron 205 microorganismos (61 % halófilos y 39 % halotolerantes) entre los cuales el 15, 12 % demostraron ser productores y acumuladores de gránulos de PHA.

6.2 La densidad óptica (600 nm) por el crecimiento microbiano (30 °C) con glucosa como fuente de carbono fue de 0,180- 1,870 con los microorganismos halófilos y 0,150- 1,778 con los microorganismos halotolerantes. Se seleccionaron los microorganismos halófilo código 40 y halotolerante código 19 por alcanzar los mayores valores en la velocidad específica de crecimiento: 0,3828 y 0,3284 h<sup>-1</sup> respectivamente.

6.3 El rendimiento del PHA del microorganismo halófilo código 40 fue de 2,8883; 3,0060 y 1,9910 g/L en 11, 2; 20, 11 y 30, 22 g/L de azúcares de cáscaras de camote. El rendimiento de PHA del microorganismo halotolerante código 19 fue de 1,6933; 2,1726 y 1,1656 g/L, respectivamente.

6.4 El microorganismo halófilo con el mayor rendimiento de PHA con azúcares de cáscaras de camote se identificó a nivel fenotípico como *Bacillus* sp. cepa 40 y a nivel molecular como *B. infantis* cepa 40.

## VII. RECOMENDACIONES

- 7.1 Caracterizar el PHA producido por *Bacillus infantis* cepa 40 mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), análisis térmico y cromatografía por permeación de gel.
- 7.2 Investigar la producción de PHA por *B. infantis* cepa 40 en 20 g/L de azúcares de cáscaras camote a nivel de biorreactor con flujo de aire continuo.
- 7.3 Comparar la producción de PHA por *B. infantis* cepa 40 en diversos sustratos residuales de las industrias de la región Lambayeque.

## VIII. REFERENCIAS

- Alam, M. (2021). A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam): Revisiting the associated health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 512-529. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.001>
- Ali, S., Elsamahy, T., Al-Tohamy, R., Zhu, D., Mahmoud, Y., Koutra, E., Metwally, A., Kornaros, M., y Sun, J. (2021). Plastic wastes biodegradation: Mechanisms, challenges and future prospects. *The Science of the Total Environment*, 780, 146590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146590>
- Altamirano, L., Ramos, E., Iglesias, S., y Carreño, C. (2021). Potencialidades de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHA) aislados de *Asparagus officinalis* L. (Asparagaceae). *Arnaldoa*, 29 (2), 217-228. <http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.282.28211>
- Arguedas, P., Mora, J., y Sanabria, J. (2015). Comparación del contenido de carotenoides en productos nutraceuticos elaborados a partir de dos variedades de camote y yuca. *Tecnología en Marcha*, 28 (4), 42-53. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v28n4/0379-3982-tem-28-04-00042.pdf>
- Awet, T., Kohl, Y., Meier, F., Straskraba, S., Grun, A., Ruf, T., Jost, C., Drexel, R., Tunc, E., y Emmerling, C. (2018). Effects of polystyrene nanoparticles on the microbiota and functional diversity of enzymes in soil. *Environment Sciences Europe*, 30(11). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0140-6>
- Behera, S., Priyadarshane, M., Vandana, y Das, N. (2022). Polyhydroxyalkanoates, the bioplastics of microbial origin: properties, biochemical synthesis, and their applications. *Chemosphere*, 294, 133723. <https://doi.org/10.1016/j.quimiosfera.2022.133723>
- Canfora, L., Papa, G., Antisari, L., Bazan, G., Dazzi, C. y Benedetti, A. (2015). Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in “extreme” hypersaline soils of a semiarid Mediterranean area. *Applied Soil Ecology*, 93, 120-129. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.014>
- Cantoral, E., Chavez, A., Flores, A. (2020). Nueva variedad de camote (*Ipomoea batatas* L. Lam.) con mejores características agronómicas y comerciales. *Scientia Agropecuaria*, 11(1), 39-48. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.01.05>
- Cantos, J. (2023). *Rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por*

- microorganismos aislados de suelos salino-sódicos en el distrito de San José en Lambayeque, 2019*. [tesis de pregrado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Perú]. <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/11671>
- Castillo, D., Castellanos, R., Valera, A., Lozano, J. (2022). Modelo matemático y velocidad específica de crecimiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en un cultivo líquido en condiciones de laboratorio. *Revista Ciencias Biológicas y Ambientales*, 1(1), 54-61. <https://doi.org/10.33326/29585309.2022.1.1588>
- Chawla, S., Varghese, B., Chithra, A., Hussain, C., Kecili, R., y Mustansar, C. (2022). Environmental impacts of post-consumer plastic wastes: treatment technologies towards eco-sustainability and circular economy. *Chemosphere*, 308, 135867. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135867>
- Daoud, L. y Ben, M. (2020). Halophilic microorganisms: Interesting group of extremophiles with important applications in biotechnology and environment. *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, 51-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818322-9.00005-8>.
- DasSarma, S., y DasSarma, P. (2017). Halophiles. ELS, 1–13. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000394.pub4>
- Deghani, S., More, F., y Akhbarizadeh, R. (2017). Microplastic pollution in deposited urban dust, Tehran metropolis, Iran. *Environment Sciences and Pollution Research*, 24, 20360–20371. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9674-1>
- Díaz, A., Sáenz, L., y Zutta, B. (2021). Formación de un humedal en la costa norte del Perú: estabilidad biofísica y diversidad biológica. *Revista Peruana de Biología*, 28(3), e21132. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v28i3.21132>
- Dubey, S., y Mishra, S. (2021). Efficient production of polyhydroxyalkanoate through halophilic bacteria utilizing algal biodiesel waste residue. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 624859. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.624859>
- El-malek, F., Farag, A., Omar, S., y Khairy, H. (2020). Polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Halomonas pacifica* ASL10 and *Halomonas salifodiane* ASL11 isolated from Mariout salt lakes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1318-1328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.258>
- Flores, A., Idrogo, E., y Carreño, C. (2018). Rendimiento de polihidroxialcanoatos (PHA) en microorganismos halófilos aislados de salinas. *Revista Peruana de Biología*,

- 25(2), 153-160. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v25i2.14249>
- García, J., Distant, F., Storti, G., Moscatelli, D., Morbidelli, M., y Sponchioni, M. (2020). Current trends in the production of biodegradable bioplastics: the case of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology Advances*, 42, 107582. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107582>
- Guclu, G., Melike, M., Aksay, O., Keskin, M., Kelebek, H., y Selli, S. (2023). Comparative elucidation on the phenolic fingerprint, sugars and antioxidant activity of white, orange and purple-fleshed sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) as affected by different cooking methods. *Heliyon*, 9, e18684. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18684>
- Guevara, J., Arroyo, I., Bahena, Y., Román, B., y Vásquez, M. (2020). Suelos salinos: fuente de microorganismos halófilos asociados a plantas y resistentes a metales. *Alianzas y Tendencias*, 5 (17), 29-51. <http://doi.org/10.5281/zenodo.5093123>
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., y Casos, I. (2017). Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. *Scientia Agropecuaria*, 8 (2), 109-118. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03>
- Hammami, K., Souissi, Y., Souii, A., Ouertani, A., El-Hidri, D., Jabberi, M., Chouchane, H., Mosbah, A., Masmoudi, A., Cherif, A., y Neifar, M. (2022). Extremophilic bacterium *Halomonas desertis* G11 as a cell factory for poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate copolymer's production. *Bioengineering and Biotechnology*, 10, 878843. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2022.878843>
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (6ta ed.). Hill Interamericana Editores S.A. Hill. <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>
- Instituto Nacional de estadística e informática, INEI (2020). Perú: Estimaciones y proyecciones de población por departamento, provincia y distrito, 2018 – 2020. [En línea]. Boletín N° 26. Enero 2020. p. 86. [Revisado: 15 de julio de 2024]. Disponible en: [https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1715/libro.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1715/libro.pdf)
- International Potato Center, CIP. (s.f.). Datos y cifras del camote. [Revisado: 15 de julio de 2024]. Disponible en: <https://cipotato.org/es/sweetpotato/sweetpotato-facts-and-figures>

- Ipenza, K. (2021). *Gestión y valorización de residuos en una empresa de elaboración de alimentos del rubro snacks en Lima-Perú, 2019 – 2020*. [tesis de pregrado, Universidad Nacional del Callao, Perú]. <https://repositorio.unac.edu.pe/handle/20.500.12952/6821>
- Jefferson, M. (2019). Whither plastics-petrochemicals, plastics and sustainability in a garbage-riddled world. *Energy Research and Social Science*, 56, 101229. <https://doi.org/10.1016/j.erss.2019.101229>
- Jeon, Y., Jin, H., Kong, Y., Cha, H., Lee, B., Yu, K., Yi, B., Kim, H., Joo, J., Yang, Y., Lee, J., Jung, S., y Park, S. (2023). Poly(3-hydroxybutyrate) Degradation by *Bacillus infantis* sp. Isolated from Soil and Identification of phaZ and bdhA Expressing PHB Depolymerase. *Journal Microbiology Biotechnology*, 33 (8), 1076-1083. <https://doi.org/10.4014/jmb.2303.03013>
- Kaushal, J., Khatrri, M., y Arya, S. (2021). Recent insight into enzymatic degradation of plastics prevalent in the environment: A mini - review. *Cleaner Engineering and Technology*, 100083. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100083>
- Kourilova, X., Novackova, I., Koller, M., y Obruca, S. (2021). Evaluation of mesophilic *Burkholderia sacchari*, thermophilic *Schlegelella thermodepolymerans* and halophilic *Halomonas halophila* for polyhydroxyalkanoates production on model media mimicking lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, 325, 124704. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124704>
- Kutralam-Muniasamy, G., Pérez-Guevara, F., Elizalde-Martínez, I., y Shruti, V. (2020). Review of current trends, advances and analytical challenges for microplastics contamination in Latin America. *Environmental Pollution*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115463>
- Lee, H., Kim, S., Cho, D., Bhatia, S., Gurav, R., Yang, S., Yang, J., Jeon, J., Yoon, J., Choi, K., Yang, Y. (2022). Finding of novel lactate utilizing *Bacillus* sp. YHY22 and its evaluation for polyhydroxybutyrate (PHB) production. *International Journal of Biological Macromolecules*, 201, 653-661. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.025>
- Li, H., Wang, M., Tian, L., y Li, Z. (2021). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Vibrio alginolyticus* strains isolated from salt fields. *Molecules*, 26, 6283. <https://doi.org/10.3390/molecules26206283>
- Li, X., Chen, J., Liu, Y., Fu, S., Zhang, P., Zhang, N., Li, W., y Zhang, H. (2024). Traditional Chinese medicine residue enzymatic hydrolysates for production of



- polyhydroxyalkanoate by newly isolated *Bacillus altitudinis*. *Bioresource Technology*, 394, 130277. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130277>
- Liu, Ch., Wang, X., Yang, H., Liu, Ch., Zhang, Z., y Chen, G. (2021). Biodegradable polyhydroxyalkanoates production from wheat straw by recombinant *Halomonas elongata* A1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 675-682. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.137>
- Liu, Y., Zhao, W., Wang, S., Huo, K., Chen, Y., Guo, H., Wang, S., Liu, R., y Yang, C. (2022). Unsterile production of a polyhydroxyalkanoate copolymer by *Halomonas cupida* J9. *International Journal of Biological Macromolecules*, 223, 240-251. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.275>
- Llumigusín, D. (2018). *Caracterización de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA) utilizando azúcares presentes en residuos agroindustriales*. [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador]. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/29057>
- Massilamany, C., Mohammed, A., Loy, J., Purvis, T., Krishnan, B., Basavalingappa, R., Kelley, C., Guda, C., Barletta, R., Moriyama, E., Smith, T., y Reddy, J. (2016). Whole genomic sequence analysis of *Bacillus infantis*: defining the genetic blueprint of strain NRRL B-14911, an emerging cardiopathogenic microbe. *BMC Genomics*, 17, 511. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2900-2>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego, MIDAGRI. (2024). El camote, uno de los protagonistas en la mesa de todos los peruanos. [Revisado: 15 Julio de 2024]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/904815-midagri-el-camote-uno-de-los-protagonistas-en-la-mesa-de-todos-los-peruanos>
- Ministerio del Ambiente. Humedales en áreas naturales protegidas sitios Ramsar cambio climático [En línea]. Perú. 2019. [Revisado: 17 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.minam.gob.pe/wpcontent/uploads/2019/03/Humedales-en-%C3%81reas-Naturales-Protegidas-sitios-RAMSAR.pdf>
- Mostafa, Y., Alrumman, S., Alamri, S., Otaif, K., Mostafa, M., y Alfaify, A. (2020). Bioplastic (poly-3-hydroxybutyrate) production by the marine bacterium *Pseudodonghicola xiamenensis* through date syrup valoration and structural assessment of the biopolymer. *Scientific Reports*, 10 (1), 8815. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65858-5>.
- Mozejko, J., y Kiewisz, R. (2016). Bacterial polyhydroxyalkanoates: still fabulous?. *Microbiological Research*, 192, 271-282.

- <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>
- Ojha, N., y Das, N. (2020). Process optimization and characterization of polyhydroxyalkanoate copolymers produced by marine *Pichia kudriavzevii* VIT-NN02 using banana peels and chicken feather hydrolysate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101616. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101616>
- Pandey, A., Adama, N., Adjallé, K., y Blais, J. (2022). Sustainable applications of polyhydroxyalkanoates in various fields: A critical review. *International journal of Biological Macromolecules*, 221, 1184-1201. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.098>
- Patel, D., Mamtora, D., Kamath, A., y Shukla, A. (2022). Rogue one: a plastic story. *Marine Pollution Bulletin*, 177, 113509. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113509>
- Pereira, L., Vanz, C., Forlan, P., Mazetti, A., Correa, J., Filiol, M., Haneda, M. (2020). Potential of colored sweet potato genotypes as source of bioactive compounds. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 21 (2). <https://www.redalyc.org/jatsRepo/813/81365122010/81365122010.pdf>
- Pérez, I. (2021). *Efecto del proceso de urbanización en la alteración del humedal La Bocana, San José, durante los años 2000-2021*. [tesis de pregrado, Universidad César Vallejo, Perú]. <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/84373>
- Ramsar (2016). ¿Qué son los humedales? Convención sobre los humedales. Documento informativo N°1, 2pp.
- Raza, Z., Abid, S., y Banat, I. (2018). Polyhydroxyalkanoates: characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 126, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>
- Rejisha, R., y Murugan, M. (2021). Alkaline protease production by halophilic *Bacillus* sp. strain SP II-4 and characterization with special reference to contact lens cleansing. *Materials Today: Proceedings*, 45, 1757-1760. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.08.624>
- Rizki, W., Ratnaningsih, E., y Hertadi, R. (2023). Production of poly-(R)-3-hydroxybutyrate from halophilic bacterium *Salinivibrio* sp. utilizing palm oil mill effluent as a carbon source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47, 102558. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102558>
- Rodríguez, E., Alvítez, E., Pollack, L., Leiva, S., y Gutiérrez, J. (2022). Notas sobre los

- elementos florísticos y estado de conservación de cuatro humedales costeros poco conocidos en la región La Libertad, Perú. *Arnaldoa*, 29 (1), 49-70. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.291.29103>
- Romero, L., Thabet, H., Maghembe, R., Gameiro, D., Van, D., Dishisha, T., y Hatti, R. (2021). Metabolic potential of the moderate halophile *Yangia* sp. ND199 for co-production of polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides. *Microbiology Open*. 10(1), e1160. doi: <http://doi.org/10.1002/mbo3.1160>
- Sachan, R., Devgon, I., Karnwal, A., y Mahmoud, A. (2024). Valorization of sugar extracted from wheat straw for eco-friendly polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Bacillus megaterium* MTCC 453. *Bioresource Technology Reports*, 25, 101770. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2024.101770>
- Sagong, H., Son, H., Choi, S., Lee, S., y Kim, K. (2018). Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 43 (10), 790-805. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.005>
- Stanley, A., Kumar, H., Mutturi, S., y Vijayendra, S. (2018). Fed-Batch strategies for production of PHA using a native isolate of *Halomonas venusta* KT832796 strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184, 935-952. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2601-6>
- Syakti, A., Jaya, J., Rahman, A., Hidayati, N., Raza'i, T., Idris, F., Trenggono, M., Doumenq, P., y Chou, L. (2019). Bleaching and necrosis of staghorn coral (*Acropora formosa*) in laboratory assays: Immediate impact of LDPE microplastics. *Chemosphere*, 228, 528-535. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.156>
- Tan, D., Wang, Y., Tong, Y., y Chen, G. (2021). Grand challenges for industrializing polyhydroxyalkanoates (PHAs). *Trends in Biotechnology*, 39 (9), 953-963. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.010>
- Tao, G., Tan, B., y Li, Z. (2021). Production of polyhydroxyalkanoates by a moderately halophilic bacterium of *Salinivibrio* sp. TGB10. *International Journal of Biological Macromolecules*, 186, 574-579. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.07.038>
- Toledo, S., Aponte, H., y Gil, F. (2023). La conservación de los humedales peruanos: un análisis de su legislación, sanciones y consecuencias. *Revista Kawsaypacha: Sociedad y Medio Ambiente*, 11. <http://dx.doi.org/10.18800/kawsaypacha.202301.a004>

- Vargas, Y., y Pérez, L. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la Calidad del ambiente. *Revista Facultad Ciencias Básicas*, 14(1), 59-72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>
- Vidal, A., Zaucedo, A., y Ramos, M. (2018). Propiedades nutrimentales del camote (*Ipomoea batatas* L.) y sus beneficios en la salud humana. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19 (2). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81357541001>
- Xiao, J., Xu., Y., Lin., Y., Xin., L., y Gou, C. (2021). Hyperproduction of 3-hydroxypropionate by *Halomonas bluephagenesis*. *Nature Communications*, 12, 1513. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21632-3>.
- Xiong, Y., Mo, S., Wu, H., Qu, X., Liu, Y., y Zhou, L. (2023). Influence of human activities and climate change on wetland landscape pattern, A review. *Science of the Total Environment*, 879, 163112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163112>
- Yasin, A., y Al-Mayaly, I. (2021). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) by a newly isolated strain *Bacillus tequilensis* ARY86 using inexpensive carbon source. *Bioresource Technology Reports*, 16, 100846. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100846>
- Yao, Y., Zhang, R., Jia, R., Deng, Y., y Wang, Z. (2023). Impact of different cooking methods on the chemical profile of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) *LWT*, 173, 114288. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114288>
- Yong, T., Musa, M., Abdulla, R., Derman, E., Gansau, J., y Rajin, M. (2024). Synthesis and characterization of bioplastics, Polyhydroxyalkanoates produced from sugarcane bagasse by using *Bacillus cereus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58, 103181. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103181>

## Anexo 1

### Medios de cultivo

**a. Agar nutritivo modificado, AN (Liu et al., 2021; Flores y Benites, 2015)**

Componentes	g/L
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Agar agar	30,0
NaCl	60
Agua destilada csp	1000 mL
pH: 8	

**b. Caldo HM1 modificado (en Romero et al., 2020)**

Componentes	g/L
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,25
KCl	0,05

CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,09
NaBr	0,06
Extracto de levadura	10,00
Glucosa	1,00
NaCl	50,00
Peptona	5,00

pH: 7,0

**c. Caldo HM2 modificado (en Romero et al., 2020)**

Componentes	g/L
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,25
NH <sub>4</sub> Cl	0,25
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,09
KCl	0,50
NaBr	0,06
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
Extracto de levadura	2,0
Glucosa	20,00
NaCl	50,00

pH: 7,0

## ANEXO 2

### Caldo de fermentación con azúcares de cáscaras de *I. batatas*

1. Primer caldo de fermentación con 1, 12 % de concentración de azúcares

#### a. Extracto de cáscaras de *I. batatas*

°Brix inicial: 14° Bx

Volumen final: 300mL

$$C1x V1 = C2x V2$$

$$14 x = 1,0 x 300$$

$$x = 21,43$$

#### b. Concentración de azúcares

$$\rho = 1,12$$

Volumen de la solución= 300 mL

$$w \text{ azúcar} = \frac{^{\circ}\text{Brix} \times w \text{ solución}}{100}$$

$$w \text{ azúcar} = \frac{1 \times 336}{100}$$

$$w \text{ azúcar} = 3,36$$

**c. % de concentración de azúcares**

$$\% \text{ azúcares} = \frac{w \text{ azúcar}}{w \text{ solución}} \times 100$$

$$\% \text{ azúcares} = \frac{3,36}{300} \times 100$$

$$\% \text{ azúcares} = 1,12$$

2. Segundo caldo de fermentación con 2,01 % de concentración de azúcares

**a. Extracto de cáscaras de *I. batatas***

$^{\circ}\text{Brix}$  inicial: 14 $^{\circ}$  Bx

Volumen final: 300mL

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$14 \times x = 1,8 \times 300$$

$$x = 38,57$$

**b. Concentración de azúcares**

$$\rho = 1,12$$

Volumen de la solución = 300 mL

$$w \text{ azúcar} = \frac{^{\circ}\text{Brix} \times w \text{ solución}}{100}$$

$$w \text{ azúcar} = \frac{1,8 \times 336}{100}$$

$$w \text{ azúcar} = 6,048$$

**c. % de concentración de azúcares**

$$\% \text{ azúcares} = \frac{w \text{ azúcar}}{w \text{ solución}} \times 100$$



$$\% \text{ azúcares} = \frac{6,048}{300} \times 100$$

$$\% \text{ azúcares} = 2,01$$

3. Tercer caldo de fermentación con 3,02 % de concentración de azúcares

**a. Extracto de cáscaras de *I. batatas***

°Brix inicial: 14° Bx

Volumen final: 300mL

$$C1x V1 = C2x V2$$

$$14 x = 2,7 x 300$$

$$x = 57,85$$

**b. Concentración de azúcares**

$\rho = 1,12$

Volumen de la solución= 300 mL

$$w \text{ azúcar} = \frac{^{\circ}\text{Brix} \times w \text{ solución}}{100}$$

$$w \text{ azúcar} = \frac{2,7 \times 336}{100}$$

$$w \text{ azúcar} = 9,072$$

**c. % de concentración de azúcares**

$$\% \text{ azúcares} = \frac{w \text{ azúcar}}{w \text{ solución}} \times 100$$

$$\% \text{ azúcares} = \frac{9,072}{300} \times 100$$

$$\% \text{ azúcares} = 3,02$$



### Anexo 3

Densidad óptica de microorganismos halófilos cultivados con glucosa como fuente de carbono

Microorganismos	Horas										
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Halófilo 40	0,014	0,016	0,140	1,002	1,368	1,694	1,870	1,860	1,834	1,798	1,645
Halófilo 12	0,012	0,017	0,018	0,930	1,228	1,290	1,430	1,800	1,400	1,390	1,200
Halófilo 05	0,015	0,018	0,019	0,720	0,990	1,190	1,300	1,340	1,200	1,140	1,084
Halófilo 29	0,010	0,011	0,015	0,098	0,138	0,306	0,415	0,300	0,204	0,200	0,180
Halófilo 15	0,013	0,012	0,014	0,078	0,098	0,178	0,240	0,306	0,404	0,398	0,278

Densidad óptica de microorganismos halófilos cultivados con glucosa como fuente de carbono

Microorganismos	Horas										
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Halotolerante 45	0,017	0,020	0,038	0,194	0,640	0,840	1,138	1,344	1,700	1,778	1,700
Halotolerante 50	0,013	0,018	0,094	0,100	0,380	0,598	0,780	1,000	1,091	0,980	0,900
Halotolerante 06	0,016	0,020	0,087	0,092	0,904	1,104	1,203	1,350	1,400	1,390	1,280
Halotolerante 14	0,012	0,018	0,079	0,101	0,802	0,990	1,090	1,140	1,300	1,280	1,200
Halotolerante 19	0,010	0,012	0,090	0,203	0,730	0,980	1,140	1,300	1,400	1,400	1,340

## Anexo 4

### Identificación fenotípica del halófilo 40

Pruebas/parámetros	Resultado
Color de la colonia	Rosado
Forma	Circular
Elevación	Convexa
Coloración de Gram	+
Morfología de célula	Bacilar
Catalasa	+
Oxidasa	-
Formación de esporas	+
Citrato	+
Ureasa	+
Indol	-
Voges Proskauer	-
Hidrolisis del almidón	+
Manitol	+
Lactosa	-
Esculina	+
Gelatina	-
Sorbitol	-
8 % de NaCl	+/-
pH 6,0	+
pH 5,0	-
(+) presente, (-) ausente	

Anexo 5

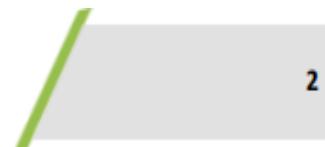


INFORME DE RESULTADOS

Orden de servicio  
N° 04-2024-019

SERVICIO	Servicio de identificación molecular de microorganismos
CLIENTE	Arnaldo Mondragón
DNI	75653015
FECHA DE EMISIÓN DEL INFORME	24 de julio del 2024
RESPONSABLES DEL INFORME	Elaborado por: Luis Gutiérrez Mesías, MSc. Especialistas en Biología Molecular Laboratorio de Micología y Biotecnología
	Revisado por: Ilanit Samolski Klein, PhD. Investigadora Laboratorio de Micología y Biotecnología





### **I. Requerimiento de servicio**

Servicio de identificación molecular de microorganismos.

### **II. Detalle de las muestras recibidas**

Tipo de muestra: Microorganismo

Número de muestras: 01

Característica de la muestra: Microorganismos cultivados en tubos con agar inclinado.

### **III. Método de análisis desarrollados**

- 3.1. Extracción de ADN genómico: Kit purificación de ADN genómico Wizard (Promega) para bacterias y Método de Cenís (1992) para hongos.
- 3.2. Cuantificación de ácidos nucleicos: Cuantificación de ADN genómico (ng/μL) por espectrofotometría (Nanodrop 2000/2000c)
- 3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Amplificación de la región 2 del espaciador transcrito interno (ITS, *Internal transcribed spacer*) utilizando los cebadores universales ITS1-F e ITS4) en el caso de hongos y del gen 16S ARNr utilizando los cebadores universales 27F y 1492F.
- 3.4. Secuenciamiento tipo Sanger del amplicón.
- 3.5. Análisis Bioinformático: utilizando las bases de datos nucleotídicas: NCBI y BOLT en el caso de hongos y NCBI y EZBioCloud en el caso de bacterias.

### **IV. Resultados y discusiones**

Según se observa en la tabla, se obtuvo ADN en cantidad adecuada para su amplificación.

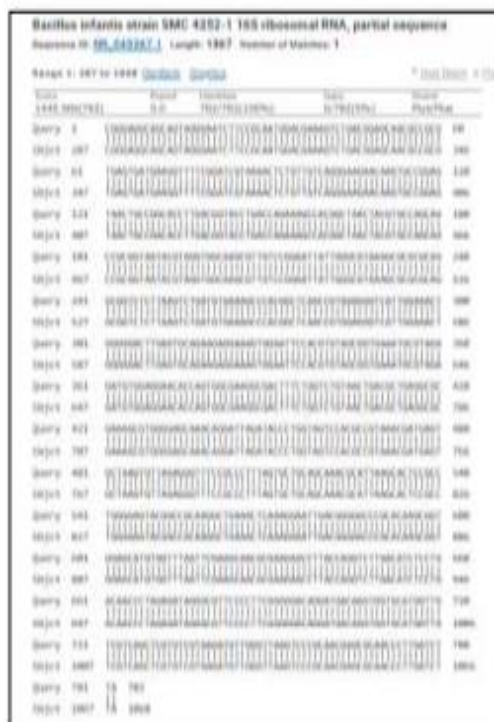
## 1. MUESTRA: 40-b

- a) **Secuencia consenso:** la secuencia consenso de 782 bp de la región 16S obtenida a partir de los dos cromatogramas es la siguiente:

>16S

```
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGATCGTAA
AACTCTGTTGTCAGGGAAGAACAAGTGCCGGAGTAAGTGCCGGCACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTCTCTTAAGTCTGATGTGA
AAGCCACGGCTCAACCGTGAGGGTCATTGGAACTGGGGGACTTGAGTGCAAGAGGAAAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAA
ACAGGATTAGATACCTGTTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAACGCA
TTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACAGGTCTTGACATCTCTGACAACCTAGAGATAGGGCGTTCCTTCGGGGGACAGGATG
ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGATCTTA
```

- b) Alineamientos de la secuencia consenso



Alineamiento de la región 16S consenso contra la base de datos de NCBI.

Rendimiento de microorganismos halófilos y halotolerantes productores de polihidroxiclcanoatos en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de Ipomoea batatas L.

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%	16%	3%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unprg.edu.pe	7%
	Fuente de Internet	
2	hdl.handle.net	4%
	Fuente de Internet	
3	revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
4	docplayer.es	<1%
	Fuente de Internet	
5	Submitted to Universidad Nacional de Costa Rica	<1%
	Trabajo del estudiante	
6	agris.fao.org	<1%
	Fuente de Internet	
7	Submitted to espam	<1%
	Trabajo del estudiante	

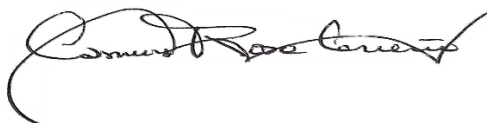
Apellidos y nombres:  
DNI:16494424  
ASESORA



## CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Carmen Rosa Carreño Farfán, asesora de la tesis del Bachiller Arnaldo Vladimir Mondragón Vera, titulada: **Rendimiento de microorganismos halófilos y halotolerantes productores de polihidroxialcanoatos en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de *Ipomoea batatas* L.**, luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud de 16 % verificable en el reporte de similitud del programa TURNITIN. La suscrita analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 13 de noviembre de 2024



---

Apellidos y nombres:

DNI:16494424

ASESORA



## Recibo digital

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

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Arnaldo Vladimir Mondragón Vera  
Título del ejercicio: Quick Submit  
Título de la entrega: Rendimiento de microorganismos halófilos y halotolerantes ...  
Nombre del archivo: tesis\_-arnaldo-finalizada.pdf  
Tamaño del archivo: 2.5M  
Total páginas: 67  
Total de palabras: 16,327  
Total de caracteres: 81,995  
Fecha de entrega: 09-ago.-2024 11:18a. m. (UTC-0500)  
Identificador de la entrega... 2429601531

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON MENCIÓN EN INGENIERÍA AMBIENTAL



### TESIS

Rendimiento de microorganismos halófilos y halotolerantes  
productores de polihidroxialcanoatos en tres concentraciones  
de azúcares de cáscaras de *Ipomoea batatas* L.

Investigador:  
Bach. Arnaldo Vladimir Mondragón Vera

Asesor:  
Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán

Co-asesor:  
Dra. Ada Patricia Barturén Quispe

Lambayeque, 2024

Apellidos y nombres:  
DNI: 16494424  
ASESORA



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA DE SUSTENTACION N° 001-2024-FCCBB-UI

Siendo las 11:00 horas del día 21 de noviembre de 2024, en la Sala de Sustentación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, se reunieron los miembros del jurado designados mediante **Resolución N° 029-2024-FCCBB/D** de fecha 01 de febrero de 2024 conformada por

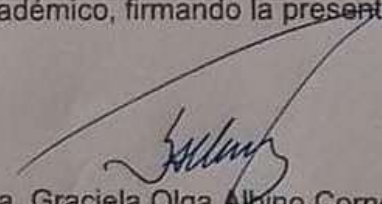
Dra. Graciela Olga Albino Cornejo	Presidente
Dra. Consuelo Rojas Idrogo	Secretaria
MSc. Josefa Escurra Puicon	Vocal
Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán	Asesora

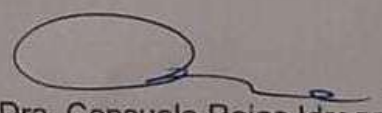
Con la finalidad de evaluar la tesis titulada: **Rendimiento de microorganismos halófilos y halotolerantes productores de polihidroxialcanoatos en tres concentraciones de azúcares de cáscaras de *Ipomoea batatas* L.** presentada por el Tesista **ARNALDO VLADIMIR MONDRAGÓN VERA** sustentación que es autorizada mediante **Resolución N°457-2024-FCCBB/D**, de fecha 19 de noviembre de 2024, que tuvo una duración de 30 minutos.

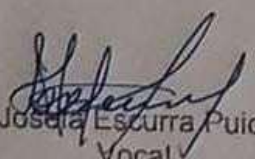
El Presidente del jurado autorizó el acto académico y después de la sustentación los señores miembros del jurado formularon las observaciones y preguntas correspondientes, las mismas que fueron absueltas por el sustentante, quien obtuvo 19.0 puntos que equivale al calificativo de MUY BUENO.

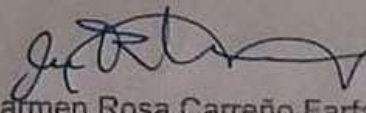
En consecuencia, el sustentante queda apto para obtener el Grado Académico de Maestría en Ciencias con Mención en Ingeniería Ambiental.

Siendo las 12:30 horas del mismo día, se da por concluido el acto académico, firmando la presente acta.

  
Dra. Graciela Olga Albino Cornejo  
Presidenta

  
Dra. Consuelo Rojas Idrogo  
Secretaria

  
MSc. Josefa Escurra Puicon  
Vocal

  
Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán  
Asesora