



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “Determinación de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA’s)
a partir de una cepa de *Bacillus licheniformis* de la fuente geotermal en
Guapán - Ecuador, usando diferentes fuentes de carbono bajo condiciones
de laboratorio.”**

AUTORA: BALSECA PAZ, CRISTINA MELISSA

DIRECTORA: KOCH KAISER, ALMA ROSEL, MSc.

SANGOLQUÍ

2019



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Yo, ALMA KOCH KAISER

Certifico que: El trabajo de titulación "***DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA'S) A PARTIR DE UNA CEPA DE BACILLUS LICHENIFORMIS DE LA FUENTE GEOTERMAL EN GUAPÁN - ECUADOR, USANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO***", fue realizado por la señorita ***Balseca Paz Cristina Melissa***, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido por lo tanto cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, enero del 2019.

Alma Rosel Koch Kaiser, 18, 01, 2019.
Alma Rosel Koch Kaiser, MSc.
C.C. 1708880792



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Balseca Paz Cristina Melissa* declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: *“Determinación de la producción de polihidroxialcanoatos (PHA’s) a partir de una cepa de Bacillus licheniformis de la fuente geotermal en Guapán - Ecuador, usando diferentes fuentes de carbono bajo condiciones de laboratorio”* es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciado las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es verás

Sangolquí, enero del 2019.

Cristina Melissa Balseca Paz
C.C. 171766904-6



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, *Balseca Paz Cristina Melissa* autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: *“Determinación de la producción de Polihidroxialcanoatos (PHA’s) a partir de una cepa de Bacillus licheniformis de la fuente geotermal en Guapán - Ecuador, usando diferentes fuentes de carbono bajo condiciones de laboratorio”* en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, enero del 2019.

Cristina Melissa Balseca Paz
C.C.....171766904-6.....

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres

A David

AGRADECIMIENTO

A Dios

Por la vida, por sus abundantes bendiciones, amor infinito, fortaleza y consuelo en todos los momentos de mi vida.

A mi familia:

A mi amada madre Merceditas quien siempre creyó y confió en mí, gracias por tanto amor, paciencia, ánimo, cuidado y entrega. Gracias a mi amado padre Patricio quién me impulsó a ser mejor, los dos me han apoyado incondicionalmente, sin ustedes este logro jamás habría sido posible.

A mis hermanas Paty y Andre gracias por su presencia en todo momento, por su cariño y comprensión. A Patricio por su generosidad, motivación, palabras de aliento y oportuna ayuda.

A David por su amor, preocupación, fuerza, motivación y apoyo que me ayuda a seguir adelante sin rendirme.

A mis profesores, mentores y amigos:

Almita Koch quien con su ejemplo, conocimiento, dedicación, tiempo, amabilidad y confianza despertó en mí entusiasmo e interés por la investigación. “Nada es más contagioso que el buen ejemplo”.

Andrés Izquierdo quien me dio la oportunidad y apertura para lograr alcanzar con éxito mi trabajo de investigación. Gracias por su apoyo, interés, experiencia y valioso conocimiento.

A Geovani Herrera, Freddy Proaño, Rafael Vargas, Claudia Segovia, Francisco Flores, Linda Guamán, Carlos Barba, Caro, Andre, Sofy, Cami y Bere con quien fue grato compartir momentos de mi vida estudiantil.

Porque la gratitud es la memoria del corazón

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE FIGURAS	ix
LISTADO DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CÁPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del problema	2
1.3. Objetivos de la investigación	5
1.3.1. Objetivo General	5
1.3.2. Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1 Plásticos	6
2.1.1 Composición de los plásticos	6
2.1.2 Degradación de los plásticos	7

2.1.3 Contaminación ambiental producida por plásticos	7
2.2 Plásticos biodegradables.....	8
2.3 Polihidroxicanoatos, plásticos de origen microbiano	8
2.3.1 Clasificación de los polihidroxicanoatos	9
2.3.2 Metabolismo de los polihidroxicanoatos	10
2.4 Producción de polihidroxicanoatos	11
2.5 Producción de polihidroxicanoatos	16
2.6 Aplicaciones de los polihidroxicanoatos	17
2.7. Detección de la acumulación de los polihidroxicanoatos.....	19
2.8 Análisis del producto por espectrofotometría UV	20
2.9. Cuantificación de los polihidroxicanoatos	20
2.9.1 Método espectrofotométrico con negro Sudán	20
2.10 Hipótesis	20
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Revisión bibliográfica	21
3.2 Reactivación de la cepa bacteriana <i>Bacillus licheniformis</i>	21
3.3 Comprobación de acumulación de PHA's	22
3.4 Preparación del inóculo y producción de PHA's	23
3.5 Extracción de PHA's de los aislados.....	23
3.6 Determinación del peso celular	24
3.7 Determinación del rendimiento de PHA's	24

3.8. Análisis espectrofotométrico de PHA producido por la cepa <i>B. licheniformis</i>	24
3.9 Cuantificación de PHA's por espectrofotometría con negro Sudán.....	25
3.9.1 Preparación de los cultivos	25
3.9.2 Ensayo de cuantificación de PHA	25
3.10 Análisis estadístico	26
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	27
4.1 Reactivación de la cepa bacteriana <i>Bacillus licheniformis</i>	27
4.1.1 Comprobación de la pureza de la cepa bacteriana	27
4.2 Comprobación de la acumulación de PHA's.....	28
4.3 Determinación del rendimiento de PHA's	28
4.4 Análisis espectrofotométrico de PHA producido por <i>Bacillus licheniformis</i>	30
4.5 Cuantificación de PHA's por espectrofotometría con negro Sudán.....	32
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	34
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	38
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	39
CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA	40

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Estructura general de los PHA.....	9
Figura 2 Clasificación de las enzimas PHA sintasas	10
Figura 3 Ruta metabólica de síntesis de los polihidroxialcanoatos (P3HB).	11
Figura 4 Acumulación de PHA en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
Figura 5 Planta del yacón. Parte aérea y parte subterránea de la planta.	16
Figura 6 Cepario de microbiología. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.	21
Figura 7 Tinción Gram de la cepa bacteriana <i>Bacillus licheniformis</i> 100X.	27
Figura 8 Rendimiento de PHA por <i>Bacillus licheniformis</i>	29
Figura 9 Rendimiento de PHA producidos por <i>Burkholderia sacchari</i>	29
Figura 10 PHA convertido en ácido crotonico con glucosa y xilosa.	30
Figura 11 PHA convertido en ácido crotonico con sacarosa y almidón.	31
Figura 12 PHA convertido en ácido crotonico con miel de yacón.	31
Figura 13 Concentración de PHA (g/L) por espectrofotometría con diferentes sustratos.	32

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 <i>Usos y aplicaciones de los plásticos</i>	6
Tabla 2 <i>Polihidroxicanoatos más representativos</i>	9
Tabla 3 <i>Polihidroxicanoatos producidos a gran escala</i>	12
Tabla 4 <i>Empresas productoras de polihidroxicanoatos</i>	18
Tabla 5 <i>Evaluación cualitativa de acumulación de PHA's</i>	23
Tabla 6 <i>Tratamientos para la acumulación de PHA's</i>	26
Tabla 7 <i>Evaluación cualitativa de acumulación de PHA's en Bacillus licheniformis</i>	28
Tabla 8 <i>Concentraciones de PHA (g/L) con dos métodos de cuantificación</i>	33

LISTADO DE ABREVIATURAS

PHA	Polihidroxialcanoatos
P3HB	Ácido 3-hidroxiбутírico
3HV	Ácido 3-hidroxiivalérico
3HHx	Ácido 3-hidroxihexanoico
3HO	Ácido 3-hidroxiocetanoico
4HB	Ácido 4-hidroxiбутírico
4HV	Ácido 4-hidroxiivalérico
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
MM	Medio mineral
DCW	Peso seco de la célula
°C	Grados centígrados
OD	Densidad óptica
nm	Nanómetros
NS	Negro Sudán
g	Gramo
L	Litro
mL	Mililitros
μg	Microgramos
pH	Potencial de hidrógeno
RPM	Revoluciones por minuto
ANOVA	Análisis de varianza

RESUMEN

La contaminación ambiental producida por plásticos es insostenible. La generación de polímeros de origen sintético ha aumentado exponencialmente. Los plásticos tardan hasta mil años en descomponerse, están presentes en todos los ecosistemas causando muerte de animales por ingestión, son transportadores de enfermedades y generan bioacumulación en los seres vivos, a tal punto que podemos respirar y comer plástico. Con el fin de contribuir a esta gran problemática mundial, la fabricación de plástico a partir de fuentes renovables es una alternativa. Este estudio determina la producción de polihidroxialcanoatos (PHA's) por una cepa bacteriana termófila *Bacillus licheniformis* aislada de las aguas termales de Guapán - Ecuador, con cinco diferentes fuentes de carbono, bajo condiciones de laboratorio. Se calculó el rendimiento de polihidroxialcanoatos para todas las fuentes de carbono siendo el más alto con glucosa (39,34% PHA), seguido de xilosa (33,94% PHA), almidón (31,89% PHA), sacarosa (30,88% PHA) y miel de yacón (20,3% PHA). Se confirmó que *B. licheniformis* es productora de bioplásticos y es capaz de crecer en una variedad de sustratos incluyendo los menos costosos.

PALABRAS CLAVE:

- **BIOPOLÍMERO**
- **BIODEGRADABLE**
- **CEPA NATIVA**

ABSTRACT

The environmental contamination produced by plastics is unsustainable. The generation of synthetic polymers has increased exponentially. Its degradation takes more than one thousand years; in consequence, plastics are present in all ecosystems causing animals' death by ingestion. These polymers can act as diseases' transporters and generate bioaccumulation, to the point we can breathe and eat plastic. In order to contribute to this great global problem, the manufacture of plastic from renewable sources is an alternative. This study determines the production of polyhydroxyalkanoates (PHA's) by *Bacillus licheniformis*, a thermophilic bacterial strain isolated from Guapán - Ecuador hot springs, using five different carbon sources under laboratory conditions. The yield of polyhydroxyalkanoates was calculated for all carbon sources being the highest glucose (39.34% PHA), followed by xylose (33.94% PHA), starch (31.89% PHA), sucrose (30, 88% PHA) and yacón honey (20.3% PHA). It was confirmed that *B. licheniformis* is a bioplastic producer and it is capable of growing on a variety of substrates including the least expensive ones.

KEY WORDS:

- **BIOPOLIMER**
- **BIODEGRADABLE**
- **NATIVE CEPA**

CÁPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1. Formulación del problema

“La contaminación por plástico está causando daños irreparables al planeta. Lejos de disminuir, este problema se agudiza cada día” (Rojas, 2018). Hasta el año 2017 se elaboraron en el mundo cerca de 8.300 millones de toneladas de plástico; en especial envases, fundas y envolturas, de los cuales solo el 9% se ha reciclado, el 30% sigue en uso y el restante ha sido arrojado al ambiente. La cantidad de plástico producido equivale al peso de un millón de torres Eiffel, con la conclusión, que en el año 2050 habrá más plástico que peces en los océanos (Geyer, Jambeck, & Lavender, 2017). Con respecto a Ecuador, en la ciudad de Quito se generan a diario 1500 toneladas de basura, de las cuales, el 40% corresponde a plásticos (Plaza, 2009). Los desechos plásticos tienen como destino final los océanos con un efecto devastador en la fauna marina, aves y el ser humano. El problema de la elaboración y uso de plásticos radica en que tardan hasta mil años en degradarse según su tipo. Utilizar masivamente un material tan duradero para objetos desechables es un error de consecuencias catastróficas a nivel mundial, contribuyendo directamente al calentamiento global (Estévez, 2013).

Los científicos advierten que la ingesta de plásticos por animales marinos es un problema infravalorado. Los vertederos de plástico representan un grave riesgo en los océanos, cada día mueren animales por enfermedades gastrointestinales, úlceras sangrantes y perforaciones de estómago (EFEverde, 2018). Hasta el momento, se estima que al menos 700 especies de animales han consumido plástico o se han quedado atrapadas en él. Además de tener un impacto negativo en cualquier tipo de ecosistema, se alteran las cadenas tróficas lo que conlleva a la extinción de especies (Daily, 2018).

Los plásticos, materiales que prácticamente no se degradan, se fragmentan en pedazos más pequeños, entre 1 y 5 milímetros, en el océano, suelo, atmósfera e incluso en el agua del grifo (Grun, 2016). Cuando las partículas de plástico se descomponen, se adhieren o adsorben a pesticidas, metales pesados, bacterias patógenas y toxinas. De esta manera, las superficies de los polímeros de tamaño reducido pueden ser peligrosas para la salud y convertirse en fuentes de enfermedades. De los microplásticos se pueden desprender aditivos como los ftalatos y bisfenol A, causantes de cambios hormonales en animales. Investigaciones recientes han encontrado que las partículas de tamaño nanométrico pueden atravesar las membranas celulares; en un caso particular, los nanoplásticos atraviesan la barrera hematoencefálica cambiando el comportamiento de los peces (Aclimaadmin, 2018).

Por tal motivo, no basta con reciclar, reducir y reusar los plásticos, sino más bien eliminarlos o buscar alternativas de fabricación de nuevos polímeros que sean biodegradables. Estas soluciones no son suficientes si no se fomenta la educación ambiental en niños y si los adultos no se comprometen a ser parte de un verdadero cambio, para que cada vez haya menos gente con la cultura de usar y tirar (Greenpeace, 2017).

1.2. Justificación del problema

En la actualidad las investigaciones sobre alternativas amigables para preservar el ambiente han crecido, por tal motivo el desarrollo de nuevas tecnologías debe desempeñar un papel protagónico en la difusión de posibles opciones y soluciones a los grandes problemas y retos para enfrentar ésta crisis ambiental (García & Zubieta, 2010). Existen varias alternativas para disminuir el efecto de los plásticos en el ambiente, una de ellas es la producción de biopolímeros que provienen de fuentes diferentes a las derivadas del petróleo, como bacterias productoras de bioplásticos totalmente biodegradables (Lemos, 2015). Los estudios científicos

se enfocan en el aprovechamiento de recursos que reemplazan aquellos no renovables porque estos causan daños ambientales al ser inadecuadamente utilizados; como por ejemplo, un derrame de petróleo o el largo plazo de biodegradabilidad de los plásticos de origen fósil, los cuales se fragmentan a niveles microscópicos y se transportan a través del ecosistema, potencialmente con graves consecuencias ambientales y de salud (Ramani, 2011).

Los polihidroxicanoatos son acumulados por numerosos microorganismos como material de reserva de carbono, energía y poder reductor (Khanna & Srivastava, 2009). Son considerados fuertes candidatos para el reemplazo de los plásticos de origen petroquímico ya que la materia prima son las bacterias, un recurso renovable. Este tipo de plástico tiene características físicas similares a los plásticos derivados del petróleo. Son termoestables y elásticos (Serrano, 2010) pudiendo ser degradados a dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias y a metano en condiciones anaerobias en hábitats tan diversos como suelo, mar y aguas estancadas (Du, Jian, & Lun, 2001).

Hoy en día los estudios se centran en la búsqueda de estrategias que permitan a los biopolímeros incursionar en la manufactura de productos desechables de uso común así como materiales biomédicos y farmacéuticos (Delgado & Mina, 2015). Se han identificado más de 300 bacterias con la capacidad de acumular bioplásticos en forma de polihidroxicanoatos y aprovechando este mecanismo la empresa pionera Biopol comenzó a comercializar botellas, fibras y artículos desechables que se degradan en menos tiempo (Rojas, 2016). Nuevas ventajas han sido descubiertas de los bioplásticos a partir de bacterias. Son biocompatibles y no tóxicos y por lo tanto es posible utilizarlos en la medicina (Segura, Noguez, & Espín, 2010). Sin embargo, a pesar de los numerosos beneficios de los biopolímeros y aplicaciones tanto para el ser humano como para el ambiente, los costos de producción son muy elevados.

Por este motivo, se están aplicando diferentes mecanismos de operación en la fermentación, sustratos más baratos y nuevas bacterias productoras de bioplásticos para poder obtener un producto de buena calidad y de bajo costo de producción (Malagón, López, & Martínez, 2017).

Con los resultados obtenidos en el proyecto “Análisis y caracterización microbiológica y molecular de la comunidad microbiana en fuentes geotermales del Ecuador”, 2015-PIC-002, financiado por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, bajo la dirección de Andrés Izquierdo, Ph.D se utilizó *Bacillus licheniformis* cepa nativa del Ecuador, de la fuente geotermal “Guapán”, Cañar - Ecuador. La presente investigación propone la producción de bioplásticos totalmente biodegradables a partir de *Bacillus licheniformis* como alternativa para reemplazar los plásticos del petróleo.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo General

Determinar la producción de Polihidroxicanoatos (PHA's) a partir de una cepa de *Bacillus licheniformis* de la fuente geotermal en Guapán - Ecuador, usando diferentes fuentes de carbono bajo condiciones de laboratorio.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Comprobar la acumulación de PHA's de *Bacillus licheniformis* utilizando un medio de cultivo específico como el medio mineral (MM).
- Determinar la producción de PHA's utilizando como fuente de carbono glucosa, xilosa, sacarosa, almidón y miel de yacón para el crecimiento bacteriano.
- Determinar el peso seco para medir el rendimiento de PHA's.
- Analizar el producto obtenido mediante espectrofotometría UV.
- Cuantificar la producción de PHA's producidos en cada tratamiento.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Plásticos

2.1.1 Composición de los plásticos

Los plásticos son polímeros procedentes del petróleo combinados con diferentes aditivos, que le confieren diferentes propiedades como: la textura, resistencia a la temperatura, maleabilidad, estabilidad, brillo, etc. Las diferentes combinaciones dan lugar a distintos tipos de plástico. Los polímeros más usados son el polietileno de alta densidad, policloruro de vinilo y poliestireno (Nieto & Montoto, 2017). A pesar de las preocupaciones ambientales, la presión de la sociedad y el aumento de la conciencia ambiental en todo el mundo se siguen utilizando los plásticos por sus innumerables aplicaciones y bajo costo de producción (Agamuthu, 2005). En la tabla 1 se muestra el nombre de cada plástico con su número de identificación y las diferentes aplicaciones de cada uno

Tabla 1
Usos y aplicaciones de los plásticos

Nombre	Símbolo	No	Principales aplicaciones
Polietilen-tereftalato	PET	1	Envases para bebidas, electrodomésticos, industria textil.
Polietileno de alta densidad	PEAD	2	Envases y empaques, aislantes, industria eléctrica, sector automotriz, entre otros.
Policloruro de vinilo o vinilo	PVC	3	Tubería, botellas, película y lámina, calzado, película, recubrimiento de cable, loseta, etc.
Polietileno de baja densidad	PEBD	4	Películas y bolsas transparentes, tuberías.
Polipropileno	PP	5	Película, rafia, productos médicos, juguetes, recipientes para alimentos, cajas, hieleras, automotriz, electrodomésticos, entre otros.
Poliestireno	PS	6	Envases de productos alimenticios, edificación, carcazas, juguetes, etc.
Otros	Otros	7	—

Fuente: Modificado de Ortiz (2013).

2.1.2 Degradación de los plásticos

Las características que brindan grandes beneficios a los plásticos, tales como resistencia contra los factores ambientales y su tardía degradación biológica, se convierten en las principales desventajas cuando se transforman en residuo (Agamuthu, 2005). El tiempo de degradación del plástico depende del tipo y de las condiciones ambientales a las que se expone (luz solar, oxígeno, agentes mecánicos). En el caso de los océanos, la radiación UV procedente de la luz solar es el principal agente que degrada el plástico. La acción del oleaje acelera este proceso y como resultado los fragmentos más grandes se van rompiendo en trozos más pequeños. Se estima que una botella se descompone en aproximadamente 500 años, los cubiertos tardan 400 años y las bolsas de plástico 55 años. Por lo tanto, acciones que disminuyan el tiempo de descomposición de los plásticos son imprescindibles (Greenpeace, 2016).

2.1.3 Contaminación ambiental producida por plásticos

El plástico ha pasado a formar parte de nuestra vida diaria. Está en todo tipo de objetos y materiales por sus características de maleabilidad, durabilidad, ligereza y sobre todo bajo precio. Los residuos de plástico se han incrementado de forma dramática, por su volumen pueden llegar a tener impacto sobre los cuerpos de agua y suelo. Ocho millones de toneladas de plásticos acaban en los mares y océanos anualmente formando el 60-80% de la basura marina (Gilberto, 2002). Son una amenaza para los ecosistemas de agua dulce y salada; más que un problema estético, es un peligro para los organismos marinos que sufren daño por ingestión (Ocampo & Elda, 2007). En el Ecuador, los residuos plásticos representan el 34.08% del total de basura que desechan los hogares y forman parte de la basura marina que afecta a los ecosistemas acuáticos (ENEMDU, 2016).

2.1.3.1 Microplásticos

La preocupación actual a nivel mundial es la disminución de los residuos plásticos que debido a su degradación dan lugar a los microplásticos, definidos como partículas plásticas de dimensiones comprendidas entre unos cuantos micrómetros hasta cinco milímetros los cuales son confundidos como microplancton y son ingeridos por organismos marinos (Hidalgo, 2015). Si se consume mariscos con microplásticos éstos pueden causar problemas en el desarrollo del feto, daño al hígado, riñón y producir ciertos tipos de cáncer (Greenpeace, 2016).

2.2 Plásticos biodegradables

Los plásticos biodegradables, bioplásticos o biopolímeros tienen propiedades fisicoquímicas y termoplásticas similares a las de los polímeros fabricados a partir de petróleo, con la diferencia que una vez desechados, se biodegradan en poco tiempo (Bueno & Molina, 2016). Los biopolímeros naturales se pueden obtener de cuatro fuentes: origen animal (colágeno, gelatina) ; marino (quitina, quitosan) ; agrícola (lípidos, proteínas, polisacáridos) y finalmente microbiano (ácido poliláctico, PLA) y polihidroxialcanoatos (PHA) (Gallur, 2010).

2.3 Polihidroxialcanoatos, plásticos de origen microbiano

Los PHA son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos o poliésteres lineales (R)-3-hidroxiácidos. En estas estructuras, el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (figura 1). Algunas bacterias, arqueas y microalgas pueden acumular biopolímeros en su interior como reserva y energía bajo condiciones desfavorables que pueden ser limitaciones de oxígeno, nitrógeno, magnesio y azufre (González, Meza, González, & Córdova, 2013).

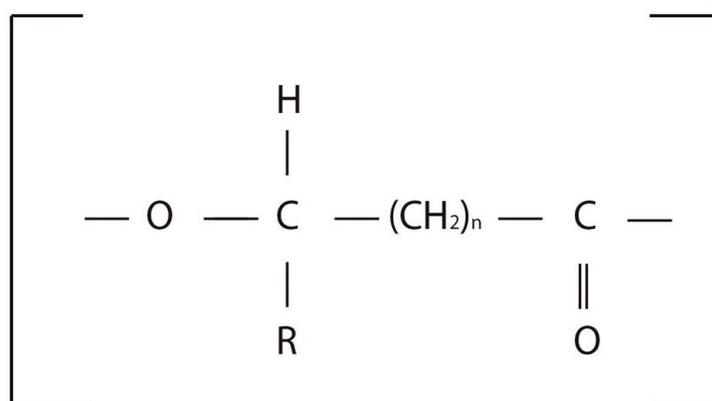


Figura 1 Estructura general de los PHA

Fuente: (Lee, 1996)

El valor de n depende del grupo R y del microorganismo que acumula el biopolímero, este puede variar entre 100 y 30000 (Lee S, 1996). En la tabla 2 se evidencia las sustituciones más frecuentes del grupo radical con el nombre del polímero (Andler & Díaz, 2013).

Tabla 2

Polihidroxialcanoatos más representativos

Grupo R	Nombre del Polímero	Abreviación
CH ₃	Poli(3-hidroxi butirato)	P3HB
CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxi valerato)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxi hexanoato)	PHHx

Fuente: Modificado de Andler y Díaz (2013).

2.3.1 Clasificación de los polihidroxialcanoatos

Los polihidroxialcanoatos se clasifican dependiendo de la naturaleza de sus unidades monoméricas. Cuando el polímero está formado por un solo tipo de unidades es un homopolímero (Anderson & Dawes, 1990) y si en el mismo gránulo hay más de un tipo de unidades monoméricas es un copolímero (Zhao & Chen, 2007).

Los PHA se clasifican según la longitud de la cadena lateral: PHAs scl (short chain length) que contiene de 3 a 5 átomos de carbono, PHA mcl (medium chain length) de 6 hasta 13 átomos de carbonos y PHA lcl (long chain length) donde la cadena lateral alquílica tiene

más de 14 carbonos (Cardona & Agudelo, 2012). También pueden ser mixtos o híbridos cuando se unen monómeros de cadena corta y media (Babel & Steinbüchel, 2001). Los PHA's se forman como un polímero de cadena corta, media, larga o mixta dependiendo de la enzima encargada con la especificidad de sustrato que puede actuar sobre monómeros con diferente número de átomos de carbono (Anderson & Dawes, 1990).

2.3.2 Metabolismo de los polihidroxicanoatos

2.3.2.1 Enzimas catalizadoras de polihidroxicanoatos

Las enzimas PHA sintasas son las que catalizan la conversión de (R)-3-hidroxiacil-CoA a polihidroxicanoatos con la liberación de CoA, uniendo monómeros para formar un biopolímero. Estas enzimas se encuentran en la superficie de los gránulos y se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a la composición de sus subunidades y a su especificidad de sustrato (Rehm, 2003). A continuación, en la figura 2 se muestra el grupo de enzimas con la especie representativa y en el sustrato en el que actúa.

Clase	Subunidad	Especies	Sustrato
I	 ~60-73kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	3HA _{SCL} -CoA (C3-C5) 4HA _{SCL} -CoA 3HA _{SCL} -CoA, 3HA _{SCL} -
II	 ~60-65kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CoA 3HA _{MCL} -CoA (≥C5)
III	 ~60-65kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{SCL} -CoA (3HA _{MCL} -CoA [C6-C8] 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	 ~40kDa-22kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA

Figura 2 Clasificación de las enzimas PHA sintasas

Fuente (Rehm, 2003).

2.3.2.2 Ruta metabólica de los polihidroxicanoatos

Para describir la ruta metabólica de los polihidroxicanoatos se ha utilizado el polihidroxicanoato más estudiado que es el P3HB y del mismo modo el microorganismo más conocido que es *Ralstonia eutropha*. La figura 3 muestra la ruta de biosíntesis a partir de carbohidratos que se convierten en Acetil CoA con la acción catalítica de las enzimas tiolasa, reductasa y sintetasa dando como resultado el polihidroxicanoato P3HB, siendo el metabolito clave en esta ruta el Acetil CoA (González et al., 2013). Algunos microorganismos pueden producir PHA a partir de carbohidratos y de ácidos grasos produciendo polímeros o copolímeros de cadena corta o mixta (Babel & Steinbüchel, 2001).

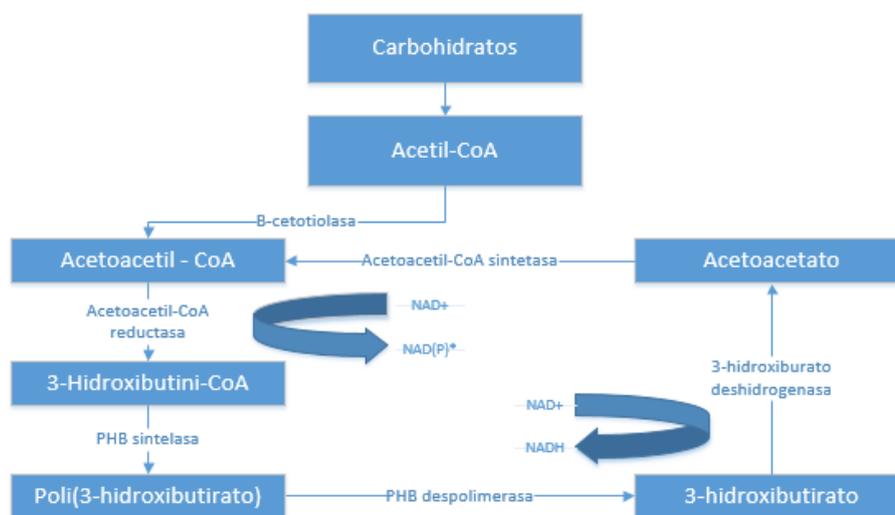


Figura 3 Ruta metabólica de síntesis de los polihidroxicanoatos (P3HB).
Fuente: (Lee, 1996).

2.4 Producción de polihidroxicanoatos

La producción de este tipo de biopolímeros aparte de ser costosa, no siempre ha tenido altos rendimientos. La tabla 3 muestra el tipo de polihidroxicanoato producidos industrialmente.

Tabla 3
Polihidroxicanoatos producidos a gran escala

Polihidroxicanoatos	Referencia
Poli(3-hidroxi butirato)	Lee y Chang, 1995
Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)	Lee y Chang, 1995
Poli(3-hidroxi valerato)	Steinbuchel y Schmack, 1995
Poli(4-hidroxi butirato)	Steinbuchel y cols., 1994
Poli(3-hidroxi hexanoato-co-3-hidroxi octanoato)	Preusting y cols., 1993

Fuente: Modificado de Bello (2008).

Las bacterias con alta capacidad de acumulación y producción de polihidroxicanoatos son: *Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa* (figura 4) y cepas recombinantes de *Alcaligenes eutrophus*, *Escherichia* y *Klebsiella aerogenes*. (Bello, 2008). Estos microorganismos, a pesar de su alta eficiencia tienen altos costos de producción, siendo el mayor inconveniente el valor de aproximadamente 10 USD Kg en comparación con los plásticos convencionales que es de 1 USD kg. El elevado costo de producción de los PHA's se lo atribuye a los precios de las fuentes de carbono y los procesos de purificación (Lee, 1996).



Figura 4 Acumulación de PHA en *Pseudomonas aeruginosa*.

Fuente: (Rehm, 2003).

2.4.1 Producción de polihidroxicanoatos en bacterias del género *Bacillus*

El género *Bacillus* son bacilos con un tamaño entre 4-10 μm , son bacterias Gram positivas y pueden ser aerobios estrictos o anaerobios facultativos, son miembro del filo *Firmicutes* (Takeharu, Manami, & Kouhel, 2015) producen endosporas con morfología oval o cilíndrica que les permiten resistir condiciones desfavorables en el ambiente, son bacterias móviles con flagelos, son catalasa positiva, presentan hemólisis variable y crecen activamente en un rango de pH entre 5.5 - 8.5 (Layton, Maldonado, Monroy, Constanza, & Sánchez, 2011).

Las especies del género *Bacillus*, productoras nativas de PHA, son las siguientes: *B. amyloliquefaciens*, *B. anthracis*, *B. aryabhatai*, *B. badius*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. flexus*, *B. laterosporus*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. odyssey*, *B. pasteurii*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis* (Yilmaz, Soran, & Beyatli, 2005; Kaynar & Beyatli, 2009; Sangkharak & Prasertsan, 2012; Kumar, Patel, Lee & Kalia, 2013) estas especies capaces de producir polihidroxicanoatos completamente biodegradables, a partir de fuentes renovables se los considera “polímeros doblemente verdes” (Mamtesh, Sanjay, & Vipin, 2009). *Bacillus licheniformis* es una de las cepas bacterianas prometedoras para la producción de PHA. Tiene lipopolisacáridos no tóxicos, las fuentes de carbono para su crecimiento son biológicas lo que disminuye el costo de fabricación de los biopolímeros (Kumar et al., 2013). Estudios anteriores han demostrado que pueden acumular entre el 70% y 80% de polihidroxicanoatos a partir de una fuente de carbono simple como el azúcar (Sonakya, Raizada, & Kalia, 2001).

2.4.1.1 Enzima del género *Bacillus*

Las sintasas de clase IV del género *Bacillus* son un nuevo grupo de polimerasas por lo que su caracterización ha sido estudiada hasta un nivel primario y las funciones que realizan

en la síntesis de PHA se encuentran comprendidos parcialmente (Valappil, Rai, Bucke, & Roy, 2008). Las sintasas de clase IV tienen dos componentes con dos subunidades PhaC y PhaR, capaces de polimerizar principalmente unidades monoméricas con una longitud de cadena corta. *Bacillus megaterium* y sus parientes producen P(3HB) a partir de azúcares y P(3HBco-3HV) con sustratos como el valerato y el propionato (Chen, König, & Lafferty, 1991).

En general se pueden obtener co-polímeros de cadena media o larga con fuentes de carbono como fructuosa, sacarosa y gluconato (Valappil et al., 2007c). Varios estudios han reportado que el mecanismo de estas enzimas presentan propiedades novedosas que podrían ser útiles en el diseño de nuevos materiales (Takeharu, Manami, & Kouhel, 2015).

2.4.2 Fuentes de carbono para la producción de polihidroxialcanoatos

En la elaboración de los polihidroxialcanoatos se emplean distintos sustratos como carbohidratos, aceites, alcanos, alcoholes, ácidos, etc. (Bello, 2008). El uso de fuentes de carbono crudas como: desechos de industrias, suero de leche, aceites vegetales, hidrolizados de maíz, remolacha y yuca pueden influir en la reducción de los costos de producción de los biopolímeros debido a que estos sustratos son más baratos en comparación con los de uso común que son puros (Lee, 1996).

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron diferentes fuentes de carbono como xilosa y glucosa, monosacáridos con cinco y seis átomos de carbono, la sacarosa un disacárido formado por glucosa y fructuosa con 12 átomos de carbono y el almidón un polisacárido con monómeros de glucosa, con el fin de comprobar la fuente de carbono que produce mayor concentración de polihidroxialcanoatos.

2.4.3 Producción de polihidroxialcanoatos a partir de mieles

La glucosa y sacarosa son los sustratos más empleados para la producción de PHA (Tsuge, 2002) y si estos son puros generan un costo de producción elevado, por tal razón se investigan formas de usar miel para reducir el costo. Su composición se basa en azúcares simples como glucosa, fructuosa, minerales y vitaminas (Otero, 1997) que pueden contribuir al crecimiento y producción de los polihidroxialcanoatos.

Investigaciones con *Bacillus megaterium* utilizando miel de caña de azúcar han obtenido un rendimiento de producción de PHB del 46,5% (Gouda, Swellam, & Omar, 2001).

2.4.3.1 Miel de yacón o jícama

En esta investigación se usó miel de yacón como sustrato alternativo, la cual se obtiene del tubérculo que es la parte subterránea del yacón (figura 5) y se lo cultiva en la región andina. Su contenido es: fructooligosacáridos (FOS) en un porcentaje de 50 y 70%, el resto de carbohidratos lo conforman la sacarosa, fructuosa y glucosa (Hermann, Freire, & Pazos, 1999). Además, contiene potasio, compuestos polifenólicos, ácidos cafeicos, sustancias antioxidantes, fitoalexinas (Takenaka, Yan, Ono, Yoshida, & Nagata, 2003), vitaminas, minerales y un alto contenido de agua (Seminario, Valderrama, & Manrique, 2003).



Figura 5 Planta del yacón. Parte aérea y parte subterránea de la planta.

Fuente: Seminario et al., (2003).

2.5 Producción de polihidroxialcanoatos

La producción de polihidroxialcanoatos se realiza mediante procesos de fermentación. Hay que tomar en cuenta si el microorganismo a utilizar acumula PHA bajo limitaciones de algún nutriente o lo hace en condiciones normales. Las bacterias que requieren algún tipo de reducción de nitrógeno, fósforo, azufre, magnesio u oxígeno para sintetizar PHA en su fase estacionaria de crecimiento a partir de un exceso de fuente de carbono son: *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas extorquens* y *Pseudomonas oleovorans*, y *Bacillus*, entre otras (Khanna & Srivastava, 2009) en cambio las que no necesitan limitación y en fase de crecimiento acumulan PHA son: *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* recombinante y *Escherichia. coli* recombinante, entre otras (Braunegg, Lefebvre, & Genser, 1998).

Es importante decidir el momento de detención de los procesos de fermentación; en la mayoría de los casos el cultivo se finaliza a las 48 h, para obtener mayor productividad. En algunos casos se pueden utilizar tiempos prolongados de cultivo con pequeñas disminuciones

de la productividad con la finalidad de facilitar el recobrado y la posterior purificación del polímero (Lee, 1996).

Luego de la producción de los polihidroxicanoatos se procede con su purificación en donde se promueve la ruptura de las células para la liberación de los PHA. Los procedimientos de purificación usualmente se los realiza con hipoclorito de sodio que es un oxidante fuerte capaz de destruir las membranas y los componentes celulares (Carvajal & Bell, 2014). Para la extracción de los gránulos de PHA se usa cloroformo, cloruro de metileno y para su precipitación se utiliza metanol o etanol frío, luego se realizan lavados con otros solventes. Éste es uno de los procedimientos más utilizados (Labuzek & Radecka, 2001).

2.6 Aplicaciones de los polihidroxicanoatos

Las aplicaciones de los PHA son diversas al producir biopolímeros biocompatibles, completamente biodegradables, no tóxicos, biorenovables y termoestables siendo una de sus aplicaciones la elaboración de materiales biomédicos como parches de bioimplantes y válvulas cardíacas. En ingeniería de tejidos se ha utilizado como matriz para crecimiento y regeneración del tejido óseo, recubrimiento de fármacos y aplicaciones quirúrgicas como reparación de nervios dañados, entre otros (Zulfiqar, Sharjeel, & Ibrahim, 2018).

En el campo de la biomedicina existen investigaciones que describen que las infecciones asociadas a biomateriales representan un problema clínico significativo, así como su tratamiento debido al creciente número de cepas resistentes a los antibióticos. Por lo tanto, se estudia a los PHA con propiedades antibacterianas que inhiben de forma selectiva y eficiente el crecimiento de bacterias patógenas tanto *in vitro* como *in vivo*. Estableciendo que estos biopolímeros son biomateriales resistentes a las infecciones (Dinjaski et al., 2014). Sus propiedades como resistencia, flexibilidad, hidrofobicidad les permiten absorberse rápidamente

cuando se encuentran en formas de suturas y en films guías para la reparación de tejidos. Incluso se han empleado como estructuras para reparaciones nerviosas y cardíacas, en sistemas de transporte de medicamentos y soportes de vías venosas (Valappil, Misra, Boccaccini, & Roy, 2006).

En la industria del envasado se han utilizado para producir films plásticos, fabricar bolsas, materiales de recubrimiento, artículos desechables, envases para cosméticos, pinturas de látex, fibras ultra fuertes para la industria pesquera y como vehículos para la liberación a largo plazo de herbicidas o insecticidas y fibras ultra fuertes para la industria pesquera (Diaz, 2010).

En la tabla 4 se muestra las empresas que han logrado llevar a los polihidroxicanoatos a la industrialización.

Tabla 4
Empresas productoras de polihidroxicanoatos

Empresa	Ubicación	Producto	Nombre comercial
Metabolix/ADM	EE.UU.	P(3HB) (3HO) P(3HB-co-3HV)	Mirel
PHB Industrial	Brasil	P(3HB) P(3HB-co-3HV)	Biocycle
Tianan Biologic Material	China	PHBV	Ecogen
Biomer	Alemania	P(3HB)	Biomer
Mitsubishi Gas	Japón	P(3HB)	Biogreen
P&G & Kaneka	EE.UU./ Japón	P(3HB-co-3HHx)	Nodax
Bio-on	Italia	PHA	Minerv-PHA

Fuente: Modificado de Textos científicos (2009).

Como se ha indicado anteriormente, la producción de este tipo de plásticos es muy costosa, por eso el enfoque de las investigaciones han cambiado y se estudian microorganismos extremófilos, los cuales son menos susceptibles a la contaminación. Las aguas termales, representan una fuente importante del recurso clave al ser su hábitat. Luego de encontrar la bacteria acumuladora se podría modificarla usando ingeniería genética y biología sintética para lograr optimizar los procesos de producción (Chen & Jian, 2017).

Bacillus es uno de los candidatos ideales para la producción de PHA. Las características más favorables para este fin son: no tiene lipopolisacáridos tóxicos, utiliza residuos biológicos como fuente de carbono además puede producir co-polímeros con fuente de carbono simples y es de recuperación rápida luego del proceso de biosíntesis de PHA (Jung-Kul, Prasun, Sanyay, & Vipin, 2013).

2.7. Detección de la acumulación de los polihidroxicanoatos

Para verificar si un microorganismo es acumulador de polihidroxicanoatos, usualmente se utiliza el colorante lipofílico negro Sudán, capaz de teñir los PHA abandonando el solvente (alcohol) porque es más soluble en los lípidos, de esta forma tiñe las inclusiones presentes en el citoplasma de las bacterias (Cortazar, Vázquez, & Zárata, 2015). La tinción permite la detección *in vivo* de los polihidroxicanoatos indicando la naturaleza lipídica de los gránulos que se colorean en un todo que desde gris a negro. Por lo tanto, las bacterias que se tiñan de ese color son positivas para acumulación de PHA de lo contrario son negativas (Baca, Sánchez, Carreño, & Mendoza, 2010).

2.8 Análisis del producto por espectrofotometría UV

Luego de la comprobación de la acumulación de PHA y su posterior extracción, se puede evaluar la presencia de PHA mediante el método espectrofotométrico UV. Este método fue descrito por primera vez por Law & Slepecky (1961). Promueve la ruptura de los polímeros a monómeros y su posterior oxidación hasta convertirse en ácido crotonico. Es un proceso de confirmación que utiliza el principio de que los PHA se convierten en ácido crotonico cuando se los calientan con ácido sulfúrico concentrado. Este ácido proporciona un pico de absorción máximo a 235 nm (Urvija & Veena, 2015).

2.9. Cuantificación de los polihidroxicanoatos

2.9.1 Método espectrofotométrico con negro Sudán

El procedimiento fue propuesto por Porras, Villar, & Cubbitto (2017), como un nuevo método de bajo costo y rápido en la determinación de PHA extraído. Consiste en teñir a las células luego de su producción y observar las absorbancias a diferentes longitudes de onda que varían en un rango de 450 a 800 nm, mostrando una altura de pico máximo en 660-680 nm. Después de un año se mejoró la técnica y los mismos autores propusieron observar las absorbancias del sobrenadante de las células teñidas con una altura de pico máxima de 600 nm (Porras, Villar, & Cubbitto, 2018)

2.10 Hipótesis

La cepa bacteriana *Bacillus licheniformis* 18.1 aislada de las aguas termales en Guapán-Ecuador es capaz de acumular polihidroxicanoatos con un rendimiento mayor al 60% utilizando glucosa como fuente de carbono.

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Revisión bibliográfica

Se realizó una revisión bibliográfica para elegir las metodologías y técnicas para la producción, extracción, caracterización, cuantificación y determinación del rendimiento de los polihidroxicanoatos, a partir de la cepa de *Bacillus licheniformis* 18.1.

3.2 Reactivación de la cepa bacteriana *Bacillus licheniformis*

La cepa bacteriana utilizada para la producción de polihidroxicanoatos fue *Bacillus licheniformis* 18.1 procedente de las aguas termales de Guapán - Ecuador almacenada en el cepario del proyecto de aguas termales 2015-PIC-002 en el Laboratorio de Microbiología en la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE en preservación a - 80°C (Figura 6). Se reactivó la cepa siguiendo el protocolo de Arencibia, Rosario, & Gámez (2008) que consiste en colocar el microtubo con la cepa bacteriana en bañomaría a 30°C, esperando un tiempo hasta su total descongelación para luego sembrarla en caldo nutriente e incubarla a 37°C.



Figura 6 Cepario de microbiología. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

3.2.1 Comprobación de la pureza de la cepa bacteriana

Luego de transcurrir las 48 h de incubación de la cepa, se procedió a verificar el crecimiento de bacterias mediante la observación de turbidez en el tubo, se hizo un aislamiento de colonias y se comprobó su pureza mediante la uniformidad en color y textura. Después se observó en el microscopio para constatar que sean bacilos Gram +, característica de *Bacillus licheniformis*.

3.3 Comprobación de acumulación de PHA's

Para comprobar si la bacteria acumula polihidroxicanoatos se preparó agar medio mineral (MM) siguiendo el protocolo de Rocha et al., (2008) con cantidad limitada de nitrógeno (1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) y con exceso de diferentes fuentes de carbono como: un monosacárido (glucosa y xilosa), disacárido (sacarosa), un polisacárido (almidón) y miel de yacón o jícama colocando 15 g/L. Los componentes del medio mineral se indican en el anexo 1. Después de la preparación de los medios se realizó la siembra en cajas Petri y se dejó en incubación a 37°C durante 48 horas a las siguientes cepas bacterianas: *Bacillus licheniformis* (unidad experimental), *Escherichia coli* (control negativo) y *Burkholderia sacchari* (control positivo) una cepa modificada genéticamente concedida por la Dra. Linda Guamán en el 2017.

Luego de haber transcurrido el tiempo de incubación y con el fin de comprobar la acumulación de PHA's en la bacteria en estudio de forma cualitativa, se preparó el colorante negro Sudán al 0,05% (m/v) en una solución con alcohol al 96%, para colocarlo en las cajas Petri con las bacterias hasta el borde, se esperó 10 minutos y se retiró el colorante lavando el exceso con alcohol al 96%. Las bacterias que se tiñen de color azul intenso son positivas para la acumulación de polihidroxicanoatos (Olubusola & Olakunle, 2017). La evaluación de los resultados se realizó siguiendo las especificaciones de la tabla 5

Tabla 5
Evaluación cualitativa de acumulación de PHA's

Intensidad de azul oscuro (+)	Resultado
+++++	Fuertemente positivo
++++	Fuertemente positivo
+++	Medianamente positivo
++	Medianamente positivo
+	débilmente positivo

Fuente: (Olubusola & Olakunle, 2017).

3.4 Preparación del inóculo y producción de PHA's

Se siguió el protocolo (Olubusola & Olakunle, 2017) se cultivó a *Bacillus licheniformis* en caldo nutriente por 12 h, luego se tomó 1 mL del cultivo y se colocó en un litro del medio mineral para su posterior incubación a 37°C en un lapso de 48 h. Finalizado la producción de PHA's, se procedió a determinar el rendimiento de los polihidroxicanoatos como se indica a continuación.

3.5 Extracción de PHA's de los aislados

El contenido de PHA aislado en las bacterias se determinó siguiendo el protocolo según Lee y Choi (1999) incubando a 37°C las células obtenidas en el proceso anterior, por el transcurso de una hora con una solución de hipoclorito de sodio al 0,4% con el fin de romper la pared celular bacteriana y disolver todos los componentes celulares excepto los PHA. La mezcla resultante se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se descartó. Los lípidos celulares y otras impurezas dentro del precipitado se eliminaron mediante la adición de 10 mL de etanol al 96% y acetona.

A continuación, se extrajo el PHA añadiendo 10 mL de cloroformo a la mezcla en un baño de agua caliente a 60°C y se dejó evaporar. Seguidamente se determinó el peso seco del extracto.

3.6 Determinación del peso celular

El medio de cultivo con producción de PHA se centrifugó a 10000 rpm durante 15 min a 4°C. El pellet que resultó se lavó con agua destilada, se decantó en placas Petri de vidrio esterilizadas previamente pesadas, se secó a 60 °C durante 24 h, se enfrió y posteriormente se pesó.

3.7 Determinación del rendimiento de PHA's

El rendimiento de PHA se calculó con la relación entre el peso seco del contenido del polímero de la célula y el peso seco de la célula completa siguiendo la fórmula (1) (Olubusola & Olakunle, 2017).

$$\%PHA = \frac{\text{PesoPHA} \times 100}{\text{Peso seco de toda la célula}} \quad (1)$$

3.8. Análisis espectrofotométrico de PHA producido por la cepa *B. licheniformis*

Para realizar este procedimiento se modificó el protocolo de Law & Slepecky, (1961). Se tomaron 500 µg del PHA obtenido anteriormente y se colocaron en un tubo de ensayo seco y limpio junto con 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, se calentó el tubo de ensayo por 10 min en un baño de agua en ebullición. Al finalizar el tiempo se dejó enfriar la solución y se la observó en el espectrofotómetro con celdas de cuarzo a varias longitudes de onda desde los 200 hasta los 280 nm, teniendo una altura de pico máximo en 235 nm en donde se determina una clase de PHA que son los ácidos Poli-β- hidroxibutiratos.

3.9 Cuantificación de PHA's por espectrofotometría con negro Sudán

3.9.1 Preparación de los cultivos

Se inocularon a las bacterias *B. licheniformis* y *B. sacchari* en 25 mL de medio LB en matraces de Erlenmeyer y se incubaron durante 12 horas a 37°C con agitación constante a 150 rpm. Al finalizar el tiempo, se midió en el espectrofotómetro la densidad óptica (OD) y se realizaron los cálculos necesarios para empezar el ensayo con una absorbancia de 0.1 de OD en cada cultivo bacteriano.

3.9.2 Ensayo de cuantificación de PHA

En base al protocolo descrito por Porras et al., (2018), se preparó 50 mL de MM caldo con cada uno de los cultivos bacterianos y su respectiva fuente de carbono con una OD inicial de 0,1 y se incubó durante 48 h a 37°C con agitación constante a 150 rpm. Al transcurrir el tiempo de incubación, se tomó 1 mL del cultivo y se centrifugó a 15000 rpm por 15 minutos. Luego se lavó dos veces con agua destilada estéril y se añadió a los tubos 440 µL de negro Sudán (3% p/v). Después se incubó por 16 minutos a 30°C con agitación constante a 220 rpm. Posteriormente se recolectó el sobrenadante y se observó en el espectrofotómetro en un rango de 450 hasta 750 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para las cinco fuentes de carbono usando como control negativo *B. licheniformis* en el MM con 7 g/ L, de este modo la bacteria no acumulará PHA, ya que no tiene exceso del sustrato.

Para cuantificar la concentración de los polihidroxialcanoatos se utilizó la siguiente ecuación descrita por el autor del protocolo.

$$Y_I = -32.058X_I + 23,313$$

En donde:

Y_I = Concentración de PHA producida por la bacteria g/L

X_I = Altura de pico del sobrenadante teñido con negro Sudán en nm

Luego se calculó la concentración de PHA restando los valores de la absorbancia del control negativo (*B. licheniformis* en condiciones de no acumulación) obtenidos con las cepas de *B. licheniformis* y *B. sacchari* en condiciones de reserva de PHA.

3.10 Análisis estadístico

Para evaluar la acumulación, la producción, extracción, rendimiento y cuantificación de los polihidroxicanoatos se utilizaron cinco diferentes tratamientos en donde se varían las fuentes de carbono especificadas en la tabla 6.

Tabla 6
Tratamientos para la acumulación de PHA's

Fuentes de Carbono	Repeticiones	Descripción
Glucosa	3	Control negativo: <i>Escherichia. coli</i> , * <i>Bacillus licheniformis</i>
Xilosa		Control positivo: <i>Burkholderia sacchari</i>
Sacarosa		Unidad experimental: <i>Bacillus licheniformis</i>
Almidón		
Miel de yacón		

*Para la cuantificación con negro Sudán se utilizó la misma bacteria en estudio, pero en condiciones de no acumulación (sin exceso de fuente de carbono).

El análisis estadístico se realizó en el programa informático InfoStat/L usando ANOVA de una vía para la determinación de diferencias significativas, con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. (Anexos). Todos los ensayos se hicieron por triplicado. Las gráficas presentadas en los resultados se elaboraron en el programa SciDAvis 2017.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Reactivación de la cepa bacteriana *Bacillus licheniformis*

La cepa bacteriana *B. licheniformis* se reactivó por triplicado en tubos con caldo nutriente, durante 24 horas a 37°C. Al transcurrir el tiempo establecido los tubos cultivados presentaron crecimiento mostrando turbidez, por lo que se continuó con los siguientes procedimientos.

4.1.1 Comprobación de la pureza de la cepa bacteriana

Se realizaron cultivos puros en medio agar nutriente de *B. licheniformis* para observar la morfología macroscópica de las colonias cuyo aspecto es digitiforme con bordes irregulares de color crema de consistencia seca.

Se realizó tinción Gram a las colonias aisladas para observar a la cepa bacteriana *B. licheniformis* de forma microscópica. La figura 7 muestra que son Gram positivas, en forma de bacilos.



Figura 7 Tinción Gram de la cepa bacteriana *Bacillus licheniformis* 100X.

4.2 Comprobación de la acumulación de PHA's

En la tabla 7 se indican los resultados obtenidos en la prueba de acumulación de polihidroxicarboxilatos utilizando medio mineral y las cinco distintas fuentes de carbono, en donde se evidencia que *B. licheniformis* acumula PHA's en todos los casos, en el anexo 2,3 y 4 se pueden observar las diferencias de coloración de las cepas bacterianas de *B. licheniformis* con sus respectivos controles.

Tabla 7
Evaluación cualitativa de acumulación de PHA's en Bacillus licheniformis.

Fuente de carbono	*Intensidad de azul oscuro	Resultado
Glucosa	+++	Medianamente positivo
Xilosa	++	Medianamente positivo
Sacarosa	++++	Fuertemente positivo
Almidón	++++	Fuertemente positivo
Miel de yacón	++++	Fuertemente positivo

*La intensidad de azul oscuro se mide cualitativamente según el número de (+).

4.3 Determinación del rendimiento de PHA's

Luego de la producción y extracción de los polihidroxicarboxilatos obtenidos con las cepas bacterianas *B. licheniformis* y *B. sacchari* se procedió a determinar el rendimiento de los PHA utilizando los datos de los pesos secos de la célula (DCW) y el peso del PHA luego del tratamiento con hipoclorito de sodio, etanol y acetona. En la figura 8, se puede observar que el mayor rendimiento de PHA producido por *B. licheniformis* se obtuvo con la fuente de carbono glucosa con un valor de 39,34% PHA y el menor fue con miel de yacón con 20,30% PHA. Las condiciones del cultivo fueron a 37°C durante 48 h en todos los casos involucrados en el crecimiento y producción de PHB.

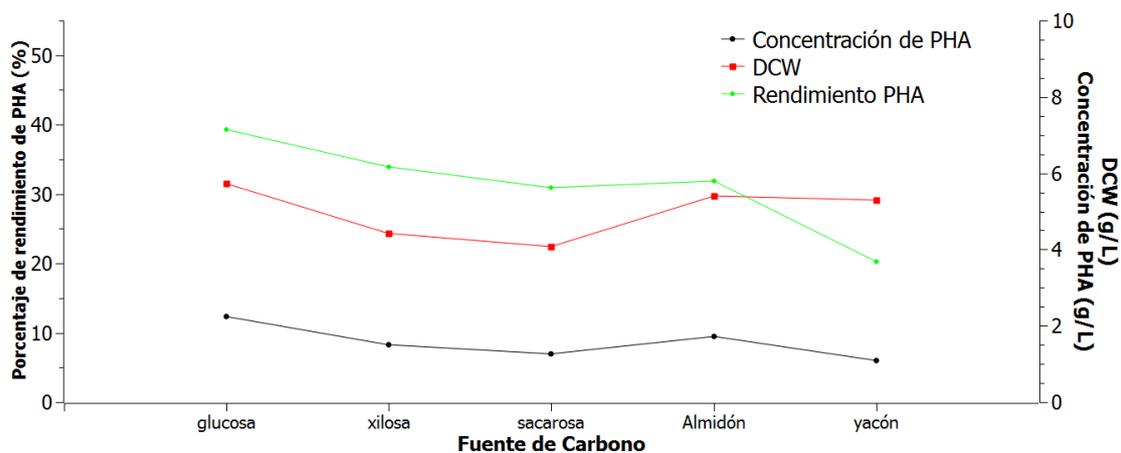


Figura 8 Rendimiento de PHA por *Bacillus licheniformis*.

En la figura 9 se puede evidenciar que el mayor rendimiento fue con xilosa con un 50,43% PHA y el menor fue con almidón con un 20,39% PHA, en este caso se muestran los resultados de los PHA producidos por el control positivo que es la cepa *B. sacchari*. No hay resultados de yacón con esta bacteria ya que se demostró que no puede acumular polihidroxicanoatos.

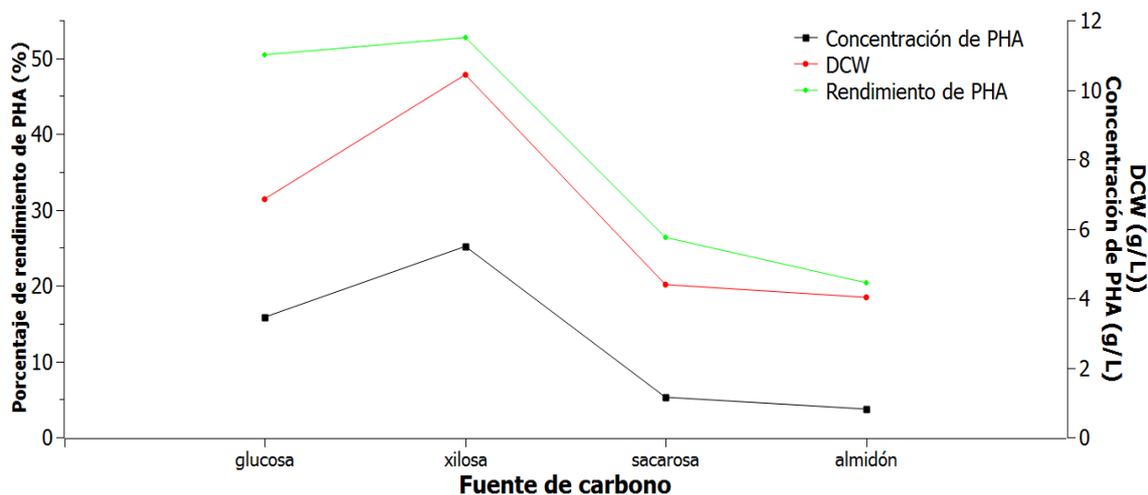


Figura 9 Rendimiento de PHA producidos por *Burkholderia sacchari*.

No existieron diferencias significativas entre los rendimientos de PHA por *B. licheniformis* y *B. sacchari* con las distintas fuentes de carbono (Anexo 5)

4.4 Análisis espectrofotométrico de PHA producido por *Bacillus licheniformis*

En las siguientes figuras se pueden observar las absorbancias obtenidas a través del calentamiento de ácido sulfúrico con la muestra de PHA, usando las cinco fuentes de carbono. En la figura 10 se puede identificar el pico máximo de (0,49) con glucosa y de (0,245) con xilosa para *B. licheniformis* y en el caso de *B. sacchari* de (0,53) y (0,572) respectivamente. En los dos casos el PHA se ha convertido en ácido crotonico demostrando la presencia de Poli- β -hioxibutirato (PHB).

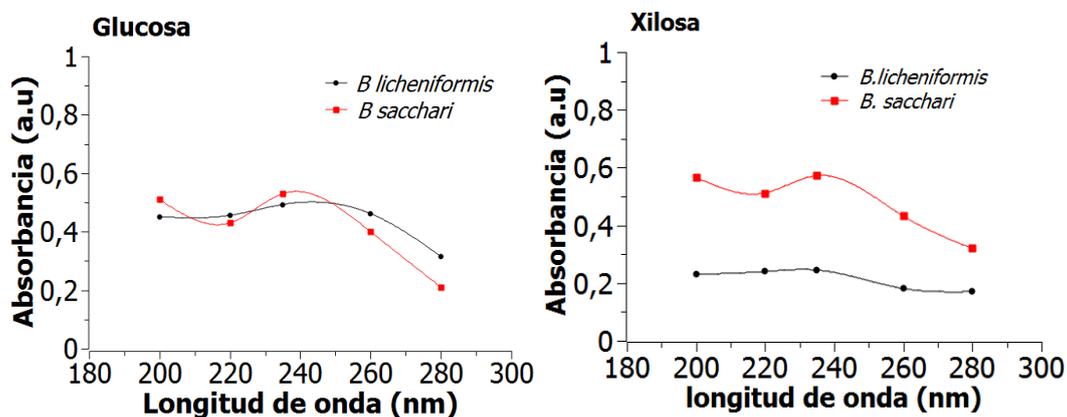


Figura 10 PHA convertido en ácido crotonico con glucosa y xilosa.

También se comprobó la presencia de PHB, con las fuentes de carbono sacarosa y almidón, tanto en *B. licheniformis* con una absorbancia de (0,36) y (0,249) como en *B. sacchari*, de (0,417) y (0,231) respectivamente, teniendo un valor máximo a 235 nm con los dos sustratos.

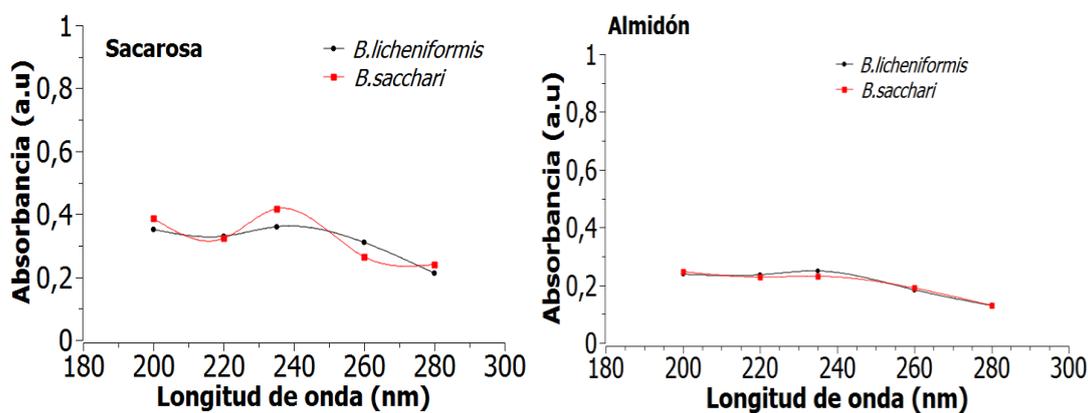


Figura 11 PHA convertido en ácido crotonico con sacarosa y almidón.

Luego de la comprobación y la producción de PHA con el sustrato menos costoso, se pudo observar con un pico máximo de (0,356) de absorbancia, que el PHA obtenido es un PHB (figura 12). No se realizó este proceso con el control positivo ya que no acumula PHA a partir de miel de yacón.

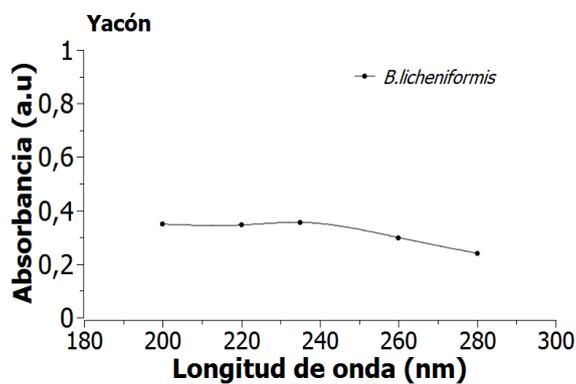


Figura 12 PHA convertido en ácido crotonico con miel de yacón.

No existieron diferencias significativas entre los picos máximos de absorbancia convertidos en ácido crotonico producidos por *B. licheniformis* y *B. sacchari* con todas las fuentes de carbono (Anexo 6).

4.5 Cuantificación de PHA's por espectrofotometría con negro Sudán

Con el fin de comparar los resultados de concentración de polihidroxicanoatos obtenidos anteriormente mediante la diferencia de pesos (figuras 9 y 10), también se realizó la cuantificación por medio de una técnica nueva con negro Sudán en donde se obtuvieron resultados parecidos con la metodología anterior de Olubusola & Olakunle (2017). Las condiciones de cultivo fueron a 37°C durante 48 h. Las concentraciones de PHA se muestran en la figura 13. Las más altas concentraciones fueron para la fuente de carbono glucosa (7,6g/L) para *B. licheniformis* y con xilosa (8,4g/L) para *B. sacchari*.

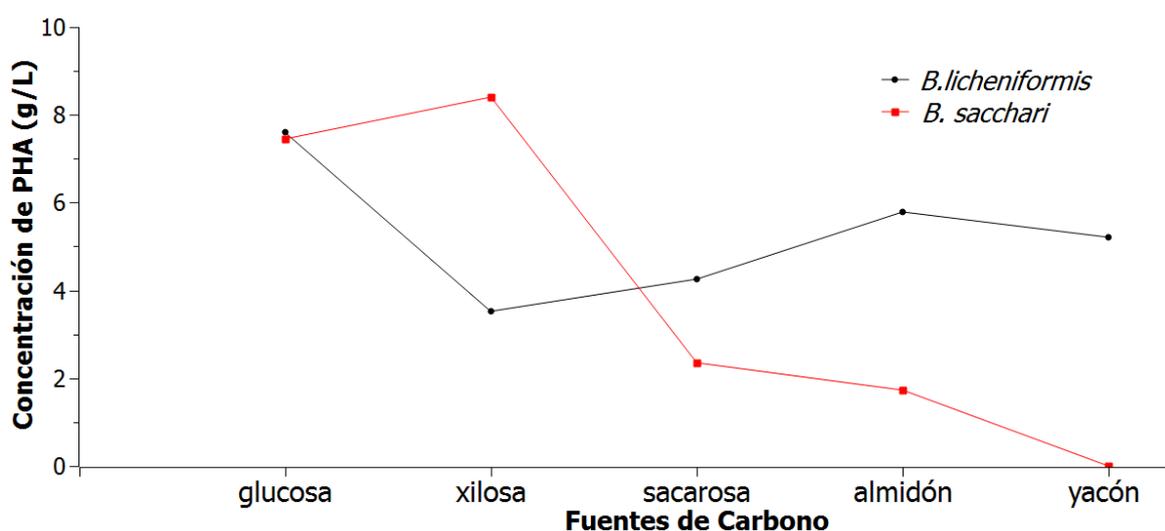


Figura 13 Concentración de PHA (g/L) por espectrofotometría con diferentes sustratos.

En la tabla 8 se muestran las comparaciones de la concentración de PHA con dos diferentes métodos, el primero es de Olubusola & Olakunle (2017) en donde se realizó la producción y el recobrado de los PHA, mientras que el segundo es de Porras et al., (2018) donde se realizó la producción, luego se hizo la tinción con negro Sudán y por espectrofotometría se cuantificó los PHA. Se obtuvieron concentraciones más altas en los dos casos con glucosa.

Tabla 8
Concentraciones de PHA (g/L) con dos métodos de cuantificación

Fuente de Consulta	*Método 1	-Método 2
Glucosa	2,25	7,6
Xilosa	1,5	3,52
Sacarosa	1,26	4,25
Almidón	1,72	6,47
Miel de Yacón	1,08	5,2

*Metodología de (Olubusola & Olakunle, 2017) – Metodología de (Porrás et al., 2018). No existen diferencias significativas entre los dos métodos (Anexo 7).

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Las cepas *Bacillus licheniformis* y *Burkholderia sacchari* resultaron ser acumuladoras de polihidroxicarboxilatos utilizando glucosa como sustrato (tabla 7) coincidiendo con los resultados obtenidos al calcular el rendimiento de 39,34% en el primer caso y 50,43% en el segundo y representa el mayor porcentaje de acumulación en el caso de *B. licheniformis* mientras que en *B. sacchari* resulta ser la segunda fuente de carbono con mayor rendimiento de polihidroxicarboxilatos. Según Olubusola & Olakunle (2017) la glucosa es un azúcar monomérica de fácil metabolismo, que ayuda a acelerar el crecimiento bacteriano y su posterior acumulación en forma de PHA (figura 9). Reportes de Kumar, Patel, Lee, & Kalia (2013) indican que el porcentaje de rendimiento *B. licheniformis* modificada genéticamente es de 21,4% PHA utilizando glucosa, siendo estas cifras menores en comparación a las obtenidas en el presente estudio, trabajando con una cepa nativa.

Con respecto a la xilosa como sustrato, *B. sacchari* (figura 9) se tuvo el mayor rendimiento (52,78% PHA) debido a que esta cepa ha sido sobreexpresada con los genes de xilosa isomerasa y xiluloquinasa, que según Guamán et al. (2018) es una estrategia para mejorar la utilización de xilosa y la producción de PHA (3HB). *B. licheniformis* tuvo un porcentaje menor (33,94% PHA) ya que no posee sobreexpresión de ningún gen, según Lopes et al., (2009) *Bacillus megaterium* presenta un rendimiento ligeramente más bajo de 26.0–64.4%, cuando se usa xilosa y arabinosa, pero presenta mayores rendimientos, concordando con los resultados obtenidos en el ensayo de acumulación que se indican en la (tabla 7) al usar sacarosa (30,88% PHA), almidón (31,89% PHA) y yacón (21,96% PHA). Según Full, Jung, & Madigan (2006) del género *Bacillus* se puede obtener los siguientes rendimientos a partir de diferentes fuentes de carbono y estas son: sacarosa (87% PHA) y almidón (43,4% PHA) rendimientos más altos, sin embargo, estas cifras son generales del género *Bacillus* y no de la especie *B. licheniformis*.

A demás a partir del estudio Labuzek & Radecka (2001) se sabe que las cepas del género *Bacillus* producen PHA en condiciones ambientales desfavorables las que inducen también a la formación de esporas, de este modo los procesos metabólicos y la producción de biopolímeros pueden verse afectados. En el sustrato de miel de yacón no se han reportado datos anteriores del rendimiento de PHA (20,3%), por lo que se comparan los resultados obtenidos con miel de caña de azúcar y remolacha de Kanokphorn & Poonsuk, (2012) que usan una cepa mutante de *B. licheniformis* donde se obtuvo (42,20% PHA). Por lo tanto, una de las soluciones para aumentar el rendimiento de los PHA podría ser la ingeniería genética; según Law et al., (2003) el género *Bacillus* se adapta bien a la introducción de genes extraños asociados a PHA, con el fin de obtener más cantidad de biopolímero, pudiendo inhibir también la formación de esporas. Este tipo de bacterias tienen más ventajas en cuanto a los procesos de fermentación de PHA que incluyen: gran secreción de amilasas, no tienen lipopolisacáridos, y se contaminan menos, lo que le da la posibilidad de utilizar diversas materias que incluyen al almidón sin refinar y a las melazas.

El uso de fuentes de carbono económicas para producir PHA, podría llevar importantes ventajas económicas (Quillaguaman, Delgado, Mattiasson, & Hatti, 2006). Sin embargo, los rendimientos de PHB son ligeramente más bajos que con los sustratos puros, los cuales varían entre 48.9 a 83.8% según Anil et al., (2007) y Lopes et al., (2009).

Los resultados obtenidos en todos los casos dieron un pico máximo con una longitud de onda de 235 nm (figura 10, 11 y 12). Según Law & Slepecky (1961), el ensayo para identificar PHB está probado, es confiable y es conveniente en todos los casos. En este estudio el valor máximo de absorbancia no se diferencia significativamente de los demás valores en el caso de *B. licheniformis* y *B. sacchari* esto podría pasar ya que según Slepecky & Law (1960b) los carbohidratos causan cierto tipo de interferencias.

Puede darse el caso de que algunas células no almacenen polímeros, por lo tanto se pueden formar un tipo de material insoluble después del tratamiento con hipoclorito que causa interferencia en las absorbancias. Por esta razón se debe revisar cuidadosamente todo el espectro de 220 a 260 nm, cuando se trata del análisis de una muestra desconocida. En esta investigación se usa éste método como verificación para PHB y no para cuantificación tal como lo hace Urvija & Veena, en el 2015 que analiza los polihidroxicanoatos al observar el pico máximo en 235 nm. Por lo tanto a partir de este análisis, es posible decir que el PHA presente en los extractos se han convertido en ácido crotónico y se puede comprobar que el PHA es producido por *Bacillus licheniformis*.

En el artículo publicado por Takeharu et al., (2015), indica que las bacterias que pertenecen al género *Bacillus* son un tipo de microorganismos que pueden producir co-polímeros incluso a partir de una sola fuente simple de carbono, ésta puede ser una de las razones por las cuales no existen diferencias significativas en las absorbancias en el caso de *B. licheniformis* ya que esta técnica identifica específicamente PHB. Entonces en el momento de realizar la producción se pudo haber obtenido co-polímeros como los que se describen en la figura 5. Sin embargo, según Valappil et al, (2008) las vías metabólicas involucradas en la formación de co-polímeros con fuentes de carbono no relacionadas todavía no se entienden completamente y no se disponen de datos moleculares suficientes para clarificar este hecho.

Los valores obtenidos mediante el protocolo de cuantificación con negro Sudán fueron mayores en todos los casos (tabla 8), estos resultados evidentemente mejores se deben a que se cuantifica la concentración de PHA intracelular y además según Porras et al., (2018) proporcionan una nueva alternativa que no es destructiva, en comparación con la metodología de Olubusola & Olakunle (2017) que utiliza la extracción con cloroformo. El principal problema es que ésta técnica es muy laboriosa y requiere bastantes pasos, además se consume

mucho tiempo, lo que implica más de 20 horas en el proceso hasta obtener los resultados de la cuantificación. La metodología con Sudán es una nueva forma de cuantificación desarrollada en el 2018 necesita pocos pasos de preparación, procesamiento y lectura de las muestras, en donde la ventaja radica en que se puede utilizar espectrometría básica de laboratorio, con un colorante de bajo costo y reactivos que se encuentran en todo tipo de laboratorio.

En el caso de la fermentación, para calcular el rendimiento de los polihidroxialcanoatos por la metodología número 1, los cultivos obtenidos con las bacterias acumuladoras PHA fueron separadas por centrifugación y luego recuperadas con acetona y etanol, sin embargo, según Jiang, Ramsay & Ramsay (2006) se usan grandes cantidades de disolventes orgánicos, como la acetona, cloroformo, cloruro de metileno o de dicloroetano haciendo que el procedimiento sea poco económico y según Braunegg, Lefebvre & Genser (1998) ambientalmente poco atractivo. El trabajo de Sathiyarayanan et al., (2013) explica que se pueden obtener mejores concentraciones de PHA optimizando los medios de cultivo, fermentación, tiempo de producción e identificando el tipo de fuente de carbono donde se obtiene más concentración de PHA a bajos precios.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

La cepa de *Bacillus licheniformis* aislada de la fuente geotermal en Guapán - Ecuador, fue capaz de producir Polihidroxicanoatos con las todas las fuentes de carbono analizadas que fueron: glucosa, xilosa, sacarosa, almidón y miel de yacón.

Se demostró que *Bacillus licheniformis* acumula moderadamente polihidroxicanoatos cuando utiliza glucosa y xilosa como fuentes de carbono y es un acumulador fuertemente positivo de polihidroxicanoatos al usar sustratos de sacarosa, almidón y miel de yacón.

Se determinaron los pesos secos de las células productoras de polihidroxicanoatos, el peso más alto se lo obtuvo con glucosa (5,72g/L) seguido de almidón (5,39 g/L), miel de yacón (5,32g/L), xilosa (4,42g/L) y finalmente sacarosa (4,08g/L).

Se calculó el rendimiento de polihidroxicanoatos para todos los tratamientos siendo el más alto con glucosa (39,34% PHA), seguido de xilosa (33,94% PHA), almidón (31,89% PHA), sacarosa (30,88% PHA) y miel de yacón (20,3% PHA).

Se comprobó que los productos obtenidos de *Bacillus licheniformis* son PHB, una clase de polihidroxicanoatos, mediante espectrofotometría UV.

Se cuantificó la concentración de polihidroxicanoatos con el método de Sudán para todas las fuentes de carbono, resultando ser la más alta con glucosa (7,6g/L), seguida con almidón (6,47g/L), yacón (5,2g/L), sacarosa (4,25g/L) y xilosa (3,52g/L).

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Para posteriores estudios se recomienda estandarizar el medio de cultivo, el tiempo de fermentación y la temperatura óptima en la que *B. licheniformis* aumente la producción, rendimiento y concentración de polihidroxicanoatos.

Se puede utilizar biología sintética para insertar genes con el fin de aumentar la acumulación y producción de polihidroxicanoatos en la cepa *B. licheniformis*.

Se recomienda utilizar una bacteria del género *Bacillus* como control positivo, para tener una comparación semejante en cuanto a producción de co-polímeros.

Se pueden escalar los procesos de fermentación para obtener mayor cantidad de polihidroxicanoatos y evaluar los rendimientos obtenidos.

Se debería seguir buscando nuevas fuentes de carbono de bajo costo para la producción de polihidroxicanoatos.

Al tener el género *Bacillus* características que le permiten utilizarlo para producir polihidroxicanoatos con aplicaciones biomédicas, se recomienda probar con diferentes fuentes de carbono y enfocarse en este ámbito, ya que el costo beneficio es justificado.

CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

1. Aclimaadmin. (2018). *aclima*. Obtenido de <https://www.aclima.eus/las-consecuencias-de-los-microplasticos-en-los-suelos-agricolas>
2. Agamuthu, P. (2005). *Biodegradabilidad de los residuos plásticos degradables*. Malasia: Waste Manage Res.
3. Anderson, A., & Dawes, E. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 450-472.
4. Andler, R., & Díaz, A. (2013). Ingeniería para producir plásticos desde bacterias Technological and market aspects of microbial bioplastics production. *Ingenerare*, 27-29.
5. Anil, P., Shamala, T., Kshama, L., Prakash, M., Joshi, G., & Chandrashekar, A. (2007). Bacterial synthesis of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using carbohydrate rich mahua (*Madhuca* sp.) flowers. *J Appl Microbiol* , 103:204–9.
6. Arencibia, D., Rosario, L., & Gámez, R. (2008). *Métodos generales de conservación de microorganismos*. Quimefa: Liorad.
7. Babel, W., & Steinbüchel, A. (2001). Biopolyesters. Special issue of advances in Biochem. Eng. *Biotechnology*, 342 pp.
8. Baca, K., Sánchez, M., Carreño, M., & Mendoza, G. (2010). Polyhydroxyalcanoates of strains of *Azospirillum* spp. isolated of roots of *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomato” and *Oryza sativa* L “rice” in Lambayeque. *Scientia Agropecuaria*, 213-224.
9. Bello, D. (2008). *Producción microbiológica y caracterización de Poli-β-hidroxibutirato a partir de mieles finales de remolacha y de caña de azúcar*. La Habana: Universidad La Habana.

10. Braunegg, G., Lefebvre, G., & Genser, K. (1998). Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol*, 127-165.
11. Bueno, M., & Molina, I. (2016). *Bioplásticos: Obtención y aplicaciones de polihidroxicanoatos*. Sevilla: Universidad de Sevilla.
12. Cardona, M., & Agudelo, L. (2012). Producción de bioplásticos a partir de bacterias empleando sustratos no convencionales. *Grupo de Biotransformación Escuela de Microbiología.*, Universidad de Antioquia.
13. Carvajal, G., & Bell, A. (2014). Separación, purificación y caracterización de polihidroxitirato. *Red de Revistas Científicas de América Latina*, 7-15.
14. Chen, G., & Jian, X. (2017). Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Sinthetic and Systems Biotechnology*, 192-197.
15. Chen, G., König, K., & Lafferty, R. (1991). Occurrence of poly-D(-)-3 hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol Lett* 84, 173-176.
16. Cortazar, M., Vázquez, G., & Zárate, C. (2015). *Tinción con el colorante Sudán Negro*. Laboratorio de Hematología.
17. Daily, N. (24 de mayo de 2018). *¿Cómo afectan los residuos plásticos a los animales?* Obtenido de https://www.nationalgeographic.com.es/naturaleza/grandes-reportajes/como-afectan-residuos-plasticos-a-animales_12738/1
18. Delgado, A., & Mina, A. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, 94-101.
19. Diaz, V. (28 de Septiembre de 2010). *BiotechSpain*. Obtenido de La industria de los PHA: cuando el plástico es natural: <https://biotechspain.com>

20. Dinjaski, N., Fernández, M., Parra, F., Lehman, S., Román, J., García, E., & Prieto, M. (2014). PHACOS, a functionalized bacterial polyester with bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials*.
21. Du, G., Jian, C., & Lun, S. (2001). Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutrofa* in a two-stage culture system. *Journal of Biotechnology*, 59-65.
22. EFEverde. (11 de septiembre de 2018). *El plástico ya está detrás de la muerte de al menos el 3% de los cetáceos*. Obtenido de <http://www.rtve.es/noticias/20180911/plastico-ya-esta-detras-muerte-menos-3-cetaceos/1796160.shtml>
23. ENEMDU. (2016). *Información ambiental en hogares*. INEC: Ecuador.
24. Estévez, R. (20 de 09 de 2013). *La contaminación del plástico no entiende de fronteras*. Obtenido de <https://www.ecointeligencia.com/2013/09/contaminacion-plastico-fronteras>.
25. Full, T., Jung, D., & Madigan, M. (2006). Production of poly- β -hydroxyalkanoates from soy molasses oligosaccharides by new, rapidly growing *Bacillus* species. *Letters in Applied Microbiology*.
26. Gallur, M. (2010). *Presente y futuro de los biopolímeros como material de envase*. Barcelona: EasyFairs.
27. García, A., & Zubieta, J. (2010). *La percepción de la conservación del Medio Ambiente*. Universidad de Cantabria: España.
28. Geyer, R., Jambeck, J., & Lavender, K. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 1-6.
29. Gilberto, A. (2002). *Plásticos y medio Ambiente*. Venezuela: Revista Iberoamericana Polímeros.

30. González, G., Meza, J., González, O., & Córdova, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*.
31. Gouda, M., Swellam, A., & Omar, S. (2001). Production of PHB by *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiol. Res.* 156, 201-207.
32. Greenpeace. (2016). *Plástico en el pescado y el marisco*. España: Departamento Científico de Greenpeace.
33. Greenpeace. (2016). *Plásticos en los océanos. Datos comparativas e impactos*. España: Gavin Parsons.
34. Greenpeace. (2017). Un millón de acciones contra el plástico. 1-42.
35. Grun, G. (13 de 12 de 2016). *6 gráficos para entender el problema del plástico*. Obtenido de <https://www.dw.com/es/6-gr%C3%A1ficos-para-entender-el-problema-del-pl%C3%A1stico/a-36756148>
36. Guamán, L., Edmar, R., Oliveira, F., Barba, C., Gomez, J., & Taciro, M. (2018). xylA and xylB overexpression as a successful strategy for improving xylose utilization and poly-3-hydroxybutyrate production in *Burkholderia sacchari*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.
37. Hermann, M., Freire, I., & Pazos, C. (1999). Compositional diversity of the yacón storage root. *International Potato Center*, 425-432.
38. Hidalgo, V. (2015). *Muestreo Nacional de microplásticos en las playas de Chile*. Chile: ResearchGate.
39. Jiang, X., Ramsay, J., & Ramsay, B. (2006). Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *J Microbiol Methods* 67, 212–219.

40. Jung-Kul, L., Prasun, K., Sanyay, P., & Vipin, K. (2013). Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnological Advances*, 1543-1561.
41. Kanokphorn, S., & Poonsuk, P. (2012). The Production of Polyhydroxyalkanoate by *Bacillus licheniformis* Using Sequential Mutagenesis and Optimization. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* , 272-279.
42. Kaynar, P., & Beyatli, Y. (2009). Determination of poly- β -hydroxybutyrate production by *Bacillus* spp. isolated from the intestines of various fishes. *Fish Sci* , 439–443.
43. Khanna, S., & Srivastava, A. (2009). *characterization of physiological state in poly (β -hydroxybutyrate) production by Wautersia eutropha*. *Appl Biochem Biotechnol*.
44. Kumar, P., Patel, S., Lee, J., & Kalia, V. (2013). Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnological Advances*, 1543-1561.
45. Labuzek, S., & Radecka, I. (2001). Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *J Appl Microbiol*, 353-357.
46. Labuzek, S., & Radecka, I. (2001). Biosynthesis of copolymers of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85 strain. *J Appl Microbiol* 90, 353–357.
47. Law K, Cheng, C., Leung, Y., Lo, W., Chua, H., & Yu, F. (2003). Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for poly hydroxyalkanoates synthesis. . *Biochem Eng J* , 203-208.
48. Law, J., & Slepecky, R. (1961). Assay of poly- β -Hydroxybutiric acid. *Journal of Bacteriology*, 33-36.
49. Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Constanza, L., & Sánchez, C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*, 177 - 187.

50. Lee, S. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. . *Biotechnology and Bioengineering* 49, 1-14.
51. Lee, S., & Choi, J. (1999). Polyhydroxyalkanoates biodegradable polymer. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 616-627.
52. Lemos, A. (2015). Polihidroaxialcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico Colombia*, 9.
53. Lopes, M., Rocha, R., Zanotto, S., Gomez, J., & Da Silva, L. (2009). Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. . *World J Microbiol Biotechnol*
54. Malagón, M., López, S., & Martínez, A. (2017). Síntesis de Bioplásticos a partir de microorganismos. *Universidad de América*, 127-135.
55. Mamtesh, S., Sanjay, K., & Vipin, C. (2009). *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *BioMed Central - Microbial Cell Factories*, 8:38.
56. Mercan, N., & Beyatlı, Y. (2005). Production of poly-beta-hydroxybutyrate hydroxybutyrate (PHB) by *Rhizobium meliloti*, *R. viciae* and *Bradyrhizobium japonicum* with different carbon and nitrogen sources, and inexpensive substrates. *Zuckerindustrie* 130, 410–415.
57. Nieto, E., & Montoto, T. (2017). *Basuras marinas, plásticos y microplásticos: orígenes, impactos y consecuencias de una amenaza global*. España: Ecologistas en Acción.
58. Ocampo, E., & Elda, G. (2007). *Plásticos y contaminación ambiental*. Morelos: Academia de Ciencias de Morelos, A.C.
59. Olubusola, A., & Olakunle, J. (2017). Production and characterization of polyhydroxyalkanoic acid from *Bacillus thuringiensis* using different carbon substrates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 407-413.

60. Ortiz, M. (2013). El impacto de los plásticos en el ambiente. *La jornada ecológica*.
61. Otero, M. (1997). *Las mieles finales de caña*. La Habana: ICIDCA.
62. Plaza, J. (04 de diciembre de 2009). *Basura plástica amenaza al planeta*. Obtenido de El Comercio: <http://www.elcomercio.com/actualidad/basura-plastica-amenaza-al-planeta.html>
63. Porras, M., Villar, M., & Cubbitto, M. (2017). Novel spectrophotometric technique for rapid determination of extractable PHA using Sudan black dye. *Journal of Biotechnology*, 28-32.
64. Porras, M., Villar, M., & Cubbitto. (2018). Improved intracellular PHA determinations with novel spectrophotometric quantification methodologies based on Sudan black dye. *Journal of Microbiological Methods*, 1-11.
65. Quillaguaman, J., Delgado, O., Mattiasson, B., & Hatti, K. (2006). Poly(beta-hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme. Microb Technol* 38, 148–154.
66. Ramani, N. (2011). *Biodegradabilidad ambiental en materiales plásticos: concepto, medición, uso y consecuencias*. Michigan: State University.
67. Rehm, B. (2003). Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *Biochemical Society*, 15-33.
68. Rocha, R., Silva, T., Taciro, M., & Pradella, J. (2008). Production of P(3HB)-co-3HV with a broad range of 3HV content at high Y_{3HV/Prop} values by *B.sacchari*. *Microbiol Biotechnol*.
69. Rojas, N. (2016). Producción de Polihidroxialcanoatos a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol 14.

70. Rojas, A. (23 de febrero de 2018). *La contaminación por plástico*. Obtenido de El financiero: <https://www.elfinancierocr.com/tecnologia/la-contaminacion-por-plastico/YTJWOX5OENA6ZAIQ3GOK6UTKJM/story/>
71. Sánchez, L., & Corrales, L. (2005). *Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas*. Cundinamarca, Colombia: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
72. Sangkhara, K., & Prasertsan, P. (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *J Gen Appl Microbiol*, 173-82.
73. Sangkharak, K., & Prasertsan, P. (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *J Gen Appl Microbiol* 58, 173-182.
74. Sathiyarayanan, G., Saibaba, G., Seghal, K., & Selvin, J. (2013). Process optimization and production of polyhydroxybutyrate using palm jaggery as economical carbon source by marine sponge-associated *Bacillus licheniformis* MSBN12. *Bioprocess Biosyst Eng*.
75. Segura, D., Noguez, R., & Espín, G. (2010). *Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables*. Biotecnología.
76. Seminario, J., Valderrama, M., & Manrique, I. (2003). *El yacón: Fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio*. Lima: Centro Internacional De La Papa (CIP).
77. Serrano, J. (2010). *Polihidroxicanoatos (PHA's): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente*. Revista Teoría y Praxis investigativa.

78. Slepecky, R., & Law, J. (1960b). A rapid spectrophotometric assay of alfa-beta-unsaturated acids and beta-hidroxy acids. *Anal. Chem.*, 1697-1699.
79. Sonakya, V., Raizada, N., & Kalia, V. (2001). Microbial and enzymatic improvement of anaerobic digestion of waste biomass. *Biotechnological Letters*, 1463-1466.
80. Takeharu, T., Manami, H., & Kouhel, M. (2015). Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*.
81. Takenaka, M., Yan, X., Ono, H., Yoshida, M., & Nagata. (2003). Caffeic acid derivatives in the roots of yacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 793-796.
82. Textos científicos. (29 de noviembre de 2009). *Polihidroxiálcanoatos (PHA)*. Obtenido de [Textos científicos.com: https://www.textoscientificos.com/polimeros/polihidroxiálcanoatos](https://www.textoscientificos.com/polimeros/polihidroxiálcanoatos)
83. Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. San Francisco: CA: Pearson.
84. Tsuge, T. (2002). Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 579-584.
85. Urvija, A., & Veena, G. (2015). Production of Polyhydroxyalkanoate (PHA) by a Moderately Halotolerant Bacterium *Klebsiella pneumoniae* U1 Isolated from Rubber Plantation Area. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*.
86. Valappil, S., Misra, S., Boccaccini, A., & Roy, I. (2006). Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and in vivo responses. *Med Devices*. Obtenido de <https://doi.org/10.1586/17434440.3.6.853>

87. Valappil, S., Peiris, D., Langley, G., J., H., Boccaccini, A., Bucke, C., & Roy, I. (2007c). Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *J Biotechnol*, 475-487.
88. Valappil, S., Rai, R., Bucke, C., & Roy, I. (2008). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *Journal of Applied Microbiology*, 1624-1635.
89. Yilmaz, M., Soran, H., & Beyatli, Y. (2005). Determination of poly- β hydroxybutyrate (PHB) produced by some *Bacillus* spp. *World J Microbiol Biotechnol* 21:565–566, 565–566.
90. Zhao, W., & Chen, G. (2007). Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes PHA-AB. *Process Biochemistry*, 1342-1347.
91. Zulfiqar, A., Sharjeel, A., & Ibrahim, B. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45-56.