



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

E.A.P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA Y LA
CONCENTRACIÓN DE MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR EN LA
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR BACTERIAS
TERMÓFILAS AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL QUILCATE,
CAJAMARCA, 2022**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. SANDRA SOLEDAD CARRASCO TARRILLO.

ASESOR

Dr. MARCO ANTONIO RIVERA JACINTO.

COASESOR

M. Cs. OMAR DANIEL PAIRAZAMÁN QUIROZ.

CAJAMARCA- PERÚ

2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

Ciudad Universitaria - IQ - 115 - Av. Atahualpa N° 1058 - Cajamarca -

☎ 076-599227 anexo 1272



La Directora de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud - Universidad Nacional de Cajamarca, Doctora Martha Vicenta Abanto Villar que suscribe, deja

CONSTANCIA

Que, la tesis titulada **EFFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR EN LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR BACTERIAS TERMÓFILAS AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL QUILCATE, CAJAMARCA 2022**, presentada por la Bachiller en Ciencias Biológicas **SANDRA SOLEDAD CARRASCO TARRILLO**, ha sido revisada en el Software Antiplagio **TURNITIN** de la Universidad Nacional de Cajamarca, obteniendo un puntaje de 11% de similitud, considerado dentro de los parámetros requeridos. Teniendo como Asesor al Docente **Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto**, Co- Asesor **M.Cs. Omar Daniel Pairazamán Quiroz**.

Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que considere convenientes.

Cajamarca, 23 de febrero del 2024



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Dra. Martha Vicenta Abanto Villar
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN

COPYRIGHT©

SANDRA SOLEDAD CARRASCO TARRILLO

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Carrasco, S. 2023. Efecto de la variación de la temperatura y la concentración de melaza de caña de azúcar en la producción de polihidroxicanoatos por bacterias termófilas aisladas de la fuente termal Quilcate, Cajamarca, 2022 / Sandra Soledad

Carrasco Tarrillo

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

Co-asesor: Mg. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo UNC - 2024

**EFFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA Y LA
CONCENTRACIÓN DE MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR EN LA
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR BACTERIAS
TERMÓFILAS AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL QUILCATE,
CAJAMARCA, 2022**

AUTOR: Bach. Sandra Soledad Carrasco Tarrillo

ASESOR: Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto

CO-ASESOR: M. Cs. Omar Daniel Pairazamán Quiroz

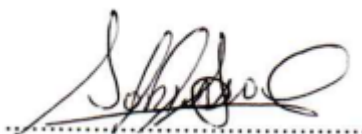
Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



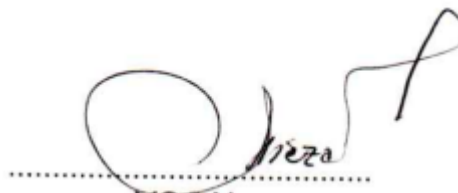
.....
Presidente

Dr. Luis Gilberto García Izquierdo



.....
Secretario

M. Cs. William Edgardo Soriano Castillo



.....
Vocal

Dr. Demetrio Cieza Yrigoín

Cajamarca, 2024 – Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 09:10 del 09 de Febrero del 2024, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 1D-106 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Efecto de la variación de la temperatura y la concentración de melaza de caña de azúcar en la producción de polihidroxicarboxilatos por bacterias termófilas aisladas de la fuente termal Quilcate, Cajamarca, 2022" del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Sandra Soledad Carrasco Tarillo

Siendo las 10:10 del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: MUY BUENO, con el calificativo de: 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra APTA para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador		Firma
Nombres y Apellidos		
Presidente:	Dr. Luis Gilberto García Izquierdo	
Secretario(a):	MCS. William Edgardo Soriano Castillo	
Vocal:	Dr. Demetrio Cieza Yrigoin	
Accesitario:	MCS. Arturo Ulises Díaz Aliaga	
Asesor (a):	Dr. Marco Antonio Rivera Jacinto	
Co Asesor (a):	MCS Omar Daniel Páramo Quiroz	

Términos de Calificación:
 EXCELENTE (19-20)
 REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18)
 REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16)
 DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Dedico esta tesis principalmente a Dios, por darme la fuerza y sabiduría para cumplir con esta meta. A mis padres, por acompañarme en cada paso que doy para ser una mejor profesional. Y a la persona más luchadora y persistente que puedo conocer: yo

AGRADECIMIENTO

A mi asesor Dr. Marco A. Rivera Jacinto y a mi Co-asesor Mg. Omar Pairazamán por su tiempo, dedicación y paciencia para impartir sus conocimientos y experiencias para el óptimo desarrollo de esta tesis. Al Ing. Juan Carlos Flores por su gentileza en prestarme algunos materiales necesarios para el desarrollo de algunos ensayos de esta tesis.

A CONCYTEC PROCENCIA, que en el marco de la convocatoria de Proyectos de Investigación Básica 2019-01 financió el Proyecto Semilla “Potencial genético con aplicación biotecnológica industrial y ambiental de la microbiota termófila de las fuentes geotermales de la Región Cajamarca” [número de contrato 395-2019-FONDECYT] del cual forma parte esta tesis.

Por último, agradecer a la Universidad por haberme exigido tanto, pero al mismo tiempo por permitirme poder desarrollar investigación científica para contribuir al desarrollo sostenible del país.

TABLA DE CONTENIDO

TÍTULO	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes de la Investigación	3
2.2. Bases Teóricas	5
2.2.1.Fuentes termales y sus características físico-químicas	5
2.2.2.Bacterias termófilas y su potencial biotecnológico	7
2.2.3.Polihidroxialcanoatos (PHA)	8
2.2.4.Potenciales fuentes de carbono reutilizables para producir PHA	13
2.2.5.Métodos de extracción de PHA.....	13
2.2.6.Aplicaciones del PHA	14
CAPÍTULO III: DISEÑO DE LA CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	16
3.1. Nivel de Investigación	16
3.2. Tipo y diseño de investigación	16
3.3. Material biológico	16
3.4. Unidad de análisis	16
3.5. Procedimientos	16
3.5.1.Caracterización microbiológica de aislamientos termófilos productores de PHA	16
3.5.2.Producción cuantitativa de PHA por aislamientos bacterianos.....	18
3.5.3.Evaluación de la variación de la temperatura y la concentración de melaza de caña en la producción de PHA	19
3.6. Procesamiento y análisis de datos	20
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
4.1. Resultados	21
4.1.1.Caracterización microbiológica de bacterias termófilas productoras de PHA	21
4.1.2.Producción cuantitativa de PHA por aislamientos bacterianos.....	23
4.1.3.Evaluación de la variación de la temperatura y la concentración de melaza de caña en la producción de PHA	24
4.2. Discusión	29

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
5.1. Conclusiones	36
5.2. Recomendaciones	36
LISTA DE REFERENCIAS	37
APÉNDICES	43
ANEXOS.....	54

LISTA DE ABREVIACIONES

AN: Agar Nutritivo

MM: Medio mineral

PHA: Polihidroxicanoatos

PHB: Polihidroxiacetato

RPM: Revoluciones Por Minuto

GLOSARIO

Polímero: compuesto químico formado por monómeros unidos mediante enlaces covalentes, pueden ser de origen natural, como los PHA sintetizados en forma de poliésteres completamente biodegradables (Mumtaz *et al.*, 2010).

Residuos agroindustriales: son recursos renovables importantes generados a partir de la cosecha y procesamiento de diferentes productos agrícolas de alta demanda para la obtención de productos de interés económico y social (Sarkar *et al.*, 2012).

Plástico sintético: está formado por polímeros artificiales derivados típicamente del petróleo en un ambiente controlado, por ejemplo, polietileno, policloruro de vinilo (Shrivastava, 2018).

Termófilos: son microorganismos que habitan ambientes calientes, como fuentes termales, tienen una temperatura óptima de crecimiento entre 45 y 80 °C (Madigan *et al.*, 2015).

**EFECTO DE LA VARIACIÓN DE LA TEMPERATURA Y LA
CONCENTRACIÓN DE MELAZA DE CAÑA DE AZÚCAR EN LA
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR BACTERIAS
TERMÓFILAS AISLADAS DE LA FUENTE TERMAL QUILCATE,
CAJAMARCA, 2022**

RESUMEN

Las bacterias termófilas aisladas de fuentes termales tienen un gran potencial biotecnológico para la producción de biopolímeros biodegradables como los polihidroxialcanoatos (PHA), estos se acumulan en forma de gránulos intracelulares como reserva de carbono y energía. En esta investigación se evaluó el efecto que tiene la variación de la temperatura y la concentración de melaza de caña en la producción de PHA por aislamientos bacterianos, previamente aislados de la fuente termal de Quilcate. Se evaluaron 106 aislamientos bacterianos a 45 °C con 2 % de melaza de caña como sustrato; la evaluación tuvo en cuenta el porcentaje del polímero ocupado en el citoplasma observados mediante tinción Negro Sudán B. 90 aislamientos fueron productores del biopolímero. Posteriormente, se cuantificó la producción de PHA por siete aislamientos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Anoxybacillus* y *Aneurinibacillus*. Después, los dos aislamientos con mayor rendimiento en el paso anterior fueron evaluados a temperaturas de 45, 50 y 55 °C y a concentraciones de 6, 10 y 14 % de melaza. *B. licheniformis* Q25 y *A. salavatliensis* Q50 a una temperatura de 50 °C presentaron 55.42 y 56.64 % de rendimientos de PHA utilizando 6 y 2 % de melaza de caña, respectivamente. Se concluye que la temperatura de 50 °C y las concentraciones de 2 y 6 % de melaza de caña favorecen el rendimiento de producción de PHA por los aislamientos bacterianos termófilos evaluados en esta investigación.

Palabras clave: Biopolímeros, Fuentes termales, Melaza de caña de azúcar, Polihidroxialcanoatos, Termófilos

ABSTRACT

Thermophilic bacteria isolated from hot springs have great biotechnological potential for the production of biodegradable biopolymers such as polyhydroxyalkanoates (PHA), these accumulate in the form of intracellular granules as a carbon and energy reserve. In this research, the effect of temperature variation and sugarcane molasses concentration on PHA production by bacterial isolates, previously isolated from the Quilcate hot spring, was evaluated. 106 bacterial isolates were evaluated at 45 °C with 2% sugar cane molasses as substrate; the evaluation took into account the percentage of the polymer occupied in the cytoplasm observed by Sudan B Black staining. 90 isolates were biopolymer producers. Subsequently, PHA production was quantified by seven isolates belonging to the genera *Bacillus*, *Anoxybacillus* and *Aneurinibacillus*. Then, the two isolates with the highest performance in the previous step were evaluated at temperatures of 45, 50 and 55 °C and concentrations of 6, 10 and 14 % molasses. *B. licheniformis* Q25 and *A. salavatliensis* Q50 at a temperature of 50 °C presented 55.42 and 56.64 % PHA yields using 6 and 2 % cane molasses, respectively. It is concluded that the temperature of 50 °C and concentrations of 2 and 6 % of cane molasses favor the production performance of PHA by thermophilic bacterial isolates evaluated in this research.

Keywords: Biopolymers, Hot springs, Sugar cane molasses, Polyhydroxyalkanoates, Thermophiles

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son biopoliésteres microbianos acumulados en forma de gránulos intracelulares principalmente como reserva de carbono y energía (Saavedra del Oso, Mauricio-Iglesias y Hospido, 2021). Este biopolímero es de gran interés biotecnológico por ser un material no tóxico, insoluble en agua, resistente a los rayos UV y principalmente por su biodegradabilidad. En este contexto, los PHAs son alternativas sostenibles y ecológicas frente a los plásticos convencionales (Bugnicourt *et al.*, 2014; Masood, Yasin y Hameed, 2014).

Debido a sus propiedades inocuas estos polímeros son utilizados en ingeniería de tejidos con aplicaciones en medicina (Porter *et al.*, 2013), como por ejemplo, en la construcción de válvulas cardíacas con nanoandamios biodegradables (Hong *et al.*, 2009). Se utilizan también en la industria del embalaje (Israni y Shivakumar, 2019), así como en la agroindustria como materia prima para la producción de películas biodegradables que retienen la humedad, controlan malezas y previenen la contaminación de los suelos (Amelia *et al.*, 2019).

Una de las limitaciones que tiene la producción de PHAs microbiano a mediana y a gran escala es la utilización de sustratos orgánicos comerciales muy costosos. Por lo tanto, desde un enfoque sustentable, el uso de residuos agroindustriales como la melaza obtenida de la caña de azúcar, puede ser una fuente de carbono adecuada y barata para su producción. Además, la melaza de caña es un residuo abundante en algunas regiones del Perú producida por la industria azucarera.

Otra limitación importante en la producción comercial actual de PHA por empresas que utilizan bacterias mesófilas es el difícil control de las condiciones de esterilidad que se requieren en este tipo de procesos biotecnológicos. En este contexto, la utilización de bacterias termófilas (temperatura óptima de crecimiento sobre los 45 °C) reduce el riesgo de contaminación microbiana debido a que las fermentaciones se llevan a cabo entre 50 y 60 °C frente a las cuales estas bacterias son resistentes. Además, la temperatura elevada mejora el proceso fermentativo debido a que la solubilidad del sustrato es mayor, se reduce la viscosidad del medio de cultivo y se mejora su homogeneidad, igualmente se aceleran los procesos metabólicos que dan lugar a la producción de PHA (Peleg, Normand y Corradini, 2012; Zeldes *et al.*, 2015; Krüger *et al.*, 2018; Chavan *et al.*, 2021).

La región Cajamarca cuenta con fuentes termales que son utilizadas principalmente con fines turísticos. Sin embargo, también hay fuentes termales que no han sufrido impacto antropogénico y que constituyen el hábitat de bacterias termófilas potencialmente útiles en biotecnología, este es el caso de la fuente termal de Quilcate ubicada en la provincia de San Miguel, de donde provienen los aislamientos evaluados en esta investigación.

Los aislamientos termófilos productores de PHA evaluados en esta investigación fueron seleccionados y caracterizados microbiológicamente antes de ser sometidos a los procesos fermentativos. En primer lugar, se evidenció la presencia de los gránulos de PHA mediante tinciones especiales, luego se valoró el peso seco de la biomasa (g) y del PHA (g) y se determinó el rendimiento productivo [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] de los aislamientos evaluados, bajo ciertas condiciones de temperatura y concentración de sustrato. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto que tiene la variación de la temperatura y la concentración de la melaza de caña de azúcar en la producción de PHA por bacterias termófilas aisladas de la fuente termal de Quilcate, San Miguel, Cajamarca.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

En Perú las investigaciones realizadas se enfocan en la evaluación del rendimiento de producción de PHA utilizando bacterias aisladas de ambientes salinos. Guzmán *et al.* (2017), aislaron bacterias productoras de PHA utilizando almidón como fuente de carbono. De los aislados obtenidos determinaron que *Halomonas* sp. M4C1 alcanzó un rendimiento de 0.144 g.g⁻¹. Sin embargo, no existen investigaciones en el Perú sobre la producción de PHA por bacterias termófilas aisladas de fuente termales utilizando melaza de caña de azúcar como fuente de carbono.

A nivel mundial se han desarrollado diversos estudios sobre la producción de PHA con bacterias termófilas. Sheu *et al.* (2009), aislaron *Caldimonas taiwanensis* de una fuente termal ubicada al sur de Taiwán, en medio Luria-Bertani suplementado con gluconato de sodio, fructosa, maltosa o glicerol como fuente de carbono, bajo condiciones limitantes de nitrógeno (C/N:30), produciéndose 70, 62, 60 y 52 % de PHB a 55 °C, respectivamente. Es importante destacar que *C. taiwanensis* necesitó solo 14 horas para lograr la máxima producción de PHB a 55 °C (71 % en peso seco) en un medio de sales minerales conteniendo 1.5 % de gluconato de sodio como única fuente de carbono. Finalmente, concluyeron que *C. taiwanensis* tiene un gran potencial para reducir el costo de producción de P(3HB-co-3HV).

De igual manera, Ibrahim *et al.* (2010), identificaron cepas bacterianas productoras de PHA de fuentes termales egipcias, entre ellas, *Chelatococcus asaccharovorans*, *Chelatococcus daeguensis*, *Chelatococcus sambhunathii* y *Methylobacterium lusitanum*. Estas cepas crecieron en un rango de temperatura de 37 a 55 °C con

crecimiento óptimo a los 50 °C y su máxima producción de poli-3HB fue de 73 % a partir de glucosa (20 g/L) como única fuente de carbono en el medio de fermentación. La concentración de la fuente de carbono disminuyó conforme avanzó el proceso fermentativo, por ejemplo, después de 99 horas la glucosa disminuyó hasta 3 g/L con varias de las cepas evaluadas y después de 145 horas se consumió totalmente; este hecho demostró que una forma indirecta de evaluar la producción del polímero es midiendo el consumo de la fuente de carbono. Finalmente, concluyeron que las nuevas cepas termófilas descubiertas producen PHB a partir de glucosa y glicerol utilizando MM a 50 °C.

Caldimonas manganoxidans JCM 10698 es una cepa termófila aislada de una fuente termal ubicada en Matsue, Japón; esta cepa fue evaluada por Hsiao *et al.* (2016), en la producción de PHB utilizando distintas concentraciones de glucosa (2.5, 5, 10, 20 y 30 g/L). Utilizando 20 g/L obtuvieron la mayor concentración de biomasa (10 ± 1 g/L) y un contenido de PHB de 40 ± 7 % a las 24 horas de incubación a 50 °C. Además, evaluaron el efecto de la temperatura en la producción de PHB reportando un incremento de hasta 58 ± 8 % cuando esta se ajustó a 55 °C. Finalmente, concluyeron que *C. manganoxidans* JCM 10698 es una cepa termófila prometedora con un alto porcentaje de producción de PHB.

Gedikli *et al.* (2018) evaluaron la producción de PHB por bacterias termófilas de la fuente termal Çitgöl en Kütahya, Turquía, bajo diferentes condiciones de temperatura de incubación (35, 55 y 75 °C) y tiempo de incubación (2, 4 y 6 días), así como diferente concentración de la fuente de carbono (10, 30 y 50 g/L). Después del proceso fermentativo utilizando medio NB con 20 g/L de sacarosa a 55°C, 48 horas

y 150 rpm obtuvieron rendimientos de producción de PHB de 0.75 %, 0.62 %, 1.63 %, 1.80 %, 4.24 % respectivamente con *Thermus thermophilus*, *Geobacillus thermoparaffinivorans*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus* sp. y *Geobacillus kaustophilus*. No obstante, después de un proceso de optimización, obtuvieron un rendimiento de 8.66 % con *G. kaustophilus*. Finalmente, concluyeron que todas estas bacterias termófilas presentaron ventajas al cultivarse a altas temperaturas durante el proceso de producción de PHA.

An, Ha y Lee (2023), evaluaron la producción de PHB por *Cupriavidus cauae* PHS1, cepa aislada de una fuente termal ubicada en Pohang, Corea del Sur, utilizando 20 g/L de gluconato como única fuente de carbono en el medio modificado MSM, a 42 °C y 200 rpm. Después de 27 horas de fermentación obtuvieron 2.62 ± 0.15 de biomasa en peso seco (g) y 0.96 ± 0.10 de PHB (g/L). Además, evaluaron el efecto de la variación de la temperatura, reportando la mayor producción de biomasa (3.14 g/L) y de PHB (47 % en peso seco) a 45 °C. Finalmente, concluyeron que la bacteria termófila que evaluaron tiene potencial en la producción de grandes cantidades de PHB.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Fuentes termales y sus características físico-químicas

Las fuentes termales son ambientes extremos naturales que se caracterizan por registrar temperaturas por encima de 36.7 °C, independientemente de su altitud o presión, con una variación de 1 ó 2 °C a lo largo de los años; estas elevadas temperaturas permiten el crecimiento exitoso de una gran diversidad de termófilos e hipertermófilos (Pentecost, Jones y Renaut, 2003; Dodds y Whiles, 2010; Madigan *et al.*, 2015).

Las fuentes termales se encuentran distribuidas a nivel mundial, principalmente en el oeste de los Estados Unidos, en Nueva Zelanda, Islandia, América Central entre otros. En el parque nacional de Yellowstone (EE. UU) se encuentra la mayor concentración del mundo de fuentes termales (Madigan *et al.*, 2015). Un dato interesante de analizar lo brinda Hou *et al.* (2013), en el que demuestra la similitud de comunidades microbianas que habitan las fuentes termales ubicadas en Tengchong (China) y en Yellowstone, posiblemente debido a que ambos fueron impulsados volcánicamente con manantiales ácidos.

En la zona nororiental de nuestro país se encuentra la fuente termal llamada Aguas Calientes ubicada entre las regiones de Ucayali y Loreto, esta fuente se caracteriza por tener un pH ligeramente ácido (pH 5.0 – 7.0) y una temperatura que varía de 45 a 90 °C (Paul *et al.*, 2016). Asimismo; en la Región Cajamarca, encontramos un promedio de 16 fuentes termales con valores de pH cercanos a la neutralidad, de las cuales cinco registran una temperatura mayor a 45 °C. En Quilcate, San Miguel, la fuente termal tiene un pH de 6.6 y la temperatura varía de 51 a 62 °C (Huamaní, 2000). En la zona central del país la constante actividad geotermal permite que las fuentes termales puedan alcanzar temperaturas de hasta 78 °C (Newell *et al.*, 2015). Al sur del país en Candarave (Tacna) las fuentes termales asociadas al campo geotermal de Calientes, presentan temperaturas entre 50 y 87 °C y pH entre 6 y 8, a excepción de la parte alta del río Calientes que presenta un pH ácido de 3.5 (Cruz y Matsuda, 2012).

2.2.2. Bacterias termófilas y su potencial biotecnológico

Las bacterias termófilas (temperatura óptima de crecimiento de 45 a 80 °C), a diferencia de las de las mesófilas, presentan proteínas y enzimas estables a altas temperaturas, característica fisiológica relevante que les permite desarrollarse en ambientes extremos como los termales. Así mismo, han desarrollado adaptaciones estructurales y químicas, como el incremento de la proporción de sus ácidos grasos saturados, que les permiten mantener la estabilidad de sus membranas. Algunas de estas bacterias han sido descubiertas a través de nuevas técnicas y herramientas genéticas, entre ellas están *Bacillus stearothermophilus*, *Thermus thermophilus*, y las especies pertenecientes a los géneros *Thermoanaerobacter* sp., *Thermotoga* sp. y *Geobacillus* sp. (Noll, 2001; Madigan *et al.*, 2015).

En muchos procesos biotecnológicos existe el riesgo de contaminación de los medios de fermentación por microorganismos mesófilos, aquí, el empleo de bacterias termófilas sería de gran importancia ya que su resistencia a altas temperaturas reduce la posibilidad de contaminación. Además, la temperatura a la que ocurre el proceso mejora la solubilidad de los sustratos, reduce la viscosidad del medio de cultivo e incluso incrementa la homogeneidad del medio. Así mismo, la demanda de energía para mantener la temperatura elevada es mínima, en cuanto a cultivos a gran escala, debido a que los procesos metabólicos de estas bacterias y los sistemas de agitación de los biorreactores generan el calor necesario sin afectar el metabolismo de las bacterias (Pernicova *et al.*, 2020; Pernicova *et al.*, 2020; Obruča *et al.*, 2022).

La producción de proteínas unicelulares, la bioconversión de desechos, los procesos de lixiviación y eliminación de metales pesados de residuos, la producción de termozimas como celulasas, amilasas, lipasas para industrias que emplean altas temperaturas como la industria del papel, alimentos, elaboración de cerveza, entre otros bioprocesos, requieren de bacterias termófilas. Además, estas mismas bacterias pueden ser útiles en la producción de exopolisacáridos y polímeros como los PHA, útiles en la fabricación de diversos biomateriales tanto para uso médico como para uso agroindustrial (Zeikus, 1979; Urbietta *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2015).

2.2.3. Polihidroxicanoatos (PHA)

Los PHA son biopolímeros biodegradables, renovables y biocompatibles, sintetizados por muchas bacterias incluyendo especies grampositivas y gramnegativas; estos biopolímeros se acumulan en el citoplasma como material de almacenamiento de carbono y energía en respuesta al exceso de fuente de carbono en el medio, o bajo condiciones de estrés por la escasez de nutrientes nitrogenados, fosfatados, o de otro tipo. Los PHA están siendo ampliamente estudiados como materiales alternativos a los plásticos sintéticos por sus propiedades físicas y termoquímicas, las cuales varían de acuerdo a la longitud y composición de la cadena de monómeros (Hazer y Steinbüchel, 2007; Choi *et al.*, 2020).

2.2.3.1. Clasificación y tipos de PHA

Los PHA se pueden clasificar estructuralmente en base al número de átomos de carbono en los monómeros, la diversidad de monómeros determina las propiedades, funcionalidades, aplicaciones y

biodegradabilidad de estos polímeros (Rehm, 2010). Los PHA de cadena corta (scl – PHA) constan de 3 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, el poli-3-hidroxi butirato (P3HB), poli-4– hidroxi butirato (P4HB) y poli-3 – hidroxi valerato (P3HV) o el copolímero P (3HB – co – 3HV). El P3HB es el tipo más común de scl-PHA y se ha reportado en muchos trabajos como producto del metabolismo de *Cupriavidus necator*. Los PHA de cadena media (mcl – PHA) constan de 6 a 14 o más átomos de carbono y su síntesis ha sido reportada mucho en *Pseudomonas* spp. (Li y Wilkins, 2020). Este biopolímero también se puede clasificar de acuerdo a los arreglos de microestructura polimérica en homopolímeros, copolímeros aleatorios, copolímeros de bloque o copolímeros funcionales (McChalicher y Srienc, 2007). La clasificación estructural se muestra en la Figura 1.

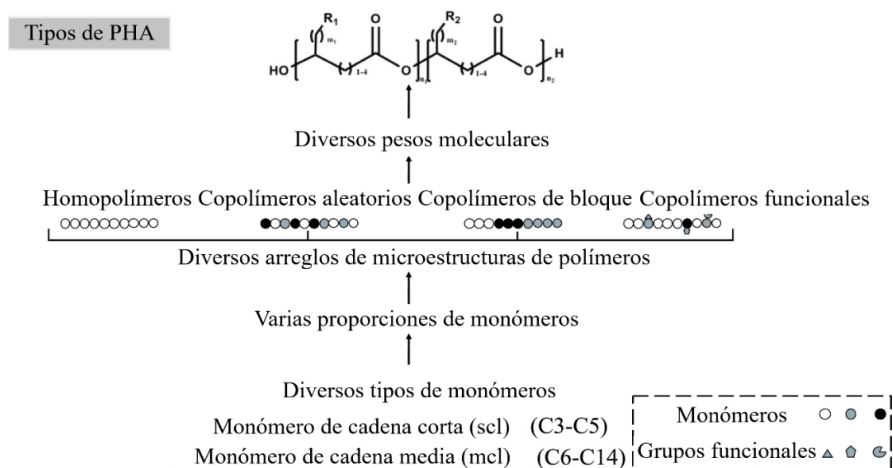


Figura 1. Clasificación estructural de los PHA con base en la cantidad de átomos de carbono en la cadena de polímeros y en los arreglos de microestructura polimérica (Zheng *et al.*, 2020).

2.2.3.2. Vías de síntesis de PHA

Existen tres vías principales para la síntesis de PHA como se puede observar en la Figura 2. En la vía I la condensación de dos moléculas de acetil CoA del ciclo del ácido tricarboxílico originan los monómeros de 3HB para formar acetoacetil-CoA. La acetoacetil CoA reductasa actúa sobre la acetoacetil CoA para formar 3-hidroxiacetil-CoA. Por último, la enzima PHA sintasa cataliza la polimerización de 3-hidroxiacetil-CoA en poli (3-hidroxiacetirato). La vía II se caracteriza por la degradación de ácidos grasos por mecanismos de β -oxidación. En la vía III se generan monómeros para la producción de PHA a partir de fuentes de carbono simples como la glucosa, sacarosa y fructosa. Las vías I y III utilizan azúcares fermentables, mientras que la vía II utiliza ácidos grasos para su crecimiento y producción de PHA (Anjum *et al.*, 2016). Para la síntesis de PHA utilizando como fuente de carbono melaza de caña se necesita un pretratamiento antes del proceso fermentativo que consiste en la hidrólisis ácida de la melaza donde la sacarosa (principal componente de la melaza) se convierte en sus monómeros glucosa y fructosa, estas finalmente serán metabolizadas por las bacterias termófilas durante el proceso posiblemente siguiendo la vía de fermentación III (Sen, Hussin y Baidurah, 2019).

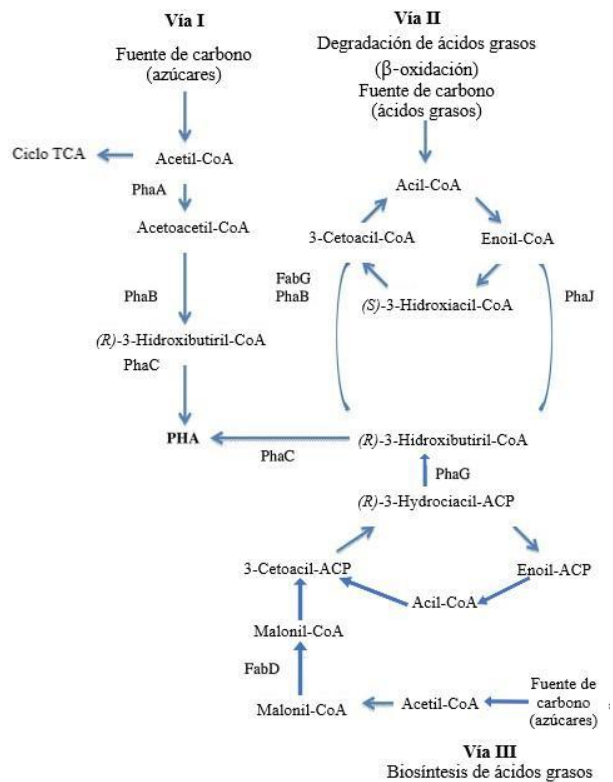


Figura 2. Vías de síntesis de PHA (Anjum *et al.*, 2016).

2.2.3.3. Factores que afectan la producción de PHA

Para mejorar la producción de PHA se evalúa diversos parámetros de optimización. Según Flora *et al.* (2010), cuando la concentración del sustrato aumenta a porcentajes elevados disminuye la producción de PHA, esta reducción podría deberse al efecto inhibitorio de la alta concentración de PHA, a la disminución de la actividad enzimática responsable de la síntesis de PHA y a la escasez de nutrientes. Algunos investigadores señalan que para lograr una mayor productividad de PHA por *B. subtilis* se tiene que tener en cuenta la variación de la temperatura de incubación de 20 a 40 °C, el pretratamiento con H₂SO₄ (0.1 N) de la fuente de carbono, la adición de etanol (1 %), las fuentes de nitrógeno como el sulfato de amonio,

concentraciones mínimas de sales en el medio, la concentración del inóculo (8 %) y el tiempo de incubación hasta 96 horas (Gomaa, 2014).

2.2.3.4. Producción de PHA por bacterias

La literatura científica reporta investigaciones sobre la producción de PHA por bacterias mesófilas. Chaudhry *et al.* (2011), reportaron una producción de 32.65 % de PHA por *Pseudomona* sp. utilizando como fuente de carbono aceite de maíz. Posteriormente, Guzmán *et al.* (2017), obtuvieron un rendimiento de producción de PHA por *Halomonas* sp. de 0.144 g.g⁻¹ utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. como fuente de carbono. Así mismo, Sen *et al.* (2019), obtuvieron una producción de PHB de 27.30 % por *Cupriavidus necator* utilizando como fuente de carbono varias melazas pretratadas.

Las bacterias termófilas aisladas de fuentes termales también poseen la capacidad de producir estos polímeros. Pantazaki *et al.* (2003), obtuvieron una producción de 40 % de PHA por *Thermus thermophilus* utilizando como fuente de carbono gluconato de sodio (1.5 % p/v) . En un estudio posterior realizado por Sheu *et al.* (2009), reportaron una producción de 62 y 60 % de PHB por *C. taiwanensis* a 55 °C utilizando como fuente de carbono fructuosa o maltosa, respectivamente. Un año más tarde, Ibrahim *et al.* (2010), obtuvieron una producción de 59.3 % de PHA por *Chelatococcus* sp. utilizando glucosa (20g/L) a 50 °C.

2.2.4. Potenciales fuentes de carbono reutilizables para producir PHA

Para la producción sostenible de PHA se puede utilizar residuos orgánicos ricos en lípidos, tales como aceites vegetales de desecho, residuos de grasas animales; se pueden utilizar también residuos de la industria del biodiésel como el glicerol y el metanol; el suero de la industria láctea, la lignina y sus derivados, los desechos de la industria del café y los residuos de la industria azucarera como la melaza de caña de azúcar (Ganesh *et al.*, 2021).

La melaza de caña es un residuo de la industria azucarera de consistencia viscosa similar a la miel, aunque de color parduzco oscuro. Según Muñoz (2020), a nivel nacional la producción total de azúcar en este año alcanzó 1 millón de toneladas aproximadamente y de acuerdo con Chauhan *et al.* (2011), se generan 0.38 toneladas de melaza de caña por cada tonelada de azúcar producida, reportándose así una producción nacional de 380 mil toneladas de melaza. Por lo tanto, la melaza es considerada una potencial fuente de carbono para la producción de PHA por ser un residuo económico, abundante y con alto contenido de azúcares como glucosa, sacarosa y fructuosa (Raza, Abid y Banat, 2018).

2.2.5. Métodos de extracción de PHA

El proceso de extracción eficiente de PHA depende de varios factores, los disolventes utilizados son el factor principal. El proceso inicia con la solubilización de PHA debido a que este material es insoluble en agua, luego continúa con la separación del biopolímero de la biomasa y finalmente, termina con la separación del PHA del disolvente. Los disolventes que se utilizan son de distinto tipo, están los no halogenados como el carbonato dimetil (DMC) y los disolventes clorados como el cloroformo y el diclorometano, estos últimos

se utilizan con mayor frecuencia debido a que se obtiene una mayor pureza, una alta calidad del polímero y un mayor porcentaje de recuperación (Pagliano *et al.*, 2021). Para el proceso de extracción de PHA se utilizan dos enfoques, el primero utiliza disolventes orgánicos, y el segundo utiliza agentes químicos para romper la matriz celular y liberar el PHA (Samorì *et al.*, 2015).

Por otro lado, se tiene que tener en cuenta también la evaluación de parámetros como el porcentaje de recuperación del polímero, pureza, peso molecular e índice de polidispersidad del polímero de PHA. Estos parámetros son importantes para determinar la utilidad y aplicabilidad del PHA, por ejemplo, la pureza de PHA está relacionada de manera estricta con las aplicaciones biomédicas, el peso molecular del PHA y el índice de polidispersidad afectan la procesabilidad del PHA. Cabe mencionar que debido a que los gránulos de PHA extraídos retienen una capa superficial proteica es difícil conseguir un 100 % de pureza (Kuchta *et al.*, 2007; Pagliano *et al.*, 2021).

2.2.6. Aplicaciones del PHA

Los PHA constituyen una alternativa a los plásticos sintéticos debido a su propiedades de biodegradabilidad, no toxicidad y biocompatibilidad, por lo tanto, son de gran importancia en diferentes áreas, por ejemplo, en la biomedicina se utilizan para la fabricación de dispositivos biomédicos (tornillos para huesos), se utilizan como vehículos que transportan fármacos a escala nanométrica (Ray y Kalia, 2017), se utilizan en ingeniería de tejido óseo para la fabricación de andamios (Lim *et al.*, 2017) y como tratamiento para la osteoporosis utilizando 3-hidroxi-butilato (Cao *et al.*, 2014). Además, en el área agrícola se utilizan bolsas de cultivo elaboradas a partir de PHA debido a que no contaminan con toxinas perjudiciales los cuerpos de agua circundantes a los

campos agrícolas (Amelia *et al.*, 2019). Además, se utilizan como biocombustibles en forma de éster metílico a partir de poli-3-hidroxitirato (Wang *et al.*, 2010), en empaques, artículos y envases desechables como botellas de champú y bolsas de plástico (Sirohi *et al.*, 2020).

CAPÍTULO III: DISEÑO DE LA CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Nivel de Investigación

Nivel explicativo

3.2. Tipo y diseño de investigación

Investigación de tipo básica con diseño cuasi experimental

3.3. Material biológico

El material biológico estuvo constituido por 106 aislamientos bacterianos obtenidos de sedimento, tapete microbiano y biopelícula de la fuente termal de Quilcate, provincia de San Miguel, Cajamarca, que vienen siendo conservados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca, los cuales fueron aislados de la fuente termal de Quilcate (55 °C). Los aislamientos están conservados en agar base a 4 °C.

3.4. Unidad de análisis

Aislamiento bacteriano cultivable productor de PHA proveniente de la fuente termal de Quilcate.

3.5. Procedimientos

3.5.1. Caracterización microbiológica de aislamientos termófilos productores de PHA

Pretratamiento de la melaza de caña

Para esta investigación se obtuvo melaza de caña de Molinorte S.A.C, Trujillo. La melaza se diluyó con agua destilada (1:1), luego se midió y se ajustó el pH de la dilución a 3,0 utilizando H₂SO₄ 0,1 N, se dejó reposar la solución durante 90 minutos. Finalmente se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos, separándose el sobrenadante en un nuevo recipiente y ajustar el pH

a 7 con NaOH 10M, constituyendo la melaza pretratada; esta se almacenó a 4 °C para su posterior uso en los procesos de fermentación.

Screening de la producción de PHA mediante tinciones

Ciento seis aislamientos bacterianos se inocularon en Agar Nutritivo (AN) y se incubaron por 18 a 24 horas con el propósito de reactivarlas, y luego se repicaron en tubos con medio de fermentación para la detección de PHA. El medio estuvo compuesto por: 20 g/L de melaza pretratada, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 13.3 g/L de KH_2PO_4 , 1.2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.7 g/L de ácido cítrico y se adicionó 10 ml/L de agua de la fuente termal con la finalidad de proveer al medio con elementos traza. El medio se autoclavó por 15 minutos a una temperatura de 121 °C y una atmósfera de presión; luego se ajustó el pH a 7 (Spiekermann *et al.*, 1999).

Después del proceso de fermentación se tomaron alícuotas de las suspensiones bacterianas y se fijaron láminas portaobjeto, dos láminas por aislamiento, una lámina fue teñida con Negro Sudán B y la otra con Azul Nilo, luego se las evaluó mediante microscopía óptica y microscopía de fluorescencia, respectivamente, para determinar la presencia de gránulos de PHA (Hartman, 1940; Ostle y Holt, 1982). Finalmente, se seleccionaron siete aislamientos bacterianos teniendo en cuenta la turbidez del medio de fermentación durante su crecimiento.

Perfil bioquímico de las bacterias productoras de PHA

Este procedimiento se realizó a partir de los cultivos puros en fase exponencial y consistió en evaluar distintas características metabólicas de los aislamientos seleccionados. La capacidad de fermentar glucosa, lactosa

y sacarosa se evaluó en el agar tres azúcares hierro (TSI); la capacidad para descarboxilar y desaminar la lisina se evaluó en el medio agar lisina hierro (LIA), la capacidad de las bacterias de metabolizar citrato de sodio como única fuente de carbono se evaluó en el medio Citrato de Simons; la movilidad bacteriana se observó en el medio SIM, y la producción de ácidos mixtos o de compuestos neutros a partir de glucosa se determinó en el caldo rojo de metilo – Voges Proskauer (RM-VP). Finalmente, se realizaron las pruebas de catalasa y oxidasa.

3.5.2. Producción cuantitativa de PHA por aislamientos bacterianos

Para la determinación cuantitativa del PHA cada uno de los aislamientos se inoculó en matraces con 250 ml de medio mineral (MM) por triplicado. El medio MM tuvo los siguientes componentes: 20 g/L de melaza pretratada, 0.1 g/L de extracto de levadura, 1.0 g/L de NH_4Cl , 0.5 g/L de NaHCO_3 , 1.0 g/L de K_2HPO_4 , 2.0g/L de KH_2PO_4 , 2.0 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g/L de citrato de amonio férrico, además se adicionó 5.0 ml de solución traza compuesta de 0.08 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g/L de H_3BO_3 , 0.2 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 g/L de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El medio se esterilizó en autoclave y luego se ajustó el pH a 7.

El inóculo bacteriano consistió en 25 ml de medio líquido con 1 % de extracto de levadura y 2 % de melaza de caña en el que se sembraron las bacterias de 18 a 24 horas de crecimiento en AN. Luego se incubaron a 45 °C con agitación a 180 rpm, por 24 horas, hasta que se obtuvo una

concentración aproximada de 1×10^7 células/ml (Gomaa, 2014). A continuación, se centrifugaron los inóculos y se vertieron por triplicado en los frascos con 250 ml de medio de fermentación MM y se incubaron a 45 °C por 72 horas con agitación a 180 rpm.

Al término de la fermentación se separó la biomasa por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos, luego, la biomasa se lavó con agua destilada por tres veces. Posteriormente se deshidrató la biomasa a 50 °C y se pesó hasta obtener un peso constante. Finalmente, esta biomasa se utilizó para extraer PHA por el método hipoclorito – cloroformo, descrito en el anexo 1 (Hahn *et al.*, 1994). La cantidad de PHA producido se determinó a través del índice de rendimiento $Y_{(P/X)}$ (ecuación 1) que relaciona el peso seco de PHA y el peso seco de la biomasa en gramos.

$$\text{Ecuación 1: } Y_{\left(\frac{P}{X}\right)} = \frac{\Delta P}{\Delta X}$$

Donde:

ΔP : peso seco de PHA (g/L)

ΔX : peso seco de la biomasa (g/L)

3.5.3. Evaluación de la variación de la temperatura y la concentración de melaza de caña en la producción de PHA

Efecto de la variación de la temperatura

Los aislamientos bacterianos con los dos mayores rendimientos evaluados en el paso anterior fueron seleccionados para evaluar el efecto de la variación de la temperatura en la producción de PHA. El proceso de fermentación se realizó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas, con una concentración constante del sustrato del 2 % de melaza pretratada, y con una variación en la temperatura de incubación de

45, 50 y 55 °C. Finalmente se evaluó el rendimiento para cada temperatura anteriormente descrita.

Efecto de la variación de la concentración de melaza de caña

Esta evaluación se realizó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas y con los dos aislamientos seleccionados. El proceso de fermentación se llevó a la temperatura correspondiente al mayor rendimiento en el paso anterior, pero con variaciones en la concentración de sustrato de 6, 10 y 14 %. Finalmente, se evaluó el rendimiento para cada concentración de sustrato siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

3.6. Procesamiento y análisis de datos

Todos los datos obtenidos durante los experimentos fueron anotados en hojas de recolección de datos. Al finalizar los experimentos todos los datos fueron vaciados en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel para Windows 10 donde fueron procesados y categorizados antes de exportarlos al programa estadístico SPSS v23 (2014).

Para el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS v23 (2014), con el que se compararon los promedios de biomasa, producción de PHA y rendimiento según las temperaturas y concentración de sustrato empleadas aplicándose la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, con un nivel de confianza de 95 % y un $p < 0.05$.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Caracterización microbiológica de bacterias termófilas productoras de PHA

Screening de la producción de PHA

De acuerdo con las consideraciones iniciales de selección de las bacterias productoras de PHA, se determinó que, de los 106 aislamientos bacterianos evaluados, un 84.91 % son productores del biopolímero y un 24.53 % de ellos acumulan el polímero en casi todo su citoplasma (tabla 1). También se observó que el 15.09 % de ellos no acumuló PHA. En el apéndice 4, se presentan fotografías de los aislamientos bacterianos evaluados con tinción Negro Sudan B y Azul Nilo.

Tabla 1. Distribución de aislamientos bacterianos según el porcentaje de PHA ocupado en el citoplasma.

PHA en el citoplasma	Número de aislamientos	Porcentaje (%)
(-) ^a	16	15.09
(+--) ^b	30	28.30
(++-) ^c	34	32.08
(+++) ^d	26	24.53
Total	106	100

^a Ausencia de gránulos de PHA en el citoplasma de las bacterias.

^b 1-34 % del citoplasma ocupado con gránulos de PHA

^c 35-74 % del citoplasma ocupado con gránulos de PHA

^d 75-100 % del citoplasma ocupado con gránulos de PHA

Perfil bioquímico de los aislamientos bacterianos productores de PHA

En la tabla 2 se muestra el perfil bioquímico de siete aislamientos bacterianos con alto porcentaje de citoplasma ocupado por PHA (+++), estos fueron seleccionados teniendo en cuenta la turbidez del medio de fermentación durante su crecimiento (a mayor turbidez mayor biomasa). De los siete, todos los aislamientos son grampositivos y formadores de esporas, citrato de Simmons, indol y Voges Proskauer negativos. La prueba catalasa fue positiva para todos los aislamientos seleccionados salvo para el aislamiento Q45-2; la prueba de oxidasa fue positiva para todos excepto para los aislamientos codificados como Q28 y Q50. Los aislamientos Q24 y Q25 fermentan solamente la glucosa, descarboxilan la lisina y fueron negativos a las pruebas MR-VP. El aislamiento codificado como Q28 además de fermentar la glucosa también fermenta la lactosa y no metabolizó la lisina al igual que el aislado codificado como Q34A. Los aislamientos bacterianos restantes no crecieron en los medios TSI y LIA.

Tabla 2. Perfil bioquímico de los siete aislamientos bacterianos con mayor producción de gránulos de PHA.

Aislamientos	Perfil bioquímico												
	Secuencia de identidad GenBank (gen ARNr 16S)	Morfología	Gram	Espora	TSI	LIA	Citrato	Movilidad	Indol	MR	VP	Catalasa	Oxidasa
Q24	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	b	+	+	K/A	K/A	-	-	-	-	-	+	+
Q25	<i>Bacillus licheniformis</i>	b	+	+	K/A	K/A	-	-	-	-	-	+	+
Q28	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	b	+	+	A/A	A/A	-	-	-	+	-	+	-
Q34A	<i>Bacillus hisashii</i>	b	+	+	Nc	A/A	-	-	-	+	-	+	+
Q45-2	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	b	+	+	Nc	Nc	-	-	-	+	-	-	+
Q50	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	b	+	+	Nc	Nc	-	+	-	+	-	+	-
Q53-2	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	b	+	+	Nc	Nc	-	-	-	+	-	+	+

b: bacilo; MR: Prueba Rojo de Metilo; VP: Prueba Voges Proskauer; (+) Positivo; (-) Negativo; K/A: superficie alcalina /profundidad ácida; A/A: superficie ácida / profundidad ácida; Nc: No creció

4.1.2. Producción cuantitativa de PHA por aislamientos bacterianos

La tabla 3 muestra los resultados de la evaluación de la producción de PHA por los aislamientos bacterianos seleccionados, donde se describe que los aislamientos identificados como *B. licheniformis* Q25 y *A. salavatliensis* Q50 fueron los que presentaron los mayores rendimientos de producción de PHA, de 13.16 y 11.42 % respectivamente; estos rendimientos fueron estadísticamente mayores en comparación a los demás aislamientos ($p < 0.05$). En la misma tabla se muestra que los cinco aislamientos restantes tuvieron rendimientos de PHA menores al 6 %. La figura 3 es un gráfico comparativo de la biomasa bacteriana producida, el PHA y el rendimiento obtenidos durante el proceso fermentativo con melaza de caña pre tratada de los siete aislamientos seleccionados.

Tabla 3. Producción de biomasa, PHA y rendimientos obtenidos por los aislamientos bacterianos seleccionados (a 45 °C con 2 % de sustrato).

Aislamientos	Secuencia de identidad GenBank (gen ARNr 16S)	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ²	Rendimiento [%] ³
Q24	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	0.2352 ± 0.07	0.009 ± 0.00	3.83 ^b
Q25	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.1564 ± 0.02	0.02058 ± 0.00	13.16 ^a
Q28	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	0.2933 ± 0.06	0.0036 ± 0.00	1.23 ^b
Q34A	<i>Bacillus hisashii</i>	0.2257 ± 0.08	0.00307 ± 0.00	1.36 ^b
Q45-2	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	0.3015 ± 0.02	0.01573 ± 0.00	5.22 ^b
Q50	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	0.1086 ± 0.02	0.0124 ± 0.00	11.42 ^a
Q53-2	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	0.1088 ± 0.00	0.0137 ± 0.00	1.26 ^b

Prueba de Kruskal-Wallis: ¹ $p=0,038$; ² $p=0,015$; ³ $p=0,011$; a,b: letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en las pruebas bilaterales.

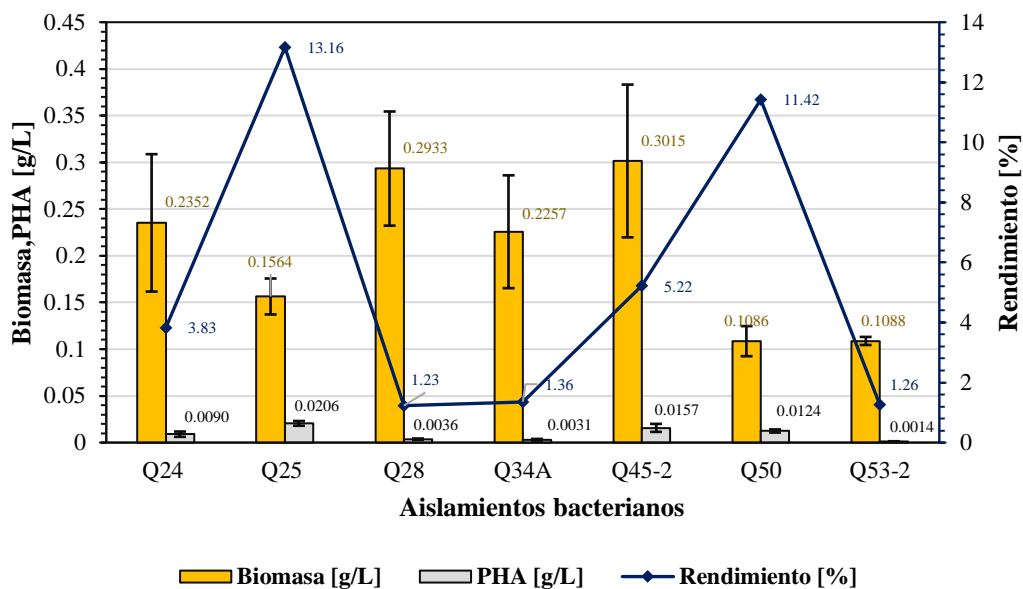


Figura 3. Evaluación de la producción de biomasa, PHA y rendimientos obtenidos por los aislamientos bacterianos seleccionados.

4.1.3. Evaluación de la variación de la temperatura y la concentración de melaza de caña en la producción de PHA

Efecto de la variación de la temperatura

En la tabla 4 se muestra los resultados de la producción de PHA por *B. licheniformis* Q25 a las temperaturas de 45, 50 y 55 °C por 72 horas de fermentación. De ella se desprende que la biomasa se duplicó al aumentar la temperatura (de 45 a 50 °C) y la producción de PHA se triplicó. Sin embargo, al evaluar el efecto de la temperatura de 55 °C, la biomasa disminuyó ligeramente y el rendimiento de producción de PHA fue cercano al producido a 45 °C. El mayor rendimiento de producción de PHA fue de 19.48 % a la temperatura de 50 °C. Finalmente, la figura 4 es un gráfico comparativo de la biomasa bacteriana producida, el PHA y el rendimiento obtenido por *B. licheniformis* Q25 durante el proceso fermentativo.

Tabla 4. Producción de PHA por *B. licheniformis* Q25 a una temperatura de 45, 50 y 55 °C con 2 % de sustrato.

Aislamiento	T (°C)	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ¹	Rendimiento [%] ¹
Q25	45	0.1564 ± 0.02	0.0206 ± 0.00	13.17
	50	0.3584 ± 0.01	0.0698 ± 0.00	19.48
	55	0.336 ± 0.01	0.0292 ± 0.00	8.69

Prueba de Kruskal-Wallis: ¹p=0,102

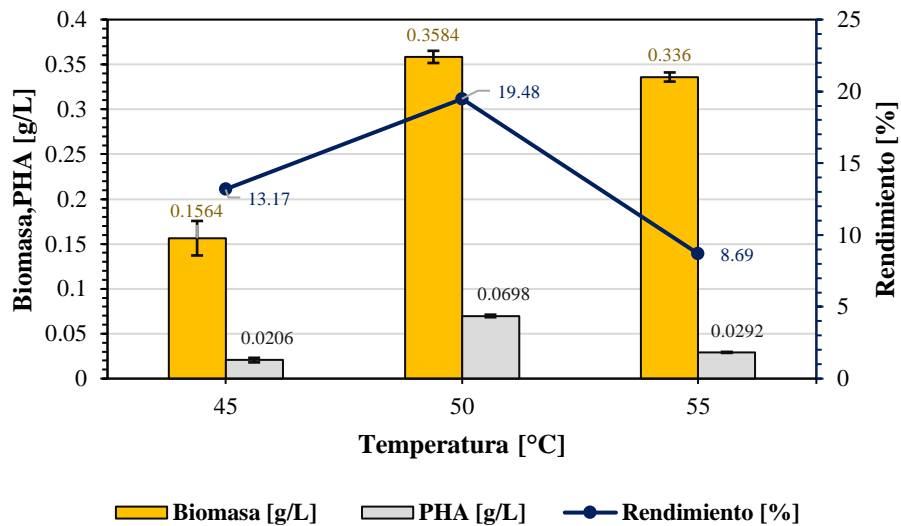


Figura 4. Evaluación de la producción de biomasa, PHA y rendimientos obtenidos por *B. licheniformis* (Q25) a una temperatura de 45, 50 y 55 °C.

En la tabla 5 se muestra los resultados de la producción de PHA por *A. salavatliensis* Q50 a las temperaturas de 45, 50 y 55 °C por 72 horas de fermentación. De ella se desprende que a las temperaturas de 50 y 55 °C el peso seco de la biomasa se redujo. Así mismo, se determinó que el rendimiento de producción de PHA a 50 °C y a 55 °C también se redujo, con producción de 56.64 % y 26.50 %, respectivamente. Finalmente, la figura 5 es un gráfico comparativo de la biomasa bacteriana producida, el PHA y el rendimiento obtenido por *A. salavatliensis* Q50.

Tabla 5. Producción de PHA por *A. salavatliensis* Q50 a una temperatura de 45, 50 y 55 °C con 2 % de sustrato.

Aislamiento	T (°C)	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ²	Rendimiento [%] ¹
Q50	45	0.4344 ± 0.06	0.0496 ± 0.01	11.42
	50	0.0434 ± 0.00	0.0246 ± 0.00	56.64
	55	0.1034 ± 0.03	0.0274 ± 0.01	26.50

Prueba de Kruskal-Wallis: ¹p=0,102; ²p=0,180

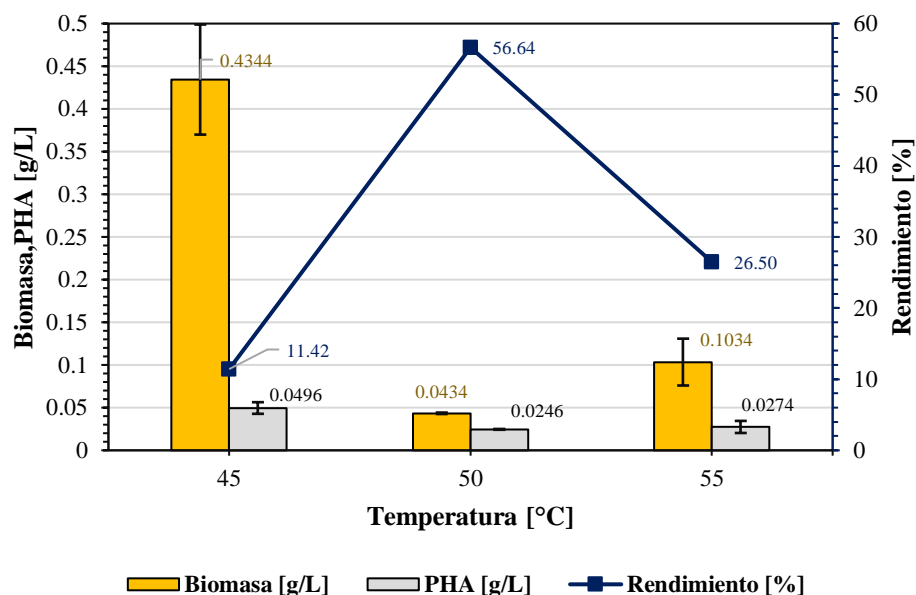


Figura 5. Evaluación de la producción de biomasa y de PHA por *A. salavatliensis* Q50 a una temperatura de 45, 50 y 55 °C.

Efecto de la variación del sustrato

A 50 °C de incubación, *B. licheniformis* Q25 y *A. salavatliensis* Q50 presentaron los mayores rendimientos de producción de PHA; debido a esto es que esta temperatura fue considerada para evaluar la producción de PHA a distintas concentraciones de melaza de caña. Las concentraciones evaluadas fueron de 6, 10 y 14 %.

Los resultados de la producción de PHA por *B. licheniformis* Q25 utilizando concentraciones de 6, 10 y 14%, por 72 horas de fermentación, se muestran en la tabla 6. En la tabla se puede observar que la biomasa incrementó de 0.0612 ± 0.03 g/L con 6 % de sustrato a 0.1288 ± 0.03 g/L empleando 14 % de sustrato; sin embargo, este incrementó

no se relacionó de manera directa con la producción de PHA (0.0339 ± 0.01 g/L y 0.02 g/L, respectivamente). Al contrario, el mayor rendimiento de PHA se obtuvo utilizando 6 % de sustrato, algo similar ocurre con 10 % de sustrato mientras que a 14 % se obtuvo el más bajo rendimiento como se puede observar en la figura 6. Finalmente, en la figura 6 también se puede observar las diferencias y similitudes de los datos en cuanto a la biomasa bacteriana producida, el PHA y el rendimiento obtenido por *B. licheniformis* Q25 a estas 3 concentraciones.

Tabla 6. Producción de biomasa, PHA y rendimientos obtenidos por *B. licheniformis* Q25 a una concentración de melaza de 6, 10 y 14 % a 50 °C.

Aislamiento	Melaza [%]	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ²	Rendimiento [%] ³
Q25	6	0.0612 ± 0.03	0.0339 ± 0.01	55.42
	10	0.0436 ± 0.00	0.0212 ± 0.00	48.62
	14	0.1288 ± 0.03	0.02 ± 0.00	15.53

Prueba de Kruskal-Wallis: ¹ p=0.156; ² p=0.180; ³ p=0.102

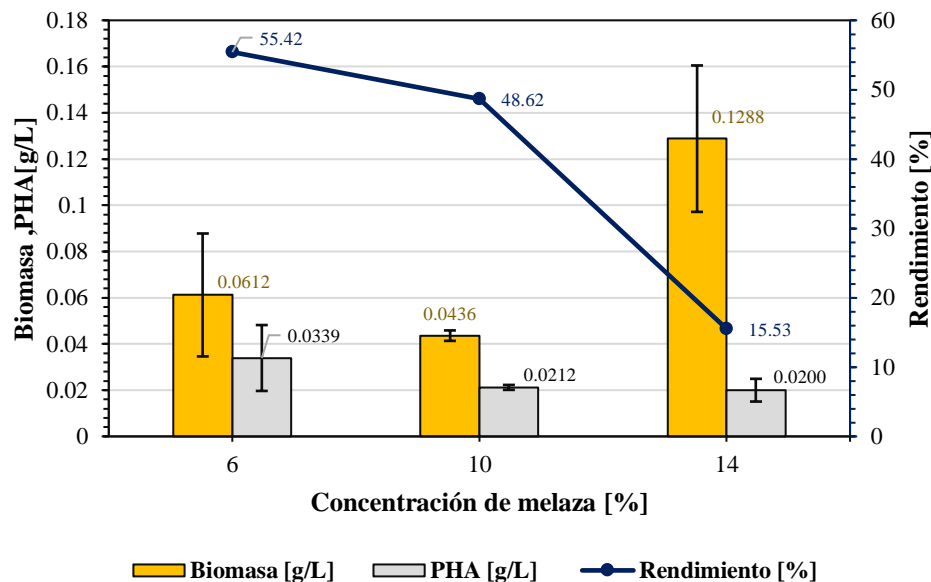


Figura 6. Producción de biomasa, PHA y rendimientos obtenidos por *B. licheniformis* Q25 a una concentración de melaza de 6, 10 y 14 %.

De manera similar, en la tabla 7 se muestran los resultados de la producción de PHA por *A. salavatliensis* Q50 utilizando 6, 10 y 14 % de sustrato por 72 horas de fermentación a 50 °C. De la tabla se desprende que la producción de PHA es igual (0.007 ± 0.00 g/L) utilizando 6 y 14 % de sustrato, aunque a 14 % se obtuvo mayor biomasa en peso seco. En cuanto al rendimiento de producción de PHA, a 6 % de sustrato se obtuvo un resultado significativamente mayor a los obtenidos con las otras concentraciones ($p < 0.05$). Finalmente, la figura 7 nos muestra que el rendimiento de producción de PHA por *A. salavatliensis* Q50 cae conforme incrementa la concentración del sustrato a pesar de que la biomasa es mayor a las concentraciones de 10 y 14 %.

Tabla 7. Producción de PHA por *A. salavatliensis* Q50 a una concentración de melaza de 6, 10 y 14 % a 50 °C.

Aislamiento	Melaza [%]	Biomasa [g/L] ¹	PHA [g/L] ²	Rendimiento [%] ¹
Q50	6	0.0211 ± 0.00	0.007 ± 0.00	33.18 ^a
	10	0.0557 ± 0.01	0.0130 ± 0.00	23.29 ^b
	14	0.0413 ± 0.01	0.007 ± 0.00	16.90 ^b

Prueba de Kruskal-Wallis: ¹ $p=0.027$; ² $p=0.061$; a,b: letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas en las pruebas bilaterales.

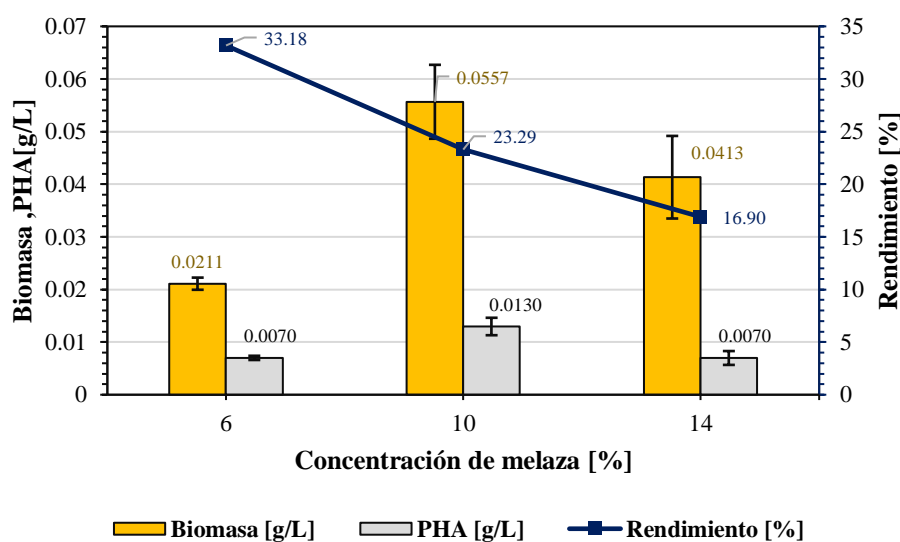


Figura 7. Producción de biomasa y PHA por *A. salavatliensis* (Q50) a una concentración de melaza de 6, 10 y 14 %.

4.2. Discusión

Las fuentes termales son ambientes extremos con temperaturas elevadas en donde habitan una gran diversidad de bacterias termófilas de interés biotecnológico (Schröder, Burkhardt y Antranikian, 2020), entre ellas especies de los géneros *Bacillus*, *Aneurinibacillus* y *Anoxybacillus* que hemos evaluado en esta investigación. Para adaptarse a las altas temperaturas estas bacterias han desarrollado diversas estrategias, como el cambio en la estructura de sus fosfolípidos para mantener la integridad de sus membranas a las altas temperaturas del medio en que viven; también la alternancia de los ácidos nucleicos en la que prevalecen los pares GC asegura la integridad de sus genomas. Y lo que más interesa, estas bacterias termófilas tienen un gran potencial biotecnológico, como por ejemplo, la capacidad de producir PHA en procesos fermentativos realizados a altas temperaturas (Urbieta *et al.*, 2015).

La melaza de caña contiene sacarosa, glucosa, fructuosa, además de magnesio, calcio, potasio y vitaminas; además, la melaza es un sustrato nutricionalmente rico en aminoácidos y barato de conseguir, que puede ser transformado a través del metabolismo bacteriano, como el de algunas especies de *Bacillus* (Shasaltaneh *et al.*, 2013), en productos biotecnológicos útiles. En esta investigación, para utilizar la melaza como sustrato en la producción de PHA se realizó un pretratamiento con H₂SO₄, esta hidrólisis ácida fue de vital importancia para convertir la sacarosa de la melaza en azúcares simples (glucosa y fructuosa) facilitando el metabolismo bacteriano y haciéndolo más eficiente; la eficiencia de este método concuerda con lo reportado por Gomaa (2014), quien después de evaluar distintos tipos de pretratamientos concluye que con la hidrólisis ácida se obtiene mayor rendimiento de PHA. La producción de PHA utilizando residuos agroindustriales como la melaza de caña, como fuente de carbono, constituye también un

aporte en la reducción del impacto ambiental que puedan causar las empresas azucareras en el norte del Perú.

Los gránulos de PHA fueron observados mediante la tinción Negro Sudan B, la cual se fundamenta en la coloración de lípidos neutros y fosfolípidos que se encuentran en la membrana anfifílica de los gránulos de PHA (Obruca *et al.*, 2020; Susianingsih, Kadriah y Nurhidayah, 2020). Esta tinción resultó ser eficaz para detectar en primera instancia la formación de gránulos de PHA, los cuales se observaron de color grisáceo o negros en células vegetativas rosadas. Los aislamientos bacterianos cultivados fueron estimulados a producir PHA en el medio descrito por Spiekermann (1999) y modificado en esta investigación, y la cantidad de gránulos que ocuparon el citoplasma bacteriano permitió agrupar a las bacterias en niveles distintos de producción de PHA (Tabla 1).

La otra tinción utilizada para observar gránulos de PHA intracelular en las bacterias evaluadas fue la tinción Azul Nilo (Apéndice 4), la cual tiene mayor afinidad por los gránulos y por tanto mejoran la especificidad de la detección (Spiekermann *et al.*, 1999). Esta tinción resulta de mucha ayuda para la detección de los gránulos en bacterias mesófilas; sin embargo, algunos autores como Pernicova (2020), señalan que las bacterias termófilas podrían contener una presencia inusual de ésteres generando falsos positivos; además, Wu, Sheu y Lee (2003) señalan que esta tinción tampoco debería utilizarse en bacterias grampositivas debido a la significativa absorción del colorante por la pared bacteriana. Aunque la información podría señalar una limitación en cuanto al empleo de la tinción Azul Nilo, en esta investigación se encontró coherencia entre ambas tinciones (Negro Sudan B y Azul Nilo) ya que todas las bacterias que presentaron positividad a los gránulos de PHA lo hicieron a partir de ambas tinciones.

Utilizando la tinción con Negro Sudan B se evaluaron de forma cualitativa la formación de gránulos de PHA de los 106 aislamientos bacterianos, y se obtuvieron 26 aislamientos productores con alto porcentaje de citoplasma ocupado por PHA (+++). De acuerdo con los resultados obtenidos, todos los aislamientos evaluados fueron grampositivos formadores de esporas, en su mayoría pertenecieron a los géneros *Bacillus*, *Aneurinibacillus* y *Anoxybacillus*. Estos géneros coinciden con los reportados en fuentes termales por Řezanka *et al.* (2012), Verma, Sourirajan y Dev (2022).

En la presente investigación se tuvo que hacer evaluaciones previas para establecer el tiempo de fermentación óptimo para todos los aislamientos seleccionados, finalmente este fue de 72 horas; la necesidad de hacer esto puede explicarse por el hecho de que conforme transcurre el tiempo las bacterias con gránulos de PHA disminuyen por la degradación intracelular del polímero o por causa de una respuesta endógena de las bacterias se provoca la hidrólisis del PHA a monómeros de hidroxialcanoatos por despolimerasas intracelulares presentes en la superficie de los gránulos (Flores, Idrogo y Carreño, 2018).

Una vez culminado el proceso fermentativo se realizó la extracción del PHA por el método hipoclorito de sodio – cloroformo. De acuerdo con Jacquél *et al.* (2008), este mecanismo de extracción da como resultado una alta recuperación y pureza del polímero. La característica hidrofóbica del PHA e hidrofílica de la membrana celular constituyen las bases de este mecanismo. El hipoclorito de sodio desnaturaliza la membrana celular así como los compuestos que no son PHA, inmediatamente el polímero migra a la fase del cloroformo para protegerse de la acción del hipoclorito de sodio (Hahn *et al.*, 1994). Esta metodología fue utilizada debido a que se pudo implementar en el Laboratorio de Microbiología, a diferencia de otras más complejas reportadas por la literatura.

La producción cuantitativa de PHA de los siete aislamientos seleccionados se evaluaron teniendo en cuenta los rendimientos obtenidos. En esta investigación se reporta un rendimiento por *A. thermoaerophilus* Q24 de 3.83 % de PHA; sin embargo, de acuerdo con Pernicova (2020), esta bacteria puede producir hasta 16.52 % de PHA a 45 °C utilizando como sustrato sacarosa 20 g/L. No obstante, con base en las tinciones Negro Sudan B realizadas de este aislamiento, después del proceso fermentativo (apéndice 5), se puede observar la formación de gránulos en casi todo el citoplasma, proporciones similares se ha reportado para una cepa productora típica de *Halomonas* sp. (Guzmán *et al.*, 2017). Las diferencias en los rendimientos podría deberse a que el método de extracción empleado por Pernicova (2020) fue un método más sensible, en este caso cromatografía de gases.

En esta investigación se reporta por primera vez la producción de PHA por *B. hisashi* (aislamiento Q34A), el cuál mostró un rendimiento de 1.36 % a 45 °C por 72 horas. Esta es una bacteria termófila grampositiva formadora de spora, anaerobia facultativa relacionada estrechamente con *Bacillus thermoamylovorans* (Nishida *et al.*, 2015), especie recientemente reportada con alto rendimiento de producción de PHA (Choonut *et al.*, 2020). Igualmente fueron evaluados cuatro aislamientos pertenecientes al género *Anoxybacillus* que produjeron rendimientos diferentes de PHA; no obstante, todos estos aislamientos presentaron características culturales distintas al crecer en AN. El aislamiento Q28 creció formando colonias irregulares, el aislamiento Q45-2 creció formando escasas colonias circulares cremosas, el aislamiento Q50 formó colonias mucosas con pigmentación amarilla y el aislamiento Q53-2 creció de manera abundante formando pequeñas colonias de forma irregular. También se observó que el aislamiento Q45-2 es el único que formó una biopelícula en el caldo de detección. Todas estas

diferencias indicarían que estos aislamientos serían especies o cepas distintas; de estas, el aislamiento Q50 presentó el mayor rendimiento (11.42 % de PHA) a 45 °C por 72 horas.

El máximo rendimiento obtenido por *B. licheniformis* Q25 fue de 13.2 % a 45 °C a diferencia de lo reportado en el estudio realizado por Getachew y Woldeesenbet (2016) donde el rendimiento de PHA utilizando *Bacillus* sp. fue de 39.74 % aunque la temperatura de fermentación fue menor (40 °C). En esta investigación, al incrementarse la concentración de sustrato de 2 al 6 % de melaza y la temperatura de 45 a 50 °C, se obtuvo un rendimiento de 55 % de PHA superando a los rendimientos obtenidos de 24 y 43 % por *B. licheniformis* (37 °C) reportados por Sangkharak y Prasertsan (2012) y Shamala *et al.*, (2003), respectivamente. Como se puede evidenciar la concentración de sustrato y la temperatura de fermentación son dos factores que deben ser evaluados siempre con la finalidad de encontrar las mejores condiciones bajo las cuales estas bacterias pueden tener sus mejores rendimientos de producción de PHA.

Por otro lado, después de evaluar el efecto de la temperatura en la producción de PHA en *A. salavatliensis* Q50, el máximo rendimiento obtenido fue de 56.6 % después de 72 horas de fermentación a 50 °C, con 2 % de sustrato. Sin embargo, cuando se incrementa la temperatura a 55°C el rendimiento de PHA disminuyó hasta 26.5 %; esto se explica con detalle más adelante.

En cuanto al efecto de la concentración del sustrato se observó que al incrementarla esta tiene un efecto negativo en el rendimiento de producción de PHA. El máximo rendimiento para *A. salavatliensis* Q50 fue de 33,2 % utilizando 6 % de melaza; sin embargo, cuando se aumentó la concentración a 10 y 14 % los rendimientos disminuyeron hasta 23.3 y 16.9 %, respectivamente. En base a estos resultados y desde un punto de vista económico resultaría más rentable la producción de PHA por *A. salavatliensis* Q50 utilizando 2 %

de sustrato a 50 °C, es decir, utilizando menor cantidad de sustrato se obtendría una mayor de producción de PHA.

La disminución del rendimiento de producción de PHA conforme aumenta la temperatura podría explicarse por el hecho de que a temperaturas muy elevadas la actividad enzimática se desacelera y por ende la capacidad de producir PHA disminuye (Getachew y Woldesenbet, 2016). La producción de PHA depende de proteínas asociadas a la superficie de los gránulos como las PHA-sintasa (PhaC), las PHA-despolimerasa (PhaZ), las fasinas (PhaP) y las proteínas reguladoras (PhaR) (De Koning y Lemstra, 1992), proteínas cuya actividad metabólica puede verse afectada ante el incremento de la temperatura; además, si se reduce la producción de PHA se reduce también la capacidad protectora que este polímero tiene sobre las enzimas involucradas (Obruca *et al.*, 2016). De igual manera, la variación en la concentración de la fuente de carbono también puede afectar la producción de PHA; por ejemplo, cuando no hay suficiente sustrato las bacterias empiezan a utilizar el PHA como fuente de carbono, por el contrario, cuando hay un exceso de sustrato este puede tener un efecto inhibitorio en la producción de biomasa y por lo tanto de PHA (Kumar *et al.*, 2020).

Es importante mencionar que, además de los gránulos de PHA, también se evidenció la formación de esporas por todos los aislamientos evaluados. Este dato es importante debido a que el proceso de esporulación puede explicar los bajos rendimientos obtenidos por algunos de los aislamientos, por ejemplo, la fuente de carbono que debería ser utilizada para la producción de PHA puede ser utilizada por las bacterias en la formación de esporas (Sadykov *et al.*, 2017).

En cuanto al análisis estadístico realizado de los rendimientos obtenidos después del proceso fermentativo por los siete aislamientos bacterianos seleccionados, se determinó

que los aislamientos Q25 y Q50 presentaron rendimientos estadísticamente diferentes al resto ($p < 0.05$). No obstante, en cuanto al efecto de la temperatura sobre la producción de PHA, se estableció que estadísticamente no habría diferencia significativa entre los promedios de producción de PHA, biomasa y rendimiento obtenidos por los aislamientos Q25 y Q50 a 45, 50 y 55 °C. Así mismo, se determinó que no hubo diferencias entre los promedios de producción de PHA, biomasa y rendimiento obtenidos a las concentraciones de 6, 10 y 14 % de sustrato al evaluar el aislamiento *B. licheniformis* Q25. Por otro lado, al analizar *A. salavatliensis* Q50 se obtuvo promedios biomasa y rendimiento significativamente distintos al utilizar 6 y 10% de sustrato comparados con el 2 %.

Es importante resaltar que existe escasa evidencia sobre la producción de PHA por *Anoxybacillus* sp., *B. licheniformis* y *B. hisashi* que hayan sido aislados de fuente termales y que utilicen melaza de caña como fuente de carbono; esta investigación aporta con las primeras evidencias y datos sobre la capacidad que tienen bacterias que provienen de fuentes termales de Cajamarca, Perú, para producir este polímero de gran interés biotecnológico para la industria.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Las diferentes temperaturas y concentraciones de sustrato tuvieron efectos distintos en la producción de PHA por las bacterias termófilas evaluadas. *B. licheniformis* Q25 y *A. salavatliensis* Q50 presentaron mayores rendimientos de producción de PHA a 50 °C, utilizando 6 y 2 % de melaza de caña, respectivamente.

Un 85 % de los 106 aislamientos bacterianos provenientes de la fuente termal de Quilcate tienen la capacidad de producir PHA. Es la primera vez que se reporta la producción de PHA por *A. salavatliensis*, *B. licheniformis* y *B. hisashii* utilizando como fuente de carbono melaza de caña.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda evaluar el efecto de factores adicionales como el pH, concentración del inóculo, fuente de nitrógeno para la optimización del proceso de producción de PHA.

Se recomienda analizar la cantidad y composición del PHA a partir de la biomasa en peso seco utilizando Cromatografía Gaseosa, para realizar el screening primario de los aislamientos productores de PHA.

LISTA DE REFERENCIAS

- Amelia, T. *et al.* (2019) 'Applications of PHA in agriculture', in Kalia, V. C. (ed.) *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer Singapore, pp. 347–361. doi: 10.1007/978-981-13-3759-8_13.
- An, J., Ha, B. and Lee, S. K. (2023) 'Production of polyhydroxyalkanoates by the thermophile *Cupriavidus cauae* PHS1', *Bioresource Technology*, 371, p. 128627. doi: 10.1016/j.biortech.2023.128627.
- Anjum, A. *et al.* (2016) 'Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier, 89, pp. 161–174. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069.
- Bugnicourt, E. *et al.* (2014) 'Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging', *Express Polymer Letters*, 8(11), pp. 791–808. doi: 10.3144/expresspolymlett.2014.82.
- Cao, Q. *et al.* (2014) 'The mechanism of anti-osteoporosis effects of 3-hydroxybutyrate and derivatives under simulated microgravity', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 35(28), pp. 8273–8283. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.06.020.
- Chaudhry, W. *et al.* (2011) 'Screening for polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing bacterial strains and comparison of PHA production from various inexpensive carbon sources', *Annals of Microbiology*, 61(3), pp. 623–629. doi: 10.1007/s13213-010-0181-6.
- Chauhan, M. K. *et al.* (2011) 'Life cycle assessment of sugar industry: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon, pp. 3445–3453. doi: 10.1016/j.rser.2011.04.033.
- Chavan, S. *et al.* (2021) 'A review on production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters by thermophilic microbes using waste feedstocks', *Bioresource Technology*, 341, p. 125900. doi: 10.1016/j.biortech.2021.125900.
- Choi, S. Y. *et al.* (2020) 'Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters', *Metabolic Engineering*, 58, pp. 47–81. doi: 10.1016/j.ymben.2019.05.009.
- Choonut, A. *et al.* (2020) '*Bacillus thermoamylovorans*-Related strain isolated from high temperature sites as potential producers of Medium-Chain-Length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA)', *Current Microbiology*, 77(10), pp. 3044–3056. doi: 10.1007/s00284-020-02118-9.
- Cruz, V. and Matsuda, K. (2012) 'Caracterización geoquímica de las fuentes termales en el campo geotermal de Calientes, Tacna'. Available at: https://repositorio.ingemmet.gob.pe/bitstream/20.500.12544/392/3/Caracterizacion_geoquimica_fuentes_termales_Campo_Geotermal_de_Calientes.pdf.
- De Koning, G. and Lemstra, P. (1992) 'The amorphous state of bacterial poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] *in vivo*', *Polymer*, 33(15), pp. 3292–3294. doi: 10.1016/0032-3861(92)90249-V.
- Dodds, W. K. and Whiles, M. R. (2010) 'Unusual or Extreme Habitats', in *Freshwater Ecology*. Elsevier, pp. 375–398. doi: 10.1016/b978-0-12-374724-2.00015-5.

- Flora, G., Bhatt, K. and Tuteja, U. (2010) 'Optimization of culture conditions for polyhydroxybutyrate production from isolated *Bacillus* Species', *Journal of Cell and Tissue Research*. CTR Journals, 10(2), p. 2235.
- Flores, A., Idrogo, E. and Carreño, C. (2018) 'Rendimiento de polihidroxicanoatos (PHA) en microorganismos halófilos aislados de salinas', *Revista Peruana de Biología*, 25(2), p. 153. doi: 10.15381/rpb.v25i2.14249.
- Ganesh, R. *et al.* (2021) 'A comprehensive overview and recent advances on polyhydroxyalkanoates (PHA) production using various organic waste streams', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 325, p. 124685. doi: 10.1016/j.biortech.2021.124685.
- Gedikli, S. *et al.* (2018) 'Experimental exploration of thermostable poly (β -hydroxybutyrates) by *Geobacillus kaustophilus* using Box-Behnken design', *Journal of Polymers and the Environment*. Springer US, 27(2), pp. 245–255. doi: 10.1007/s10924-018-1335-z.
- Getachew, A. and Woldesenbet, F. (2016) 'Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material', *BMC Research Notes*, 9(1), p. 509. doi: 10.1186/s13104-016-2321-y.
- Gomaa, E. (2014) 'Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol', *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Tecpar, 57(1), pp. 145–154. doi: 10.1590/S1516-89132014000100020.
- Guzmán, C. *et al.* (2017) 'Production of polyhydroxyalkanoates by native halophilic bacteria using *Solanum tuberosum* L. shell starch', *Scientia Agropecuaria*, 8(2), pp. 109–118. doi: 10.17268/sci.agropecu.2017.02.03.
- Hahn, S. K. *et al.* (1994) 'Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform', *Biotechnology and Bioengineering*, 44(2), pp. 256–261. doi: 10.1002/bit.260440215.
- Hartman, T. (1940) 'The use of Sudan Black B as a bacterial fat stain', *Biotechnic and Histochemistry*, 15(1), pp. 23–28. doi: 10.3109/10520294009110328.
- Hazer, B. and Steinbüchel, A. (2007) 'Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), pp. 1–12. doi: 10.1007/s00253-006-0732-8.
- Hong, H. *et al.* (2009) 'Fabrication of a novel hybrid heart valve leaflet for tissue engineering: An *in vitro* study', *Artificial Organs*, 33(7), pp. 554–558. doi: 10.1111/j.1525-1594.2009.00742.x.
- Hou, W. *et al.* (2013) 'A Comprehensive Census of Microbial Diversity in Hot Springs of Tengchong, Yunnan Province China Using 16S rRNA Gene Pyrosequencing', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0053350.
- Hsiao, L.-J. *et al.* (2016) 'The feasibility of thermophilic *Caldimonas manganoxidans* as a platform for efficient PHB production', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(5), pp. 852–871. doi: 10.1007/s12010-016-2138-0.
- Huamaní, A. (2000) 'Aguas termales y minerales en el norte del Perú'.

- Ibrahim, M., Willems, A. and Steinbüchel, A. (2010) 'Isolation and characterization of new poly(3HB)-accumulating star-shaped cell-aggregates-forming thermophilic bacteria', *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), pp. 1579–1590. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04786.x.
- Israni, N. and Shivakumar, S. (2019) 'Polyhydroxyalkanoates in packaging', in *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer Singapore, pp. 363–388. doi: 10.1007/978-981-13-3759-8_14.
- Jacquel, N. *et al.* (2008) 'Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates)', *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), pp. 15–27. doi: 10.1016/j.bej.2007.11.029.
- Krüger, A. *et al.* (2018) 'Towards a sustainable biobased industry – Highlighting the impact of extremophiles', *New Biotechnology*, 40, pp. 144–153. doi: 10.1016/j.nbt.2017.05.002.
- Kuchta, K. *et al.* (2007) 'Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Raistonia eutropha* H16', *Biomacromolecules*, 8(2), pp. 657–662. doi: 10.1021/bm060912e.
- Kumar, L. *et al.* (2020) 'Production of polyhydroxyalkanoates using waste as raw materials', in *Waste to Energy: Prospects and Applications*. Singapore: Springer Singapore, pp. 351–368. doi: 10.1007/978-981-33-4347-4_14.
- Li, M. and Wilkins, M. (2020) 'Recent advances in polyhydroxyalkanoate production: Feedstocks, strains and process developments', *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 156, pp. 691–703. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.082.
- Lim, J. *et al.* (2017) 'Emerging bone tissue engineering via polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds', *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd, pp. 917–929. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.132.
- Madigan, M. *et al.* (2015) *Brock Biology of microorganisms*. 14th edn. Edited by Pearson.
- Masood, F., Yasin, T. and Hameed, A. (2014) 'Comparative oxo-biodegradation study of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate/polypropylene blend in controlled environments', *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.ibiod.2013.09.023.
- McChalicher, C. and Srienc, F. (2007) 'Investigating the structure-property relationship of bacterial PHA block copolymers', *Journal of Biotechnology*, 132(3), pp. 296–302. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.04.014.
- Mumtaz, T. *et al.* (2010) 'Turning waste to wealth-biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates from palm oil mill effluent-a Malaysian perspective', *Journal of Cleaner Production*. Elsevier, 18(14), pp. 1393–1402. doi: 10.1016/j.jclepro.2010.05.016.
- Muñoz, J. (2020) *Commodities 2020 - Azúcar*. Available at: https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/1026014/Commodities_arroz_abr-jun_2020.pdf.
- Newell, D. L. *et al.* (2015) 'Mantle-derived helium in hot springs of the Cordillera Blanca, Peru: Implications for mantle-to-crust fluid transfer in a flat-slab subduction setting', *Chemical Geology*. doi: 10.1016/j.chemgeo.2015.10.003.

- Nishida, A. *et al.* (2015) ‘*Bacillus hisashii* sp. nov., isolated from the caeca of gnotobiotic mice fed with thermophile-fermented compost’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt_11), pp. 3944–3949. doi: 10.1099/ijsem.0.000516.
- Noll, K. (2001) ‘Thermophilic Bacteria’, in *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 1961–1963. doi: 10.1006/rwgn.2001.1288.
- Obruca, S. *et al.* (2016) ‘Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly(3-hydroxybutyrate) accumulating cells’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), pp. 1365–1376. doi: 10.1007/s00253-015-7162-4.
- Obruca, S. *et al.* (2020) ‘Novel unexpected functions of PHA granules’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), pp. 4795–4810. doi: 10.1007/s00253-020-10568-1.
- Obruča, S. *et al.* (2022) ‘Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics’, *Biotechnology Advances*, 58. doi: 10.1016/j.biotechadv.2022.107906.
- Ostle, A. and Holt, J. (1982) ‘Fluorescent stain for poly-3- hydroxybutyrate’, *Applied and Environmental Microbiology*, 44(1), pp. 238–241.
- Pagliano, G. *et al.* (2021) ‘Recovery of polyhydroxyalkanoates from single and mixed microbial cultures: A review’, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi: 10.3389/fbioe.2021.624021.
- Pantazaki, A. *et al.* (2003) ‘Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis in *Thermus thermophilus*: Purification and biochemical properties of PHA synthase’, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 254(1–2), pp. 173–183. doi: 10.1023/A:1027373100955.
- Paul, S. *et al.* (2016) ‘Metagenomic analysis of microbial community of an Amazonian geothermal spring in Peru’, *Genomics Data*. The Authors, 9, pp. 63–66. doi: 10.1016/j.gdata.2016.06.013.
- Peleg, M., Normand, M. D. and Corradini, M. G. (2012) ‘The Arrhenius Equation revisited’, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(9), pp. 830–851. doi: 10.1080/10408398.2012.667460.
- Pentecost, A., Jones, B. and Renaut, R. (2003) ‘What is a hot spring?’, *Canadian Journal of Earth Sciences*, 40(11), pp. 1443–1446. doi: 10.1139/e03-083.
- Pernicova, I., Novackova, I., Sedlacek, P., Kourilova, X., Koller, M., *et al.* (2020) ‘Application of osmotic challenge for enrichment of microbial consortia in polyhydroxyalkanoates producing thermophilic and thermotolerant bacteria and their subsequent isolation’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, pp. 698–704. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.128.
- Pernicova, I., Novackova, I., Sedlacek, P., Kourilova, X., Kalina, M., *et al.* (2020) ‘Introducing the newly isolated bacterium *Aneurinibacillus* sp. H1 as an auspicious thermophilic producer of various polyhydroxyalkanoates (PHA) copolymers–1. Isolation and characterization of the bacterium’, *Polymers*, 12(6), p. 1235. doi: 10.3390/polym12061235.
- Porter, M. M. *et al.* (2013) ‘Porous hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composites fabricated by a novel method via centrifugation’, in, pp. 63–71. doi: 10.1007/978-1-4614-

4427-5_10.

Ray, S. and Kalia, V. (2017) 'Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates', *Indian Journal of Microbiology*, 57(3), pp. 261–269. doi: 10.1007/s12088-017-0651-7.

Raza, Z. A., Abid, S. and Banat, I. M. (2018) 'Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications', *International Biodeterioration & Biodegradation*. Elsevier, 126, pp. 45–56. doi: 10.1016/J.IBIOD.2017.10.001.

Rehm, B. (2010) 'Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 8(8), pp. 578–592. doi: 10.1038/nrmicro2354.

Řezanka, T. *et al.* (2012) 'LC–ESI–MS/MS Identification of polar lipids of two thermophilic Anoxybacillus bacteria containing a unique lipid pattern', *Lipids*, 47(7), pp. 729–739. doi: 10.1007/s11745-012-3675-0.

Saavedra del Oso, M., Mauricio-Iglesias, M. and Hospido, A. (2021) 'Evaluation and optimization of the environmental performance of PHA downstream processing', *Chemical Engineering Journal*, 412, p. 127687. doi: 10.1016/j.cej.2020.127687.

Sadykov, M. *et al.* (2017) 'Poly(3-hydroxybutyrate) fuels the tricarboxylic acid cycle and de novo lipid biosynthesis during *Bacillus anthracis* sporulation', *Molecular Microbiology*, 104(5), pp. 793–803. doi: 10.1111/mmi.13665.

Samorì, C. *et al.* (2015) 'Dimethyl carbonate and switchable anionic surfactants: Two effective tools for the extraction of polyhydroxyalkanoates from microbial biomass', *Green Chemistry*, 17(2). doi: 10.1039/c4gc01821d.

Sangkharak, K. and Prasertsan, P. (2012) 'Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application', *Journal of General and Applied Microbiology*, 58(3), pp. 173–182. doi: 10.2323/jgam.58.173.

Sarkar, N. *et al.* (2012) 'Bioethanol production from agricultural wastes: An overview', *Renewable Energy*. Pergamon, pp. 19–27. doi: 10.1016/j.renene.2011.06.045.

Schröder, C., Burkhardt, C. and Antranikian, G. (2020) 'What we learn from extremophiles', *ChemTexts*, 6(1), p. 8. doi: 10.1007/s40828-020-0103-6.

Sen, K., Hussin, M. and Baidurah, S. (2019) 'Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Cupriavidus necator* from various pretreated molasses as carbon source', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. Elsevier Ltd, 17, pp. 51–59. doi: 10.1016/j.bcab.2018.11.006.

Shamala, T. *et al.* (2003) 'Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR)', *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), pp. 369–374. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01838.x.

Shasaltaneh, M. D. *et al.* (2013) 'Cane molasses as a source of precursors in the bioproduction of tryptophan by *Bacillus subtilis*.', *Iranian journal of microbiology*, 5(3), pp. 285–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24475338>.

Sheu, D. *et al.* (2009) 'Thermophilic bacterium *Caldimonas taiwanensis* produces poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from starch and valerate as carbon sources', *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier, 44(5), pp. 289–294. doi:

10.1016/j.enzmictec.2009.01.004.

Shrivastava, A. (2018) 'Introduction to plastics engineering', in *Introduction to Plastics Engineering*. Elsevier, pp. 1–16. doi: 10.1016/B978-0-323-39500-7.00001-0.

Sirohi, R. *et al.* (2020) 'Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB)', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, p. 123536. doi: 10.1016/j.biortech.2020.123536.

Spiekermann, P. *et al.* (1999) 'A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds', *Archives of Microbiology*, 171(2), pp. 73–80. doi: 10.1007/s002030050681.

Susianingsih, Kadriah and Nurhidayah (2020) 'Screening and isolation of PHB (Poly- β -hydroxybutyrate) producing bacteria as an alternative material for disease prevention on the shrimp culture', *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 564(1), p. 012053. doi: 10.1088/1755-1315/564/1/012053.

Urbieta, S. *et al.* (2015) 'Thermophiles in the genomic era: Biodiversity, science, and applications', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., pp. 633–647. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.007.

Verma, J., Sourirajan, A. and Dev, K. (2022) 'Bacterial diversity in 110 thermal hot springs of Indian Himalayan Region (IHR)', *3 Biotech*, 12(9), p. 238. doi: 10.1007/s13205-022-03270-8.

Wang, S. *et al.* (2010) 'Properties of a new gasoline oxygenate blend component: 3-Hydroxybutyrate methyl ester produced from bacterial poly-3-hydroxybutyrate', *Biomass and Bioenergy*. Pergamon, 34(8), pp. 1216–1222. doi: 10.1016/j.biombioe.2010.03.020.

Wu, H.-A., Sheu, D.-S. and Lee, C.-Y. (2003) 'Rapid differentiation between short-chain-length and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria with spectrofluorometry', *Journal of Microbiological Methods*, 53(1), pp. 131–135. doi: 10.1016/S0167-7012(02)00232-4.

Xiao, Z. *et al.* (2015) 'Thermophilic production of polyhydroxyalkanoates by a novel *Aneurinibacillus* strain isolated from Gudao oilfield, China', *Journal of Basic Microbiology*, 55(9), pp. 1125–1133. doi: 10.1002/jobm.201400843.

Zeikus, J. (1979) 'Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology', *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier, pp. 243–252. doi: 10.1016/0141-0229(79)90043-7.

Zeldes, B. M. *et al.* (2015) 'Extremely thermophilic microorganisms as metabolic engineering platforms for production of fuels and industrial chemicals', *Frontiers in Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01209.

Zheng, Y. *et al.* (2020) 'Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction', *Metabolic Engineering*. Academic Press Inc., pp. 82–93. doi: 10.1016/j.ymben.2019.07.004.

APÉNDICES

Apéndice 1: Pretratamiento con H_2SO_4 de la melaza de caña de azúcar.



Figura 8. Melaza de caña previamente diluida, está en estado de reposo por 90 minutos a pH 3, posteriormente el pH se ajusta a 7 con NaOH 10 M.

Apéndice 2: Screening primario de la producción de PHA

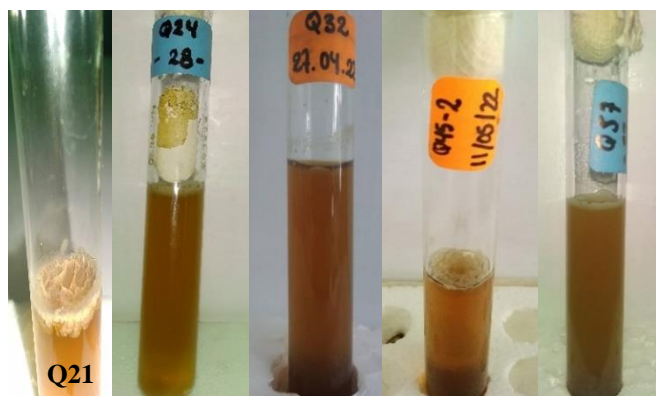


Figura 9. Turbidez y formación de biopelículas de los aislamientos bacterianos después del proceso de fermentación por 96 horas a 45 °C.

Apéndice 3. Reactivación de los aislamientos bacterianos y tinción Gram.

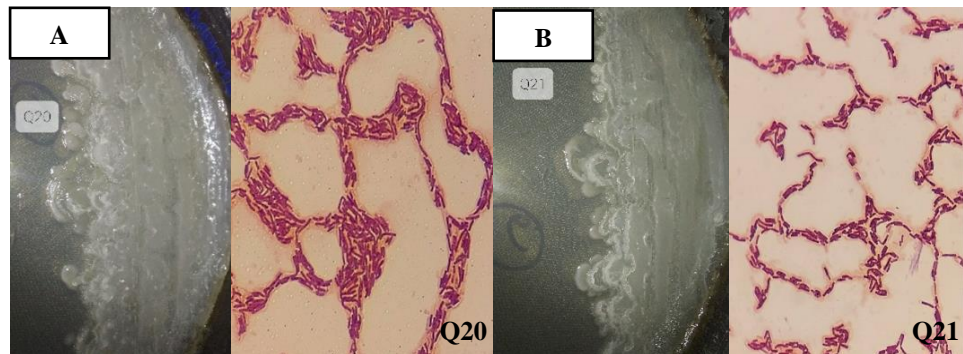


Figura 10. Reactivación en AN y tinción Gram de los aislamientos Q20 (A) y Q21 (B).

Apéndice 4. Tinción Negro Sudán B y Tinción Azul Nilo de los aislamientos bacterianos

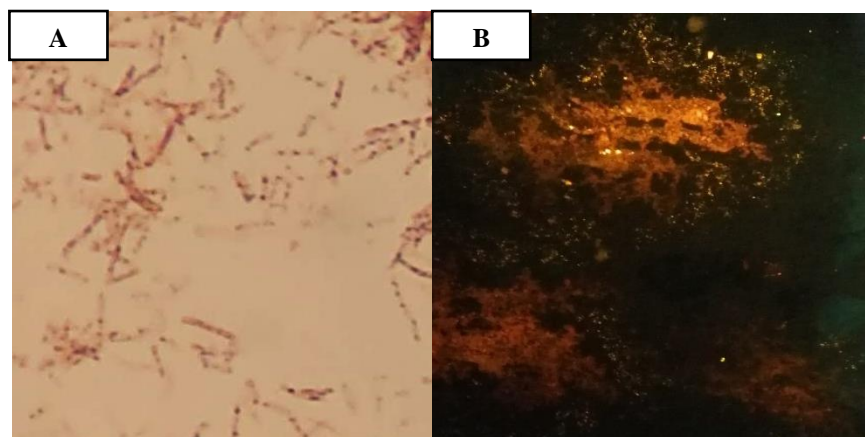


Figura 11. Detección de gránulos de PHA mediante tinción Negro Sudán B del aislamiento Q45-1 (A) y tinción Azul Nilo de *A. thermoaerophilus* Q24 (B).

Apéndice 5

Tabla 8. Código de los aislamientos bacterianos con mayor producción de PHA en base a la presencia de gránulos de PHA observados mediante tinción Negro Sudán B.

Aislamientos	Lugar de aislamiento	Nombre científico	Tinción Gram	Espora
Q4	Tapete		+	SI
Q6	Sedimento	<i>Brevibacillus agri</i>	+	SI
Q7	Tapete		+	SI
Q12-1a-b	Tapete		+	SI
Q19	Tapete	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	+	SI
Q21	Sedimento	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	SI
Q23	Tapete	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	+	SI
Q24	Tapete	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	+	SI
Q25	Tapete	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	SI
Q26	Tapete		+	SI
Q28	Sedimento	<i>Anoxybacillus gonensis</i>	+	SI
Q30	Tapete		+	SI
Q34A	Tapete	<i>Bacillus hisashii</i>	+	SI
Q40	Sedimento		+	SI
Q44	Biopelícula		+	SI
Q45 - 1	Biopelícula		+	SI
Q45 -1a	Biopelícula		+	SI
Q45 - 2	Biopelícula	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	+	SI
Q50	Biopelícula	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	+	SI
Q51	Biopelícula		+	SI
Q53	Biopelícula	<i>Bacillus sp.</i>	+	SI
Q53 -2	Biopelícula	<i>Anoxybacillus salavatliensis</i>	+	SI
Q54	Sedimento		+	SI
Q61	Sedimento		+	SI
Q62	Biopelícula		+	SI
Q75	Biopelícula		+	SI

Apéndice 6. Medio de fermentación y sistema de incubación con agitación.



Figura 12. Medio utilizado para los procesos fermentativos y sistema de incubación y agitación empleado.

Apéndice 7. Tinción Negro Sudán B de los aislamientos bacterianos seleccionados, después de un proceso fermentativo por 72 horas a 45 °C con agitación a 180 rpm.



Figura 13. Tinción Negro Sudán B de *A. thermoaerophilus* Q24 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 45 °C.

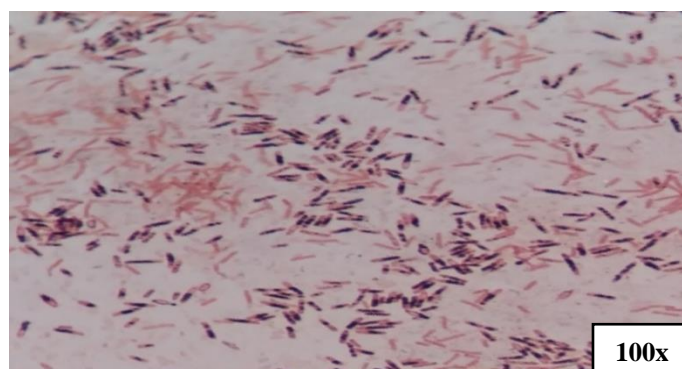


Figura 14. Tinción Negro Sudán B de *B. licheniformis* Q25 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 45 °C.

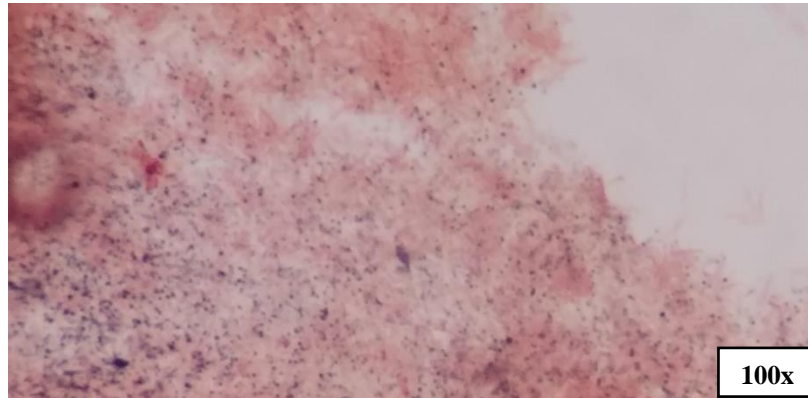


Figura 15. Tinción Negro Sudán B de *A. gonensis* Q28 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 45°C.

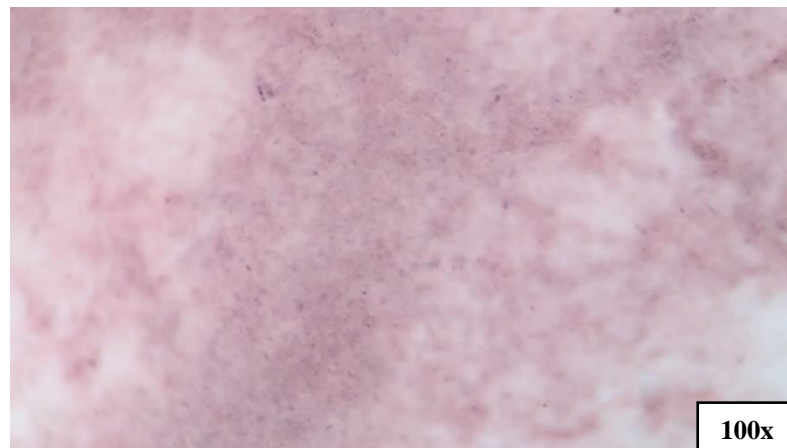


Figura 16. Tinción Negro Sudán B de *B. hisashii* Q34A después de un proceso fermentativo por 72 horas a 45 °C.

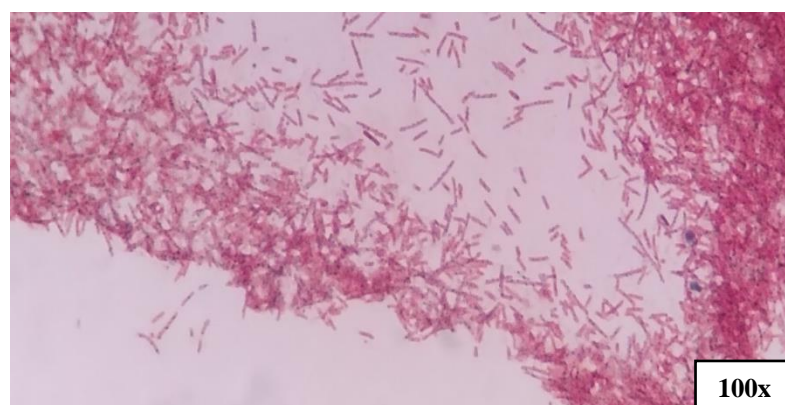


Figura 17. Tinción Negro Sudán B de *A. salavatliensis* Q45-2 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 45 °C.

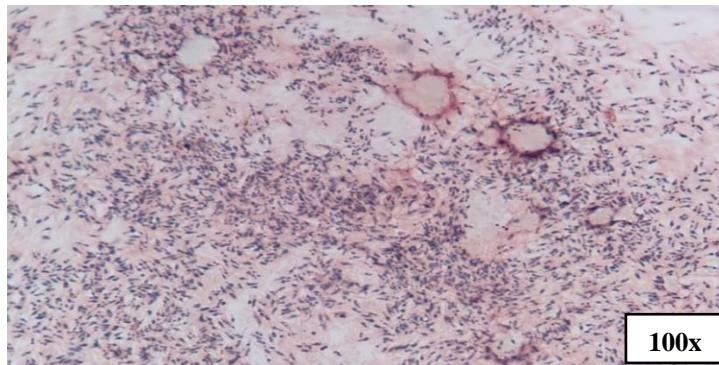


Figura 18. Tinción Negro Sudán B de *A. salavatliensis* Q50 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 45 °C.

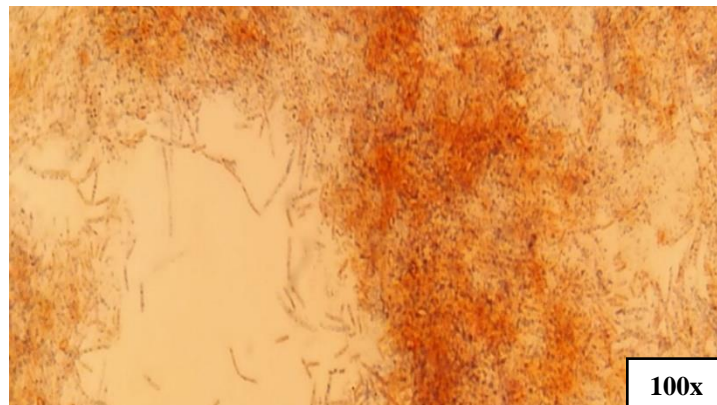


Figura 19. Tinción Negro Sudán B de *A. salavatliensis* Q53-2 después de un proceso fermentativo de 72 horas a 45 °C.

Apéndice 8. Tinción Negro Sudán B de los aislamientos bacterianos Q25 y Q50, a distintas temperaturas después de un proceso fermentativo por 72 horas a 180 rpm.

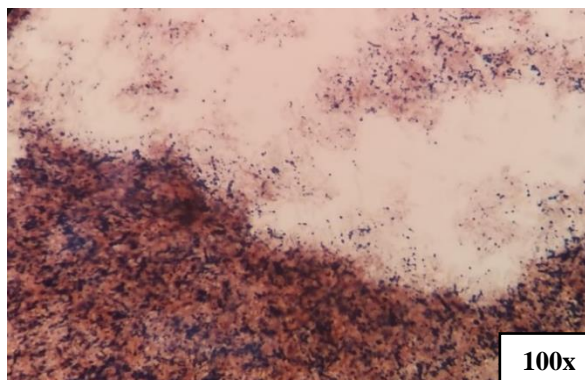


Figura 20. Tinción Negro Sudán B de *B. licheniformis* Q25 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 50 °C.

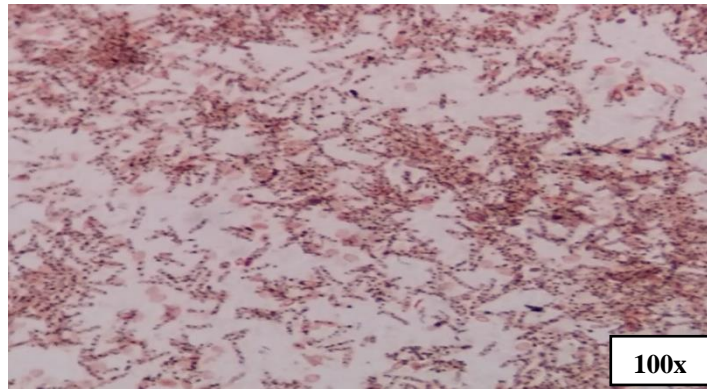


Figura 21. Tinción Negro Sudán B de *B. licheniformis* Q25 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 55 °C.

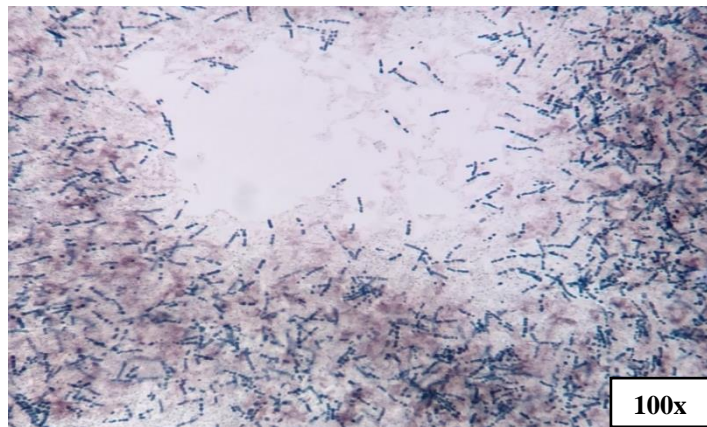


Figura 22. Tinción Negro Sudán B de *A. salavatliensis* Q50 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 50 °C.

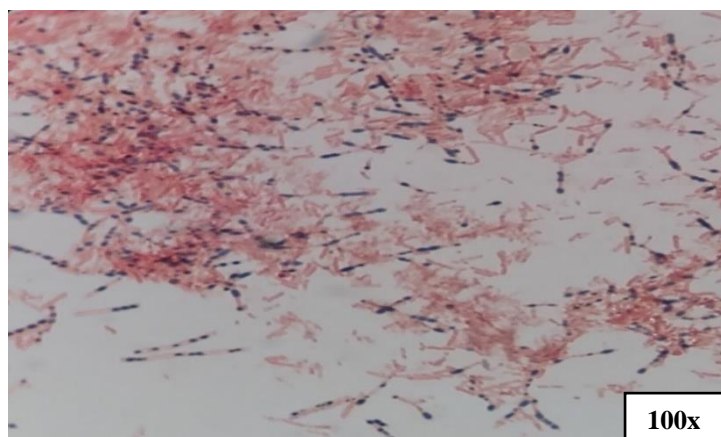


Figura 23. Tinción Negro Sudán B de *A. salavatliensis* Q50 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 55 °C.

Apéndice 9. Tinción Negro Sudán B de los aislamientos bacterianos *B. licheniformis* Q25 y *A. salavatliensis* Q50, a distintas concentraciones de sustrato, después de un proceso fermentativo de 72 horas a 50 °C con agitación a 180 rpm.



Figura 24. Tinción Negro Sudán B de *B. licheniformis* Q25 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 50 °C, utilizando 6 % de melaza de caña.

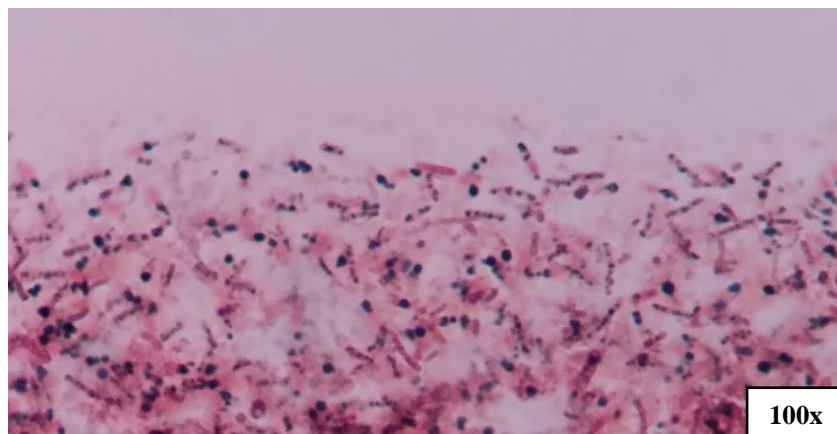


Figura 25. Tinción Negro Sudán B de *B. licheniformis* Q25 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 50 °C, utilizando 10 % de melaza de caña.

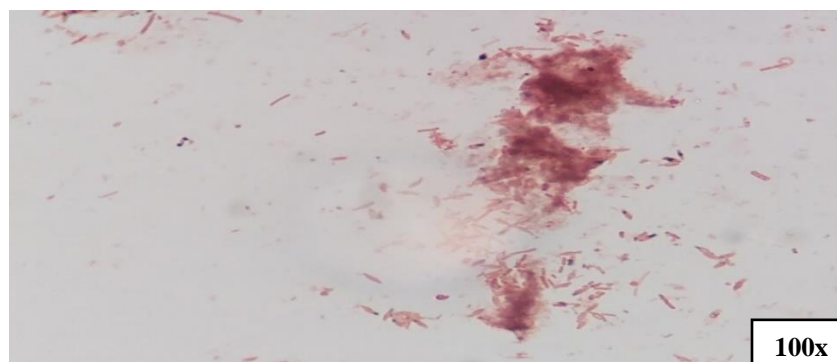


Figura 26. Tinción Negro Sudán B de *B. licheniformis* Q25 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 50 °C, utilizando 14 % de melaza de caña.

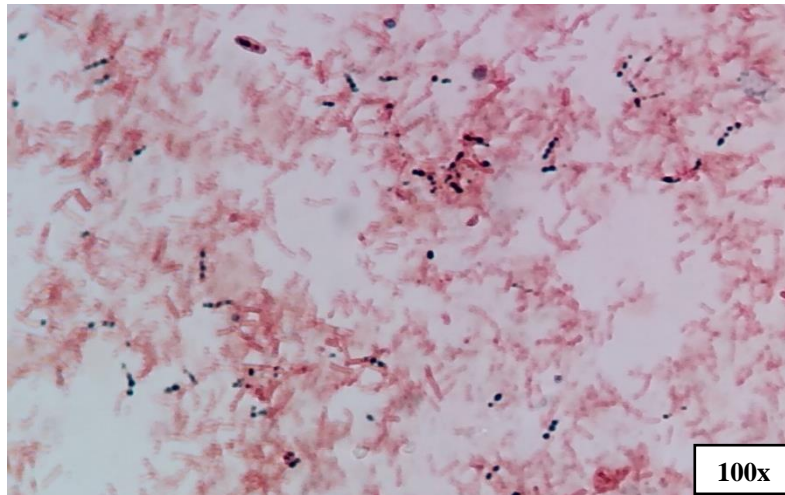


Figura 27. Tinción Negro Sudán B de *A. salavatliensis* Q50 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 50 °C, utilizando 6 % de melaza de caña.

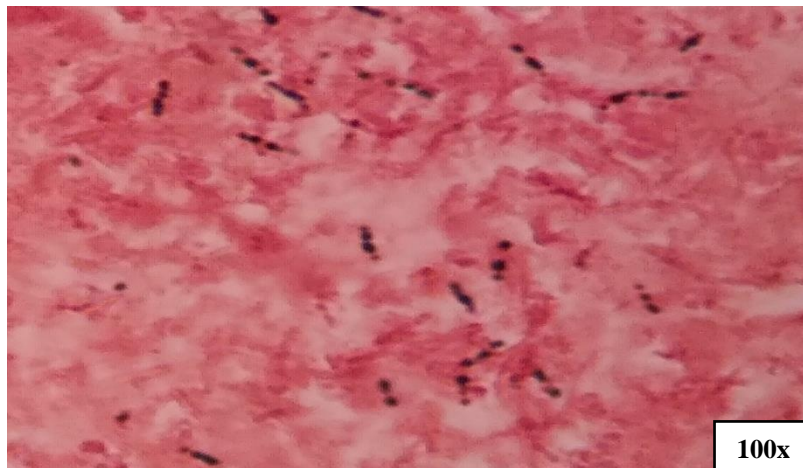


Figura 28. Tinción Negro Sudán B de *A. salavatliensis* Q50 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 50 °C, utilizando 10 % de melaza de caña.

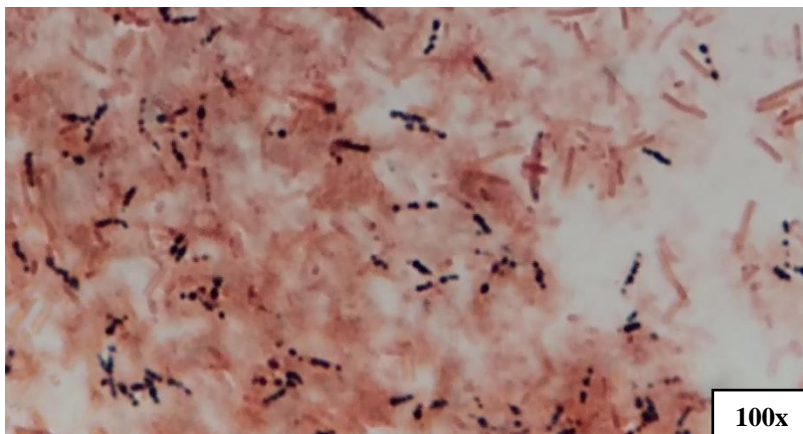


Figura 29. Tinción Negro Sudán B de *A. salavatliensis* Q50 después de un proceso fermentativo por 72 horas a 50 °C, utilizando 14 % de melaza de caña.

Apéndice 10. Método de extracción hipoclorito de sodio – cloroformo utilizando pera de decantación.

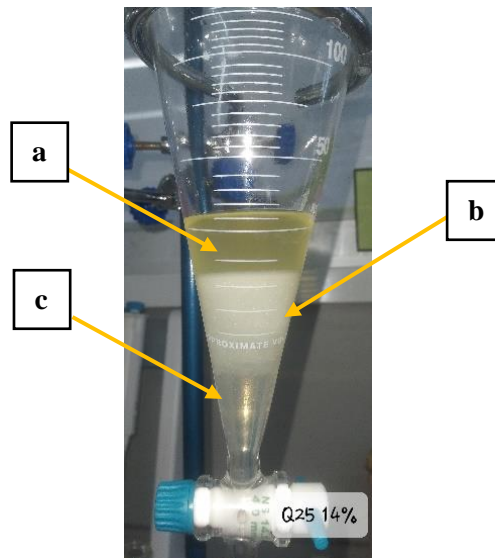


Figura 30. La utilización de la pera de decantación permitió observar las tres fases, (a) la fase superior contiene hipoclorito de sodio, (b) la fase intermedia contiene restos celulares y la última fase contiene cloroformo y el polímero (c).

Apéndice 11. Polihidroxicanoatos (PHA) extraídos utilizando el método hipoclorito de sodio-cloroformo.

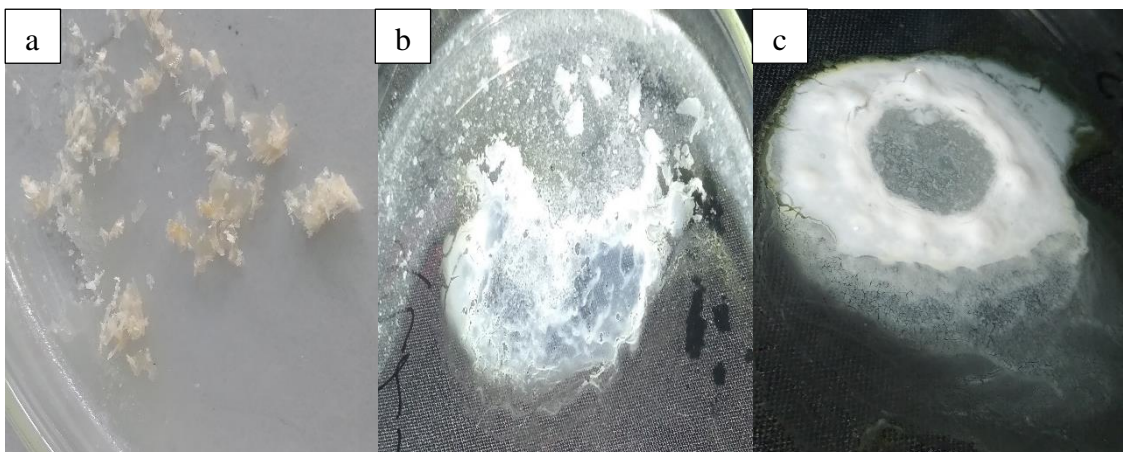


Figura 31. Polímeros extraídos de *B. licheniformis* Q25 a una temperatura de (a) 45, (b) 50 y (c) 55 °C.

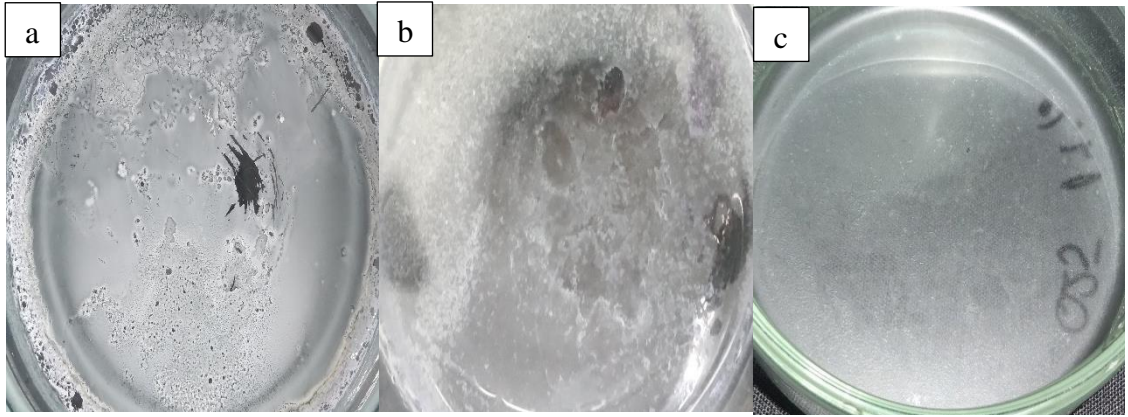


Figura 32. Polímeros extraídos de *B. licheniformis* Q25 a 50 °C utilizando concentraciones de (a) 6, (b) 10 y (c) 14 % de melaza.

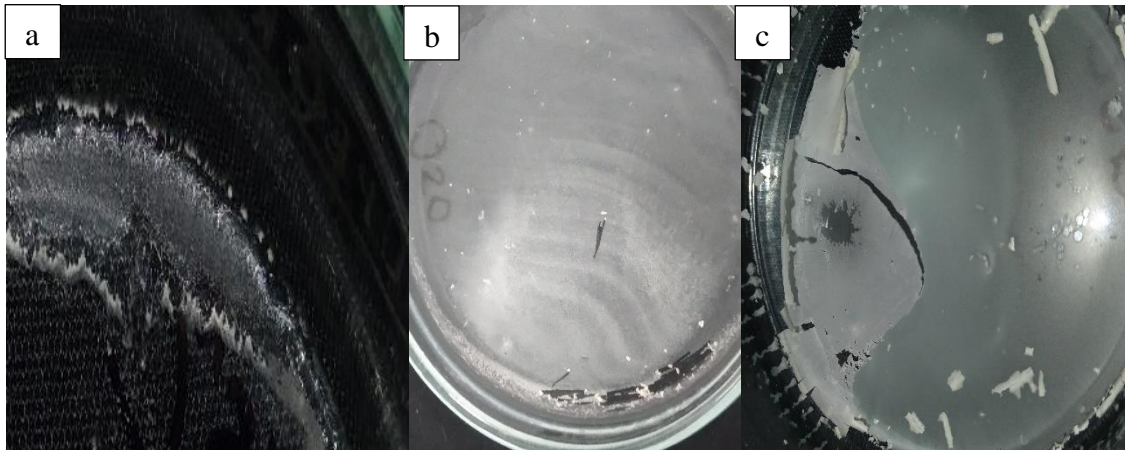


Figura 33. Polímeros extraídos de *A. salavatliensis* Q50 a una temperatura de (a) 45, (b) 50 y (c) 55 °C.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo del proceso fermentativo para la extracción de PHA producido por aislamientos bacterianos termófilos

Procedimiento

1. Se preparó 750 ml (250 ml para cada repetición) del medio mineral modificado para cada aislamiento bacteriano obtenido. Se esterilizó el medio en autoclave a 121 °C (excepto las soluciones traza), posteriormente se ajustó el medio a pH 7.
2. Se preparó 25 ml del medio de inóculo en un frasco estéril 250 ml. El medio estuvo compuesto por 1 % de extracto de levadura y 2 % de melaza de caña, después se inoculó el medio con una o dos colonias de 18 horas previamente cultivadas en agar nutritivo, posteriormente se dejó incubar por 24 horas, a 150 rpm a 45 °C, finalmente se comparó la turbidez del medio con el tubo N° 3 de Mac Farland.
3. Se agregó 2 ml del inóculo preparado en el paso anterior al frasco con 250 ml de medio de fermentación y se dejó fermentar por 72 horas, 180 rpm a 45 °C. El análisis de cada aislamiento bacteriano se realizó por triplicado.
4. El fermentado obtenido se vertió en tubos Falcon de 50 ml para separar la biomasa por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos.
5. Después del proceso de centrifugación se observó dos fases. La fase del sobrenadante y la fase constituida por la biomasa que se utilizó para la extracción de PHA. La biomasa se lavó con agua destilada y se centrifugó bajo las condiciones mencionadas en el paso anterior, se repitió el lavado por 3 veces. Posteriormente la biomasa se secó a peso constante a 50 °C por 24 horas. El peso seco de la biomasa en gramos fue la diferencia entre el peso inicial de la placa y el peso final de la placa más la biomasa seca obtenida en gramos.

6. Se extrajo el PHA de la biomasa seca, utilizando el método de hipoclorito de sodio-cloroformo según Hahn *et al.* (1994). Primero, se colocó la biomasa obtenida en un matraz de 125 ml y se agregó 15 ml de hipoclorito de sodio comercial (CLOROX, 4.5 % de NaOCl, con pH 10) y 15 ml de cloroformo, luego se colocaron los matraces en una incubadora con agitación orbital a temperatura ambiente a 250 rpm por 2 horas.
7. Se dejó decantar la solución previa en una pera de decantación hasta que se formaron tres fases, la fase superior acuosa de hipoclorito, la fase intermedia contuvo la biomasa residual y la fase inferior del cloroformo contuvo el polímero de PHA. Se dejó pasar lentamente la fase del cloroformo más el PHA a una placa Petri previamente pesada.
8. Se colocó la placa Petri en una estufa a 50 °C por 48 horas. El PHA obtenido fue la diferencia entre el peso inicial de la placa y el peso final de la placa más el polímero de PHA.