



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS, RECURSOS

NATURALES Y DEL AMBIENTE

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TEMA:

PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) EN UN MEDIO CON HARINA DE YUCA COMO FUENTE DE CARBONO UTILIZANDO LA BACTERIA *RALSTONIA EUTROPHA*, PARA UN BIO-PLÁSTICO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR.

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Ingeniería Agroindustrial.

AUTOR:

WILLIAM MARCELO ALULEMA CATOTA

DIRECTOR:

Dr. FABIÁN BAYAS MOREJÓN PhD

Guaranda – Ecuador

2022

TEMA

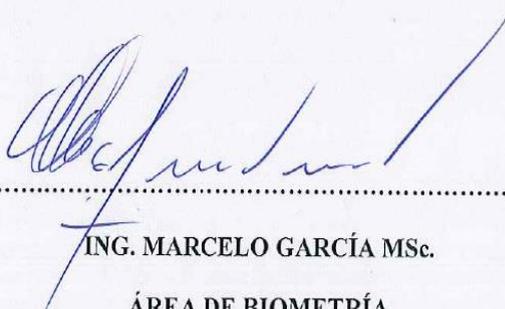
PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) EN UN MEDIO
CON HARINA DE YUCA COMO FUENTE DE CARBONO UTILIZANDO
LA BACTERIA *RALSTONIA EUTROPHA*, PARA UN BIO-PLÁSTICO EN
EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD
ESTATAL DE BOLÍVAR.

REVISADO Y APROBADO POR:



Dr. FABIÁN BAYAS MOREJÓN PhD.

DIRECTOR DEL PROYECTO



ING. MARCELO GARCÍA MSc.

ÁREA DE BIOMETRÍA



Dra. ARACELI LUCIO QUINTANA PhD.

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

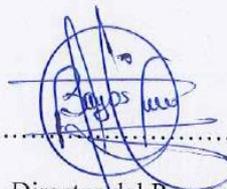
CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Yo William Marcelo Alulema Catota, portador de la CI: 1718536632, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y las referencias bibliográficas que se incluye han sido consultadas y citadas con su respectivo autor (es).

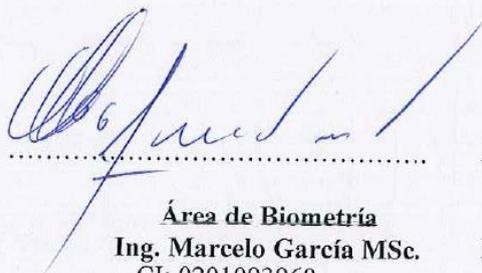
La Universidad Estatal de Bolívar puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo estipulado por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la Normativa Institucional vigente.



William Marcelo Alulema Catota
CI: 1718536632



Director del Proyecto
Dr. Fabián Bayas Morejón PhD
CI: 0201811916



Área de Biometría
Ing. Marcelo García MSc.
CI: 0201093960

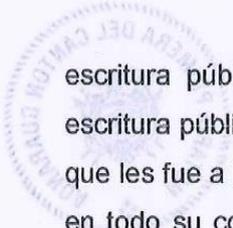


Área de Redacción Técnica
Dra. Araceli Lucio Quintana PhD
CI: 0201092152

ESCRITURA PÚBLICA
DECLARACION JURADA
SEÑOR WILLIAM MARCELO ALULEMA CATOTA



En la ciudad de Guaranda, Capital de la Provincia de Bolívar, República del Ecuador, hoy día MIÉRCOLES DOS DE MARZO DE DOS MIL VEINTE Y DOS , ante mí, Doctor GUIDO FABIAN FIERRO BARRAGAN, NOTARIO PÚBLICO PRIMERO DEL CANTÓN GUARANDA, comparece el señor **WILLIAM MARCELO ALULEMA CATOTA**, portador de la cédula de ciudadanía número uno siete uno ocho cinco tres seis seis tres dos. El compareciente es de nacionalidad ecuatoriana, mayor de edad, de estado civil, soltero, capaz de contraer obligaciones, domiciliado en esta ciudad y Cantón, a quien de conocerlo doy fe en virtud de haberme exhibido su cédula de ciudadanía y certificado de votación ,cuyas copias adjunto a esta escritura. Advertido por mí el Notario de los efectos y resultados de esta escritura, así como examinados en forma separada, de que comparece al otorgamiento de la misma sin coacción, amenazas, temor reverencial, ni promesa o seducción, juramentado en debida forma, prevenido de la gravedad del juramento, de las penas del perjurio y de la obligación que tiene de decir la verdad con claridad y exactitud, bajo juramento declara lo siguiente: " Previo a la obtención del Título de Ingeniero Agroindustrial , que los criterios e ideas emitidas en el presente trabajo de investigación titulado " **PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) EN UN MEDIO CON HARINA DE YUCA COMO FUENTE DE CARBONO UTILIZANDO LA BACTERIA RALSTONIA EUTROPHA, PARA UN BIO-PLÁSTICO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DELA UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR**", son de mi exclusiva responsabilidad en calidad de autor. Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad." (Hasta aquí la declaración juramentada rendida por el compareciente, la misma que queda elevada a



escritura pública con todo el valor legal). Para el otorgamiento de esta escritura pública se observaron todos los preceptos legales del caso; y leída que les fue a los comparecientes íntegramente por mí el Notario, se ratifican en todo su contenido y firman conmigo en unidad de acto. Incorporo esta escritura pública al protocolo de instrumentos públicos, a mi cargo. De todo lo cual doy fe.-

El número uno siete uno cinco tres seis seis tres dos. El señor WILLIAM MARCELO ALULEMA CATOTA, portador de la cédula de PÚBICO PRIMERO DEL CANTÓN GUARANDA, comparece el señor DOS, ante mí, Doctor GUIDO FABIAN FIERRO BARRAGAN, NOTARIO Ecuador, hoy día MIÉRCOLES DOS DE MARZO DE DOS MIL VEINTIDOS.

[Handwritten signature]



SEÑOR WILLIAM MARCELO ALULEMA CATOTA
C.C.1718536632

la misma sin coacción, amenazas, temor reverencial, ni promesa o seducción, juramentado en debida forma, preventivo de la gravedad del juramento, de las penas del perjurio, juramento que tiene de decir la verdad con claridad y exactitud. Previa la obtención del Título de ingenuidad emitida en el presente litigio. FOLIO DE POLIHIDROXICARBOHIDRATOS (PHAS UN MEDICAMENTO DE YUCA COMO FUENTE DE RALSTONIA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DEL "BOLÍVAR", son de mi exclusiva responsabilidad en calidad de autor. Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad." (Hasta aquí la declaración juramentada rendida por el compareciente, la misma que queda elevada a



[Handwritten signature]
Doctor Guido Fabián Fierro Barragán
NOTARIO PÚBLICO PRIMERO DEL CANTÓN GUARANDA.

CÉDULA DE IDENTIDAD

REPÚBLICA DEL ECUADOR

DIRECCIÓN GENERAL DE REGISTRO CIVIL, IDENTIFICACIÓN Y LEGISLACIÓN
CONDICIÓN CIUDADANA



APELLIDOS
CATOTA
NOMBRES
WILLIAM MARCELO
NACIONALIDAD
ECUATORIANA
FECHA DE NACIMIENTO
23 DIC 1994
LUGAR DE NACIMIENTO
LA VICENTINA CUYTO
FORMA DEL TITULAR

SEXO
HOMBRE
No. DOCUMENTO
004136088
FECHA DE VENCIMIENTO
17 JUN 2031

NACIONAL
647398

N.I.J. 1718536632



APELLIDOS Y NOMBRES DEL PADRE
ALULEMA GASPATA SEGUNDO MARCELINO
APELLIDOS Y NOMBRES DE LA MADRE
CATOTA CURSAGUANO CARMEN OFELIA
ESTADO CIVIL
SOLTERO

CÓDIGO DACTILAR
V3334V4242
TIPO SANGRE
O+

DOMANTE
SI



DIRECTOR GENERAL

LUGAR Y FECHA DE EMISIÓN
LATACUNGA 17 JUN 2021

I<ECU0041360888<<<<<<1718536632
9412228M3106176ECU<SI<<<<<<<<0
ALULEMA<CATOTA<<WILLIAM<MARCEL

CERTIFICADO DE VOTACION 11 ABRIL 2021

PROVINCIA: COTOPAXI
CANTON: LATACUNGA
PARROQUIA: TOACAZO
CANTON: TOACAZO
SEXO: MASCULINO
CANTON: TOACAZO

ALULEMA CATOTA WILLIAM MARCELO

CERTIFICADO DE CIUDADANÍA

ALULEMA GASPATA SEGUNDO MARCELINO
CATOTA CURSAGUANO CARMEN OFELIA



DOY FE: Que esta copia fotostática
ES EXACTA A SU ORIGINA
que me fue exhibido.

Guaranda, de del 2021

Dr. Guido Ferrero Barragán
NOTARIO PUBLICO 1ro. DEL CANTON GUARANDA

CERTIFICADO DE ORIGINALIDAD

Original



Verificado digitalmente por:
**ISIDRO FAVIAN
BAYAS MOREJON**

Document Information

Analyzed document ALULEMA. BORRADOR final rev fav 2.docx (D128013389)
Submitted 2022-02-16T12:27:00.0000000
Submitted by
Submitter email fbayas@ueb.edu.ec
Similarity 5%
Analysis address fbayas.ueb@analysis.arkund.com

Dra. ARACELI LUCIO QUINTANA PhD.

ÁREA DE REDACCIÓN TÉCNICA

DEDICATORIA

A mi Dios por darme la fortaleza, la persistencia y la sabiduría, para seguir en adelante en la carrera que ahora estoy culminando. Y por darme la conformidad de tener a mis padres con mucha vida y buena salud

A mis padres porque son un pilar fundamental que me sostuvieron en todos mis años de estudio, por darme las bendiciones a diario a lo largo de mi vida que me llevaron por el camino del bien y por qué esto es la mejor herencia que me pudieron haber dejado y de igual manera a mis abuelos quienes me enseñan valores como la humildad el respeto y el trabajo. Por esa y muchas razones más les dejo en ofrenda mi trabajo por la paciencia y el amor que me tienen.

A mi tío Luis Marcalla por su sabiduría y sus consejos desde el inicio de mi carrera, por creer en mi capacidad de superación en la educación, por estar conmigo hasta el último momento dándome un aliento y depositándome toda su fe en mí, gracias a ello me he forjado en el profesional que soy en la actualidad.

A mis sobrinos por llegar a mi vida para darme más aliento y motivos de seguir adelante y mi trabajo quedara de ejemplo para que sea un motivo de superación y puedan ser mejores profesionales; de igual manera a mis hermanos **Orlando, Nancy, Klever y Anita** por estar siempre unidos dándome ese apoyo moral e incondicional.

William Marcelo Alulema Catota

AGRADECIMIENTO

Ante todo, agradezco al tutor de tesis: Dr. Fabián Bayas por haberme depositado la confianza en realizar un trabajo muy complejo y haberme guiado de manera científica en esta investigación, por hacerme ver un nuevo mundo en la microbiología y gracias a ello sé a dónde encaminarme como Ingeniero Agroindustrial.

A mi Universidad Estatal de Bolívar por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para que pueda estudiar mi carrera así también a sus docentes que me brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante.

De igual manera quiero agradecer a mis primas; Patricia, Fernanda, Margarita; mis tías; Olga, Mónica y Alegría, a quienes las respeto por la determinación que ellas tienen en su trabajo y más que nada por el apoyo tanto moral como emocionalmente que me brindaron para que pueda finalizar mis estudios.

Y para finalizar quiero agradecer a mis compañeros de clase y mis amigos en especial a: Heidi, Diego, Curicama, Bryan, quienes formaron parte e influyeron en mi vida universitaria ya que gracias a la amistad y compañerismo de ellos han aportado un alto porcentaje de mis ganas de seguir adelante.

William Marcelo Alulema Catota

ÍNDICE

TEMA.....	I
CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ANEXOS.....	XIV
RESUMEN.....	XV
SUMMARY	XVI
I. INTRODUCCIÓN.....	17
II. PROBLEMA.....	19
2.1 Planteamiento del problema.....	19
2.2. Situación del problema	20
2.3. Formulación del problema.....	20
2.4. Sistematización del problema.....	21
III. MARCO TEÓRICO.....	22
3.1. Uso de los plásticos.....	22
3.1.1. Plásticos.....	22

3.1.2. Degradación de los plásticos	23
3.1.3. Plásticos Biodegradables.....	23
3.2.1. Polihidroxicanoatos, plásticos de origen microbiano	23
3.2.2. Generalidades de los polihidroxicanoatos	24
3.2.3. Composición química.....	25
3.2.4. Síntesis de las PHAs.....	25
3.2.5 Clasificación.....	27
3.2.6 Enzimas catalizadoras de los polihidroxicanoatos	27
3.3. Microorganismos productores de PHAs.	28
3.3. Ralstonia eutropha.....	31
3.3.1 Descripción.....	31
3.3.2. Clasificación taxonómica	31
3.3.3. Síntesis de producción de PHAs.....	31
3.3.4. Producción del polihidroxicanoatos	32
3.3.4.1. Cultivo por lote tipo batch.	32
3.3.3. Aplicación en la biotecnología	34
3.4. Proceso de obtención y purificación de PHAs	35
3.4.1. Producción de los Biopolímeros y Proceso de Purificación	35
3.4.2. Aislamiento y detección de bacterias productores de PHAs ...	35
3.5 Métodos de identificación.	36
3.5.1 Identificación molecular (PCR).....	36
3.5.2. Identificación bioquímica mediante las tiras Api20E.....	37

3.4.3 Métodos de extracción de PHAs	37
3.4.4. Cuantificación y Caracterización estructural de los PHAs.....	38
IV. MARCO METODOLÓGICO.	40
4.1. Ubicación de la investigación.....	40
4.1.1 Localización de la investigación.	40
4.1.2 Situación climática y geográfica.....	40
4.1.3 Material experimental.....	41
4.2 MATERIALES Y EQUIPOS.....	41
4.2.1 Materiales de laboratorio.	41
4.2.2 Reactivos.	42
4.2.3 Equipos de laboratorio.....	43
4.2.4 Materiales de oficina	44
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
4.3.1. Tipo de diseño.	44
4.3.2. Factor de estudio.....	44
4.3.3. Características de experimento.....	45
4.3.4. Análisis de varianza ADEVA.....	45
4.3.5. Modelo matemático DBCA.....	46
4.4 PROCEDIMIENTO	47
4.4.1. Recolección de suelos.....	47
4.4.2. Aislamiento del mm del género <i>Copriavidus necátor</i>	47
4.4.4. Extracción del DNA de la bacteria aislada (método boiling). 49	

4.4.5. Extracción de ADN.....	49
4.4.5.2 Verificación de la calidad del ADN en el Nano Drop	50
4.4.6. Verificación de la bacteria mediante PCR.....	51
4.4.6.1. Método de amplificación	51
4.4.6.2. Procedimiento	51
4.4.7. Electroforesis de las muestras aisladas.....	52
4.4.8. Caracterización bioquímica, a través de las tiras API 20E	54
4.4.9. Hidrólisis de Almidón de yuca como fuente de carbono.....	54
4.4.10. Protocolo de diseño de fermentación bacteriana con el microorganismo aislado.	59
4.4.10.1. Preparación de medio de sales minerales	60
4.4.10.2 Reactivación de la cepa bacteriana	61
4.4.11. Producción de PHAs.....	61
4.4.12. Cuantificación del consumo de sustrato de la fermentación. 62	
4.4.12.1. Soluciones de las concentraciones de glucosa estándar. 62	
4.4.12.2 Preparación del reactivo del ácido 3,5 dinitrosalicílico. 62	
4.4.12.3. Desarrollo de la reacción del DNS	63
4.4.13. Extracción del biopolímero.	63
4.4.14. Caracterización estructural del polímero.	64
4.4.15. Utilización del biopolímero en el embalaje de manzana	65
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
5.1. Aislamiento de los microorganismos <i>Ralstonia eutropha</i>	67

5.2. Confirmación inicial de los aislados obtenidos.....	67
5.3. Identificación de la bacteria <i>Ralstonia eutropha</i> a través de pruebas bioquímicas	69
5.4. Extracción, concentración de ADN de los aislados obtenidos.....	70
5.5. Identificación molecular mediante PCR	71
5.6. Sub cultivar los aislados mediante biorreacción tipo Batch utilizando harina de yuca como fuente de carbono	72
5.6.1. Hidrolisis del almidón de yuca	73
5.6.2 Fermentación bacteriana con <i>Ralstonia eutropha</i>	74
5.6.5. Análisis factorial.....	75
5.6.7. Evaluación de la acumulación de los gránulos de PHAs.....	78
5.7. Determinación del consumo de sustrato mediante DNS	80
5.7.1. Curva de crecimiento microbiano.....	80
5.7.2. Extracción del biopolímero	83
5.7.3. Usar el bio-plástico obtenido en el embalaje de manzana.....	83
VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS	85
6.1 Hipótesis de verificar	85
6.1.1. Hipótesis alterna (Ha).....	85
6.1.2. Hipótesis alterna (Ho)	85
6.1.3. Verificación de la hipótesis para la acumulación de biomasa para la concentración de glucosa.....	85
6.1.4. Verificación de la hipótesis para la acumulación de biomasa con	

respecto al factor B.....	86
VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	87
7.1. Conclusiones.....	87
7.2. Recomendaciones.....	87
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	89
ANEXOS.....	95
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nombres de cada plástico sus propiedades y aplicaciones.	22
Tabla 2. Sustituciones de los grupos radicales y algunos PHA	25
Tabla 3. Producción de PHA por diferentes microorganismos.	30
Tabla 4. Taxonomía de la célula.....	31
Tabla 5. Condiciones de producción de PHA a partir de la <i>Ralstonia</i> <i>Eutropha</i>	34
Tabla 6. Métodos de extracción de los polihidroxicanoatos.....	39
Tabla 7. Datos de la localización de la investigación.....	40
Tabla 8. Parámetros de la situación geográfica y climática del lugar de la investigación	40
Tabla 9. Descripción de factores de estudio	44
Tabla 10. Combinación de Factores.	45
Tabla 11. Características del experimento.....	45
Tabla 12. Análisis de varianza (ADEVA)	45
Tabla 13. Condiciones de hidrolisis del almidón de yuca	57
Tabla 14. Composición del reactivo de cuantificación.....	58
Tabla 15. Conteo de las colonias	67
Tabla 16. Resultados de concentración de ADN, las cepas de bacterias.....	70
Tabla 17. Concentraciones Azúcares reductores de las muestras.....	74
Tabla 18. Análisis de Varianza.....	75
Tabla 19. Análisis de Varianza.....	76

Tabla 20. Comparación de medias para el porcentaje de glucosa	76
Tabla 21. Comparación de medias según Fisher para el Factor B, tiempo de fermentación.	77
Tabla 22. Cuantificación de crecimiento de microorganismos.	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. estructura química del PHA Fuente: Delgado et al., (2015)	25
Figura 2. Esquema del granulo de PHA acumulado intracelularmente.....	26
Figura 3. Clasificación de las enzimas PHA sintasa	28
Figura 4. Acumulación de PHA en Pseudomonas aeruginosas.....	30
Figura 5. Producción del polímero	35
Figura 6. Micrografía de la tinción con Sudán Negro de las células de R. Eutropha.....	36
Figura 7. Flujograma del proceso de extracción del almidón de yuca	55
Figura 8,9. Fotografía de las observaciones al microscopio de luz a 100X68	
Figura 10. Aislamiento de la bacteria de carácter Gram negativa.....	70
Figura 11. Lectura de absorbancia del material genético de las muestras aisladas.....	71
Figura 12. Fotografía de la electroforesis	72
Figura 13. Fotografía de la siembra de la bacteria identificada.....	72
Fig14. Curva de calibración	73
Fig. 15. Interacción de medias.....	78
Fig. 16. Acumulación de PHAs en el ensayo1 por microscopia	79
Fig. 17. Acumulación de PHAs en el ensayo1 por microscopia	79
Fig. 18 Crecimiento microbiano.....	81
Figura 19. Consumo de sustrato	82
Figura 20, 21. Bioplástico obtenido y degradado a los 25 días.....	84

ANEXOS

ANEXO 1. Lugar del experimento.....	95
ANEXO 2. Fotografías del proceso experimental.....	96
ANEXO 3. Datos para el diseño de experimentos	99

RESUMEN

La presente investigación titulada “**Producción de polihidroxicanoatos (PHAs) en un medio con harina de yuca como fuente de carbono utilizando la bacteria *Ralstonia Eutropha*, para un bio-plástico en el laboratorio de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar**” tiene como finalidad dar a conocer el uso de sustratos agroindustriales en la obtención de gránulos de tipo PHAs, que son sintetizados intracelularmente por algunos géneros bacterianos como material de reserva cuando se encuentran con limitación de nutrientes, que reemplazarían a los polímeros sintéticos, pero el costo de elaboración de este proceso es costoso, por ello en el presente estudio se evaluó diferentes concentraciones de sustrato mediante un diseño experimental DBCA.

El estudio de obtención de PHA se realizó en tres concentraciones de ED a partir almidón de yuca en 2 tiempos de fermentación, el mejor tiempo fue de 72 horas con la adición de 10g/L jarabe de almidón de yuca hidrolizada. Dando el inicio al aislamiento de la bacteria a partir de suelos en donde habitan las bacterias productoras de PHAs, para su identificación se utilizó la técnica de tinción de Gram y molecular (PCR) y se distinguió como bacteria Gram negativa y cuya fuente de carbono suministrada fue el jarabe de harina de yuca. Posteriormente se estableció el protocolo de condiciones que intervienen en la fermentación tipo batch, durante este tiempo se evaluó: la acumulación de PHAs, el consumo de glucosa y la acumulación de células, a través de una curva de crecimiento microbiano. Seguidamente se procedió a la extracción del biopolímero y utilizando soluciones con ácido y finalmente se realizó la laminación del biopolímero que cubre no en su totalidad al producto propuesto más bien se pudo cubrir un 10% de la totalidad del producto.

Palabras clave: Azúcares Reductores, PHAs, PCR, hidrolizar.

SUMMARY

The present research entitled "Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in a medium with cassava flour as carbon source using the bacterium (*Ralstonia Eutropha*), for a bio-plastic in the research laboratory of the State University of Bolivar" aims to publicize the use of agro-industrial substrates in obtaining PHAs type granules, which are synthesized intracellularly by some bacterial genera as a reserve material when they are with nutrient limitation, which would replace synthetic polymers, but the cost of elaboration of this process is expensive, therefore in the present study different substrate concentrations were evaluated by means of a DBCA experimental design.

The study to obtain PHA was carried out in three concentrations of ED from cassava starch in two fermentation times, the best time was 72 hours with the addition of 10g/L hydrolyzed cassava starch syrup. The first step was to isolate the bacteria from soils where PHAs-producing bacteria live. For their identification, the Gram and molecular staining technique (PCR) was used and they were distinguished as Gram-negative bacteria whose carbon source was cassava flour syrup. Subsequently, the protocol of conditions involved in batch fermentation was established, during which time the accumulation of PHAs, glucose consumption and cell accumulation were evaluated by means of a microbial growth curve. The biopolymer was then extracted using acid solutions and finally the biopolymer was laminated, which does not cover the entire proposed product, but rather 10% of the entire product was covered.

Keywords: Reducing sugars, PHAs, PCR, hydrolyze.

I. INTRODUCCIÓN.

En todo el mundo anualmente se produce 300 millones de Tn de plástico, por lo que una buena parte de ello, se desecha a los ríos y mares afectando de esta manera la vida acuática, en consecuencia, se estima que para el 2050 habrá más cantidad de basura en los mares, siendo este tipo contaminación causante de un daño irreparable al planeta. Rojas et al. (2018)

Se dice que en el 2015 se ha generado 6300 Tn de plástico por lo que el 9% habían sido reciclados, el 12% incinerado y el 79% acumulado en los vertederos o tirado al medio ambiente. (Roland Geyer & Jenna R. Jambeck & Ley Kara Lavanda, 2017). Mientras que en el Ecuador generamos alrededor de 1500 toneladas a diario de basura de los cuales, el 40% corresponde al plástico Balseca et al., (2019).

La degradación del plástico toma más de mil años, lo cual, ha generado un problema durante años en todo el mundo; durante este tiempo el plástico al estar expuesto al medio ambiente provoca un efecto invernadero, taponamientos en los sumideros de alcantarillados, otras causas es que se conviertan en microplásticos que viajan en el aire impregnándose en nuestro organismo y el de los animales. Conociendo el impacto ambiental que genera los plásticos sintéticos, estudios recientes han demostrado que el uso de biopolímeros o polihidroxialcanoatos son una buena opción de reemplazo de empaques de plásticos derivados del petróleo y en oposición con esto, la producción de polímeros se puede realizar a partir de fuentes renovables de energía y aprovechamiento de subproductos agroindustriales, como es una alternativa ecológica de importancia mundial. En la presente investigación se da a conocer el uso de las bacterias como la *Ralstonia Eutropha* que pueden sintetizar polímeros; empezando con el aislamiento de dicho microorganismo en un medio de cultivo, para luego pasar a un sistema de fermentación tipo batch a partir de sustratos

naturales como la glucosa; obtenida por medio de un hidrólisis de la harina de yuca, este procedimiento nos ayudó a determinar la extracción y la estructura del polímero obtenido de igual modo el consumo de sustrato mediante la técnica DNS. Una vez que se caracterice el bio-plástico se evaluara para poder dar un uso dentro de la industria alimentaria; como es el caso en el embalaje de manzanas

El objetivo de esta investigación fue; Producir polihidroxialcanoatos (PHAs) en un medio con harina de yuca como fuente de carbono utilizando la bacteria (*Ralstonia Eutropha*), para un bio-plástico en el laboratorio de investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Aislar *Ralstonia Eutropha* a partir de suelos utilizando técnicas de cultivo en placa.
- Identificar los aislados obtenidos mediante caracterización bioquímica (tiras api) y molecular PCR (iniciadores específicos).
- Sub cultivar los aislados mediante biorreacción tipo Batch utilizando harina de yuca como fuente de carbono.
- Determinar de consumo de sustrato mediante DNS, Extracción y caracterización estructural del biopolímero obtenido.
- Utilizar el bio-plástico obtenido en el embalaje de manzana.

II. PROBLEMA.

2.1 Planteamiento del problema

Uno de los contaminantes que ha causado un daño irreparable al planeta, es el uso de los plásticos sintéticos que es un derivado creado a partir del petróleo. La mayor parte de los plásticos ha terminado en los basureros, vertederos o en el medio ambiente y se estima que para el 2050 existirá alrededor de 12000 millones de toneladas de basura en los vertederos y basureros mismos, por consiguiente, la industria que produce este tipo de polímero consume el 20 % de la producción del petróleo. (ONU Medio Ambiente, 2018).

En el Ecuador se procesa alrededor de 4493 millones de toneladas de resina PET para la elaboración de plásticos, por lo cual se constituye el 10% del desperdicio y de eso el 90 % es reciclado y el sobrante va a parar en los basureros o son incinerados las cuales emanan sustancias tóxicas al medio ambiente como pueden ser ácido clorhídrico o cianhídrico y esto puede causar efectos perjudiciales para el medio ambiente. García Y. & Meza J. & Gonzales O. (2013)

Del total de los desechos generados en el Ecuador, tan solo el 42 % constituye a los desechos inorgánicos; por lo que se vuelve una problemática seria, dado a que estos no son biodegradables y al no serlo su degradación es lenta, lo cual, se fragmentan hasta convertirse en microplásticos que son ingeridos por los peces que pueden ingresar a nuestra cadena alimentaria. Andrade et al. (2018), considera que la acumulación de las bolsas y botellas de plásticos pueden acumularse llegando a causar daños en los vertederos de las aguas fluviales y los alcantarillados, produciendo de esta manera desastres ambientales, proporcionando un hábitat adecuado para la reproducción de mosquitos y plagas; que son vectores transmisores de enfermedades como la malaria. (ONU Medio Ambiente, 2018)

Por esta razón, no basta con solo reciclar los plásticos sino buscar otra manera para poder eliminarlos o encontrar una nueva alternativa de fabricación de polímeros que sean biodegradables y amigables con el medio ambiente los cuales presentan propiedades similares a los plásticos convencionales, como los PHAs; mismos que son completamente biodegradables ya que son producidos por microorganismos como material de reserva, las propiedades de este material son muy parecidas al polipropileno y al polietileno, de esta manera, se podrá fomentar a las nuevas generaciones, sobre una educación ambiental, siempre y cuando los adultos estén muy comprometidos a ser parte de un cambio, en el cual no exista menos gente con la cultura de usar y tirar los plásticos. ONU Medio ambiente, (2018)

2.2. Situación del problema.

Existe escasa información científica sobre la producción de polihidroxialcanoatos por ende los costos de producción son sumamente altos, es por eso que se hace énfasis en estudiar y usar diferentes fuentes de carbono renovables como los almidones de tubérculos en la alimentación de distintas bacterias productoras de PHAs.

2.3. Formulación del problema.

De acuerdo a lo antes mencionado y tomando en consideración las características propias del estudio, se genera la pregunta general de investigación.

¿Se podrá obtener una mayor cantidad de polihidroxialcanoatos al utilizar como fuente de carbono un hidrolizado de harina de yuca?

2.4. Sistematización del problema.

Para dar cumplimiento correcto al objetivo principal de la investigación se plantearon las siguientes preguntas investigativas:

¿Cómo aislar la bacteria *Ralstonia eutropha* a partir de suelos?

¿Cuál es el método más adecuado de identificación molecular de la bacteria *Ralstonia eutropha*?

¿Cómo realizar la fermentación bacteriana?

¿Cómo identificar el consumo de glucosa de la bacteria y los métodos de extracción y caracterización del producto final?

¿Cómo dar uso del biopolímero obtenido en algún producto?

III. MARCO TEÓRICO.

3.1. UTILIZACIÓN DE LOS PLÁSTICOS

3.1.1. Plásticos.

En general los plásticos son de materiales flexibles, resistentes, poco pesado y aislante de la electricidad y del color, por lo que está formado de macromoléculas que estructura una madeja. Tecnología et al., (2016). y están conformados por propiedades térmicas y resistentes a la oxidación. Perdonomo et al. (2002), manifestó que, aunque el plástico sufra alguna adversidad ambiental y los pulverice seguirán siendo macromoléculas que están presentes en la atmosfera y están mesclado con el aire que naturalmente lo estamos ingiriendo. Este tipo de polímeros se obtiene de la reacción de la polimerización de dos petroquímicos secundarios, el nanómetro etilenglicol y el nanómetro ácido tereftalico o éster metálico. Suasnavas et al., (2017).

Tabla 1. Nombres de cada plástico sus propiedades y aplicaciones.

Nombre	Propiedades	Aplicaciones
PVC(cloruro de polivinillo)	Presenta un amplio rango de dureza. Impermeable	Tuberías, suelas de zapatos, guantes, trajes impermeables, mangueras
Poliestireno (PS)	Transparente Pigmentable	Filmes transparentes para embalajes y envoltorios de productos alimenticios
Polietileno (PE)	Rígido y resistente Transparente	Utensilios domésticos (cubos recipientes, botellas) juguetes. Bolsas, sacos vasos y platos
Celofán	Transparente Flexible y resistente Brillante y adherente	Embalaje, envasado y empaquetado

Fuente: Suasnavas et al., (2017).

3.1.2. Degradación de los plásticos

Los plásticos son polímeros derivados del petróleo que tienen características de suavidad, ligereza y transparencia, por lo que generan serios problemas ecológicos al no ser biodegradables; este tipo de polímeros son ultrarresistentes ante cualquier cambio climatológico, debido a que los microorganismos no son capaces de romper los enlaces C-C, por lo tanto, la biodegradabilidad del plástico depende mucho de su estructura química, Suasnavas et al. (2017), mientras tanto, Serrano et al. (2016), explica que el plástico (botellas Pet) son causantes de generar una gran parte de los residuos contaminantes que se acumulan en el planeta. “El plástico - botellas PET cuando se desechan, permanecen en el ambiente cerca de 100 años o dependiendo del ambiente pueden durar mucho más”.

3.1.3. Plásticos Biodegradables.

En las últimas décadas la conciencia sobre el desarrollo ambiental ha ido teniendo resultados alentadores en cuanto a la producción de materiales biodegradables a partir de residuos industriales o renovables para el reemplazo de los materiales sintéticos. Méndez et al., (2016).

Además, la generación de plásticos biodegradables permite diseños basados en estos materiales que tienen como objetivo producir una respuesta ambiental específica, antes, durante o después de su disposición en el suelo circundante, abriendo nuevas posibilidades de estudios para los diversos usos que puedan tener de estos materiales. Moreira & Susana & PII, (2018).

3.2.1. Polihidroxialcanoatos, plásticos de origen microbiano.

De acuerdo con los autores Pérez et al. (2017) & Fernández et al. (2006) los polihidroxialcanoatos son poliésteres biodegradables acumulados como reserva de carbono y energía, los cuales son sintetizadas por varias especies bacterianas,

incluyendo las *Archaeas* y *Eubacterias*, estos biopolímeros llegan a tener características propias de los plásticos sintéticos, son reducidos en corto tiempo a dióxido de carbono y agua, también, pueden ser sintetizados intracelularmente por varias bacterias que se pueden encontrar en los desechos agroindustriales, lo cual servirá para aprovechar las fuentes de carbono y optimizar los procesos de fermentación, recuperación y purificación del biopolímero. Arrobe & Cardona, (2013).

Las cualidades que se desea obtener del biopolímero y su aplicación dependerán mucho del microorganismo que se aplique y de la fuente de carbono que se utilice en el proceso.

3.2.2. Generalidades de los polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos son sintetizadas por varias especies bacterianas entre ellas son las Gram negativas y Gram positivas y sus moléculas pueden llegar a niveles > al 90% del peso seco de la célula. Al encontrarse en un desequilibrio de los nutrientes las bacterias lo almacenan intracelularmente, por lo que prosiguen a polimerizar estas moléculas de compuestos solubles a insolubles, sin perjudicar a la célula.

Una vez extraído estas moléculas, adquieren propiedades similares a algunos plásticos sintéticos, por lo que son considerados como materia natural y a su vez da el inicio a la evolución de muchos microorganismos que tengan la capacidad de degradar estas moléculas. (Llumigusín et al. 2018).

3.2.3. Composición química.

En la actualidad existen varios tipos de PHA, los cuales son poliésteres lineales de extremo a extremo, estos están compuestos de monómeros de ácidos grasos 3- hidroxí.

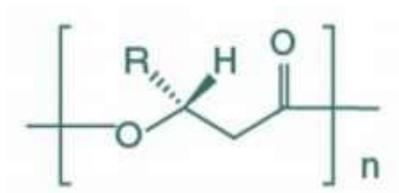


Figura 1: Estructura química del PHA Fuente: Delgado et al., (2015).

Como podemos ver en la figura 1, el valor n dependerá del grupo R y al mismo tiempo del microorganismo que interviene en la producción del biopolímero. De acuerdo con el radical se da el nombre al polímero, a continuación, se muestran algunos ejemplos.

Tabla 3. Sustituciones de los grupos radicales y algunos PHA más conocidos

Grupo R	Nombre del Polímero	Abreviación
CH ₃	Poli(3-hidroxibutirato)	PHB
CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxivalerato)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxihexanoato)	PHHx

Fuente: Arrobe & Cardona et al. (2013)

3.2.4. Síntesis de las PHAs.

En las síntesis están implicadas varias rutas metabólicas centrales en la bacteria, siendo clave la molécula acetyl-coA que a su vez interviene en la ruta de ácidos trocarboxílicos, la β - oxidación y la producción de ácidos grasos. García Y. & Meza J. & Gonzales O. (2013).

El por qué se los considera biodegradables, es debido especialmente a que su síntesis y su descomposición estén medidas por enzimas microbianas entre estas pueden ser las propias del suelo. En cambio, existen otros tipos de enzimas (las despolimerasas) que son encargadas de su hidrólisis, estas pueden ser intercelulares para el aprovechamiento de esta reserva natural o a su vez extracelulares que los microorganismos de la comunidad microbiana usan como fuente de carbono. Marina et al., (2019).

En la actualidad, se conocen por lo menos 75 géneros diferentes de bacterias que producen PHA, tanto Gran positivas como Gran negativas, las cuales son acumuladas en el citoplasma bajo limitadas condiciones de cultivo, no obstante, cabe resalta que la producción del polímero intracelularmente se lo hace bajo condiciones desfavorables para el crecimiento bacteriano, los cuales son acumulados como reserva de energía para el beneficio de la célula. Delgado et al., (2015).

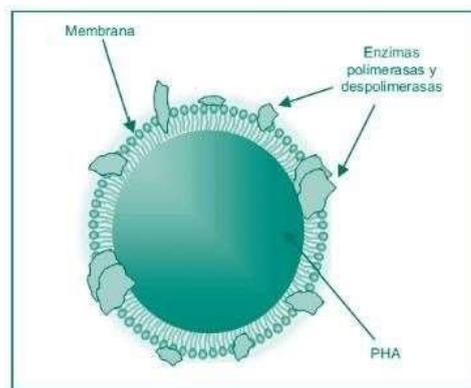


Figura 2. Esquema del gránulo de PHA acumulado intracelularmente

Fuente: Delgado et al. (2015).

3.2.5 Clasificación.

Los PHA se clasifican de acuerdo a la cantidad de carbonos laterales, estos pueden ser de tres clases de longitud: de cadena corta, media o larga. Llumigusín et al., (2018).

- **PHA de cadena corta (scl).** – se caracterizan por tener 5 átomos de carbono
- **PHA de cadena media (mcl).** – se caracterizan por tener de 5 a 14 átomos de carbono.
- **PHA de cadena larga(lcl).** – se caracterizan por tener más de 14 carbonos, estos son poco comunes y menos estudiados.

De acuerdo con sus unidades monómeras

- **Homopolímero.** – está formado por un solo tipo de unidad.
- **Copolímero.** – está formado por monómeros con distinta longitud de átomos de carbono.

3.2.6 Enzimas catalizadoras de los polihidroxicanoatos

Balseca et al. (2019), manifiesta que las enzimas PHA son las que catalizan la solución de R-3-hidroxiacil-CoA a polihidroxicanoatos liberando CoA uniendo monómeros para formar un biopolímero.

Las enzimas que están unidas a los gránulos tienen una especificidad de sustrato, las cuales pueden aceptar nanómetros con diferentes números de carbono, en base a esta característica, se clasifican en cuatro grupos con sus respectivas subunidades y la especificidad de sustrato Serrano et al., (2018), como se muestra en la figura3.

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

Figura 3. Clasificación de las enzimas PHA sintasa

Fuente: Balseca et al. (2019)

Como se puede evidenciar, las PHAs sintasa clase I tienen como microorganismo modelo a la *Ralstonia Eutropha*, por lo que están compuestas de una sola clase de subunidad (PhaC) y actúan sobre tioesteres CoA de varios 3 hidroxialcanoatos de cadena corta.

Sabiendo que el PHA son poliésteres almacenado a partir del exceso de carbono, por naturaleza los microorganismos deben de contar con una enzima para degradarlo y a la vez recuperar el carbono que ha sido ocupado, de esta manera se denomina al PHA como una fuente de nutrientes para las bacterias durante un ayuno o estrés nutricional. Delgado et al., (2015).

3.3. Microorganismos productores de PHAs.

En base a los autores Arrobe & Cardona (2013), en la producción de PHAs intervienen muchos tipos de microorganismo, pero solo algunos seleccionados son capaces de producirlo a gran escala Arrobe & Cardona (2013), por eso es necesario la elección de la bacteria ya que al elegirlo puede variar dependiendo de algunos factores como:

- La habilidad celular para utilizar fuentes de carbono no costosas.
- La velocidad de crecimiento.
- Síntesis del biopolímero
- La calidad.
- Cantidad del PHA.
- El costo de los procesos de recuperación.

La producción de PHA pueden ser por dos tipos de microorganismo; procariontes y eucariotes, como:

- *Ralstonia eutropha*
- *Alcaligenes latus*
- *Azotobacter vinelandii*
- *Pseudomonas oleovorans*
- *Paracoccus denitrificans*
- *Protomonas extorquens*
- *E. coli recombinante*

En cambio Balseca et al., (2019), menciona que las bacterias que tienen una alta capacidad de acumulación y producción de polihidroxicanoatos, por ejemplo:

- *Alcaligenes eutrophus*
- *Alcaligenes latus*
- *Azotobacter vinelandii*
- *Pseudomonas oleovorans*
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- Cepas recombinantes de *Alcaligenes eutrophus*, *Escherichia* y *Klebsiella aerogenes*

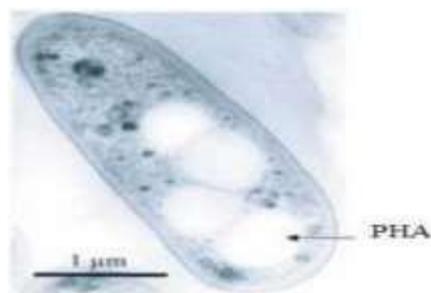


Figura 4. Acumulación de PHA en *Pseudomonas aeruginosas*

Fuente: (Balseca et al., 2019).

A pesar de tener una alta eficiencia tiene altos costos de fabricación de aproximadamente 10USD x Kg en comparación con la producción de los plásticos convencionales de 1USD kg, lo que implica a los precios de las fuentes de carbono y los procesos de purificación. Serrano et al. (2018).

De igual manera, se han evidenciado existencia del PHAs en los tejidos animales y humanos por lo que estudios recientes han determinado que ayudan en el control de las convulsiones, las enfermedades metabólicas y mejorar el ritmo cardiaco. (Llumigusín et al. 2018).

Tabla 4. Producción de PHA por diferentes microorganismos y estrategias.

Fuente de carbono	Cepa Bacteriana	Modo de fermentación	Factor limitante	Tipo de polímero	Acumulación de PHA (%)
Triglicéridos	<i>P. seudomonas</i>	Fed-Batch	NA	Mcl	45,0
Glucosa	<i>P.aeruginosa</i> <i>ATCC10145</i>	Continuo	Nitrógeno	Mcl	7,5
	<i>Lysinibacillus</i> <i>sphaericus</i> <i>GBS1</i>	Batch	ND	Scl	60,0
Ácidos grasos	<i>P. putida</i> <i>Bet001</i>	Batch	Nitrógeno	Mcl	49,7-68,9
Bagazo de caña de azúcar	<i>P. aeruginosa</i>	Batch	ND	ND	60,0
Glucosa de harina de yuca	<i>Ralstonia eutropha</i>	Batch	Carbono/ nitrogeno	mcl	Nd

ND: No Determinado

FUENTE: Llumigusín et al. (2018).

3.3. *Ralstonia eutropha*

3.3.1 Descripción

Son bacterias Gram negativas que no forma esporas, significa que tienen dos membranas y tiene una mancha roja o rasada, tienen dos flagelos y dos membranas que generalmente tienen forma de varilla. Diana et al. (2016), consideran que además que el microorganismo tiene un hábitat de 30°C, por lo cual no requieren un entorno halófilo (no salado). Se puede encontrar en los suelos o aguas ricos en carbono. El microorganismo tiene un gran potencial en el uso de la biorremediación ya que es capaz de degradar azúcares fermentables para originar alrededor de citoplasma gránulos de polihidroxialcanoatos o polihidroxibutiratos.

3.3.2. Clasificación taxonómica.

Tabla 5. Taxonomía de la célula

Dominio	Bacterias
Filo	Proteobacterias
Clase	Betaproteobacterias
Orden	Burklolderiaceae
Familia	Burkholderiaceae
Genero	<i>Cupriavidus</i> / <i>Ralstonia</i> / <i>Wautersia</i>

3.3.3. Síntesis de producción de PHAs.

Esta bacteria produce moléculas de acetil-CoA a partir del metabolismo de los carbohidratos, las cuales son incorporadas a la biosíntesis de nuevos ácidos grasos, por lo que genera el 3-hidroxiacil, que es transportado de la ACP para la coenzima A(Coa) y ahí es polimerizado por la acción de la PHA sintasa, cabe mencionar que este microorganismo genera PHA cuando existe ausencia de elementos nutricionales como N, P, O, o Mg. (Malagon & Lopez & Martinez, 2017), así también, se caracteriza por la capacidad de acumular grandes cantidades de PHAs

del tipo poli- β -hidroxinutirato (PHA) y con un peso seco de la bacteria cerca del 80%, dentro de un medio a partir de fuentes de carbono económicas tales como la glucosa, fructosa y residuos oligonoleicos. La cepa nativa puede crecer sobre la glucosa por lo que es necesario establecer condiciones para la acumulación del polímero.

3.3.4. Producción del polihidroxicanoatos.

En la producción del polímero a partir de la bacteria *Ralstonia eutropha*, la estrategia más utilizada es la fermentación; consta de un cultivo de lote alimentado (tipo batch) en el cual, las células crecen hasta un determinado acumulamiento de biomasa, en donde se encuentra la concentración de gránulos de PHAs deseados, para ello y en cierto tiempo la concentración de un nutriente esencial es limitada para favorecer la síntesis de PHAs. En el tiempo en que se limita este nutriente el acumulamiento de la biomasa es constante presentándose la acumulación del biopolímero. En este proceso las bacterias sintetizan el PHA por medio de diferentes sustratos cuyos polímeros son almacenados en el citoplasma como reserva de carbono, ya que la bacteria es expuesta a condiciones de estrés. Sanabria et al., (2017).

3.3.4.1. Cultivo por lote tipo batch.

El proceso de fermentación para la producción de PHAs es muy parecido a las bebidas fermentadas como la cerveza y el vino, dicho de otro modo, en tanques agitados con un medio adecuado para el crecimiento de los microorganismos que producen PHA, en la actualidad para la producción de PHAs existen varios procesos de fermentación industriales como: reactores batch, reactores batch semi-continuo, cultivo de alta densidad celular entre otros. Fuentes et al, (2015).

Estos procesos son fáciles de manejar ya que de estos se pueden hacer estudios de crecimiento, modelación, comportamiento del microorganismo y la acumulación del polímero, en si este tipo de sistema limita a un nutriente en especial

que es el nitrógeno (N) que causa el crecimiento de la biomasa, mientras que otro de los nutrientes como el carbono en especial se encuentra en exceso. De igual manera, el proceso de fermentación tiene una ventaja de no causar daño al medioambiente ya que los subproductos generados suelen ser agua y CO₂. Fuentes et al., (2015).

El tiempo de duración es de 36 a 72 horas tiempo en el cual las células pasan por unas etapas de crecimiento.

.3.4.1.1. Etapas

- Producción de la biomasa. – consiste en llevar a cabo un cultivo enriquecido que favorece el crecimiento de la biomasa.
- Acumulación del PHA. - consiste en el alimento del medio de cultivo con la limitación de algunas de los nutrientes como le fosforo, nitrógeno, oxígeno, sulfuro y magnesio, las cuales favorecen la acumulación del biopolímero, lo cual se adiciona un exceso de glucosa complementada con ácido propiónico

Para la producción de PHAs se emplea un biorreactor donde el sistema se conforma con una entrada continua de nutrientes, pero mas no una salida además es necesario que tenga un volumen de 3 litros, agitado mecánicamente con control de pH y temperatura. Betancur et al. (2011).

Tabla 6. Condiciones para la obtención de PHA a partir de la *Ralstonia Eutropha*.

PRODUCCIÓN DE PHA A partir de <i>Ralstonia eutropha</i>	
Procesos	Harina de yuca
Acondicionamiento de sustrato	Consiste en la hidrolisis enzimática para la obtención de la glucosa
Activación de cepa Microbiana	Por la activación de tripticasa soya
Incubación	Temperatura de 32°C por 48 horas
Fermentación	Durante 36 horas, en un medio mínimo de sales a 30°C y agitación de 150rpm utilizando como inóculo enriquecido tripticasa soya al 10 %
Extracción de PHA	Centrifugación en un medio fermentado a 4500 rpm durante 15 min. Para posterior extracción empleando 5ml de ácido sulfúrico 0,1 M en ebullición durante 1 hora.
biopolímero extraído	Con una relación de C/N=20, la producción de biopolímero de 0,62g/L.

Fuente: Oscar et al. (2016).

3.3.3. Aplicación en la biotecnología

La bacteria es capaz de degradar compuestos cloromáticos y contaminantes químicamente, además los microorganismos son modelos de estudio para la producción microbiana de poliésteres biodegradables que acumulan grandes porcentajes de gránulos de PHAs.

Además, estudios recientes han demostrado que se pueden usar como material para aplicaciones biomédicas tales como filamentos de sutura, portadores de drogas e incentivan el crecimiento celular.

3.4. Proceso de obtención y purificación de PHAs.

3.4.1. Producción de los Biopolímeros y Proceso de Purificación

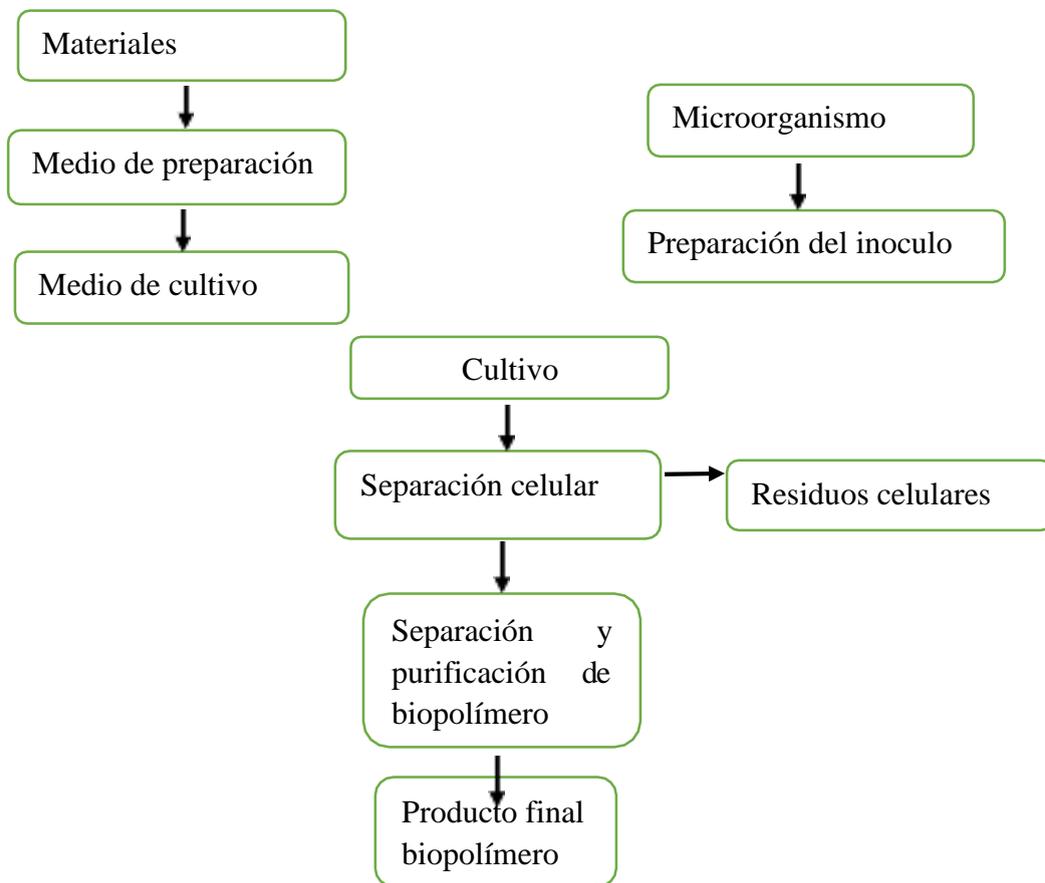


Figura 5. Producción del polímero
Fuente: *Malagón et al. (2017)*.

3.4.2. Aislamiento y detección de bacterias productoras de PHAs

En la síntesis y descomposición de los polímeros interviene las especies microbianas, por lo que en el suelo existe millones de bacterias con la capacidad de degradar este tipo de polímeros que son encargadas de la hidrólisis de las despolimerasas estas pueden ser intracelulares que tienen la función de aprovechar esta reserva nutricional o a su vez pueden ser extracelulares que son sintetizadas por los microorganismos de la comunidad para el uso del carbono existente. (Marina et al., 2019)

Se comienza con el aislamiento de la bacteria productora de PHAs para lo cual, es recomendable utilizar diluciones seriadas del suelo y posteriormente

sembrar en un medio con sales minerales en un PH de 7,0 y la glucosa como fuente de carbono. En cambio Silvia, Moreno & Montoya (2012), recomiendan que para la detección de las colonias productoras de PHAs sembradas, se puede utilizar el método de tinción con el Negro Sudan, rojo de Nilo, o azul posterior a eso se debe utilizar un microscopio con un aumento de 100X, si las bacterias llegan a presentar una fluorescencia rojo-naranja, esto nos indica si existe la producción de PHAs, mientras con la tinción de negro sudan las bacterias que contienen el polímero se pinta unos pequeño gránulos de negros entre más grande sea el PHAs, el microorganismo es vuelve más pequeño.



Figura 6. Micrografía de la tinción con Sudan Negro de las células de R. Eutropha.

3.5 Métodos de identificación.

3.5.1 Identificación molecular (PCR)

Como bien se había dicho los polihidroxiacanoatos (PHAs), son sintetizados intracelularmente en la célula de la bacteria, la cual se utiliza como reserva de carbono. Para que suceda esta reacción, la bacteria deberá contener en su estructura proteica un gen PhaG capaz de transformar los ácidos grasos hacia la síntesis de PHA, por lo que comprende de la composición de los monómeros del microorganismo y de la fuente de carbono utilizada, ya que ésta puede transformarse en precursores de hidroxiacil-CoA por diferentes rutas metabólicas; el cual deberá ser encontrado por

medio de una comparación de proteínas PhaG ya conocidas; una proteína similar a PhaG, fue encontrada siendo codificada por el gen H16_A0147 productora de PHAs y dicha presencia del gen es confirmada preliminarmente usando PCR. (Uribe Acosta & Villa Restrepo, 2019).

3.5.2. Identificación bioquímica mediante las tiras Api20E.

Con base en el informe de Biología et al., (2016), manifiesta que para que una célula viva crezca y se reproduzca debe de tener la capacidad de poder metabolizar los componentes químicos necesarios para obtener energía y de igual manera los elementos que pasan a constituirse de su material celular.

Es así que como estas pruebas bioquímicas nos ayudan a determinar la existencia o ausencia de una enzima o una vía metabólica que puede ser en uno o más microorganismos. Entre las que más se usa puede ser:

La técnica llamada API son un método de ayuda de identificación de levadura, bacterias entéricas especies microbianas dela familia Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos.

3.4.3 Métodos de extracción de PHAs

La extracción del biopolímero consiste en la aplicación de solventes que permiten destruir la membrana celular extrayendo el PHA del citoplasma, que es el lugar donde se almacenan, poniendo a un lado la biomasa residual y los residuos que quedan en la pared celular son separados por medio de los procesos de: filtración y/o centrifugación. Como procedimiento final purificamos empleando una mezcla de solventes.

3.4.4. Cuantificación y Caracterización estructural de los PHAs.

Muchos estudios dedicados a la producción de PHAs muestran que los costos de producción son por encima de los valores de la obtención de los polímeros fósiles. Para que los biopolímeros sean de fácil acceso es necesario optimizar los costos de extracción y purificación del material.

Los últimos estudios de extracción de PHAs para diferentes bacterias, nos han llevado al uso de solventes para así obtener un biopolímero de alta pureza y la eliminación de endotoxinas presentes en la bacteria, aun así, esta técnica es un poco costosa y menos amigable con el medio ambiente, por lo que se ha estudiado diversas técnicas, por ejemplo, la purificación con fluidos súper crítico o la técnica de disrupción mecánica.

Al finalizar el proceso de fermentación se realiza la medición de la concentración de biomasa y de fructosa. La biomasa se midió indirectamente mediante la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro teniendo una curva patrón construida para *R. eutropha* que relaciona absorbancia y peso seco de la biomasa, usando como blanco solución salina a una longitud de onda de 600 nm, esto se lo realiza con muestras tomadas cada 3 horas de todo el tiempo de producción de PHAs. Actualmente, existe nuevas técnicas de liberación espontánea de PHA en bacterias y la dilución de la membrana celular en el aire, por lo que es una de las técnicas muy efectivas en la disminución de costos de extracción de purificación de polihidroxialcanoatos a escala piloto.

Tabla 7. Métodos de extracción de los polihidroxicanoatos

Métodos de extracción.	Ventajas.	Desventajas.
Extracción por solventes	Eliminación de endotoxinas, no degrada el polímero	Es una técnica costosa y se puede obtener poco Polímero
Digestión enzimática	Baja recuperación	Alto costo de enzimas
Disrupción mecánica	No usa químicos	Requiere varias etapas en el proceso
Fragilidad celular	Emplea la fragilidad celular	
Método de digestión	Alta pureza.	Degradación del Polímero
Digestión con NaOCl.	Alta pureza, baja degradación del polímero.	Alto costo de solventes empleados.
Digestión con NaOCl y cloroformo.		
Digestión con quelatos y surfactantes	Alta pureza, baja contaminación.	Gran cantidad de agua residual con contenido de biopolímero.

Fuente: Oscar et al. (2016)

IV. MARCO METODOLÓGICO.

1.1.1 UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.

4.1.1 Localización de la investigación.

La presente investigación se desarrolló en la Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Departamento de Investigación y Vinculación, en los laboratorios de Suelos y de Biología Molecular.

Tabla 8. Datos de la localización de la investigación

UBICACIÓN	LOCALIDAD
Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Sector	Laguacoto II
Dirección	Vía Guaranda – San Simón Km 1 ½

Elaborado por: Alulema W,2021)

4.1.2 Situación climática y geográfica.

Tabla 9. Parámetros de la situación geográfica y climática del lugar de la investigación

PARÁMETROS	VALOR
Altitud	2800 msnm
Latitud	01°34'15" sur
Longitud	79°0'02" oeste
Temperatura mínima	8°C
Temperatura media anual	13°C
Temperatura máxima	18°C
Humedad	75%

Fuente: (Estación Meteorológica, Universidad Estatal de Bolívar, Laguacoto II, 2017)

4.1.3 Material experimental.

25 cajas Petri aisladas (bacterias obtenidas de suelos de cultivos de caña de azúcar en el sector de Babahoyo de la empresa Ingenio Valdez).

Se recolectó 6 muestras del suelo.

4.2 MATERIALES Y EQUIPOS.

4.2.1 Materiales de laboratorio.

- Vasos de precipitación
- Probetas.
- Varillas de agitación.
- Espátula.
- Micro-pipetas.
- Puntas para micro-pipetas.
- Tubos para centrífuga.
- Tubos Eppendorf.
- Pizetas.
- Guantes de látex, mascarillas.
- Pipetas.
- Cajas petri.
- Mechero.
- Gradillas.
- Microtubos Eppendorf.
- Gradillas de Eppendorf.
- Asas de siembra.
- Buretas de precisión.

4.2.2 Reactivos.

Identificación mediante PCR.

- Sarcosyl
- Cloroformo.
- NaOH.
- Agua miliQ.
- Cloroformo.
- Alcohol Isoamilico.
- Acetato de sodio.
- Etanol absoluto
- Fucsina básica.
- Lugol.
- Violeta de genciana.
- Sudam black B
- Medios de cultivos.
- Caldo trpticasa soy broth
- Reactivo somigi
- Reactivo de neelson
- Solución de Rectivo DNS.
- Sulfato de magnesio.
- Cloruro de calcio.
- Peptona.
- Glucosa.
- Sulfato ferroso.
- Na Cl.

- Sulfato de sodio.
- Almidón de yuca.
- Enzima alfaamilasa.
- Enzima glucoamilasa
- Bacto Agar.
- Agua destilada.
- Ácido Sulfanílico.

4.2.3 Equipos de laboratorio.

- Estufa de marca MEMMERT.
- Balanza analítica de marca citizen.
- Incubadora de marca MEMERT
- Cuenta colonias de marca TECHNE
- Cámara de flujo laminar de marca Inglobal Cia.Ltda
- Espectrofotómetro
- Agitador orbital Thermo SCIENTIFIC
- Plancha de calentamiento de marca IKA-CMAG
- Baño maria de marca baño de agua MEMMERT.
- Agitador vórtex de marca Fisher Scientific
- Microscopio eléctrico convencional de marca AmScope
- Autoclave de marca BKQ-B75II
- Termociclador de marca TECHNE
- Centrífuga 5804R de marca Eppendorf

4.2.4 Materiales de oficina.

- Materiales de escritorio.
- Transporte.
- Libreta para recopilar datos.
- Tabulación de datos.
- Transcripción.
- Impresión del documento.
- Empastado.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

4.3.1. Tipo de diseño.

4.3.2. Factor de estudio.

Tomando como referencia el objetivo específico cuatro, para la acumulación del PHAs en la bacteria, se aplicó un diseño experimental que se utilizaron los siguientes factores de estudio.

Tabla 10. Descripción de factores de estudio

Factores de estudio.		
Factor	Código	Nivel
Concentración de ED	A	a1: 10%
		a2: 7,5%
		a3: 5%
Tiempo	B	b1:72 h
		b2:36 h

Fuente: Trabajo experimental 2021

Tabla 11. Combinación de factores.

Combinaciones de niveles			
Tratamientos	Código	A	B
T1	a1b1	10%	72h
T2	a1b2	10%	36h
T3	a2b1	7,5%	72h
T4	a2b2	7,5%	36h
T5	a3b1	5%	72h
T6	a3b2	5%	36h

Elaborado por: (Alulema W, 2021)

4.3.3. Características de experimento.

Tabla 12. Características del experimento.

Localidad	1
Número de tratamientos	6
Número de repeticiones	3
Tamaño de la unidad experimental	4,5
Número total de muestras	18

Fuente: Trabajo experimental 2021

4.3.4. Análisis de varianza ADEVA

Se utilizó un, diseño de bloques al azar, según el siguiente esquema de ADEVA.

Tabla 13. Análisis de varianza (ADEVA)

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total (t-r)	3
Tratamientos (t-1)	5
Bloques (repeticiones-1)	2
Error Experimental (t-1) (t-r)	15

Fuente: Trabajo experimental 2021

4.3.5. Modelo matemático DBCA.

El siguiente modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dónde:

y_{ijk} Es el valor de la variable respuesta en la repetición k del nivel i-ésimo de A y el nivel j-ésimo de B

μ Promedio general si no se hubiese aplicado ningún tratamiento,

A_i Es el efecto del i-ésimo nivel del factor A

B_j Es el efecto del j-ésimo nivel del factor B

AB_{ij} Es el efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor A y el j-ésimo nivel

ϵ_{ijk} : es el error experimental en la repetición k del nivel i-ésimo de A y el nivel j-ésimo de B.

4.4 PROCEDIMIENTO.

4.4.1. Recolección de suelos.

Las muestras recolectadas fueron de 500 g a una profundidad del suelo de 0–15 cm, las cuales fueron recogidas de diferentes zonas en manera de zigzag a una distancia de 2 metros. Se seleccionaron 6 muestras de suelo en donde existe cultivo de caña de azúcar (“En la ciudad de Babahoyo en el sector de los puentes gemelos, en la finca Ingenio Isabel María”).

Ya selladas las muestras fueron trasladadas al Departamento de investigación de la Universidad Estatal de Bolívar, dentro de un cooler con hielo seco tratando que no exista contaminación dentro de las fundas ziploc.

4.4.2. Aislamiento de microorganismos del género *Copriavidus necátor*.

Para el aislamiento de esta especie del género *Copriavidus necátor*, se inició a partir de un cultivo líquido en medio APT (agua peptona tamponada) (**Emd milpore, VM666728443, Alemania**) y 10 gramos de cada muestra las cuales fueron puestas en cada Erlenmeyer, posterior a eso se incubo a 38°C x 24 horas; una vez finalizada el tiempo se procedió a hacer soluciones serias con agua estéril de cada una de las muestras hasta la dilución M_1^{-5} .

Para la inoculación de las bacterias diluidas se cultivó en placas con Agar Mc. Conkey midiendo 1 ml de muestra e inoculando en cada caja petri, finalizado esto se etiqueto y se selló para trasladarla a la incubadora a 38°C durante 72 horas.

Finalizado el tiempo de incubación se procedió a contar las colonias en una cuenta colonias (código SC6PLUS de marca techne fisher Scientific, del país de origen de España.) dividiendo a las cajas petri en cuatro cuadrantes; se clasificaron a las placas que obtuvieron un mejor crecimiento y acumulación de colonias, para después identificar su morfología mediante una tinción de Gram como lo describe. Barbosa & Romeo (2005)

4.4.3. Confirmación inicial de los aislados obtenidos

Las colonias con morfología característica en placa fueron observadas mediante microscopía por Tinción de Gram, las cuales mediante su coloración vista en un microscopio se puede deducir qué tipo de bacterias se obtuvo; color rosa Gram negativas (productoras de PHAs); color violeta Gram positivas (no productoras de PHAs), el protocolo utilizado se describe a continuación:

- Extensión.
- Desecación.
- Fijación.
- Teñido con Violeta de Genciana durante 1 minuto.
- Sin lavar, se reemplaza el colorante por la solución de Lugol, arrastrando primero.
- y dejándole actuar durante 1 minuto.
- Lavado 1 con agua destilada.
- Decolorado con alcohol durante 30 segundos.
- Lavado 2 con agua destilada.
- Teñido con Fucsina básica diluida durante 3 minutos.
- Lavado 3, secado y observación al microscopio con el objetivo de inmersión.

Las cepas con características específicas a pertenecer supuestamente al género *Copriavidus necátor* presentaron en forma de diplococos Gram negativas, posteriormente, fueron congelados en crio viales.

4.4.4. Extracción del DNA de las bacterias aisladas (método boiling).

Se seleccionaron los aislados de las bacterias obtenidos de muestras del suelo, para lo cual, se prepararon cajas petri con un medio TSB, en las cuales fueron resembradas las bacterias Gram(-) conforme a lo establecido por Maddela et al. (2015). La siembra de las bacterias se lo llevó a cabo tomando las colonias y haciendo un frotis en forma de estría sobre las cajas de agar TSB, que posteriormente fueron incubados a 37°C durante 24-48 h conforme lo establecido por, Vásconez Vinza et al, (2020).

4.4.5. Extracción de ADN.

Con el objeto de conocer la calidad de material genético del microorganismo aislado, se procedió a realizar la extracción de ADN, para lo cual, se realizó conforme el siguiente protocolo:

- Se tomó con el aza al rojo vivo la muestra del microorganismo aislado en un medio de agar triptycasa de soja.
- Se trasladó a la muestra a un tubo eppendorof + 1ml de agua mili-Q
- Para extraer el DNA las cepas, se re-suspendió las células en 200µl de agua estéril.
- Se centrifugó durante 15s a 10000 rpm.
- Las células se re suspendieron en 200µl de sarcosyl al 1%, se centrifugó a 14000 rpm durante 4 min y se desechó el sobrenadante
- La extracción del DNA se llevó a cabo añadiendo a las células 100µl de NaOH 0,05M, que se calentó a 100°C durante 4 min.
- Transcurrido este tiempo se añadieron 300µl de agua mili-Q estéril, se homogeneiza la mezcla de forma suave y se centrifuga a 12000 rpm durante 3 min para eliminar los restos celulares. Después de la centrifugación, se trasvasó

el sobrenadante a un segundo tubo Eppendorf de 1,5 ml, se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1), se homogeneizó con micropipeta durante 10 s y se centrifugó a 12000 rpm durante 3 min.

- La fase acuosa se trasvasó a un tubo nuevo y se adicionó un volumen equivalente de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), posteriormente se homogeneizó nuevamente durante 10 seg y se centrifugó durante 3 min a 12000 rpm.
- Se trasvasó una vez más la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadieron 0,07 volúmenes de acetato de sodio pH 7 (Amresco, USA) y 4 volúmenes de etanol absoluto (Merck).
- Se agitó por inmersión y se mantuvo a -20°C durante 12h.
- Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 min, se eliminó el sobrenadante y las muestras se secaron en SpeedVac durante 5min.
- Se agregaron 200µl de agua mili-Q estéril a cada uno de los tubos y se calentaron a 42°C durante 15 min para disolver el ADN.

4.4.5.2 Verificación de la calidad del ADN en el espectrofotómetro Nano Drop

La concentración del ADN se realizó utilizando un micro-espectrofotómetro (NanoDrop) (**Thermo Scientific™, ND-ONE-W, USA**). Para lo cual, se programó el equipo y se colocó 1 µl de material genético (ADN) sobre el lector de la columna del NanoDrop, y se grabó concentraciones en ng/µl obtenido. El mismo procedimiento se lo realizó con todas las muestras que se desea saber la cantidad de material genético que existe.

4.4.6. Verificación de la bacteria mediante PCR.

4.4.6.1. Método de amplificación.

Para la amplificación mediante PCR, se utilizó como plantilla al ADN de *R. eutropha* para el desarrollo y la optimización de la amplificación de los genes phaG-like, lo cual se utilizaron los cebadores dirigidos al gen phaG-like H16_A0147 descritos por, Uribe Acosta & Villa Restrepo (2019), y se envió la secuencia a la empresa biomol para su síntesis.

4.4.6.2. Procedimiento

La PCR se llevó a cabo con las siguientes instrucciones.

En la reacción se incluyeron cuatro controles negativos sin ADN a temperaturas de recocido de 54, 56, 58 y 60.

La reacción del Mix de PCR se realizó utilizando los siguientes reactivos:

- 50 µL PCR buffer (-50 nM KCl aforado al 1%).
- 2,5 Mm MgCl.
- 0,2 Mm DNTP.
- 0,5 µM primer.
- 0,5UL Taq DNA polimerasa

Las secuencias de los primers fueron las siguientes:

- R. Forward: 5'- CACGCCACCAGCCGAAA-3'
- R. Reverse: 5'- GATTGGATCCTCACGGAACGTCG-3'

Forward 3r tuvo una concentración de 107,4 nmol, este fue diluido a 0,1047 µm. De igual manera, el cebador Reverse KT1 pheC tuvo una concentración de 113,7 nmol por lo que fue diluido a 1137 µm.

La solución del mix fue la siguiente:

- Master mix 25 μ l x2 50 μ l.
- Reuphe3r 1 μ l x2 2 μ l.
- Kt1pheC 1 μ l x2 2 μ l
- Total **27 μ l**
- Agua mili-Q **18 μ l** x2 36 μ l

Total, de solución para los 4 tubos eppendorof **45 μ l**

Se añadió 5 μ l del ADN de la bacteria.

Luego de haber concluido la reacción mix, las muestras se llevaron a amplificación en un termociclador (serie TC3000 20X0,5ML, marca Techne FTC3/05, origen España) con los siguientes tiempos de ciclado.

- Desnaturalización inicial 95°C 30 seg
- Desnaturalización 95°C 20 seg
- Unión de cebadores 53°C 45 seg
- Extensión 72°C 60 seg
- Extensión final 72°C 120 seg

Al haber concluido estos pasos en el termociclador se programa para que se realice 30 ciclos.

4.4.7. Electroforesis de las muestras aisladas.

Los productos resultantes de la PCR se visualizaron en un gel de agarosa.

El objetivo de este proceso es constar la existencia del gen productora del PHAs, mediante los siguientes pasos:

- Preparar el gel agarosa, en una relación de 1,2% en 100 ml de agua tampón, esta solución se calentó en un microondas por un minuto con agitación constante para poder disolver todo el agar.

- Posteriormente se puso en el recipiente con el peine donde se va colocar las muestras.
- Se obtuvo 4 muestras de diferentes plaquetas aisladas.
- Para lo cual, se preparó 6 μ l de blue/Orange 6X que se distribuyó en dos gotas para dos muestras sobre una caja petri y lo mismo se hizo para las dos muestras.
- También se preparó 6 μ l de marcador de peso moleculares (Green 6) + tampón de carga.
- Al tener listo estos, se procedió a cargar el marcador de peso molecular + el tampón de carga en el segundo posillo marcado por el peine en el gel agarosa.
- Seguidamente se tomaron 3 μ l del ADN la primera gota del blue orange6x, una vez homogenizado se procedió a colocar toda la solución en el tercer pasillo del gel agarosa.
- Este mismo paso lo realizamos para todas las muestras.
- Una vez finalizado este procedimiento se dejó correr el gel a 110 voltios durante 45 min.
- Al finalizar este tiempo se preparó agua tampón con el colorante diamont DNA gel y se puso el gel agarosa con el ADN amplificado y se dejó en reposo durante 30 minutos. Para luego visualizar en un transiluminador (12824038, Syngene DG1, España) la amplificación del ADN requerido.

4.4.8. Caracterización de los microorganismos aislados mediante las tiras API 20E

- Para la identificación en las tiras API se siguió una serie de pasos.
- Etiquetar las galerías API en la lengüeta lateral de la cámara de incubación
- Llenar con agua destilada, los alveolos del fondo de la cámara de incubación.
- Colocar la galería API dentro de la cámara de incubación.
- A partir del tubo de suspensión, proceder a inocular las galerías de izquierda a derecha.
- Se introdujo el inóculo en los pozos de la galería con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril. Tener cuidado de no mezclar el contenido de cada pozo una vez hidratado el medio de cultivo.
- Para las pruebas CIT, VP Y GEL se llenó el pozo y la cúpula, en cambio para las otras pruebas llenar únicamente los pozos. Para las pruebas ADH, LDC, ODC, H_2S y RE crear una atmósfera anaerobia llamado la cúpula con aceite mineral estéril.
- Posteriormente se inóculó dos galerías por equipo, una con el tubo de la suspensión de la bacteria problema y la otra con la cepa de referencia.
- Por último, se cerró la cámara de incubación e incubar a la temperatura óptima de desarrollo determinada durante 18 a 24 horas ya por ultimo realizar la lectura. (Biología 2016).

4.4.9. Hidrólisis del Almidón de yuca como fuente de carbono

El proceso de hidrólisis se realizó a partir de la extracción del almidón de yuca, con la intención de identificar las variables que puedan afectar al momento de la obtención del biopolímero.

4.4.9.1. Obtención del almidón de yuca.

4.4.9.1.1. Diagrama de flujo de la extracción del almidón de yuca.

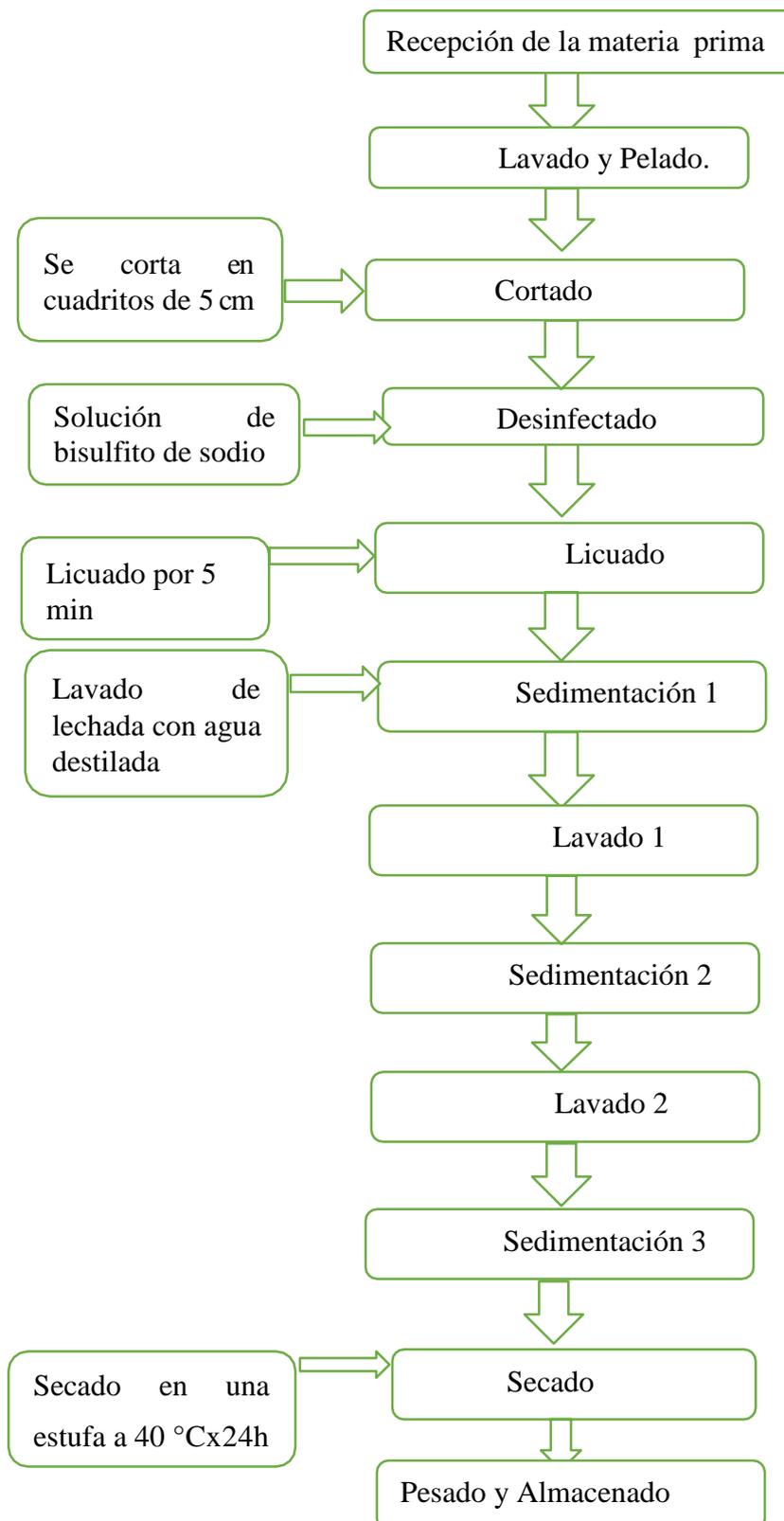


Figura 7. Flujograma del proceso de extracción del almidón de yuca.

4.4.9.1.1.2 Descripción del proceso.

La extracción del almidón se realizó de la siguiente manera:

5 Kg del tubérculo (la yuca) se lavó y se pelo

- El tubérculo fue troceado con un cuchillo, en cubos de máximo 2 cm, y se dejaron remojar durante 30 minutos en una solución de bisulfito de sodio, con una concentración de 1500 ppm, en una relación 1:3 (p/v).
- La mezcla de los cubos con agua fue sometida a un licuado durante 5 minutos a máxima velocidad.
- Al licuado obtenido se le adicionó agua sulfitada (1500 ppm de bisulfito de sodio) en la proporción 1:1 (v/v).
- Posteriormente se filtró con una tela cedazo para eliminar la fibra.
- El filtrado se dejó sedimentar bajo refrigeración a 4°C durante 4 horas, el sobrenadante fue eliminado.
- Nuevamente se realizó un lavado del almidón durante tres veces con agua destilada. En proporción de 2:1. Se controló que el decantado sea translúcido.
- El almidón fue secado a 40 °C durante 24 h en una estufa.
- Finalmente, se guardó en frascos de vidrio color ámbar y tapa hermética, y almacenados a temperatura ambiente para su posterior uso.

4.4.9.2. Preparación de la muestra a hidrolizar.

Se preparó una mezcla de almidón en proporción 4:1, es decir 80 % de agua y 20 % de almidón en este estudio se realizó tres suspensiones con diferentes concentraciones de enzima.

T1: Se pesó 10 g de almidón y se aforo a 50 ml con agua destilada al 20%.

T2: Se pesó 20 g de almidón y se aforo a 100 ml con agua destilada al 20%.

T3: Se pesó 10 g de almidón y se aforo a 50 ml con agua destilada al 20%.

4.4.9.3 Hidrólisis del almidón.

4.4.9.3.1 Gelatinización

Se calentó la mezcla de agua-almidón se trasladó a baño maría a 80 ± 5 °C durante 25 minutos.

4.4.9.3.2. Licuefacción.

Posterior a la gelatinización se dejó enfriar hasta 70 °C, se ajustó el pH a 6,5 utilizando una solución de ácido cítrico al 10 %, luego se adicionó 5,625 ml de la enzima alfa amilasa

Se ajustó la temperatura a 70 ± 5 °C y se dejó reaccionar durante 36 minutos por 250 rpm en el agitador orbital, después del cual se calentó a 85 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima.

4.4.9.3.3. Sacarificación.

Una vez desactivada la enzima se enfrió a 60°C y se puso 7,5 ml de glucoamilasa y se dejó por 24 horas, hasta alcanzar una cantidad de 8solidos totales de 64°brix. Finalmente, se llevó a 80°C durante 1 min para desactivar la enzima.

Tabla 14. Condiciones de hidrólisis del almidón de yuca

Tratamientos	Tiempo _{horas}	°Brix _{inicial}	Cant. α-amilasa	Cant. Glucoamilasa
T1	00:00	11	5,625 ml	-----
	04:00	28	-----	7,5 ml
	20:00	-----	-----	-----
T2	00:00	11	2,00 ml	
	04:00	16	-----	6,25 ml
	22:00	-----	-----	-----
T3	00:00	11	5,00 ml	-----
	04:00	15	-----	6,25 ml
	22:00	-----	-----	-----

Fuente: Trabajo experimental 2021

4.4.9.4. Proceso de cuantificación de Azúcares Reductores en el jarabe hidrolizado de almidón de yuca.

Tabla 15. Composición del reactivo de cuantificación.

<i>Reactivo (reactivo de neelson):</i>	<i>Reactivo B(reactivo Somogy):</i>
Sulfato de sodio	Ácido sulfúrico.
Tartrato de sodio y potasio.	Arseniato de sodio.
Carbonato de sodio.	Molibdato de amonio di-hidratado
Sulfato de cobre.	
Bicarbonato de sodio.	

Fuente: Trabajo experimental 2021

Fase 1.

Preparación del reactivo Somogy.

Se preparó disolviendo 480 mg de tartrato de sodio y potasio y 960 mg de carbonato de sodio anhidro en 10 ml de agua. Los reactivos subsiguientes se adicionaron mientras se agitaba:

- 1) Una solución de 160mg de sulfato de cobre penta-hidratado en 100 ml de agua.
- 2) Incorporación de 16 g de bicarbonato de sodio.
- 3) Una solución de 180 mg de sulfato de sodio anhidro en 500 ml de agua, se llevó a ebullición durante 1 minuto y posteriormente dejar a temperatura ambiente para que se enfrié.

Posteriormente se filtra en caliente para obtener una solución clara y se guardó en un frasco color ámbar.

Fase 2.

Preparación del reactivo de Nelson.

Se prepara disolviendo 25 g de molibdato de amonio en 450 ml de agua, con adición de 21 ml de ácido sulfúrico del 96% y de una solución de 3,0 g de arseniato hidrógeno di-sódico hepta-hidratado en 25 ml de agua.

La solución final se dejó incubar a 37° C durante 24 horas antes de su utilización y se almacenó en un frasco oscuro.

Procedimiento de lectura en el espectrofotómetro

- Para empezar, se preparó la glucosa estándar.
- Se preparó estándares de glucosa de 10, 20, 50, 100, 200, 300 µl/ml a partir de una solución madre de glucosa de 1000ppm
- Se añadió 500 µl en diferentes tubos de ensayo rotulados cada uno de los estándares de glucosa.
- Posterior a eso se puso 500 µl del reactivo de Somogy y se llevó a calentamiento en agua hirviendo por 10min.
- Una vez transcurrido este tiempo se enfrió y se puso 500 µl del reactivo de Nelson se dejó en reposo durante unos 5 minutos y se dio lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 650 nm.

4.4.10. Protocolo de diseño de fermentación bacteriana.

El procedimiento ha sido estudiado dentro de un cultivo por lotes alimentado, esto se hizo por el motivo de que estos procesos son fáciles de manejar y además de eso resultan ser muy adecuados para realizar los estudios de crecimiento, comportamiento de los microorganismos y la acumulación del polímero; la finalidad de este estudio es que uno de los nutrientes en especial el nitrógeno limite el crecimiento de la biomasa hasta que la célula se adapte al medio, transcurrido este tiempo, la intervención de otros nutrientes en especial el carbono se encontrará

en exceso dando como resultado la acumulación de la biomasa y el biopolímero como tal. El procedimiento en sí, tiene una duración de 72 horas, por lo cual, las células pasan por unas etapas de crecimiento.

Las etapas de crecimiento utilizadas fueron las siguientes.

Etapas 1.- Se lleva a cabo a través, de un medio de cultivo enriquecido (TSB) y las cepas bacterianas (*Ralstonia eutropha*), en lo cual se establece la adaptación de la bacteria para favorecer el desarrollo de biomasa.

Etapas 2.- Al medio de cultivo se alimenta en las primeras 24 horas con limitación de nitrógeno, una vez finalizado el tiempo de adaptación y crecimiento celular, se agrega pulsos de glucosa (jarabe hidrolizado de almidón de yuca), para promover la formación e inducir la acumulación del biopolímero.

Los cultivos fueron monitoreados tomando muestras cada 4 horas durante el tiempo que dura la fermentación, esto con la finalidad de poder evaluar el crecimiento y la presencia de los gránulos del biopolímero. Las muestras tomadas se mantuvieron a 4°C hasta el respectivo análisis.

4.4.10.1. Preparación de medio de sales minerales.

Para cada litro de medio de sales minerales (MSM) contenía las siguientes soluciones:

6,7 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1,5 g/L KH_2PO_4 .

1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

citrato de amonio y hierro 60mg/L.

10 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

En donde se agregó un ml de solución de oligoelementos que contenía en 1 litro.

0,2 g/L of $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

0,3 g/L of H_3BO_3 .

0,1 g/L of $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

10 mg/L of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

30 mg/L of $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

30 mg/L of $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

10 mg/L of $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

4.4.10.2 Reactivación de la cepa bacteriana.

Para activar la cepa (*Ralstonia Eutropha*), se siguió la metodología recomendada por Diana et al. (2016), en la que se inocularon 500 ml de un caldo nutritivo (TSB) con 20 colonias de un cultivo puro en medio sólido, el tiempo de incubación fue a 30°C, en 150 rpm durante 24 horas.

4.4.11. Producción de PHAs.

Para la producción de PHAs se empleó de acuerdo a los ensayos realizados y estandarizados, que concierne a la producción en dos etapas, en las cuales se analizó el consumo de sustrato y la producción del PHAs, que consistió en activar el microorganismo en un medio de TSB durante 24 horas en su fase exponencial.

De lo cual, se colocaron 111,11 ml del medio bacteriano en estado de fase exponencial en un litro de MSM, que son macro elementos y micro elementos requeridos para el proceso fermentativo de producción de PHAs, los cuales fueron preparados anteriormente. Este medio preparado se procedió a fermentar durante 24 horas a 30°C por 150 rpm en un agitador orbital. Una vez finalizado este tiempo se agregó 111,11 ml de glucosa hidrolizada del almidón de yuca y continuó la

fermentación hasta las 72 horas. Para el análisis, se tomaron 20 ml de cada muestra, esto cada 6 horas, donde se evaluó concentración del biopolímero, consumo de sustrato, crecimiento bacteriano.

4.4.12. Cuantificación del consumo de sustrato de la fermentación.

4.4.12.1. Soluciones de las concentraciones de glucosa estándar.

Para comenzar se preparó de 2 µl de glucosa pura diluida en 2 ml de agua destilada, la cual fue llevada a una concentración de 800 ppm. A partir de la solución realizada se prepararon las siguientes concentraciones; 10, 20, 50, 100, 200, 300.

De igual manera, para llevar las muestras a las mismas concentraciones de la glucosa estándar; la muestra se aforó a 250 ml con agua destilada más 100 µl de la muestra extraída durante el periodo de fermentación.

4.4.12.2 Preparación del reactivo del ácido 3,5 dinitrosalicílico.

Siguiendo la metodología de: Bello GIL & Daniel; Carrera B.&Emilia; Diaz M. (2006).

Se empezó con el peso de 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico.

- 150 g de tartrato de Na-K.
- g de NaOH.

4.4.12.2.1. Preparación.

- Se disuelve el NaOH en 200 ml de agua.
- Se añade en agitación el tartrato de Na-K lentamente.
- Se completa con agua hasta 400 ml y se comienza a añadir lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico.
- Se dejó en agitación durante toda la noche y se afora a 500 ml y se filtra.

4.4.12.3. Desarrollo de la reacción del DNS.

Se inicia con la preparación de tubos de ensayo; ya una vez esterilizados y secos, se procede a realizar la reacción.

- En los tubos de ensayo de cristal de 10 ml se adicionaron 0,5 ml de muestra y 0,5 mL del reactivo de DNS.
- Posteriormente se colocaron en baño de agua a 100 °C durante 5 min.
- Después se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se añade 5 ml de agua destilada.
- Por último, se agita y se realiza la lectura a 640 nm en espectrofotómetro.

4.4.13. Extracción del biopolímero.

La extracción del biopolímero se realizó por medio de una digestión ácida del material celular no polimérico para recuperar el polímero, la cual describe Alcaraz Zapata, Acosta Cárdenas, & Villa Restrepo, (2019). De forma que describe de la siguiente manera

- La muestra final de la fermentación aeróbica, se centrifuga a 5000 rpm durante 12 minutos (marca eppendorof 5804R 15amp versión).
- Posterior a eso el sobrenadante se separó en un tubo aparte para nuevamente centrifugar y el pellet se lavó con 200 ml de agua destilada 2 veces y la suspensión se esterilizó a 121°C y 1 atm durante 30 min.
- La suspensión esterilizada se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores y se suspendió en una solución de H₂SO₄ 0,1 M que también fue preparada.
- Esta solución se calentó a 90°C durante 2 h y, tras enfriarse a temperatura ambiente, se ajustó el pH a 10 con NaOH 5 N., para luego realizar repetidos lavados con agua destilada con la finalidad de eliminar el exceso de ácido.

- Seguidamente, los gránulos de biomasa se suspendieron en una solución 2:1 de agua destilada con hipoclorito de sodio al 6% v/v, dejándole decolorar durante 2 horas a temperatura ambiente para nuevamente centrifugarlo en las mismas condiciones.
- Finalmente, el polímero obtenido se lavó con agua destilada, para luego ser liofilizada que sirvió para su posterior análisis estructural.

4.4.14. Caracterización estructural del polímero.

4.4.15. Caracterización Fourier FTIR.

Para la caracterización del biopolímero se basó en dos investigaciones realizadas; la una es por Alcaraz Zapata et al. (2019), quienes utilizaron la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), en un espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer Spectrum BX y un módulo ATR de 4000 a 400 cm^{-1} , lo cual dio como resultado la identificación de los grupos funcionales que describen al biopolímero producido por la bacteria *R. eutropha* cuyos datos obtenidos corrobora su investigación utilizando una muestra de control de polihidroxobutirato (PHB) de la marca Sigma-Aldrich con una pureza del 99%, en tanto que Fernandez & Hoyos (2016), quien utilizó una metodología similar de (FTIR) empezó con la preparación de pastillas transparentes que fueron prensadas prensado, las cuales están compuestas por bromuro de potasio secadas a 100 °C en un estufa y conjuntamente con un PHA altamente macerado posterior a eso la pastilla se colocó en el compartimiento del equipo (Thermo Fisher Scientific, Nicolet 200. USA), y se procedió a hacer un barrido en toda la franja de infrarrojo, lo cual se obtuvo el espectro para su posterior análisis discusión y comparación.

4.4.15. Utilización del biopolímero en el embalaje de manzana.

Se caracterizó las propiedades térmicas, reológicas, mecánicas y de barrera del PHBV con diferentes contenidos de valerato y pesos moleculares, el contenido de co-monómero ya que ayudan a mejorar la flexibilidad de los plásticos y reducen la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_m), el punto de fusión de la materia prima y del film obtenido del PHB.

Técnicas y condiciones de procesamiento

Para la obtención del film de PHAs se basa en la metodología de Fabra, López-Rubio & Lagaron (2015); Shrivastav et al. (2011) y Poltronieri & Kumar (2018), de los cuales pueden ser extruidos mediante moldeo por inyección y varios tipos de protocolos de extrusión, en películas y cuerpos huecos

- El procesamiento del polímero se realiza por debajo de los 160°C , lo que lo hace beneficioso al utilizar una velocidad de tornillo baja. Se debe realizar un ensayo de muestra con un polímero sintético para calcular el tiempo de degradación
- La película de PHB y Acrilato se preparó mezclando y disolviendo 0,15 g de PHB y 0,15 g de Acrilato en 30 ml de cloroformo. posteriormente a eso se fabricaron las películas por colada en placas de vidrio limpias y secas por último el cloroformo se evaporó lentamente.
- Se disolvió 0,3 g del PHB en 30 ml de cloroformo, mientras que se formaba el film de PHB el cloroformo se disolvía a temperatura ambiente.

A continuación, el material mezclado (granulado) puede moldearse por compresión en una prensa calentada hidráulicamente, comúnmente de $170\text{-}180^{\circ}\text{C}$ entre dos láminas de Teflón durante 2-5 minutos sin presión y otros 1-3 minutos con presión (50 bares).

- Después del moldeo, las muestras se enfrían entre placas metálicas con agua fría.
- Se dio la evaporación completa que dio lugar a la formación de películas y se dejaron reposar durante otras 24 horas hasta que sus pesos se estabilizaron en el aire.
- El espesor de la película se mide con un micrómetro. Para determinar su grosor.
- Se seleccionaron segmentos de igual grosor y se cortaron películas circulares de 3 cm de diámetro.

Como bien se lo explica en el proceso de laminación del biopolímero intervienen varios equipos y etapas los cuales, son escasos y de difícil acceso en el país, en cambio como lo señala en la investigación de Shrivastav et al. (2011), los autores diseñaron una opción de formar la lámina de PHAs con una solución de cloroformo PHA, posteriormente se dejó que el cloroformo se volatilice a temperatura ambiente o si es necesario elevar a una temperatura considerable sin que la lámina del PHAs se deforme; para realizar este procedimiento es necesario contar con una cantidad necesaria de 40 gramos, para obtener una lámina de 9 cm de diámetro y 2 μm de grosor.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Aislamiento de los microorganismos *Ralstonia eutropha*.

Durante esta investigación se trabajó con 6 muestras de microorganismos, obtenidos previamente de diferentes áreas del cultivo de caña de azúcar, en ese sentido se procedió a seleccionar los cultivos aislados con el microorganismo de interés para la presente investigación. De tal manera se inició a partir de un cultivo líquido agua peptonada y partir de eso se realizó re-siembra en placas con medio de agar (TSB) para luego identificarlas y caracterizarlas.

5.2. Confirmación inicial de los aislados obtenidos.

Al transcurrir el tiempo de incubación de las placas con las siembras se sometieron al conteo bacteriano (cuenta colonias) las cuales dieron los siguientes resultados:

Tabla 16. Conteo de las colonias

Numero de muestras	Numero de muestras seriadas	Colonias existentes	Cantidad de colonias por cada 10 g medio inoculado
M1	Mpatron	Con colonias	80 ufc
	M_1^{-1}	Con colonias	74 ufc
	M_1^{-3}	Con colonias	52 ufc
	M_1^{-4}	Con colonias	54 ufc
	M_1^{-5}	Con colonias	58 ufc
	M_2^{-3}	Con colonias	146 ufc
	M_2^{-4}	Con colonias	84 ufc
M3	Mpatron	Con colonias	224 ufc
	M_3^{-1}	Con colonias	196 ufc
	M_3^{-2}	Con colonias	140 ufc
	M_3^{-3}	Con colonias	222 ufc
M4	Mpatron	Con colonias	1222 ufc
	M_4^{-1}	Con colonias	648 ufc
	M_4^{-4}	Con colonias	1248 ufc
	M_4^{-5}	Con colonias	1496 ufc
M5	Mpatron	Con colonias	164 ufc

	M_5^{-1}	Con colonias	224 ufc
	M_5^{-4}	Con colonias	248 ufc
	M_5^{-5}	Con colonias	182 ufc

Fuente: Trabajo experimental 2021

Tras la tinción de Gram, se pudo identificar a las bacterias Gram negativas, las cuales miden entre 1-2 μm y se caracteriza por poseer un flagelo, dos membranas y dos tipos de pili, las cuales no fermenta la lactosa y es considerada como Fito patógena. Que como resultado único en la muestra 1⁻⁴ que existe bacterias Gram negativas ya que dio una coloración morada, que demuestra que existe la posibilidad que este ahí la bacteria *Ralstonia eutropha*.

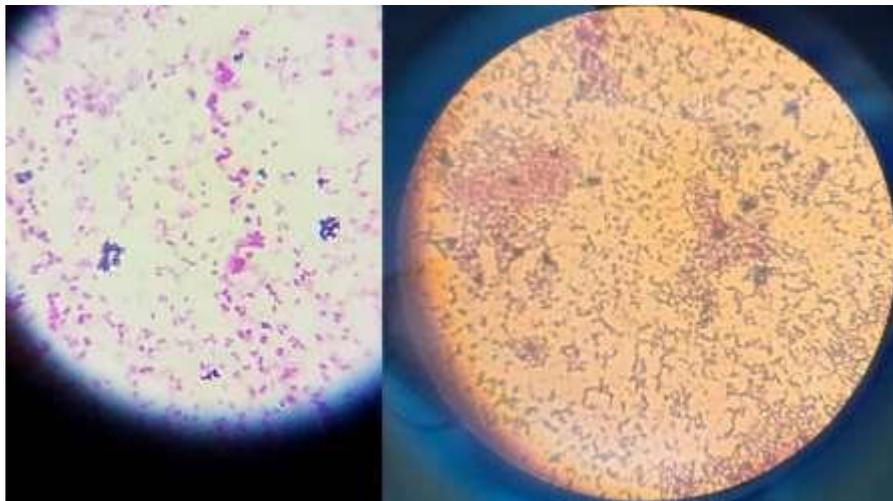


Figura 8, 9. Fotografía de las observaciones al microscopio de luz a 100X

En la Tinción de Gram, se pudo apreciar la forma y tamaño de las células, la estructura de la colonia, así como su clasificación en Gram Negativas. Diana et al. (2016). La identificación de la bacteria aislada se basa de acuerdo a las muestras recolectadas, cuyo procedimiento fue realizado en manera de estría, desde el perímetro del terreno que fue la muestra 1, hacia adentro del cultivo de caña de azúcar, por lo tanto y de acuerdo a A.Mora & M.Marin & A.cardona (2013), que

lograron aislar bacterias de género *Enterobacter* con capacidad de producir PHAs, fueron encontradas en la rizosfera de los suelos de cultivos de caña de azúcar y de subproductos de lácteos. De igual manera, en la investigación de Silvia et al. (2012), quienes lograron aislar con buenos resultados a la bacteria *Ralstonia eutropha* en desechos de fique, hortalizas y plantas medicinales.

El resultado de la tinción de las diluciones realizadas de las 5 muestras aisladas, se la seleccionó tan solo una dilución que sirvió, para continuar con el desarrollo de la investigación y en lo que respecta a las demás muestras que no se encontraron bacterias Gram (-), se deduce que puede ser por el efecto del uso de fertilizantes inorgánicos aplicados en los cultivos lo cual afecta al entorno microbiano.

5.3. Pruebas bioquímicas para la identificación de la bacteria *Ralstonia eutropha*

Luego de haber culminado todo el aislamiento de los microorganismos de interés, se procedió a reanimar la bacteria en placas con agar (TSB) para su posterior estudio, las bacterias identificadas que fueron Gram negativas, se activó en un medio con agar y se puso a incubación en una estufa, por un periodo de 24 h a 37 °C. como se muestra en la fig. 10. posteriormente los microorganismos extraídos fueron sometidos a la técnica establecida por Uribe Acosta & Villa Restrepo (2019), para el cultivo de *Ralstonia eutropha* con el que se procedió al aislamiento de bacterias del género en estudio.

Siembra de la bacteria *Ralstonia eutropha* en un medio de agar TSB.

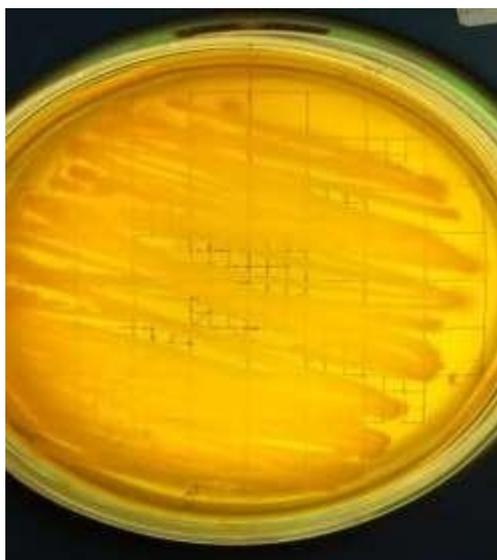


Figura 10. Aislamiento de la bacteria de carácter Gram negativa.

5.4. Extracción, concentración de ADN de los aislados obtenidos

Luego de la reanimación de los microorganismos aislados, procedimos con la extracción de ADN del género en estudio, para analizar su concentración y constatar mediante un análisis bioquímico, y corroborar que se trata de la bacteria *Ralstonia eutropha*.

Se extrajo ADN de la cepa considerada como supuestos positivos de la bacteria *Ralstonia eutropha*.

Tabla 17. Resultados de concentración de ADN, las cepas Gram negativas aisladas de suelos de residuos de caña.

<i>Aislados</i>		<i>Nanodrop</i>
N°	Código	ng/μL
1	M1	567,3
2	M2	131,1

Fuente: Trabajo experimental 2021

Los resultados de lectura de absorbancia se muestran en la fig11. de los cuales se obtienen diferentes concentraciones del material genético, cuyos datos oscilan de entre > a 100 ng/μl, la concentración presenta resultados satisfactorios,

conforme lo establecido por Guamán et al (2017), consideran que la concentración mínima recomendada de ADN para una buena amplificación molecular es de 3 ng/ μ L, por lo que podemos enunciar que existe un alto nivel de material genético extraído de la muestra 1, mientras que la muestra 2 no existe mucho material genético, por lo que se presume que en la M1 existe la posibilidad de que se encuentre la bacteria deseada.



Figura 11. Lectura de absorbancia del material genético de las muestras aisladas.

5.5. Identificación molecular mediante PCR.

La identificación por PCR con los cebadores modificados del gen H16_A0147, permitieron encontrar una baja similitud de la secuencia del ADN de la bacteria, lo cual se obtuvo amplicones de tamaño de banda 800-pb en el cuarto pocillo del medio agar, que fue realizado en el espectrofotómetro UV, como se muestra en la figura 5 y 6.

Autores como Uribe Acosta & Villa Restrepo (2019), quienes realizaron una detección exitosa por PCR del gen productor de PHAs de la bacteria comparando con algunos cebadores similares, al igual que Mora & Marin, (2013), quienes utilizaron el método boilin para la detección de bacterias productoras de PHAs cuyas muestras fueron recogidas de suelos contaminados, por lo que en comparación entre los homólogos de PHAs del gen de la bacteria aislada de esta investigación y

H16_A0147 modificado indica que pertenecen a la misma familia de proteínas, la familia de pliegues α/β hidrolasa, a pesar de la baja similitud de secuencia. Este hecho sugiere además que podrían compartir sitios activos catalíticos, óptimos para producir PHAs.

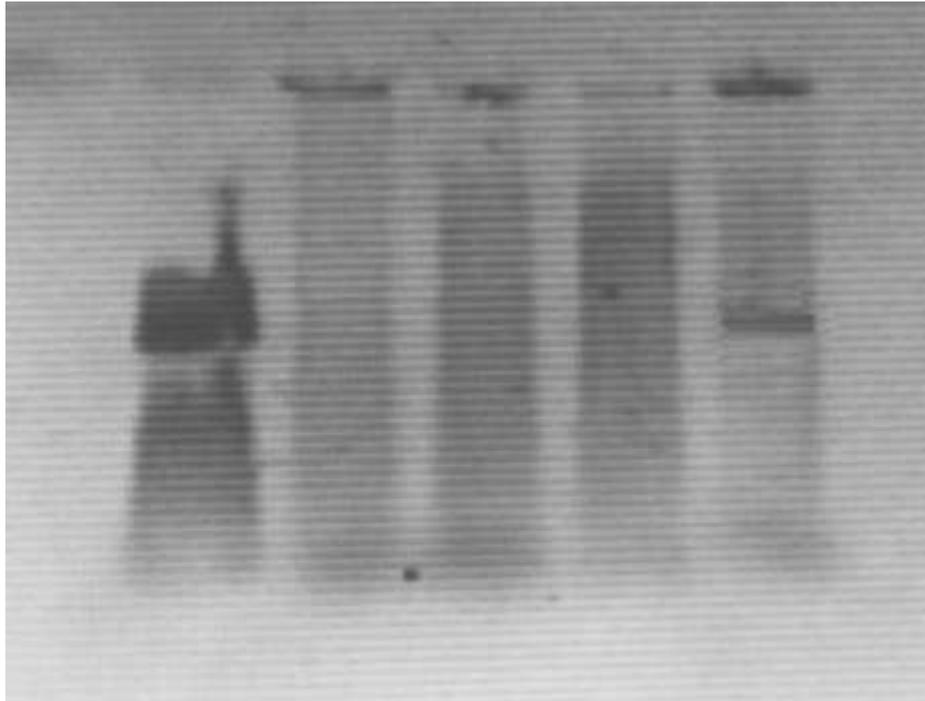


Figura 12. Fotografía de la electroforesis

Posterior a la identificación por PCR de la muestra aislada se procedió a realizar una siembra en 30 cajas Petri de la bacteria en un medio de agar (TSB)



Figura 13. Fotografía de la siembra de la bacteria identificada

5.6. Sub cultivar los aislados mediante biorreacción tipo Batch utilizando harina de yuca como fuente de carbono.

Para este punto fue necesario plantear un protocolo de fermentación microbiana de acuerdo a la bibliografía investigada, en lo cual, como primer paso fue conseguir el jarabe glucosado de harina de yuca.

5.6.1. Hidrólisis del almidón de yuca.

La hidrólisis se efectuó con la muestra que contenía más concentración de azúcares fermentables, la cual fue el T1 que al cabo de las 2 horas obtuvo una concentración de sólidos totales de 24°Brix, y utilizando la glucoamilasa de la casa comercial Granotec un tiempo de 24h, la cantidad de sólidos totales llegó a los 68°Brix. Y seguidamente se midió la cantidad de ED, lo cual se obtuvo una concentración de 64%.

Los resultados de la curva de calibración con las concentraciones de la glucosa estándar, se muestran a continuación:

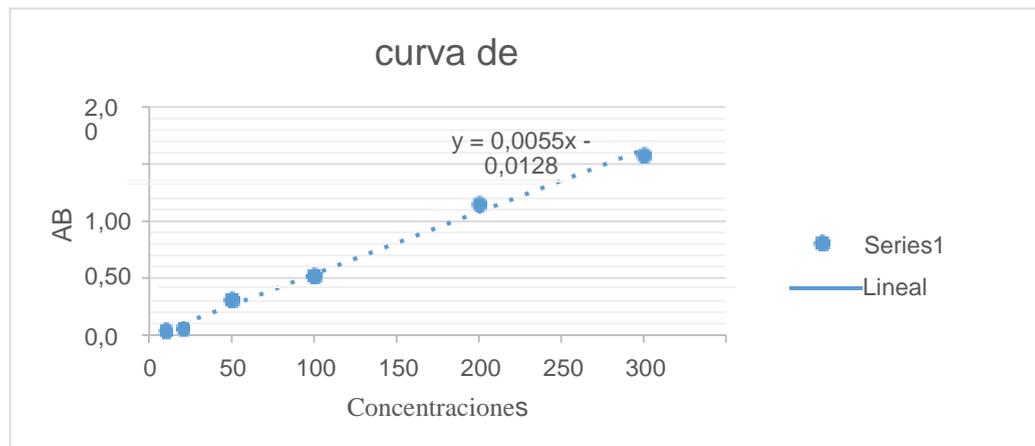


Fig14. Curva de calibración

Tabla 18. Concentraciones Azúcares reductores de las muestras.

Conc.	Abs			Prom(Y)	con.	% (g. glucosa /100 ml muestra)	Equivalente ED
	R1	R2	R3				
T1	0,53	0,51	0,54	0,53	98,69	24,67	38,55
T2	0,16	0,16	0,18	0,17	32,83	8,20	12,82
T3	0,20	0,23	0,22	0,22	41,97	10,49	16,39

Fuente: Trabajo experimental 2021

El resultado de los análisis de las concentraciones diferentes se muestra que en el T1 coincide con el patrón de glucosa estándar obtenido previamente, por lo cual, se puede llegar a concluir que se obtuvo en la muestra del tratamiento 1 una cantidad de 24,67 gramos de glucosa en 100 ml de muestra hidrolizada, por lo cual, la cantidad de azúcares reductores (azúcares fermentables) es de 38,55 % esto es un resultado considerable y con el que se puede trabajar para la alimentación de la bacteria (*Ralstonia eutropha*). Por otro lado, el rango de los datos obtenidos por; Decheco Egúsqizua et al. (2015) que informan una concentración de azúcares reductores de 24,22% por el motivo que se utilizó una enzima comercial de baja concentración, mientras que, Carrera Cataño & Mera. (2005) informan un porcentaje del 89,20% de azucares reductores, ya que en este estudio se usó una enzima comercial de una concentración alta, además de ello, esta enzima estuvo disponible a nivel del país y su costo fue accesible; por lo tanto, el aumento del porcentaje de azúcares reductores va de acuerdo a la cantidad de concentración de enzima y el tiempo de reacción, mientras que la temperatura se mantuvo constante.

5.6.2 Fermentación bacteriana con *Ralstonia eutropha*.

Al tener ya preparado el hidrolizado de la harina de yuca y de igual manera el microorganismo aislado, se procedió a preparar el MSM (Medio de Sales Minerales), el cual fue reportado por Ramsay et al. (1990), que concluye que la

cantidad de MSM va de acuerdo al crecimiento de la biomasa y celular, por lo tanto, para la experimentación se preparó añadiendo la cantidad correspondiente de cada solución salina por 20 g/l de azúcar (glucosa), aportada por el hidrolizado de harina de yuca: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6,7g/l; KH_2PO_4 , 1,5g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l; citrato de hierro y amonio, 60 mg/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l; 1 mL de elementos traza (0,3 g/l de H_3BO_3 ; 0,2 g/l de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 30 mg/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 30 mg/l de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 20 mg/l de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

5.6.5. Análisis factorial.

Tabla 19. Análisis de Varianza

Se evaluaron los pesos de la biomasa en seco obtenidos durante todo el tiempo de fermentación bacteriana de acuerdo a cada una de las cantidades de fuente carbono suministrada, para ello se evaluaron las tres concentraciones de azúcares reductores evaluadas en el hidrolisis en 2 diferentes tiempos de fermentación.

Combinaciones de niveles				Pesos biomasa (g/250mL)		
Tratamientos	Código	A	B	R1	R2	R3
T1	a1b1	10%	72h	0,68	0,65	0,66
T2	a1b2	5%	36h	0,58	0,58	0,56
T3	a2b1	7,50%	72h	0,16	0,28	0,22
T4	a2b2	10%	36h	0,21	0,23	0,22
T5	a3b1	5%	72h	0,13	0,13	0,13
T6	a3b2	7,50%	36h	0,08	0,13	0,1

Fuente: Trabajo experimental 2021

Tabla 20. Análisis de Varianza.

ANOVA					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Glucosa	0,0296778	2	0,0148389	1,03	NS 0,3853
B:Tiempo	0,131756	1	0,131756	9,18	**0,0105
AB	0,853144	2	0,426572	29,71	**
RESIDUOS	0,172267	12	0,0143556		
TOTAL	1,18684	17			

***:* Diferencia estadística altamente significativa; *NS:* Diferencia estadística no significativa

Fuente: Trabajo experimental 2021

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre BIOMASA con un 95,0% de nivel de confianza. Tras el análisis de varianza se puede considerar que en el factor A no existe diferencia significativa, sin embargo, en el factor B (Tiempo de reacción) e interacción AxB si se evidencia diferencia estadística altamente significativa, ya que los valores-P son menores que 0,05.

Tabla 21. Comparación de medias según Fisher para el porcentaje de glucosa.

COMPARACION DE MEDIA PARA EL FACTOR (A)				
Glucosa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
5,00%	6	0,351667	0,0489141	X
7,50%	6	0,36	0,0489141	X
10,00%	6	0,441667	0,0489141	X

Fuente: Trabajo experimental 2021

La comparación de medias muestra que no tiene significancia la cantidad de glucosa suministrada en ninguno de los tratamientos, pero cabe recalcar que para el 10% de cantidad de glucosa proporcionada en la fermentación bacteriana, tenemos

la mayor cantidad de biomasa por lo que sería proporcionalmente a la acumulación de PHAs. Los datos obtenidos son similares a los de Fernandez & Hoyos (2016), quienes informan una cantidad de biomasa de 0,155 g/250 mL de medio al tener una concentración de ED de 79%, y de igual manera está por encima de los datos reportados por Khanna & Srivastava (2005), que obtuvieron una producción de biomasa de 0,0031 g/l.

Tabla 22. Comparación de medias según Fisher para el Factor B, tiempo de fermentación.

COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA EL FACTOR (B)				
Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
36h	9	0,298889	0,0399382	X
72h	9	0,47	0,0399382	X

Fuente: Trabajo experimental 2021

En tabla 22, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X en la columna. Mientras que en la mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias por lo que se colocó un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. Según datos obtenidos en la presente investigación muestra que a las 72 horas se obtiene un mayor porcentaje de biomasa, siendo así el resultado más alto resultado en media de, 0,47.

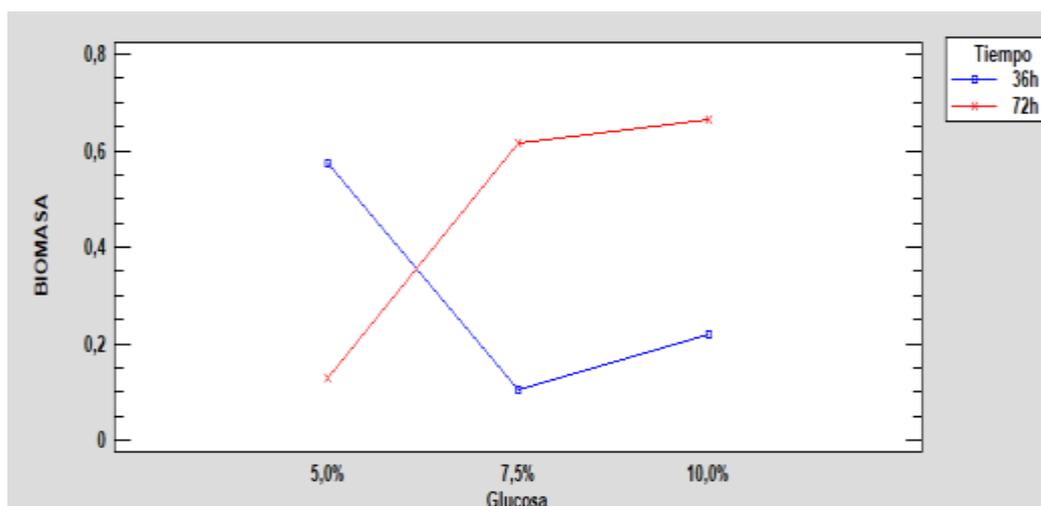


Fig. 15. Interacción de medias.

En la figura 15, muestra que a las 72 horas el aumento de biomasa es mayor con el 10% de glucosa, seguidamente por el 7,5% de glucosa y el rendimiento más bajo es con la adición del 5% mientras que, a las 38 horas el mejor crecimiento de la biomasa es con 5% , seguidamente a las 36 horas con el 10 % y por último va el de 7,5 %, por lo que nos da a entender que el mejor procedimiento de acumular mayor cantidad de biomasa dentro de fermentación bacteriana es de 72 con el 10% de glucosa suministrada. Estos datos son similares a los publicados por Alcaraz Zapata et al. (2019), quienes informan una cantidad de biomasa de 0,0965 gr/250ml de medio fermentado.

5.6.7. Evaluación de la acumulación de los gránulos de PHAs.

Los datos obtenidos por: Alcaraz Zapata et al. (2019); Toro et al. (2015), quienes describen la identificación lipofílica diferencial con negro sudam B, usan como estrategia para la detección de gránulos de PHAs formados intracelularmente en las bacterias, los cuales dieron un seguimiento en el transcurso de la fermentación aerobia, que concluyen que el tiempo óptimo de acumulación es de 72 horas, estos datos fueron similares a lo que se obtuvo en esta investigación, lo cual se usó diferentes muestras en distintos tiempos de fermentación que se realizó una siembra

en plaquetas con un medio de agar TSB y una vez incubado se procedió a identificar realizando un frotis bacteriano en un porta objetos, lo cual, arrojó buenos resultados de la fermentación 2 que se trabajó con el MSM, la bacteria y la fuente de carbono en un tiempo de 72 horas, este resultado se puede evidenciar en las figuras 17 y 18, mientras que a diferencia del ensayo 1, lo cual se trabajó directamente con la fuente de carbono el MSM y la bacteria en un tiempo de 36 horas.

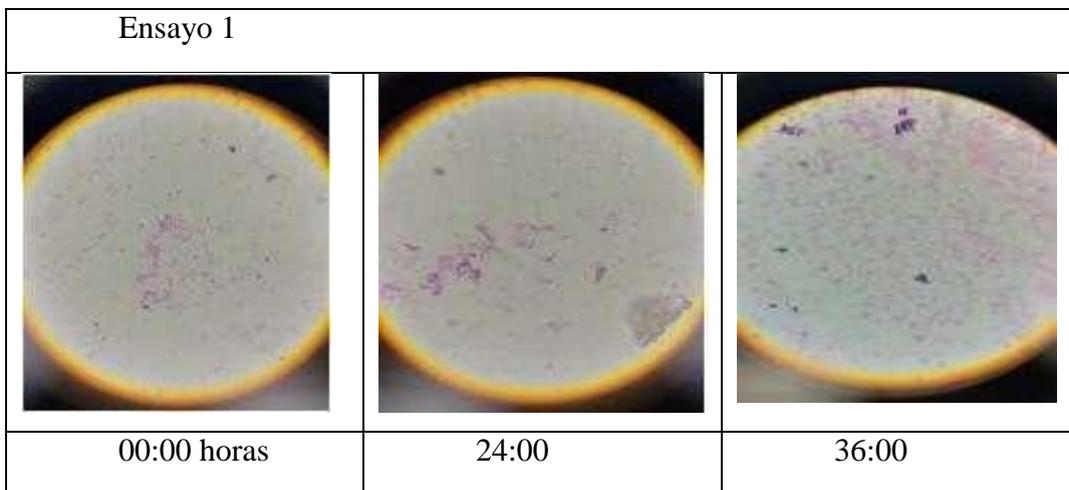


Fig. 16. Verificación de acumulación de PHAs en el ensayo1 por microscopia

Como se puede evidenciar en el ensayo 1, la acumulación de biopolímeros en la bacteria es escasa, esto se debe al tiempo de fermentación y a la fuente de carbono que se inyectó al principio de la reacción, esto quiere decir que no se respetó el tiempo de adaptación de la bacteria, para que pueda asimilar la fuente de carbono.

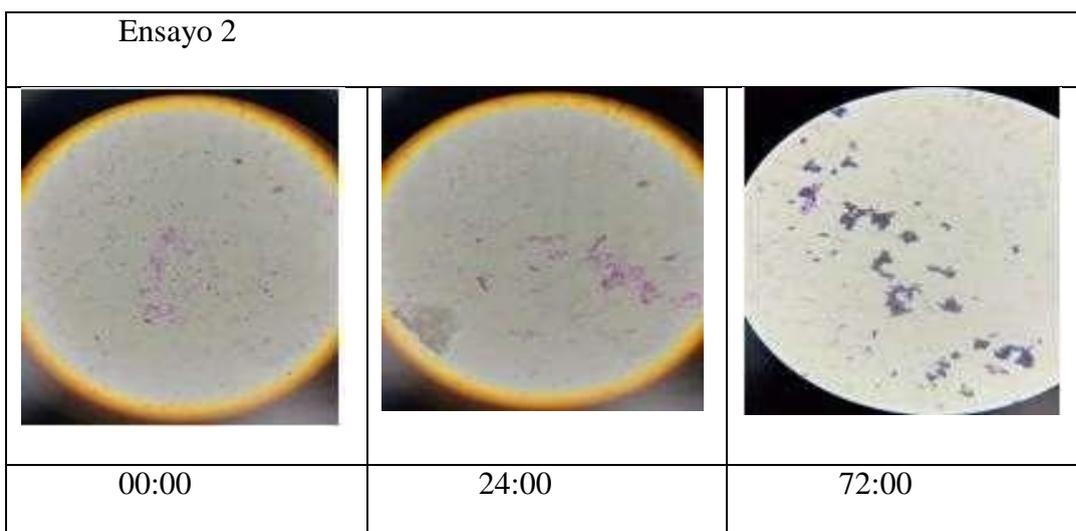


Fig. 17. Verificación de acumulación de PHAs en el ensayo1 por microscopia

En el ensayo 2, se muestra que a través del análisis microscópico realizado existe una aparición del biopolímero dentro de las bacterias; por lo que a partir de las 24 horas después de haber inyectado un pulso de la fuente de carbono existe una acumulación de los gránulos de PHAs y mientras pasa el tiempo de fermentación la acumulación del biopolímero se torna más clara. Esto corrobora ante la investigación de Alcaraz Zapata et al. (2019), que nos explica a partir de las 30 horas de fermentación la existencia una acumulación de biopolímero.

5.7. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE SUSTRATO MEDIANTE DNS.

Para la determinación de la curva de consumo de glucosa por parte de la glucosa, en primera instancia se midió la acumulación de bacterias, lo cual se determina a partir de la técnica del NMP (Número más probable), para establecer las fases de crecimiento microbiano, por lo que, se dedujo que a partir de las 36 horas de fermentación la bacteria inicia con la fase estacionaria, equilibrando el crecimiento de bacterias generadas, debido a lo cual las bacterias que permanecen en el medio de cultivo, consumen la fuente de glucosa suministrada con el fin de sobrevivir y generar intracelularmente reservas de alimento (PHAs).

Tabla 24. Cuantificación de crecimiento de microorganismos.

Tiempo (h)	Ensayo 2	-1	-2	-3	-4	-5	V-tablas	D. poblacional mm/mL
12	M1colonias	5	5	5	5	1	3272	3,27E+08
24	M2colonias	5	5	5	5	5	230546	2,31E+10
36	M3colonias	1	3	5	0	0	107	1,07E+07

Fuente: Trabajo experimental 2021

5.7.1. Curva de crecimiento microbiano

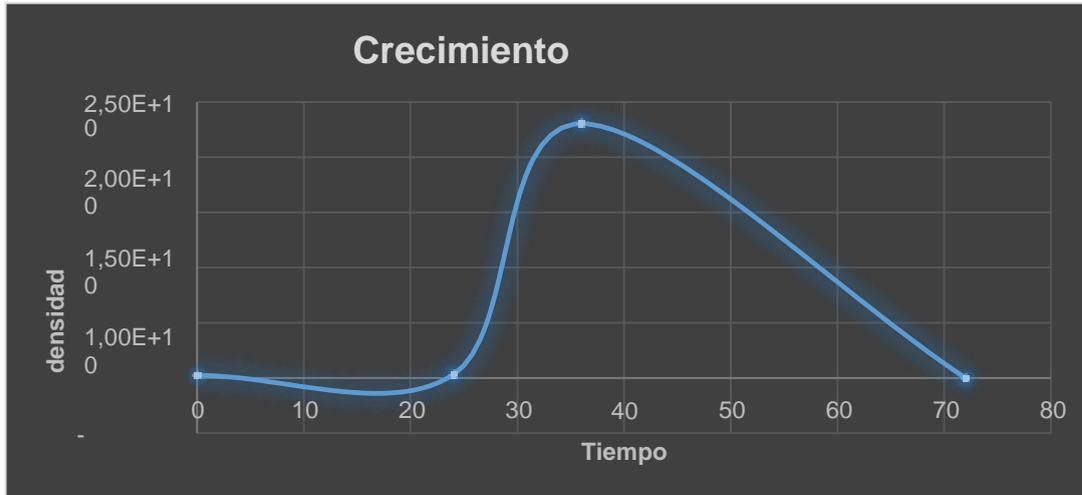


Fig. 18 Crecimiento microbiano.

Como se evidencia en los datos obtenidos y la curva de crecimiento, durante las 24 horas de fermentación de la bacteria inicia su fase de acondicionamiento en el medio de cultivo, por consiguiente de las 24 horas de fermentación, inicia su fase exponencial en el cual inicia con un aumento celular de $2,55E+08$ células/ 1 ml hasta las 36 horas que se mantiene en $3,27E+08$ células/ 1 ml y a partir 40 horas va descendiendo paulatinamente bacteriana y comienza su fase de muerte, por lo que la fermentación termina con $1,07E+07$ células/ 1 ml. Por lo que llega a tener una similitud con los datos obtenidos por (Fernández, Hoyos 2016), quien explica que a partir de las 20 horas la cantidad de células se mantiene en la fase estacionaria con una cantidad de $9,00 \times 10^9$ cel/ml luego de este tiempo las células viables comienzan a descender.

Tabla 25. Absorbancias para la verificación del consumo de sustrato por parte de la bacteria.

Horas de Fermentación	Abs			Prom	Con. glucosa.	Con. g/L
	R1	R2	R3			
0	0,23	0,21	0,19	0,21	40,76	10,19
30	0,28	0,29	0,27	0,28	53,57	13,39
42	0,19	0,15	0,17	0,17	33,44	8,36
72	0,11	0,09	0,10	0,10	20,63	5,16

Fuente: Trabajo de investigación 2021



Figura 19. Consumo de sustrato

Como se puede evidenciar en los datos tomados por la lectura de las absorbancias, el medio de cultivo inicia con 10,19 g de glucosa por 1 ml de muestra fermentada, por consiguiente, en las primeras las 24 horas de fermentación se añadió 10 gr por litro de medio, como fuente carbono. Al transcurrir 6 horas después, se recogió 1 ml de muestra de la fermentación dio un resultado de 13,39 g de glucosa por litro de medio, posteriormente a las 42 horas de fermentación el consumo de sustrato descendió paulatinamente llegando a los 8,36 g de glucosa consumida por la bacteria por cada litro de solución, por lo tanto en este tiempo la bacteria consumió un 83,6% de la fuente de carbono suministrada por lo que, al final de la fermentación se demostró una cantidad de 5,16 g de glucosa consumida por litro de solución, esto nos quiere decir que durante el tiempo de fermentación la bacteria *Ralstonia eutropha* asimila muy bien la fuente de carbono suministrada y por consiguiente existe un rendimiento de biomasa acumulada, por lo tanto los datos reportador por, Oscar et al. (2016), explica la concentración de glucosa en la fermentación inicia con 20 g/l y al transcurrir las 57 horas de fermentación la concentración desciende a los 3,29 g/l, por lo cual, la bacteria consumió un 83,56% de la fuente de carbono, mientras que la investigación de Mariana et al, (2011), informa que se inició con 10 g/l y al transcurrirlas 30 horas de fermentación la bacteria consumió $8,30 \pm 0,01$ g/l, por lo tanto el consumo de la glucosa es del 83%.

5.7.2. EXTRACCIÓN DEL BIOPOLÍMERO.

El peso obtenido del PHAs va de acuerdo a la cantidad de fuente de carbono suministrada al principio, por lo que en esta investigación se adiciono 10g de glucosa en un litro de MSM por lo que se obtuvo 0,20 g de polímero por litro de medio de cultivo. Los datos tienen una peculiaridad muy similar al peso de PHAs obtenido por Fernández & Hoyos (2016), en el utilizan 66,36 g de glucosa con un porcentaje de ED de 79% por litro de cultivo y por lo tanto obtiene 0,62 g de PHAs. Mientras que los datos reportados por Alcaraz Zapata et al. (2019), quienes utilizaron como fuente de carbono 10 g de glucosa por litro de solución y en 72 horas de fermentación obtuvo un peso de PHAs de 0,383 g/l de medio, a su vez, los datos publicados por Toro et al. (2015), utilizó diferentes medios de cultivos enriquecidos con glucosa obtuvo el mejor peso que fue de 0,0624 g de PHAs en un litro de solución. Por lo tanto, se deduce que al tener un buen porcentaje de azúcares reductores en la fuente de carbono que se suministra a la bacteria la formación de los PHAs, la cual es intracelular es alta y a su vez estos valores están directamente relacionada con la biomasa generada.

5.7.3. Utilizar del bio-plástico obtenido en el embalaje de manzana.

Para el siguiente paso se utiliza la metodología descrita por Shrivastav et al. (2011), quienes realizan la laminación en una placa de vidrio un con 40 g de PHA obtenido, seguidamente mezcla con una dilución de cloroformo por un tiempo establecido y posteriormente se espera hasta que el cloroformo se evapora ya sea en temperatura ambiente o calentándoles lentamente. Una vez que se solidifique el PHAs en el cloroformo empieza a formar una lámina la cual se debe pasar por unos rodillos a una temperatura de 120°C lentamente.

Para asegurar que la lámina de PHAs es de carácter polimérico se utiliza un polímero sintético (Acrilato) el cual lo mezcla con PHA y aparte lo hace individualmente.



Figura 20, 21. Bioplástico obtenido y degradado a los 25 días

El bioplástico obtenido fue de 20 mg por litro de medio de cultivo fermentado, por lo tanto, la cantidad de polímero obtenido no fue suficiente para lograr el cubrimiento completo de la manzana, sino más bien un 10 por ciento de la superficie total; una de las razones es la falta de material e información existente en el laboratorio y en el país en general, por lo cual no se completó la laminación total del polímero.

VI. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS.

6.1 Hipótesis de verificar.

Las hipótesis de la investigación planteadas fueron.

6.1.1. Hipótesis alterna (H_A)

La cepa bacteriana *Ralstonia eutropha* aislada del suelo es capaz de acumular polihidroxicarboxilatos con un rendimiento aceptable utilizando harina de yuca como fuente de carbono.

$$H_A: \tau_i \neq 0 \text{ para algún } i$$

6.1.2. Hipótesis alterna (H_0)

La cepa bacteriana *Ralstonia Eutropha* aislada del suelo no es capaz de acumular polihidroxicarboxilatos con un rendimiento aceptable utilizando harina de yuca como fuente de carbono.

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_k = 0$$

Tabla 26. Comparación de los valores de “F” calculando con el de “F” de tablas

Factores de estudio	F - Calculada	F – Tablas
Factor A (concentraciones de glucosa)	1,03	3,885
Factor B (Temperatura de fermentación)	9,18	3,885

Fuente: Trabajo experimental 2021

6.1.3. Verificación de la hipótesis para la acumulación de biomasa para la concentración de glucosa.

La verificación de las hipótesis se realizó mediante la comparación de los valores de F calculada en el cuadro de análisis de varianza ADEVA con respecto a la acumulación de biomasa, de los cuales, para el factor A como se muestra en la tabla 26 los valores de F calculada a los valores de la tabla de Fisher al 5% de

significancia, con la siguiente denominación: si la F calculada es mayor a la F de tablas no existe diferencia significativa, por lo tanto, se acepta H_a y se rechaza H_o , esto quiere decir que las concentraciones de glucosa experimentadas no generan producción del biopolímero y aun así la más alta producción de biomasa fue cuando la concentración de glucosa suministrada fue de 10 g/l.

Tabla 27. Comparación de los valores de “F” calculando con el de “F” de tablas, con respecto al factor B (tiempos de fermentación).

Factores de estudio	F Calculada	F Tablas
Factor B (Métodos de extracción)	2089,34	3,55

Fuente: Trabajo experimental 2021

6.1.4. Verificación de la hipótesis para la acumulación de biomasa con respecto al factor B.

La verificación de las hipótesis se realizó mediante la comparación de los valores de F calculada en el cuadro de análisis de varianza ADEVA con respecto a la acumulación de biomasa, de los cuales, para el factor B como se muestra en la tabla 27 los valores de F calculada a los valores de la tabla de Fisher al 5% de significancia, con la siguiente denominación: si la F calculada es mayor a la F de tablas existe diferencia significativa, por lo tanto se rechaza la H_o y se acepta la H_a , es decir al menos un nivel del factor B es aceptable y como se puede ver en las comparaciones de medias la temperatura más óptima de fermentación de 10 g de glucosa suministrada por 1 litro de medio mineral.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación se concluye lo siguiente:

- De las muestras del suelo recogidas tan solo la M1 se obtuvo la bacteria *Ralstonia eutropha* y se utilizó para la fermentación bacteriana.
- La preparación del medio de cultivo óptimo para el desarrollo y crecimiento de la bacteria *Ralstonia eutropha* fue: caldo nutritivo TSB, medio de sales minerales (MSM), glucosa de harina de yuca, PH de 7, Temperatura de 25°C, agitación de 150rpm.
- El mejor método de identificación para la bacteria *Ralstonia eutropha* fue la PCR por lo que se realizó la comparación de genes de la bacteria aislada con una secuencia de ADN propia de la bacteria.
- Los datos muestran que durante la síntesis de producción del biopolímero que se realizó se obtuvo una cantidad de 220 mg/l de PHA, por lo que se representa la producción máxima de producción de la bacteria *Ralstonia eutropha*, con una cantidad de azúcares reductores de 39%.
- El tiempo de degradación del biopolímero fue de 30 días estos resultados son bastante considerable en comparación con otros autores que duraron 28 días.

7.2. Recomendaciones.

- No incubar muestras de suelos contaminados con pesticidas o con algún otro componente químico ya que normalmente las bacterias productoras de PHAs son susceptibles a este tipo de contaminantes.

- Estudiar más fuentes de carbono sustentables que la bacteria pueda asimilar y aumentar la producción PHAs, ya que como se vio en esta investigación todo depende de la fuente de carbono que se utilice.
- No esterilizar el medio de sales minerales hasta que se diluya bien todas por eso puede ocasionar una precipitación de las sales e intoxicación de las bacterias, es mejor filtrar con un papel filtro de 0,2µl
- Realizar más investigaciones sobre los PHAs ya que a más del aprovechamiento de los residuos agroindustriales también se caracteriza por estar ligado a la rama de los bioprocesos y la microbiología y lograr tener suficiente producción para realizar a escala piloto.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. Mora. A., & Marin M., & Cardona A. (2013). Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar Molecular. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 18(2), 7129–7140. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/41230>
2. Alcaraz W., & Villa F. (2019). Evaluation of polyhydroxyalkanoate (PHAs) production with a bacterial isolate using cassava flour hydrolysates as an alternative substrate. *Dyna*, 86(208), 75–81. <https://doi.org/10.15446/dyna.v86n208.72019>
3. Cardona A. (2013). Identificación de cepas nativas con potencial para obtención de polihidroxicanoatos-(PHAs) en lodos activados. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 2(2), 69–76. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612013000300008
4. Balseca., (2019). Determinación de la producción de polihidroxicanoatos (PHA's) a partir de una cepa de *Bacillus licheniformis* de la fuente geotermal en Guapán - Ecuador, usando diferentes fuentes de carbono bajo condiciones de laboratorio. *Tesis pregrado*. Universidad de las Fuerzas Armadas. Obtenido de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/8732/1/146089or.pdf>
5. Barbosa, M. (2005). Producción de polo-β -hidroxibutirato (PHB) β por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Universitas Scientiarum*, 10(1), 45–54. Obtenido de <http://revistas.sena.edu.co/index.php/CDITI/article/download/2358/2639/92>

6. Bello D., & Carrera B., & Diaz M., (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5, dinitrosalicílico. *Icidca*, 40, 45–50. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120664006.pdf>
7. Carrera J., & Mera, I. (2005). Obtención de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot sculenta*. *Dialnet*, 3(1), 54–63. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6117970>
8. Cortés A., & Díaz M., & Guzmán A. (2018). Sobre *Bacillus cereus* y la inocuidad de los alimentos (una revisión). *Revista de Ciencias*, 22(1), 93–108. Obtenido de <https://doi.org/10.25100/rc.v22i1.7101>
9. Dehecho A. (2015). Obtención de jarabe de glucosa a partir de almidón de yuca *Manihot (Esculenta Crantz)* y estudio comparativo entre los métodos de hidrólisis ácida y enzimática. Obtenido de *Revista de Investigaciones de La Universidad Le Cordon Bleu*, 2(2), 5–14. Obtenido de <https://doi.org/10.36955/riulcb.2015v2n2.001>
10. Delgado C. (2015). Polihidroxialcanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico Colombiano*, 93–101. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5290930>
11. Diana, E. (2016). Aprovechamiento de subproductos de la industria colombiana de aceite de palma para la producción de un biopolímero del tipo PHA. Tesis de post-grado. 4-15 *Universidad de Antioquia*, 30-40. Obtenido de <http://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/5742>
12. Fernández M. (2016). Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir

- de *Ralstonia eutropha* en un medio de harina de yuca como fuente de carbono. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Agroindustrial*, 14(1), 19–26. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)19-26](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)19-26)
13. Fuentes. (2015). Influencia de la concentración de los azúcares y la temperatura de fermentación en el rendimiento de un bioplástico a partir del hidrolizado de granos usados de cervecería empleando *Pseudomonas aeruginosa*. *Universidad de Trujillo*. 20-25 Obtenido de <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3627>
 14. García M. (2015). Producción de polihidroxicanoatos a partir de agua residual de la industria cervecera, Tesis de Pregrado, Universidad de Coruña-España, 60-70, Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=49117>
 15. Llumigusín J. (2018). Caracterización de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA) utilizando azúcares presentes en residuos agroindustriales. Tesis de pregrado. *Universidad Técnica de Ambato*. 31-33, Obtenido de <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/29057>
 16. Maddela, N. R., Masabanda, M., & Leiva-Mora, M. (2015). Novel diesel-oil-degrading bacteria and fungi from the Ecuadorian Amazon rainforest. *Water Science and Technology*, 71(10), 1554–1561. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.142>
 17. Malagón L., & Martínez A., (2017). Síntesis de bioplástico a partir de microorganismos. *IICA*. 127–135. Obtenido de <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6446/1/COL0046961-2017>.

18. Mariana B. (2011). Producción de biopolímeros (Polihidroxialcanoatos) a partir de una cepa comercial empleando métodos convencionales. Tesis Doctoral. *Universidad de Antioquia*. 55-70. Obtenido de https://www.academia.edu/32397400/Producci%C3%93n_de_biopol%C3%8dmeros_Polihidroxialcanoatos_a_partir_de_una_cepa_comercial_employando_sustratos_no_convencionales
19. Marina C. et al. (2019). Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de ácidos grasos en *Pseudomonas putida* KT2440 : optimización del proceso y cambio de escala en biorreactor tipo tanque agitado. Tesis de pregrado. *Universidad Politécnica de Madrid*. 23-26. Obtenido de <https://oa.upm.es/57105/>
20. Méndez, J., & Paschoalin, R., & Carmona, V., Sena, A., Marques, A., & Marconcini, J., & Mattoso, L., & Medeiros, E., & Oliveira, J. (2016). Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion. *Elservier*. 137, 452–458. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861715010735>
21. Moreira S., & Fabio, Bilck Y., & Aline de O., (2018). Biodegradable plastic designed to improve the soil quality and microbiological activity. *Polymer Degradation and Stability*. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2018.10.023>
22. ONU Medio Ambiente. (2018). El estado de los plásticos: Una hoja de ruta para la sostenibilidad. 20. https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/25513/state_plastic
23. Perdonomo et al. (2002). Plásticos y medio ambiente. *Revista Iberoamerica de polimeros*3(2), 1–13. Obtenido de https://reviberpol.org/articulos_publicados-en-numeros-anteriores/2002-2/

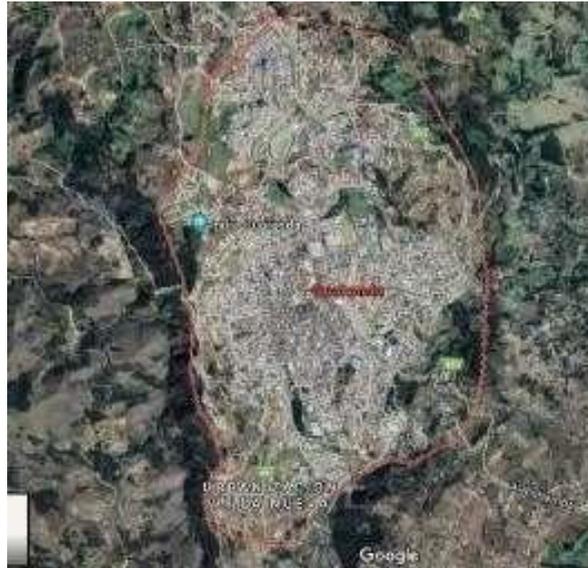
24. Ramsay B., & Lomaliza K., & Chavarie C., & Dube B., & Ramsay, J. A. (1990). *Production of Poly- (P-Hydroxybutyric-Co-3-Hydroxyvaleric) Acids*. *Environmental microbiology*, 56(7): 2093–2098. Obtenido de [https://scholar.google.com.ec/scholar?q=Production+of+Poly-+\(+P-Hydroxybutyric-Co-3-Hydroxyvaleric+\)+Acids.&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart](https://scholar.google.com.ec/scholar?q=Production+of+Poly-+(+P-Hydroxybutyric-Co-3-Hydroxyvaleric+)+Acids.&hl=es&as_sdt=0&as_vis=1&oi=scholart)
25. Sanabria S. et al. (2017). Evaluación de la obtención de polihidroxicanoatos (PHAs) partiendo del residuo del almidón de papa *Bacillus subtilis* a nivel laboratorio. Tesis de pregrado. *Fundación Universidad de America*. 48-58. Obtenido de <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/6040>
26. Serrano J. et al. (2018). Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente Polyhydroxyalkanoates (PHAs) polymers produced by. Researchgate, January 2010. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3702404>
27. Serrato J. et al. (2016). Diagnóstico del impacto del plástico - botellas sobre el medio ambiente: un estado del arte. Tesis de grado. *Universidad santa Tomás vicerrectoría*. 10-13. Obtenido de <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/10047/Gomez2016.pdf>
28. Shrivastav A., & Mishra S., Pancha I., & Jain D., & Bhattacharya, S., & Patel, S., & Mishra, S. (2011). Biodegradability studies of polyhydroxyalkanoate (PHA) film produced by a marine bacteria using *Jatropha* biodiesel byproduct as a substrate. *World Journal of Microbiology*

- and Biotechnology*, 27(7), 1531–1541. Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0605-2>
29. Silvia, Moreno, & Montoya. (2012). Identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique Identification of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria in soils contaminated with fique wastes. *Dialnet*, 2, 89–100. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/776/77625401010.pdf>
30. Suasnavas et al. (2017). Degradación de materiales plásticos “PET” (polyethylene terephthalate), como alternativa para su gestión. Tesis de grado. In *Pontificia Universidad del Ecuador*. Pontificia Universidad del Ecuador. 12-15. Obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/13224>
31. Tecnología D. (2016). *PLÁSTICOS*. 13–22. Obtenido de <https://iesvillalbahervastecnologia.files.wordpress.com/2011/09/plasticos-tejina.pdf>
32. Toro S. et al. (2015). Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) de *Ralstonia eutropha* H16. Universidad de los Andes. Colombia Bogotá, 3-7. <http://hdl.handle.net/1992/39705>.
33. Uribe M., & Villa Restrepo A. (2019). In silico analysis of phag-like protein in *Ralstonia eutropha* H16, potentially involved in polyhydroxyalkanoates synthesis. *Revista Politécnica*, 15(29), 55–64. <https://doi.org/10.33571/rpolitec.v15n29a5>

ANEXOS

ANEXO 1. Lugar del experimento.

Mapa del Cantón Guaranda



Departamento de Investigación, Laboratorio de Biología molecular,
pertenece al centro de Investigación y Desarrollo Bacteriológico.



ANEXO 2. Fotografías del proceso experimental.

Recolección y pesado de Muestras



Preparación de medios de cultivo iniciales, peptone Water y agar Mc konkey



Inoculación de las muestras de suelo e inoculación de las diluciones seriadas.



Incubación de las bacterias y conteo de colonias



Identificación bioquímica de la bacteria



Lectura de electroforesis de rayos UV



Lectura de absorbancias del material genético



Preparación del protocolo para la fermentación.





Fermentación bacteriana tipo Batch



Determinación del consumo de sustrato y extracción del biopolímero.



Tiempo de degradación del biopolímero.



Anexo 3. Datos para el diseño de experimentos

Apéndice a): Efecto antes y después del proceso de biorremediación

72h de fermentación		Pesos de biomasa				
	R1		R2		R3	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
A_1B_1	13,83	14,51	14,01	14,66	14,00	14,66
A_2B_1	14,01	14,55	13,86	14,41	13,80	14,36
A_3B_1	13,16	13,32	13,98	14,26	13,70	13,92
36h de fermentación.						
	R1		R2		R3	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
A_3B_2	13,91	14,12	13,98	14,26	13,90	14,02
A_3B_2	13,80	13,93	11,18	11,31	11,28	11,41
A_3B_2	11,43	11,51	11,40	11,53	11,40	11,50

GLOSARIO DE TÉRMINOS.

- **Aislamiento:** es la calidad que posee un elemento, vivo o no, que se encuentra separado y sin contacto con otros.
- **Aerobios:** es un proceso de respiración celular, en el que se usa el oxígeno para la oxidación del sustrato (por ejemplo, azúcares y grasas, para obtener energía).
- **Hidrocarburo:** son compuestos formados por átomos de carbono e hidrogeno de gran abundancia en la naturaleza.
- **Enterobacter:** es un género de bacterias Gram negativas facultativamente anaeróbicas de la familia de las Enterobacteriaceae.
- **Optimización:** se refiere a la capacidad de hacer o resolver alguna cosa de la manera más eficiente posible.
- **Biorremediación:** es llamado a cualquier proceso que utilice microorganismos.
- **Bacterias:** son organismos procariotas unicelulares, que se encuentran en casi todas las partes de la Tierra.
- **Agrícola:** es un adjetivo que significa relativo o perteneciente a la agricultura o al agricultor.
- **Aguas:** el agua es la sustancia líquida, transparente, inodora, incolora e insípida, fundamental para el desarrollo de la vida en la Tierra,
- **Lisis celular:** es el proceso de ruptura de la membrana celular de células o bacterias que produce la salida del material celular,
- **Suelos:** es la capa superficial de la corteza terrestre considerada la parte biológicamente activa.
- **Plásmido:** es una pequeña molécula de ADN circular que a menudo se encuentran en bacterias y otras células.

- **Tinción de Gram:** cuando la tinción se combina con la bacteria en una muestra, las bacterias pueden estar de color púrpura o volverse rosadas o rojas.
- **Microorganismo:** hace referencia a un ser vivo diminuto que solo puede verse a través de un microscopio.
- **Medioambientales:** es un sistema formado por elementos naturales y artificiales que están interrelacionados y que son modificados por la acción humana.
- **Sintéticos:** que sigue un procedimiento que va de lo simple a lo complejo.
- **Tóxicos:** designamos aquello que es perteneciente o relativo a un veneno o toxina. En este sentido, una sustancia tóxica es aquella que produce efectos, alteraciones o trastornos graves en el funcionamiento.
- **Fósiles:** son los restos petrificados de organismos que vivieron en épocas remotas.
- **FTIR:** infrarrojos por transformada de Fourier y es el método preferido para la espectroscopía de infrarrojos.
- **Fermentación tipo batch:** es un "sistema cerrado", en la cual al inicio de la operación se añade la solución esterilizada de nutrientes y se inocular con el microorganismo, permitiendo que se lleve a cabo la incubación en condiciones óptimas de fermentación.
- **Fermentación anaeróbica:** incluye un complejo número de microorganismos con diferentes características y capacidades, durante el proceso de producción del metabolito los productos finales son sustancias orgánicas.
- **Fermentación Anaerobia:** se caracteriza por una reacción de síntesis o de asimilación, consistente en la asimilación de elementos nutritivos, de materia orgánica, a los microorganismos, utilizando una parte de los compuestos orgánicos como fuente de energía y otra para formar nueva masa de microorganismos.

- **Polímeros:** son macromoléculas compuestas por una o varias unidades químicas (conocidas como monómeros) que se repiten a lo largo de toda la cadena.
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN.
- **Análisis:** que centrarse en una única definición aplicable en todos los ámbitos resulta muy complicado.