



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS CÓRDOBA

**MAESTRIA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA
SUSTENTABLE**

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS DEL PROCESO DE
OBTENCIÓN DE AZÚCAR PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs**

JOSÉ ALBERTO VEGA VIDAURRI

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

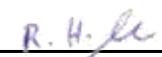
2021

La presente tesis, titulada: **Aislamiento y selección de cepas bacterianas del proceso de obtención de azúcar para la producción de PHAs**, realizada por el alumno: **José Alberto Vega Vidaurri**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

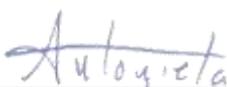
MAESTRO EN CIENCIAS

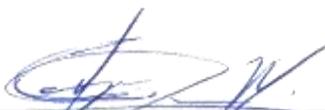
MAESTRIA EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
Dr. Ricardo Hernández Martínez

CODIRECTOR: 
Dr. Marlon Rojas López

ASESOR: 
Dra. María Antonieta Ríos Corripio

ASESOR: 
Dr. Juan Manuel Loeza Corte

ASESOR: 
Dr. Francisco Hernández Rosas

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, **septiembre 2021.**

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE AZÚCAR PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs

José Alberto Vega Vidaurri, M.C.

Colegio de postgraduados, 2021

Resumen

La producción masiva de plásticos derivados del petróleo y el uso excesivo de estos plásticos ha generado una gran diversidad de problemas ambientales, debido a lo anterior existe la necesidad de explorar sistemas de producción de plásticos biodegradables. Por lo tanto, en este trabajo se aislaron 11 cepas bacterianas del proceso de obtención de azúcar, de las cuales tres mostraron capacidad para producir polihidroxialcanoatos (PHAs) mediante los métodos de tinción con Negro de Sudan y aparición de fluorescencia en placa Petri en presencia de Azul de Nilo. Las cepas que mostraron la capacidad para producir PHAs se caracterizaron por morfología macroscópica y microscópica, así como también por pruebas bioquímicas y existe la posibilidad de presencia de *Burkholderia* sp en la cepa JA1, y *Bacillus* sp para las cepas MA1 y ML2. Con las tres cepas, se exploró la capacidad de producción de PHAs y exopolisacaridos (EPS) por fermentación y se encontró que las concentraciones máximas de PHAs después de 72 horas de cultivo fueron de 57.60 mg/L para la cepa JA1, 44.1 mg/L para la cepa MA1 y 148.42 mg/L para la cepa ML2. Así mismo los rendimientos máximos de EPS fueron de 15, 16.5 y 86 mg/L para las cepas JA1, MA1 y ML2 respectivamente. Finalmente, el análisis mediante espectroscopia FT-IR mostró que las tres cepas bacterianas (JA1, MA1 y ML2) son capaces de producir PHB, mientras que la cepa JA1 es capaz de producir Inulina y las cepas MA1 y ML2 son capaces de producir Lévano, siendo esta técnica

una alternativa rápida no destructiva para la caracterización de este tipo de biopolímeros.

Palabras Clave: Cepas bacterianas, Fermentación, Polihidroxicanoatos, Polihidroxitirato, Exopolisacáridos, Inulina, Lévano

ISOLATION AND SELECTION OF BACTERIAL STRAINS FROM THE PROCESS OF OBTAINING SUGAR FOR THE PRODUCTION OF PHAs

José Alberto Vega Vidaurri, M.C.

Colegio de postgraduados, 2021

Abstract

The massive production of plastics derived from petroleum and the excessive use of these plastics has generated a great diversity of environmental problems, due to the above, there is a need to explore biodegradable plastics production systems. Therefore, in this work, 11 bacterial strains were isolated from the sugar production process, of which three demonstrated the ability to produce polyhydroxyalkanoates (PHA) by means of Sudan Black staining methods and the appearance of fluorescence in a Petri dish in the presence of Nile blue. The strains that realize the ability to produce PHAs were characterized by macroscopic and microscopic morphology, as well as by biochemical tests and there is the possibility of the presence of Burkholderia sp in the JA1 strain, and Bacillus sp for the MA1 and ML2 strains. With the three strains, the production capacity of PHAs and exopolysaccharides by fermentation was explored and it was found that the maximum concentrations of PHAs after 72 hours of culture were 57.60 mg / L for the JA1 strain, 44.1 mg / L for the strain MA1 and 148.42 mg / L for the ML2 strain. Likewise, the maximum yields of exopolysaccharides were 15, 16.5 and 86 mg / L for the JA1, MA1 and ML2 strains respectively. Finally, the FT-IR analysis showed that the PHAs produced by the bacterial strains are PHB, while in the case of exopolysaccharides the JA1 strain showed spectra corresponding to inulin and the

MA1 and ML2 strains showed spectra corresponding to Levan. This technique is a fast non-destructive alternative for the characterization of this type of biopolymers.

Key words: Bacterial strains, Fermentation, Polyhydroxyalkanoates, Polyhydroxybutyrate, Exopolysaccharides, Inulin, Levan

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico brindado durante mis estudios de postgrado

Al **Colegio de Postgraduados Campus Córdoba**, por haberme permitido hacer uso de sus equipos e instalaciones para que se llevara a cabo mi investigación

A mi **Consejo Particular**, les agradezco de todo corazón aceptar ser parte de este equipo y por los consejos brindados que cada uno de ustedes me dio, al **Dr. Juan Manuel Loeza Corte** gracias por compartir sus conocimientos conmigo, **Dra. María Antonieta Ríos Corripio**, gracias por todas las veces que fui a su cubículo y me recibió muy amablemente, **Dr. Marlon Rojas López**, gracias por haber aceptado ser mi codirector y por todo el apoyo en brindado en los análisis FT-IR.

Dr. Francisco Hernández Rosas, muchas gracias por el apoyo previo al inicio de mis estudios de postgrado, ya que desde que le pedí una oportunidad para hacer aquí mi estadía de TSU, no dudo en decirme que no, de igual manera le agradezco el haberme ofrecido trabajo, en verdad muchas gracias.

Dr. Ricardo Hernández Martínez, agradezco profundamente todo el apoyo ofrecido dentro de todos mis estudios de postgrado y que a pesar de los regaños, opiniones y comentarios que me hizo, yo sé que no los hizo de una manera negativa, siempre los hizo para que yo viera las cosas desde otra perspectiva.

A mis amigos y compañeros del colegio, **David, Pedro, Marisol, Ruth, Ale, Jorge y Rubén**, entre regaños y buenos momentos, considero que siempre estuvieron ahí

para darme un buen punto de vista y por eso considero que son parte importante de este gran logro.

Dedicatoria

A mis padres **Enma** y **Luciano**, mis hermanos **Luis Porfirio** y **Andrés**, ya que sin ellos no podría haber llegado hasta aquí, ellos son los que en ningún momento me dejaron desertar, les agradezco de todo corazón y por lo tanto este logro también es parte de ustedes.

A **Jessica Guadalupe Velázquez Díaz**, gracias por todas esas veces donde ya no podía seguir y tú me jalabas de las orejas y me decías, yo sé que tú puedes, sé que eres capaz de eso y más, gracias por todas esas veces que llegue todo estresado y de mal humor y me tratabas de tranquilizar, por eso y muchas cosas más, este logro también es parte de ti, ya que tu estuviste en los tiempos más pesados de este largo camino.

A **toda mi familia**, por las veces que estábamos en reuniones y me tenía que retirar porque debía hacer trabajos o tenía que descansar porque al siguiente día debía presentarme al COLPOS como ustedes les dicen a seguir trabajando.

Contenido

Portada.....	1
Resumen.....	ii
Abstract.....	iv
Agradecimientos	vi
Dedicatoria	viii
Contenido.....	ix
Lista de figuras	x
Lista de cuadros.....	xi
I. Introducción.....	1
Industria azucarera en México.....	2
Bioplásticos.....	4
Bioplásticos a base de almidón	4
Bioplásticos a base de ácido polilactico	5
Polihidroxicanoatos	5
Propiedades de los PHAs	7
Rutas metabólicas para la producción de PHAs	7
Estructura química de los PHAs	8
Clasificación de los PHAs.....	9
PHAs de cadena corta.....	9
PHAs de cadena media.....	10
PHAs de cadena larga.....	10
Exopolisacáridos.....	10
Lévano.....	11
Inulina.....	12
II. Justificación	12
III. Hipótesis.....	13
IV. Objetivos	13
General.....	13
Específicos.....	13
V. Materiales y métodos	14

Aislamiento y purificación de cepas bacterianas del proceso de obtención de azúcar	14
Identificación de coliformes, salmonella y shigella	15
Caracterización morfológica y bioquímica de cepas bacterianas	15
Determinación de la capacidad de producción de PHAs de cepas bacterianas	17
Producción de PHAs por cultivo en medio líquido	18
Preparación de inóculo	18
Cultivo en medio líquido	18
Estimación de la producción de PHAs	18
Extracción de PHAs	19
Determinación de la producción de exopolisacáridos	19
Determinación de azúcares reductores	20
Cuantificación de biomasa por peso seco	20
Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	21
VI. Resultados y discusión	21
Aislamiento y purificación de cepas bacterianas del proceso de obtención de azúcar	21
Determinación de la capacidad de producción de PHAs de aislados bacterianos	23
Caracterización morfológica y bioquímica de cepas bacterianas aisladas del proceso de obtención de azúcar	24
Producción de PHAs en medio líquido	26
Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	29
VII. Conclusión	33
VIII. Referencias bibliográficas	34
Anexos	42

Lista de figuras

Figura 1 Derivados de la agroindustria azucarera y su producción comercial (Figura elaborada en CmapTools®)	3
Figura 2. Ruta metabólica para la producción de PHAs (Figura elaborada en Microsoft® PowerPoint)	8
Figura 3. Estructura química de los PHAs (Figura elaborada en Microsoft® PowerPoint)	9
Figura 4. Estructura química del lévano (Figura elaborada en Microsoft® PowerPoint)	11

Figura 5. Estructura química de inulina (Figura elaborada en Microsoft® PowerPoint).	12
Figura 6. Preservados de los microorganismos ML2, JA1 y MA1 reactivados en agar MRS.....	23
Figura 7. Métodos de determinación del potencial para la producción de PHAs por las cepas bacterianas aisladas. a) Tinción con negro de Sudan cepa JA1, b) Tinción con Negro de Sudan cepa MA1, c) Crecimiento en caja Petri con azul de Nilo, cepa ML2.	24
.Figura 8. Cinética de producción de PHAs, EPS, biomasa y comportamiento de azúcares reductores por la cepa JA1 en cultivo en medio líquido.....	28
Figura 9. Cinética de producción de PHAs, EPS, biomasa y comportamiento de azúcares reductores por la cepa MA1 en cultivo en medio líquido.	29
Figura 10. Cinética de producción de PHAs, EPS, biomasa y comportamiento de azúcares reductores por la cepa ML2 en cultivo en medio líquido.	29
Figura 11. Espectros FT-IR de PHB y las cepas JA1, MA1 y ML2	31
Figura 12. Espectros FT-IR de Lévano y las cepas MA-1 y ML-2	32
Figura 13. Espectros FT-IR de inulina y la cepa JA-1	33

Lista de cuadros

Tabla 1. Microorganismos que producen PHAs y sus fuentes de carbono	6
Tabla 2. Identificación de cepas bacterianas de acuerdo a su origen.....	22
Tabla 3. Resultados de pruebas bioquímicas.....	25
Tabla 4. Rendimientos de producción de PHAs y EPS por microorganismo	29

I. Introducción

La producción masiva de plásticos convencionales y el uso excesivo de dichos plásticos en la sociedad es innegable, por lo tanto, su uso mal empleado ha provocado una epidemia de residuos mal gestionados, por lo que a partir del año 1950 han sido producidas más de 7,800 millones de toneladas métricas y más de la mitad de ese plástico se produjo entre los años 2014 y 2017, así mismo, se estima que para el año 2050 esta cifra se triplique (Schmaltz *et al.*, 2020). Debido a lo anterior, existen graves impactos ambientales tanto en la producción masiva de estos plásticos, como en la eliminación y, por consiguiente, existe una necesidad de reemplazar los plásticos derivados del petróleo por plásticos biodegradables producidos por microorganismos tales como bacterias ya sean Gram positivas o negativas y arqueas (Tohme *et al.*, 2018 y Simó *et al.*, 2021).

Algunos biopolímeros microbianos como los PHAs y los EPS, como lévano e inulina, tienen usos establecidos en las industrias alimentaria, cosmética, farmacéutica y química, así como aplicaciones emergentes en la ciencia de los materiales, no solo por sus características de biocompatibilidad y biodegradabilidad sino también por sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas similares a los plásticos convencionales (Leyva *et al.*, 2017; Gonzalez *et al.*, 2018 y Tohme *et al.*, 2018 y Mendonça *et al.*, 2021), sin embargo, para que los biopolímeros microbianos sean alternativas viables a los plásticos convencionales, su producción debe ser rentable desde una perspectiva económica, ya que para producir PHAs, los costos de producción son de tres a cinco veces más que la de los plásticos convencionales, esto debido a que las fuentes de carbono y nitrógeno que se utilizan para la producción de los biopolímeros son costosas, a lo cual se opta por bajar dichos

costos realizando una coproducción de PHAs y EPS (Li *et al.*, 2017; Yaday *et al.*,2021).

Una de las ventajas para producir PHAs y EPS es que pueden ser producidos por desechos industriales los cuales suelen ser utilizados como fuentes de carbono y estas fuentes se pueden encontrar en la industria de aceites, vegetales, biodiesel, láctea y la industria azucarera, donde en esta última durante el proceso de extracción de 100 toneladas de caña azúcar se generan alrededor de 4 toneladas de melaza y 10 toneladas de sacarosa (Raza *et al.*,2018). Aunque la melaza es un gran problema para la industria azucarera, se ha estudiado que tanto la melaza como la sacarosa son utilizados como fuentes de carbono principal para la producción de PHAs (Saratele *et al.*,2021), además otra de las ventajas es que estos desechos son de bajo costo y hacen que los precios de producción de los PHAs disminuyan (Wen *et al.*, 2020).

Industria azucarera en México

La agroindustria de la caña de azúcar muestra gran potencial para el desarrollo económico e industrial en muchas naciones que son productoras de caña de azúcar. No obstante, este desarrollo solo puede lograrse si hay un enfoque multidisciplinario, que incluye fines económicos, medio ambientales, agronómicos, de ingeniería, financieros y estratégicos que integran cambiantes de forma integradora, cualitativa y cuantitativa (Pippo y Luengo, 2013; Aguilar-Rivera, 2017). Durante la zafra 2019/2020 en México, los ingenios azucareros del país tuvieron una molienda de 49,274,468 toneladas de caña de azúcar con una producción de 5,278,320 toneladas de azúcar (CONADESUCA, 2019).

Las propiedades de los residuos agroindustriales y la biomasa generada a lo largo de la producción de sacarosa tienen la posibilidad de convertirse en productos de valor agregado por medio de la aplicación idónea de tácticas químicas y biotecnológicas (Solomon, 2011; Iqbal, Kyazze y Keshavarz, 2013). Dichos derivados de la agroindustria azucarera se parten en dos categorías, los subproductos tales como residuos de cosecha, bagazo, meladura y cachaza y los coproductos: melazas y sacarosa, los cuales son puntual para la diversificación (figura 1) como materia prima para las industrias de alimentos, farmacéutica, papelera y de productos químicos (Aguilar *et al.*,2017).

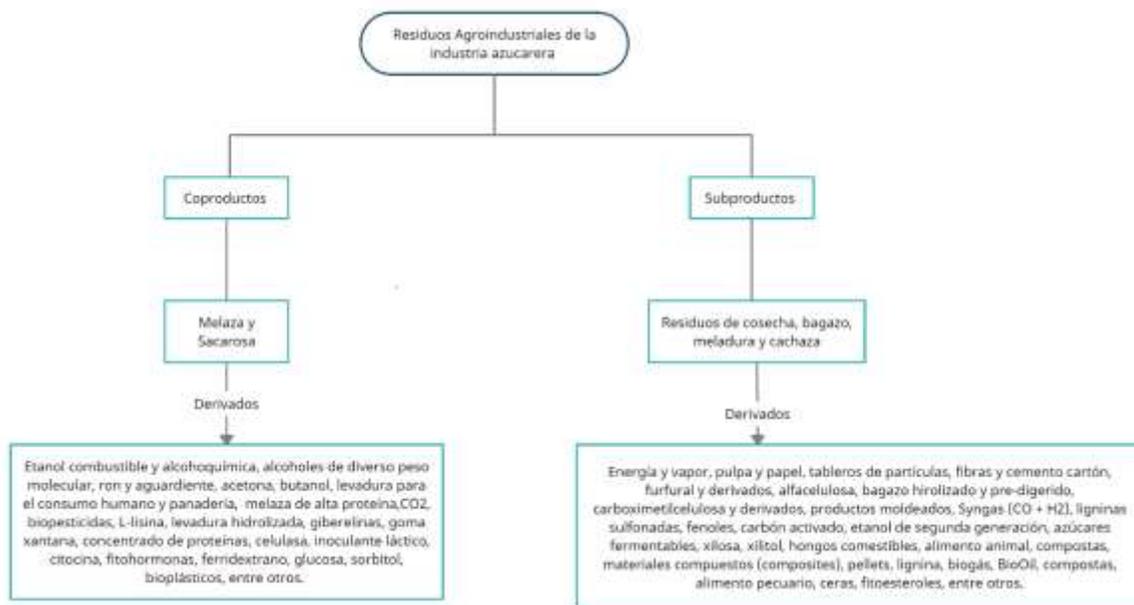


Figura 1 Derivados de la agroindustria azucarera y su producción comercial (Figura elaborada en CmapTools®).

En México, la industria azucarera tiene un gran potencial de producción gracias a su aporte económico y nutricional, sin embargo, en los últimos años ha habido serios inconvenientes operativos y de productividad (Anaya-Reza y López-Arenas, 2017).

Bioplásticos

Los bioplásticos pertenecen a la familia de los polímeros cuyo carbono principalmente procede de recursos biológicos como la biomasa (Narayan, 2011). No obstante, los bioplásticos biodegradables tienen la posibilidad de ser de base biológica o fósiles. Por consiguiente, el concepto “bio” previo a “plástico” tiene relación con su fuente de carbono o su biodegradabilidad. Curiosamente los bioplásticos de base biológica tienen la posibilidad de no ser biodegradables (de Vargas Mores *et al.*,2018), así mismo en la actualidad, casi la mitad de los bioplásticos a base biológica accesibles no son biodegradables (Rahman y Bhoi, 2021).

Bioplásticos a base de almidón

El primer bioplástico se había inventado con plásticos sustituidos con almidón de maíz y se vendió con nombres como EverCorn™ y NatureWorks, dichos plásticos se fabricaron por medio de la mezcla de polímero plástico petroquímico con compuestos poliméricos de almidón biodegradable, así mismo en la actualidad, el polímero a base de almidón se puede elaborar desde papa, maíz, trigo, y tapioca (Manjunath y Sailaja, 2016). A lo largo de la supresión de dichos bioplásticos, las moléculas de almidón que se encuentran en el polímero van a ser degradadas por los microorganismos y, por consiguiente, el polímero plástico se desintegrará, no obstante, las propiedades físicas y químicas de dichos bioplásticos sustituidos con almidón no son adecuados para un uso práctico. Además, la acumulación de residuos plásticos no degradables en el suelo y agua pueden provocar contaminación ambiental, por consiguiente, esta clase de bioplásticos fabricados de

manera directa desde el almidón, perjudicará el equilibrio de los productos a lo largo de la exposición a la humedad (Liu *et al.*,2009; Peelman *et al.*,2013).

Bioplásticos a base de ácido poliláctico

El ácido poliláctico (PLA) pertenece a los polímeros más capaces para suplir ciertos de los termoplásticos sintéticos convencionales accesibles en el mercado de los polímeros, esto gracias a su bajo precio y elevado módulo de flexión y resistencia (Zhang *et al.*, 2012). El PLA se sintetiza usualmente desde α -hidroxiácidos (de recursos naturales como caña de azúcar, maíz, batata, etcétera), usando algunas rutas de polimerización tales como polimerización por apertura de anillo o por condensación directa y se considera como un producto biodegradable, polímero biobasado compostable que forma parte de la familia del poliéster alifático (Cisneros-Lopez *et al.*,2020).

Polihidroxicanoatos

Los PHAs son biopolímeros, que pueden sintetizados por microorganismos como inclusiones lipídicas para el almacenamiento de energía en formas granulares dentro de la estructura celular (Poli *et al.*, 2011). Los PHAs son completamente biodegradables y poseen similitudes a los plásticos derivados del petróleo, además, los PHAs son amigables con el ambiente y tienen un gran potencial por las principales aplicaciones que se les puede dar, las cuales van desde artículos desechables, envases para alimentos, usos agrícolas, de construcción, farmacéuticas y biomédicas (Mannina *et al.*, 2019). Los PHAs pueden ser producidos por diferentes fuentes de carbono como son sacarosa, glucosa, ácido cítrico, fructosa entre otros (tabla 1) (Reddy *et al.*, 2003; Jiang *et al.*,2016). En 1925

el científico francés Lemoigne descubrió por primera vez en *Bacillus megaterium* un PHA en forma de poli(3-hidroxiбутirato) (P(3HB)) (Chee *et al.*,2010). Los PHAs son biopolímeros de ácidos 3-, 4-, 5- y 6- hidroxialcanoicos que son termoplásticos, además, han sido identificados más de 90 géneros de bacterias Gram positivas y negativas como productoras de PHAs tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Raza *et al.*, 2018). Algunos microorganismos pueden almacenar inclusiones orgánicas e inorgánicas intracelulares que están rodeadas por fosfolípidos, además en el caso de los PHAs, el núcleo del poliéster está rodeado por fosfolípidos o proteínas (Poli *et al.*, 2011). Las bacterias son capaces de almacenar PHAs dentro del citoplasma donde se presentan como gránulos que varían desde 0.2 a 05 µm de tamaño y están rodeadas por una membrana de 2 nm compuesta por aproximadamente 2% de proteína y 0.5% de lípidos (Raza *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2019).

Tabla 1. Microorganismos que producen PHAs y sus fuentes de carbono

Microorganismos	Fuentes
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Gluconato, propionato, octanoato
<i>Bacillus megaterium</i>	Glucosa
<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	Fructosa, metanol, lactosa
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Sacarosa
<i>Alcaligenes latus</i>	Sacarosa, almidón
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>	Sacarosa, lactosa
<i>Ralstonia eutropha</i>	Sacarosa, lignocelulosa

Propiedades de los PHAs

Los PHAs son comparables al polipropileno y muestra una resistencia a la humedad y adquiere excelentes propiedades de a la barrera de gases. Los PHAs tienen la capacidad de ser insolubles en agua, así mismo tienen una gran firmeza al ataque hidrolítico, también son resistentes a los rayos UV y son capaces de hundirse en el agua lo que facilita su degradación, también los PHAs son solubles en cloroformo y otros disolventes clorados. Su temperatura de transición vítrea va desde -50 °C a 4 °C, la temperatura de fusión va de 40 °C a 180 °C. la temperatura de termodegradación, la resistencia a la tracción, el modelo de Young, el vapor de agua y la tasa de transmisión de oxígeno varían según el tipo de polímero producido y la composición de la unidad monomérica (Raza *et al.*,2018)

Rutas metabólicas para la producción de PHAs

Diferentes vías metabólicas están involucradas en la generación de los tipos de monómeros base integrados en los PHAs., La vía metabólica para producir P(3HB) a partir de azúcares, implica tres enzimas: β -cetotiolasa (PhaA), Acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH (PhaB) y PHA synthase (PhaC). En esta vía, dos moléculas de la fuente de carbono se transforman en acetyl-coenzima A (CoA) mediante la tiolasa, PhaA, al mismo tiempo el precursor para producir PHA, (R)-3-hidroxi-butiril-CoA se transforma por la PhaB, lo que conduce a la polimerización de P(3HB) por la PhaC (Alcántara *et al.*, 2020 y Sudesh *et al.*, 2000).

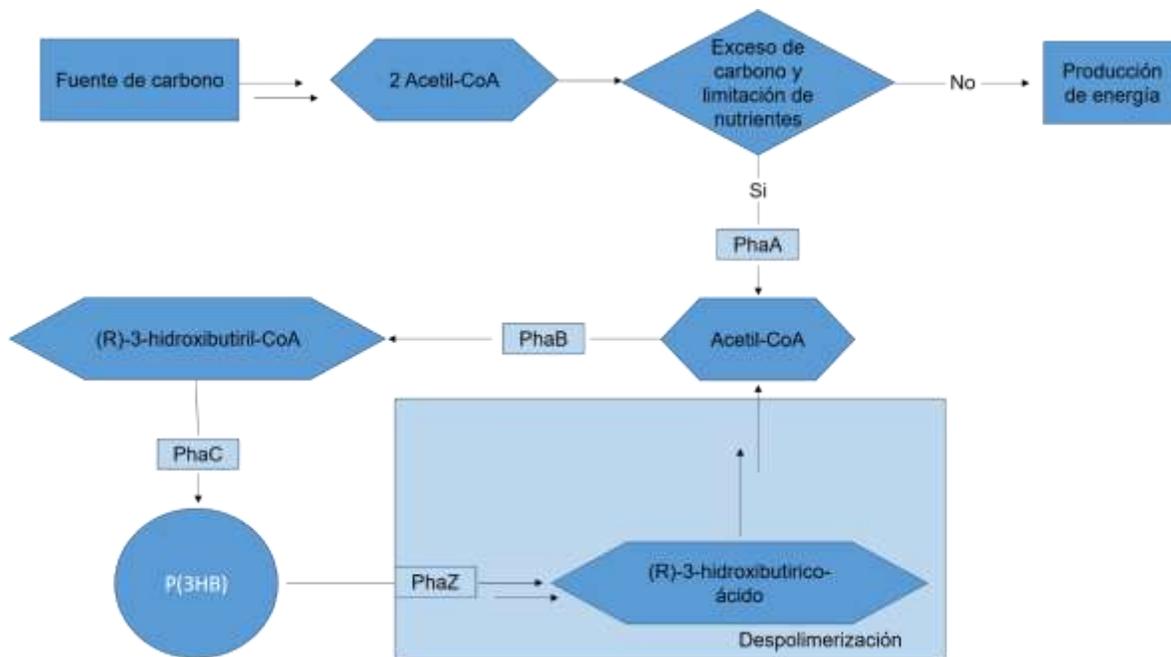


Figura 2. Ruta metabólica para la producción de PHAs (Figura elaborada en Microsoft® PowerPoint).

Estructura química de los PHAs

Los PHAs son principalmente poliésteres lineales que contienen monómeros de ácidos grasos 3-hidroxi, donde un enlace éster se forma por la reacción entre los grupos carboxilo e hidroxilo (figura 3) (Leja y Lewandowicz, 2010). Por lo tanto, la mayoría de los PHAs producidos por varios microorganismos son de configuración rectus (R) (Kabe *et al.*, 2012). El representante más común de los polihidroxicanoatos es el polihidroxiacetato (PHA) y está presente principalmente en la configuración R, sin embargo, los PHAs podrían sintetizarse sintetizando un copolímero con algunos estereopolímeros (Raza *et al.*, 2018). La figura 3, muestra la estructura química de los PHAs, donde R representa un grupo alquilo que puede variar del grupo metilo (C1) al tridecilo (C13), derivado de esto existe una gran

variación dentro de la cadena lateral del alquilo, siendo estos monómeros aromáticos, halogenados, epoxidados u otros monómeros ramificados, también existen variaciones de tamaño y la composición de los suplentes de la cadena lateral los cuales son los responsables de la modificación química de los PHAs y de su grande diversificación en las aplicaciones de estos (Raza *et al.*, 2018) .

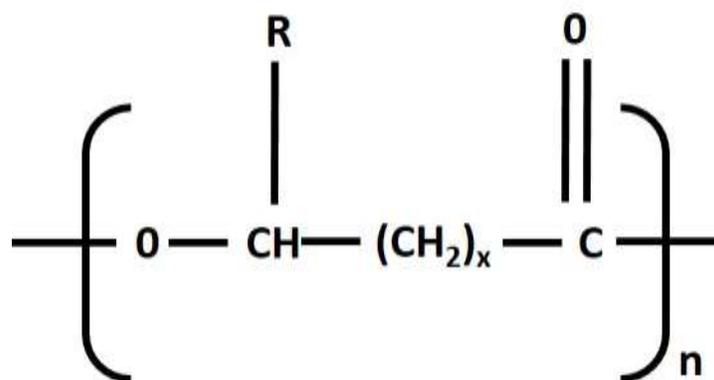


Figura 3. Estructura química de los PHAs (Figura elaborada en Microsoft® PowerPoint).

Clasificación de los PHAs

Los PHAs se agrupan en tres grupos según la longitud de la cadena de átomos de carbono: cadena corta, consistente de tres a cinco átomos de carbono; cadena media, que consiste de seis a 14 átomos de carbono (Kourmentza *et al.*, 2017) y cadena larga, con más de 14 átomos de carbono (Raza *et al.*, 2018). Esto depende de la configuración monomérica del polímero (Kourmentza *et al.*, 2017).

PHAs de cadena corta

El polihidroxicanoato se conoce como polímero cristalino y quebradizo, pero las mezclas de PHAs tienen baja cristalinidad y mayor flexibilidad y se clasifican como

PHAs de cadena corta (Raza *et al.*, 2018). Los PHAs de cadena corta pueden estar formados por una cadena que va de los 3 a 5 átomos de carbono e incluyen a poli (3-hidroxi butirato) P(3HB), poli (4-Hidroxi butirato) P(4HB), poli (3-Hidroxi valerato) P(3HV) y el heteropolímero que incluye poli (3-hidroxi butirato-copolímero-3-hidroxi valerato) P(3HB-co-3HV) (Kumar *et al.*, 2020).

PHAs de cadena media

Los polímeros de cadena media son poliésteres que tienen un alto grado de biocompatibilidad y biodegradabilidad y se obtienen a partir de recursos renovables, además son menos frágiles y cristalinos que los de cadena corta (Kim *et al.*, 2007; Raza *et al.*, 2018). Estos polímeros constan de seis a 14 átomos de carbono e incluyen homopolímeros tales como poli (3-hidroxi hexanoato) P(3HHx) y poli (3-hidroxi octanoato) P (3HO) y un heteropolímero como poli (3-hidroxi hexanoato-copolímero-3-hidroxi octanoato) P(3HHx-co-3HO) (Basnett *et al.*, 2017; Kavitha *et al.*, 2018).

PHAs de cadena larga

Los polímeros que en su cadena cuentan con más de 14 átomos de carbono se les denomina polímeros de cadena larga, derivado de esto son poco comunes y están menos estudiados (Raza *et al.*, 2018).

Exopolisacáridos

Los EPS son polímeros de alto peso molecular secretados por los microorganismos en el ambiente circundante, usualmente los EPS están formados por monosacáridos y constituyentes como piruvato, acetato, fosfato, entre otros. Dichos

EPS se dividen en homo y heteropolisacáridos y son producidos por diversas bacterias, hongos, levaduras y microalgas (Freitas *et al.*, 2017; Hussain *et al.*, 2017).

Lévano

El Lévano es un tipo de fructano con un residuo de glucosa en el extremo reductor y puede ser producido a partir de sacarosa por una variedad de bacterias a través de la acción de la enzima levansacarasa. A diferencia de la inulina, en la que los residuos fructosilo están conectados a través de enlaces beta (2,1) glicosídicos, la cadena de fructosilo del lévano está formada por enlaces beta (2,6) glicosídicos, y algunos lévanos derivados de microorganismos pueden poseer estructuras ramificadas, así mismo el lévano tiene muchas aplicaciones potenciales en los campos de alimentos, farmacéutica y productos para el cuidado personal debido a la variedad de funciones fisiológicas y características fisicoquímicas del lévano (Gojgic *et al.*, 2019; Ni *et al.*, 2018).

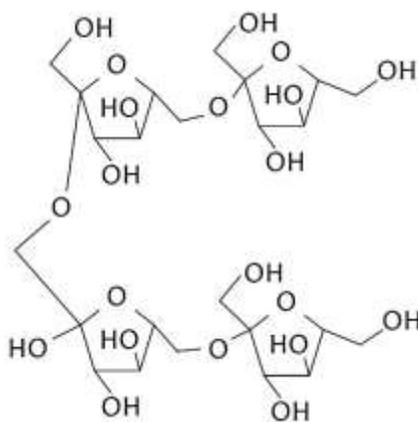


Figura 4. Estructura química del lévano (Figura elaborada en Microsoft® PowerPoint).

Inulina

La inulina (Figura 5) está compuesta por residuos de fructosa conectados por enlaces beta (2,1) glicosídicos con muchas propiedades fisicoquímicas y fisiológicas prometedoras, así mismo la inulina puede ser producida por plantas pero también por microorganismos mediante la inulosacarasa la cual es un tipo de fructosiltransferasa que cataliza la transferencia de un residuo de fructosa de la sacarosa para formar una cadena de polisacárido conectada por beta (2,1) enlaces fructosilos, que dan como resultado la síntesis de polímeros de inulina de alto peso molecular (Ni *et al.*,2019).

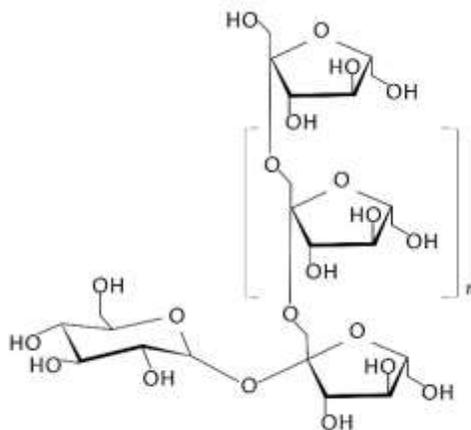


Figura 5. Estructura química de inulina (Figura elaborada en Microsoft® PowerPoint).

II. Justificación

La creciente preocupación sobre el rápido agotamiento de los recursos fósiles, así como los impactos ambientales adversos de los plásticos convencionales a base de petróleo, es lo que impulsa a producir PHAs los cuales son amigables con el medio ambiente, ya que debido a que los plásticos se han convertido en un producto

imprescindible en la vida actual se deben buscar alternativas para poder disminuir el uso de estos plásticos (Groh *et al.*,2019).

Por lo tanto, una de las alternativas para reducir el uso de los plásticos a base de petróleo son los bioplásticos en específico los PHAs ya que estos bioplásticos tienen propiedades físicas y mecánicas similares a la de los plásticos convencionales en específico a polipropileno, sin embargo, el éxito de los PHAs se ve obstaculizado por los altos costos de producción a lo cual para que la producción de estos sea rentable se busca realizar coproducción con los EPS, así como también con fuentes de carbono que provengan de desechos agroindustriales (Li *et al.*,2017 y Yadai *et al.*,2021).

III. Hipótesis

Es posible producir PHAs a partir de cepas bacterianas aisladas del proceso de obtención de azúcar.

IV. Objetivos

General

- Aislar y seleccionar cepas bacterianas del proceso de obtención de azúcar para la producción de PHAs

Específicos

- Aislar cepas bacterianas del proceso de obtención de azúcar
- Determinar cualitativamente la capacidad para la producción de PHAs de las cepas bacterianas aisladas

- Caracterizar bioquímica y morfológicamente las cepas bacterianas con capacidad de producción de PHAs.
- Producir PHAs por cultivo en medio líquido

V. Materiales y métodos

Aislamiento y purificación de cepas bacterianas del proceso de obtención de azúcar

Para el aislamiento de las cepas bacterianas se obtuvieron muestras de diferentes puntos del proceso de obtención de azúcar en dos ingenios de la zona centro del estado de Veracruz. Los puntos muestreados fueron: jugo desmenuzado, mezclado, alcalizado, filtrado, jugo clarificado, meladura, miel A, miel final, temple de A y azúcar. Las muestras fueron almacenadas en frío y trasladadas en esa condición al Laboratorio de Biotecnología Microbiana Aplicada del Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Para el aislamiento de las cepas, las muestras fueron sembradas por diluciones seriadas (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7}) en placas de agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), DIFCO™ que estaba compuesto por (g/L): peptona proteosa No.3 (10), extracto de carne (10), extracto de levadura (5), dextrosa (20), polisorbato 80 (1), citrato de amonio (2), acetato de sodio (5), sulfato de magnesio (0.1), sulfato de manganeso (0.05), fosfato dibásico de potasio (2) y agar (15), e incubadas a 37 °C durante 48 horas (Abid *et al.*, 2017). El procedimiento fue repetido hasta que se tuvo certeza de la pureza mediante tinción de Gram (Abid *et al.*, 2017). Las cepas fueron

conservadas en glicerol al 30% y 50% (v/v) y almacenadas a 4 y -20 °C, respectivamente (Liu *et al.*, 2003; Chauhan *et al.*, 2007).

Identificación de coliformes, salmonella y shigella

Las cepas se sometieron a pruebas para identificar si pertenecían al grupo de las enterobacterias, ya sea coliformes o Salmonella y Shigella. Para la identificación de coliformes, las cepas se sembraron por estría en placas de agar de eosina y azul de metileno (BD Bioxon®) que contenía en (g/L): peptona de gelatina (10), lactosa (10), sacarosa (5), Fosfato dibásico de potasio (2), eosina Y (0.4), azul de metileno (0.065) y agar (13.5) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Un resultado positivo para la identificación de *Escherichia coli* perteneciente a la familia de los coliformes es la aparición de un verde metálico por toda la estría (Levine, 1918; Leininger *et al.*, 2001 y Subedi *et al.*, 2018). Así mismo, para identificar si las cepas pertenecían a alguna Salmonella o Shigella se sembraron por estría en placa de agar para Salmonella y Shigella que contenía en (g/L): Extracto de carne (5), mezcla de peptonas (5), lactosa (10), sales biliares (8.5), citrato de sodio (8.5), tiosulfato de sodio (8.5), citrato férrico (1.5), verde brillante (0.00033), rojo neutro (0.025) y agar (13.5) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Un resultado positivo para la identificación de salmonella o shigella son colonias incoloras o amarillas, lisas y con un centro negro (Mahmoudi *et al.*, 2017; Awol *et al.*, 2019 y Tosisa *et al.*, 2020).

Caracterización morfológica y bioquímica de cepas bacterianas

Para la caracterización bioquímica y morfológica, las cepas conservadas fueron sembradas en placas con agar MRS y mantenidas a 37 °C durante 48 horas para

su reactivación. La caracterización morfológica se realizó mediante observaciones de colonia en placa Petri que incluyen forma, color, bordes y elevación (Isamil *et al.*, 2018). Por otro lado, para caracterización la bioquímica se realizaron las siguientes pruebas: catalasa, rojo de metilo, Vogues Proskauer, citratos, oxidasa y movilidad. La prueba de catalasa se realizó poniendo una gota de peróxido de hidrogeno al 3% con un frotis bacteriano en un portaobjetos, la prueba positiva indica la formación de burbujas después de 10 segundos de reacción. Las pruebas de rojo de metilo y Vogues Proskauer se realizaron inoculando la cepa bacteriana en tubos de ensaye con medio Clark Lubs compuesto por (g/L): triptona (7.2), fosfato dibásico de potasio (5) y glucosa (5) y se mantuvieron a 37 °C durante 48 horas. Después del crecimiento bacteriano, para la prueba de rojo de metilo se agregaron de tres a cinco gotas de rojo de metilo y para la prueba de Vogues Proskauer se agregaron de tres a cinco gotas de alfa naftol al 5% y de tres a cinco gotas de hidróxido de potasio al 40%, la prueba positiva en ambos casos está indicada por el desarrollo de color rojo. Por otra parte, se llevó a cabo la prueba de Citrato de Simmons donde se inocularon las cepas bacterianas en Agar Citrato de Simmons (BD Bioxon®) en tubos de ensaye y se mantuvieron a 37 °C durante 24 horas, la prueba es positiva cuando el tubo tiene un cambio de color de verde a azul. Adicionalmente se realizó la prueba de oxidasa se realizó poniendo una azada de cultivo bacteriano en tiras reactivas (Bactident®), la prueba positiva lo indica un color azul-morado en la parte de la tira reactiva después de 10 segundos de reposo. Finalmente se realizó la prueba de movilidad donde se inoculo por punción la cepa bacteriana en tubos de ensaye con medio SIM compuesto por (g/L): peptona de caseína (20), peptona de carne (6.1), sulfato de hierro y amonio (0.2), tiosulfato de sodio (0.2) y agar (3.5) y

se mantuvieron a 37 °C durante 24 horas. Un resultado positivo es cuando la cepa bacteriana se mueve por todo el medio de cultivo y no solamente por la punción. (Al-Dhabaan 2019; Tsototetsi *et al.*,2020; Hug, 2020 y Chelvan *et al.*, 2014).

Determinación de la capacidad de producción de PHAs de cepas bacterianas

La capacidad de producción de PHAs por las cepas aisladas fue determinada por el método de tinción con Negro de Sudan y por el método de Azul de Nilo en placa (Arshad *et al.*, 2017; Chandani *et al.*, 2020; Kosmachevskaya *et al.*, 2020; Tyagi *et al.*, 2018). Para la tinción con Negro De Sudan, las cepas bacterianas aisladas fueron inoculadas en placas de agar nutritivo (BD Bioxon®) suplementados con 20 g/L de sacarosa (Fermont™) e incubadas a 37 °C durante 48 horas. Después del crecimiento en placa, se realizó un frotis y la biomasa fue teñida con una solución de negro de Sudan (HYCEL®) al 0.3% (Kosmachevskaya *et al.*, 2020) en etanol al 70% (AZ®), se dejaron reposar 30 minutos y fueron lavadas con xileno (Fermont™) por 20 segundos, posteriormente se contra tiñeron con una solución de safranina (HYCEL®). Finalmente, fueron observadas al microscopio (National DC5-163) (Chandani *et al.*,2020; Kosmachevskaya *et al.*,2020). Un resultado positivo se determina por la aparición de manchas oscuras dentro de la célula.

Para la determinación de la capacidad de producción de PHAs por las cepas bacterianas aisladas por el método de Azul de Nilo, las cepas aisladas fueron inoculadas en placas de agar nutritivo (BD Bioxon®) suplementadas con 8 g/L de sacarosa (Fermont™) y 0.5 mg/mL de azul de Nilo (SIGMA®) y se incubaron a 37 °C durante 72 horas, se considera un resultado positivo cuando la biomasa que

creció en las placas se torna de un color naranja fluorescente al irradiarse con luz ultravioleta (Arshad *et al.*, 2017; Tyagy *et al.*,2018).

Producción de PHAs por cultivo en medio líquido

Preparación de inóculo

Las cepas bacterianas fueron inoculadas en medio líquido utilizando como unidad experimental matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían (g/L): caldo nutritivo (BD Bioxon®) (23) y de glucosa (Meyer®) (20). El cultivo se incubó a 37 °C a 150 rpm durante 24 horas, la biomasa producida fue considerada como inóculo para la producción de PHAs (Gomaa, 2014).

Cultivo en medio líquido

La producción de PHAs se realizó utilizando matraces Erlenmeyer de 250 mL como unidad experimental, y medio cultivo compuesto por (g/L): caldo nutritivo (BD Bioxon®) (23), sacarosa (Difco™) (20), cloruro de amonio (Fermont™) (2), fosfato dibásico de potasio (Karal®) (1.5). La concentración de inóculo se ajustó a 2×10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) y el cultivo se mantuvo a 37 °C durante 72 horas a 150 rpm, realizando un muestreo periódico cada 12 horas (Ammar *et al.*,2021; Lee,2020; Samrot *et al.*,2011).

Estimación de la producción de PHAs

La estimación de PHAs se realizó por el método espectrofotométrico reportado por Porras *et al.* (2017) con la ayuda de una curva patrón de PHB (anexo A). Las muestras obtenidas de la fermentación fueron centrifugadas a 7500 x g y la biomasa recuperada fue lavada con agua destilada y posteriormente fue teñida con 400 µL de una solución de negro de Sudan (HYCEL®) al 30% en etanol (AZ®) al 70 %, la

mezcla fue mantenida a 35 °C por 20 minutos seguido de tres lavados con agua destilada y centrifugación a 7500 x g durante 15 minutos. la biomasa obtenida fue resuspendida en 1 mL de agua destilada y la absorbancia fue determinada a 660 nm con un espectrofotómetro UV visible Thermo Scientific™ GENESYS 10S.

Extracción de PHAs

La extracción de PHAs se llevó a cabo por digestión. La biomasa producida durante la fermentación fue separada del medio de cultivo por centrifugación a 7500 x g durante 15 minutos, el precipitado obtenido fue lavado con agua destilada y liofilizado en un equipo FreeZone 4.5 (LABCONCO). Para la digestión a la biomasa liofilizada se le adiciono una solución de hipoclorito de sodio al 13% (v/v) y pH de 12.3, la mezcla se mantuvo en reposo a temperatura ambiente por una hora y posteriormente se agregó un volumen de agua, la mezcla fue mantenida a temperatura ambiente por 8 horas. Los PHAs fueron recuperados por centrifugación a 4500 x g durante 15 minutos y lavados dos veces con agua destilada y una con isopropanol, después de ambos lavados los PHAs fueron recuperados por centrifugación a 4500 x g durante 15 minutos y liofilizados para su análisis por FTIR (Heinrich *et al.*, 2012).

Determinación de la producción de exopolisacáridos

Adicional a la producción de PHAs, se determinó la capacidad de producción EPS en el mismo sistema. Los EPS fueron extraídos del cultivo por centrifugación a 15,000 rpm durante 15 minutos. La recuperación de los EPS fue realizada añadiendo etanol gélido 96% (AZ®) en relación 2:1 (v/v) (sobrenadante/ etanol enfriado), y mantenido en refrigeración por una noche. La mezcla fue centrifugada

a 15,000 rpm por 15 minutos a 4° C, el precipitado fue lavado tres veces con acetona (Fermont™) fría y los EPS fueron recuperados por centrifugación a 15,000 rpm por 15 min. Los EPS obtenidos fueron liofilizados para su análisis por FTIR (Castilla *et al.*, 2020).

Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron mediante la técnica de Miller (1959) con ayuda de una curva patrón de glucosa (Anexo B). Para la determinación de azúcares reductores, en un tubo de ensaye se añadió 1 ml de muestra, después se agregó 1 ml de reactivo DNS que estaba compuesto por (g/L): hidróxido de sodio (MACRON) (16), tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (J.T. Baker) (300) y ácido 3,5-dinitrosalisílico (SIGMA-ALDRICH®), por último, se colocan los tubos en baño maría a 99 °C por 30 minutos seguido de un enfriamiento en baño de hielo durante 15 minutos, finalmente se agregaron 5 ml de agua destilada y se leyó la muestra en el espectrofotómetro UV visible Thermo Scientific™ GENESYS 10S a una longitud de onda de 575 nm.

Cuantificación de biomasa por peso seco

Para la cuantificación de la biomasa bacteriana fueron tomadas muestras periódicas del cultivo en medio líquido cada 12 horas por 3 días, las muestras fueron centrifugadas a 28,300 x g durante 30 minutos a 4 °C, el precipitado fue lavado con agua destilada para retirar restos del medio de cultivo y secado hasta peso constante a 80 °C en un horno (Scorpion Scientific) por 12 h (Arumugam *et al.*, 2018). La muestra seca fue pesada y considerada como la biomasa producida durante en cultivo.

Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

El análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) de los PHAs y EPS recuperados por el método de digestión de las cepas aisladas fue realizado utilizando un espectrofotómetro infrarrojo Bruker™ Vertex 70 (con una resolución de 3 cm^{-1}) en el modo de muestreo de reflexión total atenuada (ATR). Se utilizó un cristal de diamante con un solo reflejo; los valores porcentuales de transmisión de este tipo de placas son superiores a 25. La región de medición estaba en el medio del espectro infrarrojo, de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$. Los resultados se compararon con estándares comerciales de PHAs: DL- β -Hydroxybutyric acid sodium salt (SIGMA®), Poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] (SIGMA®) y Poly (3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) (SIGMA®). Para el análisis de los espectros de EPS se utilizarán tres estándares comerciales: Inulina de Dahlia tubers (SIGMA®), Levano de Erwinia herbicola (SIGMA®) y Dextrano de Leuconostoc mesenteroides (SIGMA®). Para el análisis de espectros se utilizó el programa Origin™ 6.1 (OriginLab Corporation, EE.UU.) (Castilla *et al.*, 2020).

VI. Resultados y discusión

Aislamiento y purificación de cepas bacterianas del proceso de obtención de azúcar

Los resultados del aislamiento indicaron que se obtuvieron 11 cepas bacterianas del total de los puntos de muestreo. Los aislados obtenidos fueron identificados de acuerdo al punto de origen de donde se encontró, tal y como se muestra en la tabla 2. Dichos aislamientos bacterianos provienen del jugo mezclado, jugo alcalizado,

jugo filtrado, jugo clarificado, meladura, miel A y templa de A (cristalizador) especificar a qué te refieres con A, en otros lugares pueden desconocerlo. Dichas cepas se preservaron en glicerol al 30% en refrigeración donde se ha observado una supervivencia de 2 años con 8 meses, así como también se mantienen en glicerol al 50% en congelación donde se ha observado una supervivencia de 9 meses tal y como se muestra en la figura 6 (Liu *et al.*, 2003; Chauhan y Patel, 2007).

Tabla 2. Identificación de cepas bacterianas de acuerdo a su origen

Origen de la muestra	Ingenio 1	Ingenio 2	Codificación
Jugo desmenuzado	-	-	
Jugo mezclado	-	X	JM-1
Jugo alcalizado	-	X	JA-1
Jugo filtrado	-	X	JF-1
Jugo filtrado	X	-	JF-2
Jugo filtrado	X	-	JF-3
Jugo filtrado	X	-	JF-4
Jugo Clarificado	-	X	JC-1
Meladura	X	-	ML-1
Meladura	-	X	ML-2
Miel A	X	-	MA-1
Miel final	-	-	
Templa A	-	X	TA-1
Azúcar	-	-	

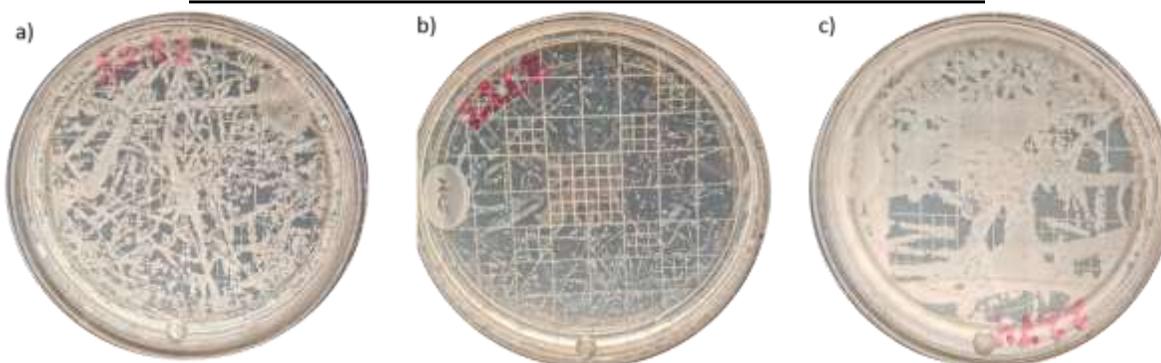


Figura 6. Preservados de los microorganismos ML2, JA1 y MA1 reactivados en agar MRS

Determinación de la capacidad de producción de PHAs de aislados

bacterianos

Los resultados de la determinación de la capacidad de producción de PHAs mediante tinción con negro de Sudán y azul de Nilo indicaron que, de las once cepas bacterianas aisladas, solo tres mostraron la capacidad para producir PHAs (Figura 7). El resultado de la tinción con negro de Sudán evidencio la presencia de gránulos oscuros dentro del citoplasma para las cepas JA1 y MA1, lo cual es un parámetro indicativo de la producción intracelular de los PHAs, dicho resultado concuerda con lo reportado por Tufail *et al.* (2017), Rathika *et al.* (2017), Ojha *et al.* (2018) y Ojha *et al.* (2020), quienes reportaron que la presencia de PHAs producidos en la célula se pueden observar cómo gránulos negros de tamaño aproximado al 80% del tamaño de la célula.

Por otro lado, el resultado de la determinación de la capacidad de producción de PHAs por la estrategia de Azul de Nilo en caja Petri mostró que la biomasa que se desarrolló por la cepa ML2 presentó una coloración naranja fluorescente al irradiarse con luz ultravioleta (UV), el resultado es consistente con lo reportado por Lee y Rahim (2020), Kitamura y Doi (1994), Reddy *et al.* (2008) y Bhuwal *et al.* (2013), donde indicaron que los PHAs acumulados en las colonias emiten una fluorescencia naranja brillante al exponerse a luz UV.

Los resultados obtenidos en ambos métodos utilizados mostraron el fenotipo (potencial) para la producción de PHAs por las cepas JA1, MA1 y ML2, por lo cual fueron seleccionadas para la producción de PHAs por cultivo en medio líquido.

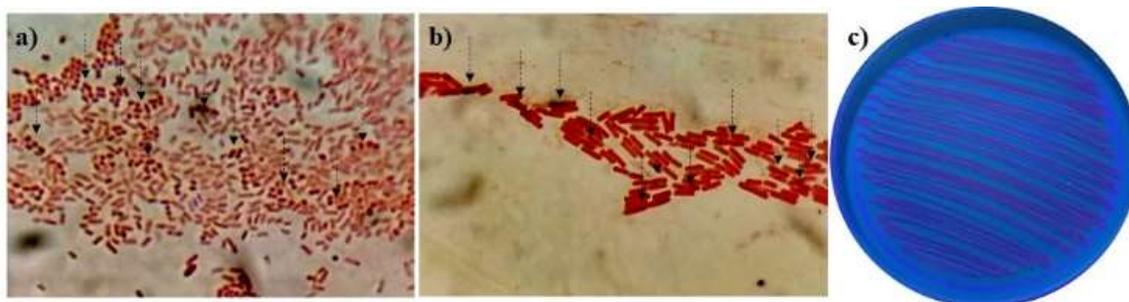


Figura 7. Métodos de determinación del potencial para la producción de PHAs por las cepas bacterianas aisladas. a) Tinción con negro de Sudan cepa JA1, b) Tinción con Negro de Sudan cepa MA1, c) Crecimiento en caja Petri con azul de Nilo, cepa ML2.

Caracterización morfológica y bioquímica de cepas bacterianas aisladas del proceso de obtención de azúcar

Las tres cepas que mostraron un resultado positivo para la producción de PHAs fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas y morfológicas. Los resultados de la observación morfológica y pruebas bioquímicas de la cepa JA1 (Tabla 3) complementado con la tinción de Gram (-), es similar morfológicamente a *Burkholderia sp*, ya que posee colonias blancas, con bordes regulares, forma circular y elevación convexa, dicho resultado concuerda con lo reportado por Chee *et al.* (2010), Lopes *et al.* (2014) y Yamada *et al.* (2018), además de que existen diversos reportes que demuestran que dicho microorganismo produce PHAs, por lo cual su sospecha de identidad es aún mayor. Asimismo, los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas para la cepa bacteriana MA1 (Tabla 3) complementados con la tinción de Gram (+) y la morfología, concuerdan con lo reportado por Pillai *et*

al. (2017), Park *et al.* (2017) y Mohammed *et al.* (2019), quienes reportaron una cepa de *Bacillus aryabhatai* con características similares a la cepa MA1, por lo cual se tiene sospecha de que su género es *Bacillus*. Por último, los resultados de la observación morfológica y pruebas bioquímicas (tabla 3) obtenidos para la cepa bacteriana ML2, complementados con la tinción de Gram (+) muestran similitud con lo reportado por Halami *et al.* (2008); Mizuno *et al.* (2010) y Mohammed *et al.* (2020).

Tabla 3. Resultados de pruebas bioquímicas

Pruebas bioquímicas	JA1	MA1	ML2
Catalasa	+	+	+
Rojo de metilo	+	+	-
Voges Proskauer	-	+	+
Citrato reductasa	+	+	+
Oxidasa reductasa	+	-	-
Gram	-	+	+
Movilidad	+	+	+
Forma	Circular	Circular	Circular
Color	Blanco	Blanco	Hueso
Margen	Regular	Entero	Lobulado
Elevación	Convexa	Elevada	Convexa

Los resultados de la caracterización bioquímica y morfológica muestran que las tres cepas bacterianas aisladas muestran características de los géneros Bacilos (2) y

Burkholderia (1), sin embargo, para tener certeza de la identidad será necesario caracterizarlas por biología molecular para tener certeza de su identidad. Finalmente, a las tres cepas se les realizaron pruebas diferenciales donde las tres cepas dieron resultados negativos para coliformes y salmonella y shigella.

Producción de PHAs en medio líquido

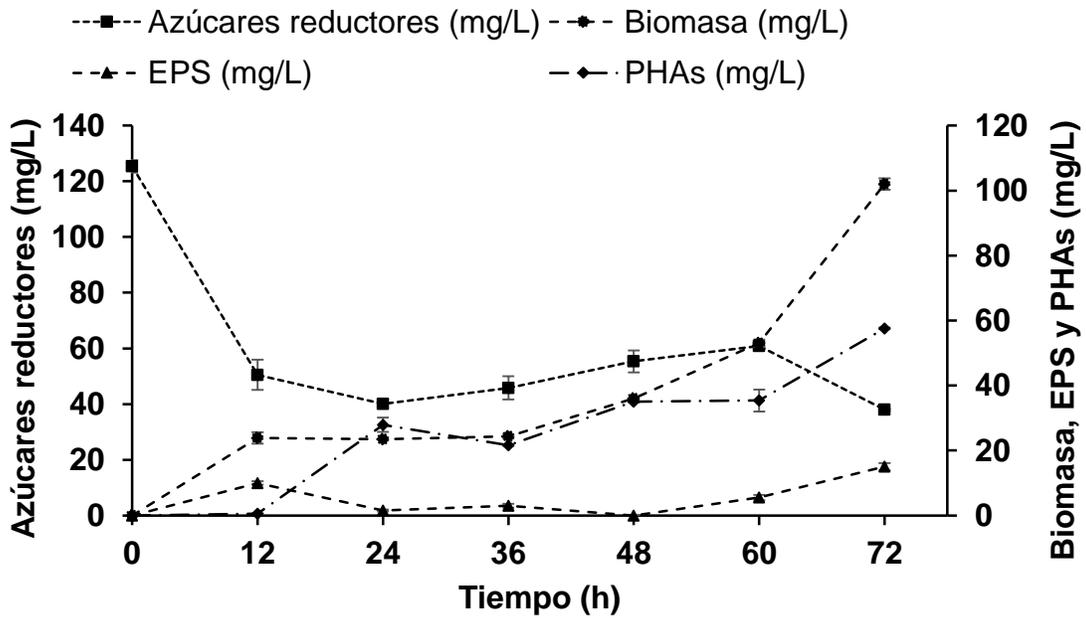
Las cepas que mostraron la capacidad de producir PHAs en las pruebas cualitativas fueron sometidas a un proceso de cultivo en medio líquido para determinar el potencial cuantitativo. Los resultados de la cinética de producción de PHAs (Figura 8) para la cepa JA1 muestra que existe una relación directa entre el crecimiento (biomasa) con la producción de EPS y PHAs. Asimismo, se observó que después de las 12 horas el contenido de azúcares reductores equivalentes a glucosa disminuyeron probablemente debido a que la bacteria la incorpora a su metabolismo para crecer y producir PHAs y EPS. Después De 72 horas de cultivo la cepa exhibió una producción de biomasa de 102 mg/L, 15 mg/L de EPS y 57.60 mg/L de PHAs. Por otro lado, los resultados de la cinética de producción de PHAs (Figura 9) para la cepa MA1 muestra que existe una relación directa entre el crecimiento (biomasa) con la producción de EPS y PHAs, asimismo, se observa que después de las 12 horas el contenido de azúcares reductores equivalentes a glucosa disminuyen de manera constante hasta las 72 horas, probablemente debido a que bacteria la incorpora a su metabolismo para crecer y producir PHAs y EPS. Después De 72 horas de cultivo la cepa exhibió una producción de biomasa de 173.5 mg/L, 16.5 mg/L de EPS y 44.10 mg/L de PHAs. De la misma manera, los resultados de la cinética de producción de PHAs (Figura 10) para la cepa ML2 muestra que existe

una relación directa entre el crecimiento (biomasa) con la producción de EPS y PHAs, de igual forma, se observa que después de las 36 horas el contenido de azúcares reductores equivalentes a glucosa tienden a aumentar de manera constante hasta las 72 horas probablemente debido a que la bacteria crece muy poco, indicando que el destino de los azucares reductores es mayoritariamente para la producción de biomasa. Después de 72 horas de cultivo la cepa exhibió una producción de biomasa de 235 mg/L, 86 mg/L de EPS y 148.42 mg/L de PHAs.

Los resultados indicaron que la cepa que presentó una mayor producción de PHAs fue la cepa MA1 (presunto *Bacillus*), de igual manera, la cepa que presentó una mayor producción de EPS fue la cepa ML2 (presunto *Bacillus*).

En este trabajo las cepas JA1, MA1 Y ML2 mostraron la capacidad de producir 15, 16.5 y 86 mg/L de EPS respectivamente y 57.60, 44.10 y 148.42 mg/L de PHAs respectivamente, utilizando sacarosa como fuente de carbono; este resultado es inferior a la concentración máxima de EPS (219.8 mg/L) y PHAs (870 mg/L) reportada por Soto *et al.* (2021), así mismo también es inferior a lo reportado por Clifton *et al.* (2020) donde ellos obtuvieron 250 mg/L de PHAs utilizando sacarosa como fuente de carbono. Sin embargo en contraste con lo reportado por de Jesus Assis *et al.* (2016) donde utilizaron sacarosa como fuente de carbono y obtuvieron 470, 60 y 570 mg/L de EPS donde este resultado es inferior a lo mencionado en esta investigación pero en la concentración máxima de PHAs (120, 140 y 90 mg/L), los resultados obtenidos en esta investigación son mayores siendo la cepa MA1 la cepa que produjo la mayor concentración de PHAs con 206.80 mg/L. Cabe mencionar que este medio es un medio que fue diseñado para la producción de

PHAs. Tanto los PHAs como los EPS fueron liofilizados para su posterior análisis por espectroscopia infrarroja.



.Figura 8. Cinética de producción de PHAs, EPS, biomasa y comportamiento de azúcares reductores por la cepa JA1 en cultivo en medio líquido.

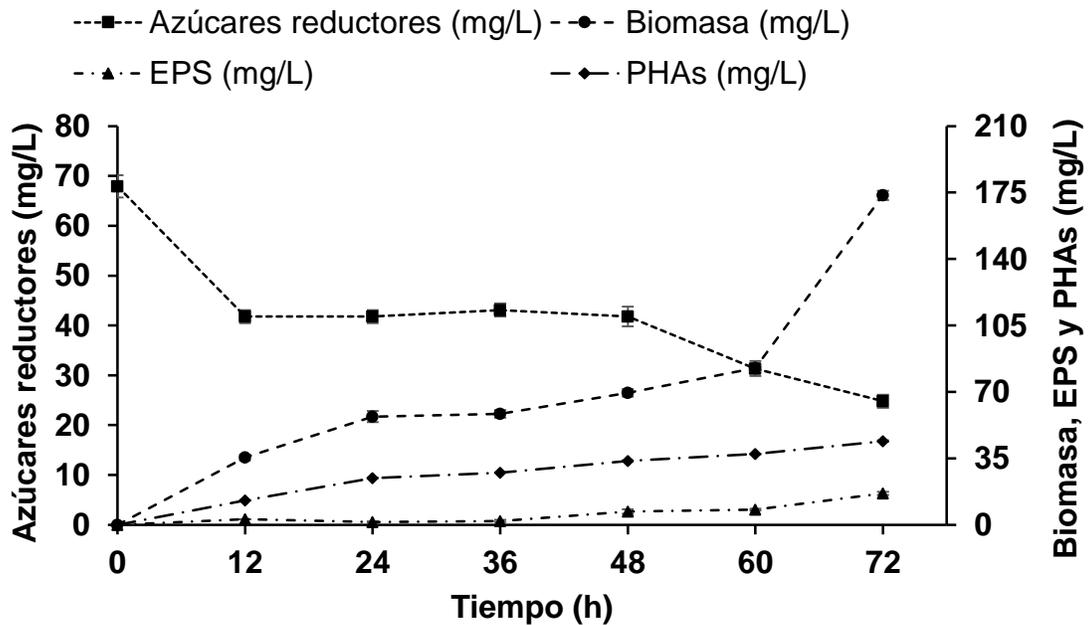


Figura 9. Cinética de producción de PHAs, EPS, biomasa y comportamiento de azúcares reductores por la cepa MA1 en cultivo en medio líquido.

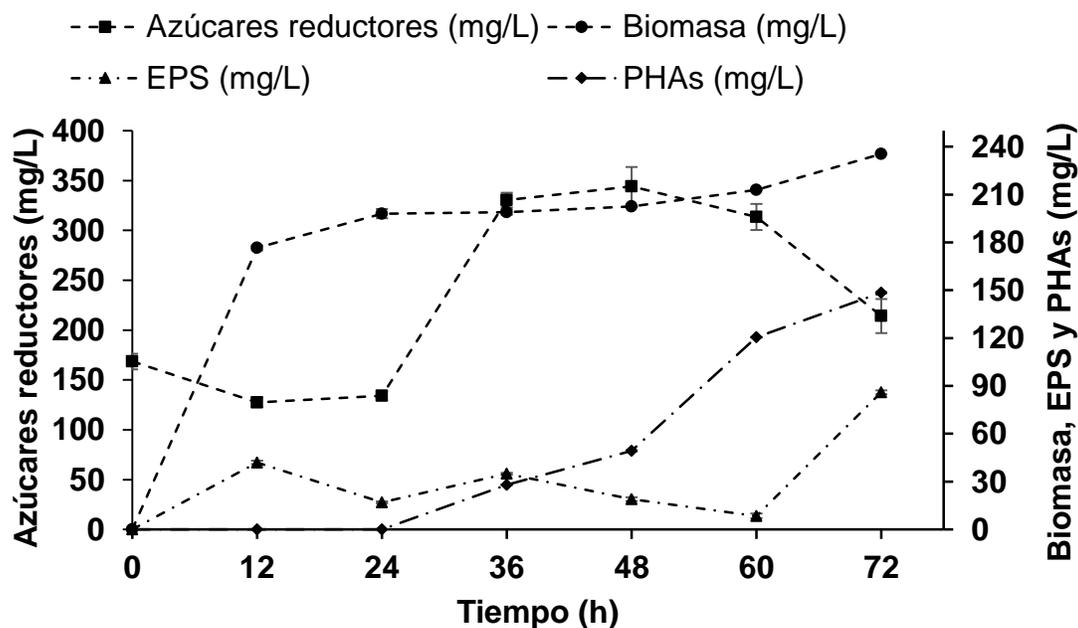


Figura 10. Cinética de producción de PHAs, EPS, biomasa y comportamiento de azúcares reductores por la cepa ML2 en cultivo en medio líquido.

Tabla 4. Rendimientos de producción de PHAs y EPS por microorganismo

Cepa	Biomasa (mg/L)	EPS (mg/L)	PHAs (mg/L)
JA1	102	15	57.60
MA1	173.5	16.5	44.1
ML2	235.5	86	148.42

Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los PHAs recuperados por el método de digestión fueron usados para el análisis de FT-IR. Los espectros FT-IR obtenidos mostraron que las tres cepas bacterianas (JA1, MA1 y ML2) tienen la capacidad para sintetizar PHB como se puede ver en la

figura 11. Se observaron bandas de absorción asociadas principalmente a los grupos funcionales (-CH) 2931 cm^{-1} , (-C=O) 1732 cm^{-1} , (CH_3) 1379 cm^{-1} , (-CH₂ y CH₃) 1456 cm^{-1} y (-C-O) 1055 cm^{-1} para las tres cepas bacterianas, las cuales coinciden con los resultados del estándar de PHB. Estos resultados corroboraron la capacidad que tienen las tres cepas para producir PHB, lo cual concuerda con lo reportado por Porras *et al.*, 2017; Herrera *et al.*, 2018; Martínez *et al.*, 2020 y Silambarasan *et al.*, 2021.

Por otro lado, el análisis de los EPS producidos por las tres cepas bacterianas mostro que las cepas bacterianas MA1 y ML2 tienen la capacidad para sintetizar lévano como se puede ver en la figura 12. Las bandas de absorción características del espectro mostraron grupos funcionales (-OH) 3394 cm^{-1} , (-CH) 2932 cm^{-1} , (C-O) 1647 cm^{-1} , (C-H) 1424 cm^{-1} y (C-OH) 1053 cm^{-1} fueron observados para las dos cepas antes mencionadas que coinciden con los resultados del estándar de lévano. Estos resultados corroboraron la capacidad que tienen las cepas MA1 y ML2 para producir lévano y los cuales concuerdan con los resultados reportados por Moussa *et al.*, 2017 y Gamal *et al.*, 2020

Así mismo, la cepa JA1 mostró bandas de absorción características del espectro de inulina tal y como se muestra en la figura 13. Las bandas características fueron observadas en 3370 cm^{-1} , 2923 cm^{-1} , 2115 cm^{-1} , 1614 cm^{-1} , 1140 cm^{-1} , 1091 cm^{-1} y 935 cm^{-1} los cuales fueron muy similares al estándar comercial de inulina. Las bandas de espectro características de la cepa JA1 mostraron grupos funcionales (-OH) 3380 cm^{-1} , (-CH) 2933 cm^{-1} y (C-O) 1652 cm^{-1} correspondientes a grupos

funcionales de C-C, estiramiento de C-O y C-OH, formas de distorsión de C-O-C de numerosos oligo y polisacáridos (Chikkerur *et al.*,2019).

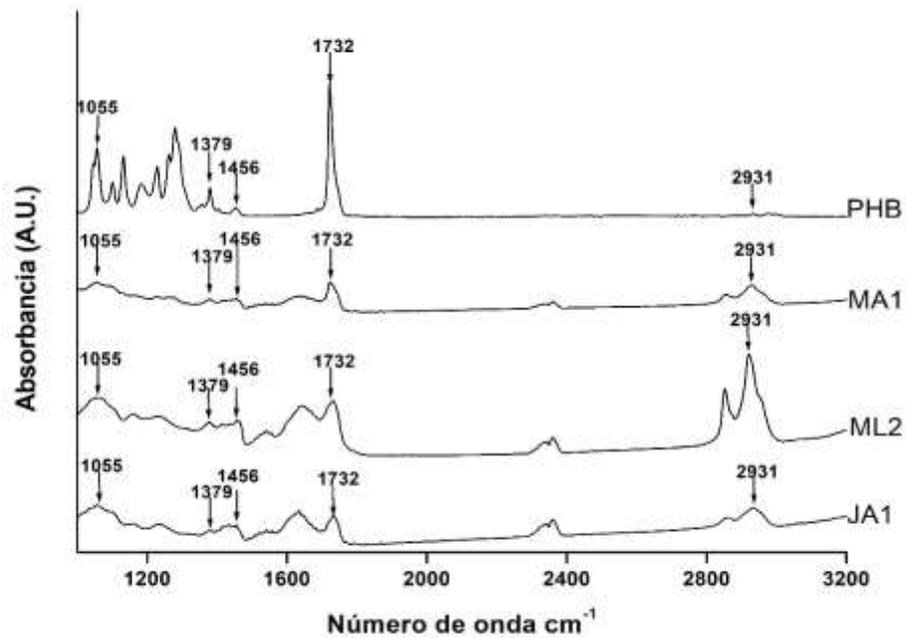


Figura 11. Espectros FT-IR de PHB y las cepas JA1, MA1 y ML2.

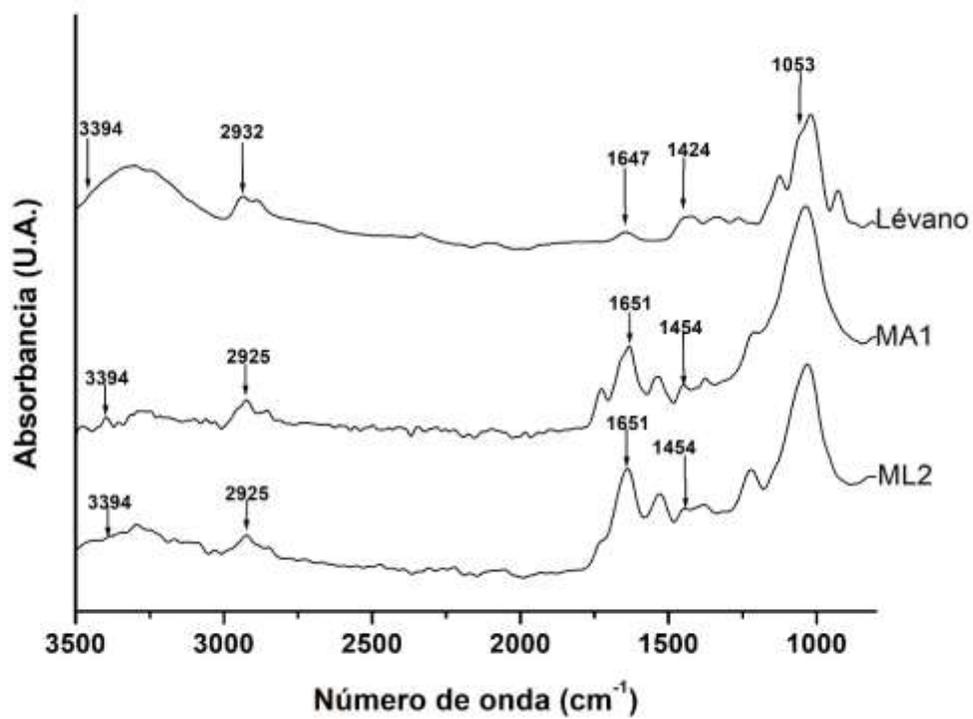


Figura 12. Espectros FT-IR de Lévano y las cepas MA-1 y ML-2.

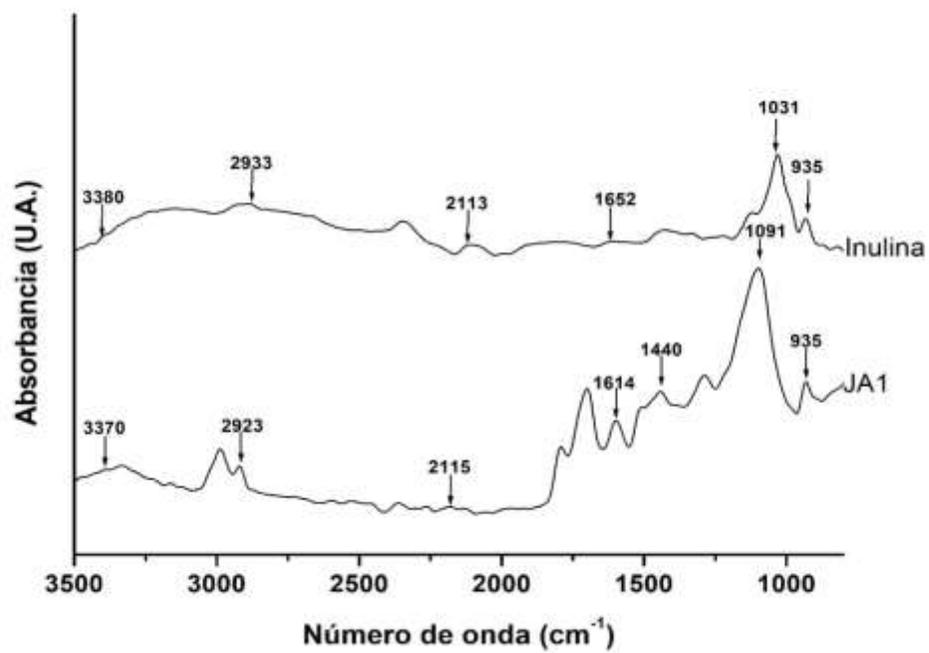


Figura 13. Espectros FT-IR de inulina y la cepa JA-1.

VII. Conclusión

Los resultados obtenidos indicaron que 11 cepas bacterianas se aislaron del proceso de obtención de azúcar, de las cuales, solo 3 cepas bacterianas, que fueron nombradas como JA1, MA1 y ML2, presentaron la capacidad para producir PHAs mediante los métodos de tinción con Negro de Sudan y aparición de fluorescencia en placa Petri en presencia de Azul de Nilo.

Las cepas se caracterizaron morfológicamente y bioquímicamente, dando como resultado que la cepa JA1 pertenece posiblemente al género de *Burkholderia* y las cepas MA1 y ML2 al género *Bacillus*, sin embargo, se debe realizar la identificación molecular para tener la certeza que estas cepas bacterianas pertenecen a los géneros antes mencionados.

Finalmente, mediante la técnica de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier confirmo que las tres cepas (JA1, MA1 y ML2) son capaces de producir PHB, así como también la cepa JA1 es capaz de producir Inulina y las cepas MA1 y ML2 son capaces de producir Lévano, a lo cual esta técnica ofrece una alternativa rápida no destructiva a las técnicas de medición química para la caracterización.

VIII. Referencias bibliográficas

- Aguilar-Rivera, N. (2017). Cadena de valor de la diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar en México. *AGROProductividad*, 10(11), 21-29.
- Aguilar-Rivera, N., Debernardi-Vázquez, T. J., & Herrera-Paz, H. D. (2017). Byproducts, coproducts and derivatives of the sugar agroindustry. *Agroproductividad*, 10(11), 13-20.
- Alcântara, J. M. G., Distante, F., Storti, G., Moscatelli, D., Morbidelli, M., & Sponchioni, M. (2020). Current trends in the production of biodegradable bioplastics: The case of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology Advances*, 107582.
- Al-Dhabaan, F. A. (2019). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi journal of biological sciences*, 26(6), 1247-1252.
- Ammar, E. M., El-Sheshtawy, H. S., El-Shatoury, E. H., & Amer, S. K. (2021). Green synthesis of polyhydroxyalkanoate polymer by *Bacillus iocasae*. *Polymer International*.
- Anaya-Reza, O., & López-Arenas, T. (2017). Design of a sustainable biorefinery for the production of lactic acid from sugarcane molasses. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 243-259.
- Arshad, A., Ashraf, B., Ali, I., & Jamil, N. (2017). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from styrene by *Enterobacter* spp. isolated from polluted environment. *Frontiers in Biology*, 12(3), 210-218.
- Arumugam, A., Senthamizhan, S. G., Ponnusami, V., & Sudalai, S. (2018). Production and optimization of polyhydroxyalkanoates from non-edible *Calophyllum inophyllum* oil using *Cupriavidus necator*. *International journal of biological macromolecules*, 112, 598-607.
- Awol, N., Nigusse, D., & Ali, M. (2019). Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Salmonella* and *Shigella* among food handlers working in food establishment at Hawassa city, Southern Ethiopia. *BMC research notes*, 12(1), 1-7.
- Basnett, P., Lukasiewicz, B., Marcello, E., Gura, H. K., Knowles, J. C., & Roy, I. (2017). Production of a novel medium chain length poly (3-hydroxyalkanoate) using unprocessed biodiesel waste and its evaluation as a tissue engineering scaffold. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1384-1399.
- Castilla-Marroquín, J. D., Hernández-Martínez, R., de la Vequia, H. D., Ríos-Corripio, M. A., Hernández-Rosas, J., López, M. R., & Hernández-Rosas, F. (2020). Dextran synthesis by native sugarcane microorganisms. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 19(Sup. 1), 177-185.

- Chandani, N., Mazumder, P. B., & Bhattacharjee, A. (2020). Potential of dumpsite bacterial isolate in producing polyhydroxybutyrate under stress prone environment. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)*, 58(9), 643-650.
- Chauhan, K., Trivedi, U., & Patel, K. C. (2007). Statistical screening of medium components by Plackett–Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. *Bioresource Technology*, 98(1), 98-103.
- Chee, J. Y., Yoga, S. S., Lau, N. S., Ling, S. C., Abed, R. M., & Sudesh, K. (2010). Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 1395-1404.
- Chee, J. Y., Yoga, S. S., Lau, N. S., Ling, S. C., Abed, R. M., & Sudesh, K. (2010). Bacterially produced polyhydroxyalkanoate (PHA): converting renewable resources into bioplastics. *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, 1395-1404.
- Chelvam, K. K., Chai, L. C., & Thong, K. L. (2014). Variations in motility and biofilm formation of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Gut pathogens*, 6(1), 1-10.
- Chikkerur, J., Samanta, A. K., Kolte, A. P., Dhali, A., & Roy, S. (2019). Production of short chain fructo-oligosaccharides from inulin of chicory root using fungal endoinulinase. *Applied biochemistry and biotechnology*, 1-21.
- Cisneros-López, E. O., Pal, A. K., Rodriguez, A. U., Wu, F., Misra, M., Mielewski, D. F., ... & Mohanty, A. K. (2020). Recycled poly (lactic acid)–based 3D printed sustainable biocomposites: a comparative study with injection molding. *Materials Today Sustainability*, 7, 100027.
- Clifton-García, B., González-Reynoso, O., Robledo-Ortiz, J. R., Villafaña-Rojas, J., & González-García, Y. (2020). Forest soil bacteria able to produce homo and copolymers of polyhydroxyalkanoates from several pure and waste carbon sources. *Letters in applied microbiology*, 70(4), 300-309.
- CONADESUCA. (2020). Balance Nacional de azúcar ciclo 2019/2020.
- Costa, S. S., Miranda, A. L., de Moraes, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian, J. I. (2019). Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs)—A review. *International journal of biological macromolecules*, 131, 536-547.
- de Jesus Assis, D., Gomes, G. V. P., da Cunha Pascoal, D. R., Pinho, L. S., Chaves, L. B. O., & Druzian, J. I. (2016). Simultaneous biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substance (EPS) from crude glycerol from biodiesel production by different bacterial strains. *Applied biochemistry and biotechnology*, 180(6), 1110-1127.
- de Vargas Mores, G., Finocchio, C. P. S., Barichello, R., & Pedrozo, E. A. (2018). Sustainability and innovation in the Brazilian supply chain of green plastic. *Journal of cleaner production*, 177, 12-18.

- Freitas, F., Cristiana, A. V., & Torres, C. AV, Reis MAM.(2017). *Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production*, 245, 1674-1683.
- Gamal, A. A., Hashem, A. M., El-Safty, M. M., Soliman, R. A., & Esawy, M. A. (2020). Evaluation of the antivirus activity of *Enterococcus faecalis* Esawy levan and its sulfated form. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28, 101735.
- Gojic-Cvijovic, G. D., Jakovljevic, D. M., Loncarevic, B. D., Todorovic, N. M., Pergal, M. V., Ciric, J., ... & Vrvic, M. M. (2019). Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. *International journal of biological macromolecules*, 121, 142-151.
- Gomaa, E. Z. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 145-154.
- González-Garcinuño, Á., Tabernero, A., Domínguez, Á., Galán, M. A., & Martín del Valle, E. M. (2018). Levan and levansucrases: polymer, enzyme, microorganisms and biomedical applications. *Biocatalysis and Biotransformation*, 36(3), 233-244.
- Groh, K. J., Backhaus, T., Carney-Almroth, B., Geueke, B., Inostroza, P. A., Lennquist, A., ... & Muncke, J. (2019). Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. *Science of the total environment*, 651, 3253-3268.
- Halami, P. M. (2008). Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 805-812.
- Heinrich, D., Madkour, M. H., Al-Ghamdi, M. A., Shabbaj, I. I., & Steinbüchel, A. (2012). Large scale extraction of poly (3-hydroxybutyrate) from *Ralstonia eutropha* H16 using sodium hypochlorite. *AMB express*, 2(1), 1-6.
- Herrera-Kao, W. A., Loría-Bastarrachea, M. I., Pérez-Padilla, Y., Cauich-Rodríguez, J. V., Vázquez-Torres, H., & Cervantes-Uc, J. M. (2018). Thermal degradation of poly (caprolactone), poly (lactic acid), and poly (hydroxybutyrate) studied by TGA/FTIR and other analytical techniques. *Polymer Bulletin*, 75(9), 4191-4205.
- Huq, M. A. (2020). *Paenibacillus anseongense* sp. nov. a silver nanoparticle producing bacterium isolated from rhizospheric soil. *Current microbiology*, 77(9), 2023-2030.
- Hussain, A., Zia, K. M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., & Zuber, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *International journal of biological macromolecules*, 94, 10-27.

- Iqbal, H. M. N., Kyazze, G., & Keshavarz, T. (2013). Advances in the valorization of lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. *BioResources*, 8(2), 3157-3176.
- Jiang, G., Hill, D. J., Kowalczyk, M., Johnston, B., Adamus, G., Irorere, V., & Radecka, I. (2016). Carbon sources for polyhydroxyalkanoates and an integrated biorefinery. *International journal of molecular sciences*, 17(7), 1157.
- Kabe, T., Tsuge, T., Kasuya, K. I., Takemura, A., Hikima, T., Takata, M., & Iwata, T. (2012). Physical and structural effects of adding ultrahigh-molecular-weight poly [(R)-3-hydroxybutyrate] to wild-type poly [(R)-3-hydroxybutyrate]. *Macromolecules*, 45(4), 1858-1865.
- Kavitha, G., Rengasamy, R., & Inbakandan, D. (2018). Polyhydroxybutyrate production from marine source and its application. *International journal of biological macromolecules*, 111, 102-108.
- Kitamura, S., & Doi, Y. (1994). Staining method of poly (3-hydroxyalkanoic acids) producing bacteria by Nile blue. *Biotechnology techniques*, 8(5), 345-350.
- Kosmachevskaya, O. V., Osipov, E. V., Van Chi, T., Mai, P. T. T., & Topunov, A. F. (2020). Effect of Cultivation Conditions on Poly (3-hydroxybutyrate) Synthesis by Nodule Bacteria *Rhizobium phaseoli*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(1), 64-71.
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H. N., & Reis, M. A. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 4(2), 55.
- Kumar, M., Rathour, R., Singh, R., Sun, Y., Pandey, A., Gnansounou, E., ... & Thakur, I. S. (2020). Bacterial polyhydroxyalkanoates: Opportunities, challenges, and prospects. *Journal of Cleaner Production*, 121500.
- Lee, N. S., & Rahim, A. A. (2020). Isolation and Characterization of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Producers from Kg Batu Melintang hot spring. *J. Trop. Resour. Sustain. Sci*, 8, 1-4.
- Lee, N. S., & Rahim, A. A. (2020). Isolation and Characterization of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Producers from Kg Batu Melintang hot spring. *J. Trop. Resour. Sustain. Sci*, 8, 1-4.
- Leininger, D. J., Roberson, J. R., & Elvinger, F. (2001). Use of eosin methylene blue agar to differentiate *Escherichia coli* from other gram-negative mastitis pathogens. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 13(3), 273-275.
- Leja, K., & Lewandowicz, G. (2010). Polymer biodegradation and biodegradable polymers-a review. *Polish Journal of Environmental Studies*, 19(2).
- Levine, M. (1918). Differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes* on a simplified eosin-methylene blue agar. *The Journal of Infectious Diseases*, 43-47.

- Leyva-Porras, C., Saavedra-Leos, M. Z., López-Pablos, A. L., Soto-Guerrero, J. J., Toxqui-Terán, A., & Fozado-Quiroz, R. E. (2017). Chemical, thermal and physical characterization of inulin for its technological application based on the degree of polymerization. *Journal of Food Process Engineering*, *40*(1), e12333.
- Li, T., Elhadi, D., & Chen, G. Q. (2017). Co-production of microbial polyhydroxyalkanoates with other chemicals. *Metabolic engineering*, *43*, 29-36.
- Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L., & Li, L. (2009). Thermal processing of starch-based polymers. *Progress in polymer science*, *34*(12), 1348-1368.
- Liu, S. Q., Holland, R., & Crow, V. L. (2003). The potential of dairy lactic acid bacteria to metabolise amino acids via non-transaminating reactions and endogenous transamination. *International journal of food microbiology*, *86*(3), 257-269.
- Lopes, M. S. G., Gomez, J. G. C., Taciro, M. K., Mendonça, T. T., & Silva, L. F. (2014). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous removal of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *41*(9), 1353-1363.
- Mahmoudi, S., Pourakbari, B., Moradzadeh, M., Eshaghi, H., Ramezani, A., Ashtiani, M. T. H., ... & Mamishi, S. (2017). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* and *Shigella* spp. among children with gastroenteritis in an Iranian referral hospital. *Microbial pathogenesis*, *109*, 45-48.
- Manjunath, L., & Sailaja, R. R. N. (2016). Starch/polyethylene nanocomposites: mechanical, thermal, and biodegradability characteristics. *Polymer Composites*, *37*(5), 1384-1395.
- Mannina, G., Presti, D., Montiel-Jarillo, G., & Suárez-Ojeda, M. E. (2019). Bioplastic recovery from wastewater: a new protocol for polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures. *Bioresource technology*, *282*, 361-369.
- Martínez-Herrera, R. E., Alemán-Huerta, M. E., Almaguer-Cantú, V., Rosas-Flores, W., Martínez-Gómez, V. J., Quintero-Zapata, I., ... & Rutiaga-Quñones, O. M. (2020). Efficient recovery of thermostable polyhydroxybutyrate (PHB) by a rapid and solvent-free extraction protocol assisted by ultrasound. *International Journal of Biological Macromolecules*, *164*, 771-782.
- Mendonça, C. M. M., Oliveira, R. C., Freire, R. K. B., Piazzentin, A. C. M., Pereira, W. A., Gudiña, ... & Oliveira, R. P. S. (2021). Characterization of levan produced by a *Paenibacillus* sp. isolated from Brazilian crude oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, *186*, 788-799.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, *31*(3), 426-428.

- Mizuno, K., Ohta, A., Hyakutake, M., Ichinomiya, Y., & Tsuge, T. (2010). Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. *Polymer degradation and stability*, 95(8), 1335-1339.
- Mohammed, S., Behera, H. T., Dekebo, A., & Ray, L. (2020). Optimization of the culture conditions for production of Polyhydroxyalkanoate and its characterization from a new *Bacillus cereus* sp. BNPI-92 strain, isolated from plastic waste dumping yard. *International journal of biological macromolecules*, 156, 1064-1080.
- Mohammed, S., Panda, A. N., & Ray, L. (2019). An investigation for recovery of polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Bacillus* sp. BPPI-14 and *Bacillus* sp. BPPI-19 isolated from plastic waste landfill. *International journal of biological macromolecules*, 134, 1085-1096.
- Moussa, T. A., Al-Qaysi, S. A., Thabit, Z. A., & Kadhem, S. B. (2017). Microbial levan from *Brachybacterium phenoliresistens*: characterization and enhancement of production. *Process Biochemistry*, 57, 9-15.
- Narayan, R. (2011). Carbon footprint of bioplastics using biocarbon content analysis and life-cycle assessment. *MRS bulletin*, 36(9), 716-721.
- Ni, D., Xu, W., Bai, Y., Zhang, W., Zhang, T., & Mu, W. (2018). Biosynthesis of levan from sucrose using a thermostable levansucrase from *Lactobacillus reuteri* LTH5448. *International journal of biological macromolecules*, 113, 29-37.
- Ni, D., Xu, W., Zhu, Y., Zhang, W., Zhang, T., Guang, C., & Mu, W. (2019). Inulin and its enzymatic production by inulosucrase: Characteristics, structural features, molecular modifications and applications. *Biotechnology advances*, 37(2), 306-318.
- Ojha, N., & Das, N. (2018). A statistical approach to optimize the production of polyhydroxyalkanoates from *Wickerhamomyces anomalus* VIT-NN01 using response surface methodology. *International journal of biological macromolecules*, 107, 2157-2170.
- Ojha, N., & Das, N. (2020). Process optimization and characterization of polyhydroxyalkanoate copolymers produced by marine *Pichia kudriavzevii* VIT-NN02 using banana peels and chicken feather hydrolysate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 27, 101616.
- Park, S. J., Jang, Y. A., Noh, W., Oh, Y. H., Lee, H., David, Y., ... & Lee, S. Y. (2015). Metabolic engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of polyhydroxyalkanoates from sucrose. *Biotechnology and bioengineering*, 112(3), 638-643.
- Peelman, N., Ragaert, P., De Meulenaer, B., Adons, D., Peeters, R., Cardon, L., ... & Devlieghere, F. (2013). Application of bioplastics for food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 32(2), 128-141.

- Pillai, A. B., Kumar, A. J., Thulasi, K., & Kumarapillai, H. (2017). Evaluation of short-chain-length polyhydroxyalkanoate accumulation in *Bacillus aryabhatai*. *Brazilian journal of microbiology*, 48(3), 451-460.
- Pippo, W. A., & Luengo, C. A. (2013). Sugarcane energy use: accounting of feedstock energy considering current agro-industrial trends and their feasibility. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 4(1), 1-13.
- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. R., & Nicolaus, B. (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by archaea. *Archaea*, 2011.
- Porras, M. A., Villar, M. A., & Cubitto, M. A. (2017). Novel spectrophotometric technique for rapid determination of extractable PHA using Sudan black dye. *Journal of biotechnology*, 255, 28-32.
- Rahman, M. H., & Bhoi, P. R. (2021). An overview of non-biodegradable bioplastics. *Journal of Cleaner Production*, 126218.
- Rathika, R., Janaki, V., Shanthi, K., & Kamala-Kannan, S. (2019). Bioconversion of agro-industrial effluents for polyhydroxyalkanoates production using *Bacillus subtilis* RS1. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(10), 5725-5734.
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45-56.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., & Kalia, V. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource technology*, 87(2), 137-146.
- Samrot, A. V., Avinesh, R. B., Sukeetha, S. D., & Senthilkumar, P. (2011). Accumulation of poly [(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Enterobacter cloacae* SU-1 during growth with two different carbon sources in batch culture. *Applied biochemistry and biotechnology*, 163(1), 195-203.
- Schmaltz, E., Melvin, E. C., Diana, Z., Gunady, E. F., Rittschof, D., Somarelli, J. A., ... & Dunphy-Daly, M. M. (2020). Plastic pollution solutions: emerging technologies to prevent and collect marine plastic pollution. *Environment International*, 144, 106067
- Silambarasan, S., Logeswari, P., Sivaramakrishnan, R., Pugazhendhi, A., Kamaraj, B., Ruiz, A., ... & Cornejo, P. (2021). Polyhydroxybutyrate production from ultrasound-aided alkaline pretreated finger millet straw using *Bacillus megaterium* strain CAM12. *Bioresource Technology*, 325, 124632.
- Simó-Cabrera, L., García-Chumillas, S., Hagagy, N., Saddiq, A., Tag, H., Selim, S., ... & Martínez-Espinosa, R. M. (2021). Haloarchaea as Cell Factories to Produce Bioplastics. *Marine Drugs*, 19(3), 159.

- Solomon, S. (2011). Industrias basadas en subproductos de la caña de azúcar en India. *Sugar Tech*, 13(4), 408-416.
- Soto, L. R., Thabet, H., Maghembe, R., Gameiro, D., Van-Thuoc, D., Dishisha, T., & Hatti-Kaul, R. (2021). Metabolic potential of the moderate halophile *Yangia* sp. ND199 for co-production of polyhydroxyalkanoates and exopolysaccharides. *MicrobiologyOpen*, 10(1).
- Subedi, M., Luitel, H., Devkota, B., Bhattarai, R. K., Phuyal, S., Panthi, P., ... & Chaudhary, D. K. (2018). Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC veterinary research*, 14(1), 1-6.
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in polymer science*, 25(10), 1503-1555.
- Tohme, S., Haciosmanoğlu, G. G., Eroğlu, M. S., Kasavi, C., Genç, S., Can, Z. S., & Oner, E. T. (2018). *Halomonas smyrnensis* as a cell factory for co-production of PHB and levan. *International journal of biological macromolecules*, 118, 1238-1246.
- Tosisa, W., Mihret, A., Ararsa, A., Eguale, T., & Abebe, T. (2020). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* and *Shigella* species isolated from diarrheic children in Ambo town. *BMC pediatrics*, 20(1), 1-8.
- Tsotetsi, L., Prenaven, R., Modise, S. J., & Monapathi, M. (2020). Isolation and identification of xylanase producing thermophilic bacteria from compost piles and optimization of xylanase production. *Journal of Biotech Research*, 11.
- Tufail, Saiqa, Munir, Sajida, & Jamil, Nazia. (2017). Variation analysis of bacterial polyhydroxyalkanoates production using saturated and unsaturated hydrocarbons. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 629-636.
- Tyagi, P., Saxena, N. K., & Sharma, A. (2018). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from a non-lignocellulosic component of sugarcane bagasse: fueling a biobased economy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 12(4), 536-541.
- Wen, Q., Liu, B., Li, F., & Chen, Z. (2020). Substrate strategy optimization for polyhydroxyalkanoates producing culture enrichment from crude glycerol. *Bioresource Technology*, 311, 123516.
- Yadav, B., Talan, A., Tyagi, R. D., & Drogui, P. (2021). Concomitant production of value-added products with polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis: A review. *Bioresource Technology*, 125419
- Yamada, M., Yukita, A., Hanazumi, Y., Yamahata, Y., Moriya, H., Miyazaki, M., ... & Shimoi, H. (2018). Poly (3-hydroxybutyrate) production using mannitol as a sole carbon source by *Burkholderia* sp. AIU M5M02 isolated from a marine environment. *Fisheries science*, 84(2), 405-412.

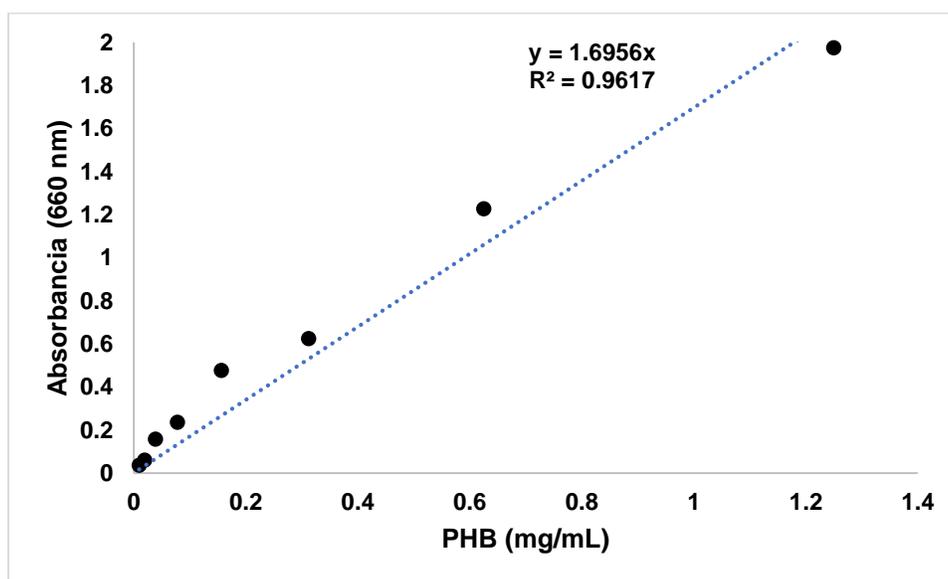
Zhang, K., Mohanty, A. K., & Misra, M. (2012). Fully biodegradable and biorenewable ternary blends from polylactide, poly (3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and poly (butylene succinate) with balanced properties. *ACS applied materials & interfaces*, 4(6), 3091-3101.

Anexos

Anexo A. Curva patrón de PHB

Resultados							
Muestra	Concentracion de PHB (mg/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio ABS	Desviación estandar	Error estandar
1	1.25	1.975	1.975	1.98	1.975	2.71948E-16	1.57009E-16
2	0.625	1.228	1.228	1.23	1.228	0	0
3	0.3125	0.625	0.625	0.63	0.625	0	0
4	0.15625	0.477333333	0.477	0.48	0.477333333	0	0
5	0.078125	0.236666667	0.237	0.24	0.236666667	0	0
6	0.0390625	0.158333333	0.158	0.16	0.158333333	0	0
7	0.01953125	0.061333333	0.061	0.06	0.061333333	0	0
8	0.009765625	0.037	0.037	0.04	0.037	0	0

Cuida el número de cifras que utilices.



Anexo B. Curva patrón de glucosa

Resultados							
Muestra	Glucosa (g/mL)	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	Desviación estandar	Error estandar
1	0.11	0.111	0.125	0.13	0.12133333	0.009073772	0.005238745
2	0.25	0.25	0.268	0.27	0.26333333	0.011718931	0.006765928
3	0.42	0.377	0.39	0.42	0.395	0.020952327	0.012096832
4	0.66	0.556	0.57	0.53	0.55066667	0.02247962	0.012978615
5	1	0.644	0.692	0.71	0.683	0.035369478	0.020420578

6	1.5	0.868	0.879	0.89	0.87733333	0.008621678	0.004977728
7	2.3	0.978	0.951	0.99	0.97233333	0.019139836	0.01105039

