

**OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) POR BACTERIAS SILVESTRES  
EMPLEANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**



Universidad  
del Cauca

**HERNANDO BLADIMIR CABRERA ORDÓÑEZ  
MARÍA CAMILA ZÚÑIGA TENGANÁN**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
POPAYÁN  
2017**

**OBTENCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) POR BACTERIAS SILVESTRES  
EMPLEANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

**HERNANDO BLADIMIR CABRERA ORDÓÑEZ  
MARÍA CAMILA ZÚÑIGA TENGANÁN**

**Trabajo de grado en la modalidad de Investigación para optar al título de  
Ingeniero Agroindustrial**

**Directores**

**Ph. D. JOSÉ LUIS HOYOS CONCHA  
M. Sc. IVÁN DARÍO OTERO RAMÍREZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL  
POPAYÁN  
2017**

## **Página de aceptación**

Los Directores y los Jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del mismo por sus autores y lo encuentran satisfactorio.

---

**Ph. D. JOSÉ LUIS HOYOS CONCHA**  
Director

---

**M. Sc. IVÁN DARÍO OTERO RAMÍREZ**  
Director

---

**Ing. SANDRA MAGALLY SÁNCHEZ**  
Presidente del Jurado

---

**M. Sc. CLARA INÉS GIRALDO**  
Jurado

## **DEDICATORIA**

Julia Ortiz Bolaños Q.E.P.D

David Alejandro Cabrera Ordoñez Q.E.P.D

## **AGRADECIMIENTOS**

A DIOS por guiar nuestros pasos y enseñarnos que todo es posible si confías en Él.

A mis tías Julia Ortiz y María Elvia Ortega porque con su ejemplo, entrega, esfuerzo, dedicación, pero sobre todo amor han hecho de mí una persona íntegra. Gracias por estar conmigo en todos y cada uno de los momentos de mi vida.

A mis padres Hernando Cabrera, Teresa Ordoñez y hermano Kevin Cabrera Ordoñez por siempre confiar en mí, por haberme dado todo su amor y corregirme cuando era necesario esfuerzos que hicieron de mí una mejor persona.

A nuestros directores Ph. D José Luis Hoyos Concha e M. Sc. Ivan Darío Otero Ramírez por ser nuestros guías, por siempre estar comprometidos con nuestro trabajo porque con su ejemplo y dedicación aportaron a nuestra formación y nos motivaron para que esta investigación fuera la mejor. Gracias infinitas por hacernos parte del grupo de investigación ASUBAGROIN, fue un placer haber conocido a todos y cada uno de los profesionales que lo conforman que ante todo son personas con excelentes valores y principios.

## CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO REFERENCIAL	18
1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)	18
1.2 CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs	20
1.3 PROPIEDADES ELASTÓMERAS DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	22
1.4 APLICACIONES DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS	22
2. METODOLOGÍA	24
2.1 SELECCIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)	24
2.1.1 Activación de microorganismos	24
2.1.2 Evaluación de bacterias acumuladoras de polihidroxicanoatos en un medio con glucosa y azul Nilo	24
2.1.3 Evaluación de bacterias acumuladoras de polihidroxicanoatos en un medio con sacarosa, almidón, lactosa y azul Nilo	24
2.1.4 Tinción con negro sudán	24
2.1.5 Descripción macroscópica y tinción de Gram	25
2.1.6 Identificación taxonómica mediante el gen ARNr 16s	25
2.1.6.1 Extracción de DNA bacteriano	25
2.1.6.2 Electroforesis en gel de agarosa	26
2.1.6.3 Amplificación en cadena de la polimerasa	26
2.1.6.4 Secuenciación y edición de secuencias	26
2.1.6.5 Comparación con las bases de datos	26

	pág.
2.2 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR LAS BACTERIAS SELECCIONADAS EMPLEANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO	27
2.2.1 Activación de bacterias	27
2.2.2 Cinética de crecimiento para la determinación de la fase estacionaria	27
2.2.3 Cinética de las bacterias <i>B. thuringiensis</i> UC-036, <i>Serratia sp</i> UC-082 Y <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAVE2M4 en los sustratos glucosa, sacarosa, lactosa y almidón	27
2.2.4 Cuantificación de biomasa	28
2.2.4.1 Cuantificación de sustrato	28
2.2.4.2 Determinación de azúcares por el método de Ácido Dinitrosalicílico (DNS)	28
2.2.4.3 Determinación de azúcares por el método de Fenol ácido sulfúrico	29
2.2.5 Caracterización del biopolímero	30
2.2.5.1 Extracción de PHAs	30
2.2.5.2 Caracterización del polímero obtenido por cromatografía líquida de ultra alta precisión acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS)	30
2.2.5.3 Caracterización del polímero obtenido por espectroscopía Infrarroja (IR-FT)	31
2.2.6 Diseño experimental	31
3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
3.1 SELECCIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS	32
3.1.1 Evaluación de bacterias acumuladoras de Polihidroxicanoatos en un medio con glucosa y azul nilo	32
3.1.2 Selección de bacterias acumuladoras de Polihidroxicanoatos por fluorescencia en medio con sacarosa, almidón y lactosa suplementado con azul nilo	32
3.1.3 Tinción con negro sudán	33

	pág.
3.1.4 Descripción macroscópica y tinción de Gram	34
3.1.5 Identificación taxonómica de las bacterias seleccionadas mediante el gen ARNr 16s	35
3.2 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR LAS BACTERIAS SELECCIONADAS, EMPLEANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO	38
3.2.1 Cinética de crecimiento para la determinación de la fase estacionaria	38
3.2.2 Cinética de las bacterias <i>B. thuringiensis</i> UC-036, <i>Serratia sp</i> UC-082 Y <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAVE2M4 en los sustratos glucosa, sacarosa, lactosa y almidón	41
3.2.3 Caracterización del biopolímero por Cromatografía líquida de ultra alta precisión acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS) y Espectroscopía infrarroja (FTIR)	47
4. CONCLUSIONES	59
5. RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	76



## LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Principales monómeros que conforman los PHAs producidos por microorganismos	18
Cuadro 2. Efecto de la relación Carbono-Nitrógeno en el crecimiento celular y la acumulación de PHAs	21
Cuadro 3. Propiedades termoplásticas y elastoméricas de PHAs frente a los plásticos convencionales	22
Cuadro 4: Concentraciones de la curva de calibración de DNS	28
Cuadro 5: Concentraciones de la curva de calibración de fenol ácido sulfúrico	29
Cuadro 6. Diseño de medidas repetidas simple	31
Cuadro 7. Diseño completamente al azar con arreglo factorial	31
Cuadro 8. Crecimiento y fluorescencia de bacterias evaluadas en medios con glucosa, sacarosa, lactosa y almidón suplementado con azul nilo a las 72 horas de crecimiento	33
Cuadro 9. Periodos de tiempo promedio correspondientes a la fase estacionaria de <i>B. thuringiensis</i> UC-036, <i>Serratia sp</i> UC-082 y <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAVE2M4 en los diferentes sustratos	41
Cuadro 10. Grado de significancia del análisis estadístico del diseño experimental de bloques completamente al azar	44
Cuadro 11. Prueba de Tukey del análisis estadístico del diseño experimental de bloques completamente al azar. Las diferentes letras indican los subconjuntos formados de acuerdo con la producción de PHAs	45
Cuadro 12. Rendimientos de producción PHAs de las bacterias <i>B. thuringiensis</i> UC-036, <i>Serratia Sp</i> UC-082 y <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en las diferentes fuentes de carbono	51
Cuadro 13. Polihidroxicanoatos sintetizados por microorganismos cultivados en glucosa, sacarosa, lactosa y almidón como fuentes de carbono	54

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Síntesis de Polihidroxicanoatos de cadena media a partir de ácidos grasos	19
Figura 2. Fluorescencia emitida. a) Azul, bacterias PSAVE2M4; b) Verde, BAC UC 131	32
Figura 3. Descripción macro y microscópica de las bacterias BAC 082, BAC 036, PSAVE2M4, BAC 017	34
Figura 4. Gel de agarosa al 0,8% para verificar la calidad del DNA. 1 y 8 marcador lambda Hind III, carriles 2 al 6 contienen muestras de DNA extraído de cepas BAC 082, BAC 036, PSAVE2M4, BAC 082, BAC 036	36
Figura 5. Gel de agarosa al 0,8%. 1 y 10 marcador de tamaño molecular 1Kb ladder; carriles 2 a 8 fragmentos amplificados usando cebadores universales para el gen ARNr 16s de las cepas BAC 082; BAC 036; PSAVE2M4; BAC 082; BAC 036; PSAVE2M4; BAC 082; control negativo agua	36
Figura 6. Cinética de crecimiento de <i>B. thuringiensis</i> UC-036 en los cuatro sustratos evaluados	39
Figura 7. Cinética de crecimiento <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en los cuatro sustratos evaluados	39
Figura 8. Cinética de crecimiento <i>Serratia sp.</i> UC-082 en los cuatro sustratos evaluados	40
Figura 9. Producción de Polihidroxicanoatos en <i>B. thuringiensis</i> UC-036, en las diferentes fuentes de carbono	42
Figura 10. Producción de Polihidroxicanoatos en <i>Serratia Sp</i> UC-082 en las diferentes fuentes de carbono	42
Figura 11. Producción de Polihidroxicanoatos en la bacteria <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en las diferentes fuentes de carbono	43
Figura 12. Crecimiento de las bacterias <i>B. thuringiensis</i> UC-036 (a), <i>serratia sp</i> UC-082 (b) y <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 (c) en las diferentes fuentes de carbono	44
Figura 13. Consumo de sustrato <i>B. thuringiensis</i> UC-036 en las diferentes fuentes de carbono	46

	pág.
Figura 14. Consumo de sustrato <i>Serratia Sp</i> UC-082 en las diferentes fuentes de carbono	46
Figura 15. Consumo de sustrato <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en las diferentes fuentes de carbono	47
Figura 16. Cromatograma de <i>B. thuringiensis</i> UC-036 en glucosa	48
Figura 17. Espectros de masas. A) <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en glucosa (hidroxiburato); B) <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en glucosa (hidroxivalerato)	48
Figura 18. Molécula del copolímero Polihidroxitirato-Co-Poihidroxivalerato	49
Figura 19. Cromatograma y espectro de masas del copolímero polihidroxitirato-polihidroxivalerato	49
Figura 20. FTIR del copolímero polihidroxitirato-polihidroxivalerato producido por la bacteria <i>Serratia Sp</i> UC-082 en almidón	50
Figura 21. (a) Vía Entner-Doudoroff para <i>Bacillus</i> . (b) Via Embden-Meyerhof para <i>Serratia sp</i>	53
Figura 22. Posibles rutas metabólicas implicadas en la producción de copolímero P(3HB-co-3HV-co-4HB), P(3HB-co-3HV) y P(3HB-co-4HB)	54
Figura 23. Degradación de la molécula de sacarosa en sus respectivos azúcares antes de ingresar vía glucólisis y continuar con la síntesis de PHAs	55
Figura 24. Degradación de la molécula de lactosa en sus respectivos azúcares antes de ingresar vía glucólisis y continuar con la síntesis de PHAs	56
Figura 25. Degradación de la molécula de almidón en sus respectivos azúcares antes de ingresar vía glucólisis y continuar con la síntesis de PHAs	57

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Evaluación de 160 bacterias en azul nilo en presencia de glucosa como única fuente de carbono	76
Anexo B. Secuencias editadas del gen 16s rRNA de las bacterias 082,036 y PSAVE2M4, respectivamente	80
Anexo C. Prueba de efecto intra-sujeto producción de phas de los resultados obtenidos del programa SPSS de las bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Serratia sp.</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en glucosa, sacarosa, lactosa y almidón	82
Anexo D. Prueba de efecto intra-sujeto producción de biomasa de los resultados obtenidos del programa SPSS de las bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Serratia sp</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en glucosa, sacarosa, lactosa y almidón	88
Anexo E. Comparaciones por pares producción de PHAS de los resultados obtenidos del programa SPSS de las bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Serratia sp</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en glucosa, sacarosa, lactosa y almidón	94
Anexo F. Comparaciones por pares biomasa de los resultados obtenidos del programa SPSS de las bacterias <i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Serratia sp</i> y <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> en glucosa, sacarosa, lactosa y almidón	109
Anexo G. Espectro de masas de las bacterias <i>B. Thuringiensis</i> uc-036, <i>Serratia sp.</i> UC-082 y <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en las diferentes fuentes de carbono	124
Anexo H. FT-IR de las bacterias <i>B. Thuringiensis</i> uc-036, <i>Serratia sp.</i> UC-082 y <i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en las diferentes fuentes de carbono	132

## GLOSARIO

**BIOPOLÍMERO:** Macromolécula de origen biológico formada por unidades monoméricas.

**CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC):** Técnica analítica para la separación e identificación de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles empleando una columna (fase estacionaria) y un gas inerte (fase móvil).

**CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A MASAS (GC-MS):** Técnica analítica que acopla la cromatografía de gases y espectrometría de masas para la identificación de compuestos orgánicos.

**ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA:** Reacción enzimática in vitro que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente.

**ESPECTROFOTOMETRÍA:** Método cuantitativo de análisis químico que utiliza la luz para medir la concentración de una sustancia.

**ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (FTIR):** Esta técnica proporciona un espectro de reflexión de las bandas de los grupos funcionales de las sustancias inorgánicas y orgánicas, por lo cual es posible realizar una identificación de los materiales.

**FERMENTACIÓN:** En un contexto industrial, cualquier proceso microbiano a escala que se realice aeróbica o anaeróbicamente.

**GRAVIMETRÍA:** Método analítico cuantitativo para determinar la cantidad de una sustancia midiendo su peso.

**METABOLISMO:** Conjunto de reacciones bioquímicas de una célula.

**MÉTODO DNS:** Técnica colorimétrica que emplea ácido 3,5 dinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra. Técnica que sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante la fermentación.

**MÉTODO FENOL ACIDO- SULFÚRICO:** Se fundamenta en la sensibilidad que tienen los carbohidratos a ácidos fuertes y altas temperaturas.

**NEGRO SUDÁN:** Técnica que permite apreciar la acumulación de polímero por medio de la tinción de la pared lipídica de los gránulos.

**NILO AZUL:** Colorante lipofílico, soluble en solventes orgánicos. Permite la detección presuntiva de bacterias productoras de polihidroxicanoatos por emisión de una fuerte fluorescencia cuando se observa el cultivo a luz ultravioleta.

**POLIHIDROXIALCANOATOS:** Son poliésteres intracelulares que se agrupan formando gránulos acumulados por bacterias sometidas a estrés nutricional y que actúan principalmente como reserva de carbono y energía. A nivel biotecnológico tienen propiedades similares a los plásticos de origen petroquímico, pero son biodegradables.

## RESUMEN

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son poliésteres bacterianos acumulados como material de almacenamiento de carbono y energía en ambientes con desbalance Carbono/Nitrógeno ó Carbono/Fosforo, que han ido adquiriendo mayor importancia debido a su diversidad estructural y similitud con los plásticos. Su desventaja radica en sus elevados costos de producción que en gran parte se deben a la fuente de carbono utilizada, hecho que ha implicado la búsqueda de alternativas que minimicen su valor; razón por la cual en esta investigación se evaluó inicialmente la capacidad productora de PHAs de 160 bacterias silvestres presentes en el cepario del grupo de investigación ASUBAGROIN por medio de la técnica de tinción de Nilo Azul suplementado con glucosa, de las cuales 31 bacterias mostraron fluorescencia como indicativo de producción de PHAs y se continuo con la evaluación en sacarosa, lactosa y almidón; de este grupo solo 4 bacterias mostraron fluorescencia en los tres sustratos, posteriormente con el fin de corroborar que las bacterias seleccionadas son capaces de producir PHAs se realizó la prueba de Negro Sudan técnica que a través de la tinción de la pared lipídica de los granulos del biopolímero permitió elegir 3 bacterias que fueron identificadas molecularmente mediante el gen ribosómico ARNr 16s como *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Serratia sp.* microorganismos que fueron sometidos a una fermentación tipo batch donde la mayor producción de PHAs se obtuvo en glucosa (61,83%) seguido de lactosa (61,36%); sacarosa (58,77%) y almidón (30,30%). Finalmente, el polímero recuperado se caracterizó por cromatografía líquida de ultra alta precisión acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS) y espectroscopia infrarroja (FTIR) donde los resultados determinaron que los compuestos resultantes de la fermentación realizada son Polihidroxitirato-Polihidroxicaprolato.

**Palabras clave:** *Bacillus sp.*, *Serratia sp.*, Copolimero, Polihidroxitirato, Polihidroxicaprolato.

## ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial polyesters accumulated as carbon and energy storage material in environments with Carbon / Nitrogen, Carbon / Phosphorus imbalances that have become more important because of their structural diversity and similarity with plastics. Its main drawback lies in its high production costs, which are largely due to the carbon source used, a fact that has involved the search for alternatives that minimize its value; That is the reason why in this investigation the PHA production capacity of 160 wild bacteria was evaluated, these bacteria are present in the strain owned by the "Utilization of by-products and agroindustrial residues" group from the University of Cauca, this evaluation was made by means of the technique of Blue Nile staining supplemented with glucose, Of which 31 bacteria showed fluorescence, these were evaluated in sucrose, lactose and starch; From this group only 4 bacteria showed fluorescence in all three substrates, subsequently in order to corroborate that the selected bacteria were able to produce PHAs, these were tested by Black Sudan technique that through the staining of the lipid wall of the granules of the biopolymer which allowed to choose 3 bacteria that were identified molecularly by the ribosomal rRNA gene *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Serratia* sp, microorganisms that were submitted to a batch fermentation, where the highest production of PHAs was obtained in glucose (61.83%) followed by lactose (61.36%), sucrose (58, 77%) and starch (30.30%). Finally, the recovered polymer was characterized by Ultra High Precision Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS) and Infrared Spectroscopy (FTIR). The results of the characterization analyzes determined that the compounds resulting from the fermentation were Polyhydroxybutyrate-Polyhydroxyvalerate.

**Keywords:** *Bacillus* sp, *Serratia* sp., Copolymer, Polyhydroxybutyrate, Polyhydroxyvalerate.

## INTRODUCCIÓN

Desde el siglo XX los polímeros sintéticos (plásticos) se han utilizado ampliamente en la industria, medicina, agricultura y actividades de la vida cotidiana, gracias a que son económicos, livianos, versátiles, tienen resistencia a la oxidación, corrosión al agua y descomposición bacteriana, además de ser aislantes a la corriente eléctrica (Valero *et al.*, 2013). Su desventaja radica en que requieren tiempos largos para su descomposición completa, hecho al que se le suma la inadecuada disposición, convirtiéndose en una problemática ambiental (López, 2014; Camacho y Hoyos, 2014). Se estima que anualmente se emplean más de 140 millones de toneladas de plástico en el mundo, donde más del 60% está siendo dispuesto en ambientes marinos o vertederos (Ortiz, 2013); a nivel nacional la producción y consumo de plásticos ha ido en aumento en los últimos años, posicionándose como uno de los sectores más dinámicos de la economía (Acoplasticos, 2013).

Por esta razón alrededor del mundo se ha despertado el interés por encontrar una opción para reemplazar los polímeros sintéticos, siendo los biopolímeros de origen bacteriano denominados polihidroxialcanoatos (PHAs) una gran alternativa (Valle, 2015; Gonzalez, 2013), puesto que son biodegradables, poseen propiedades fisicoquímicas y termoplásticas similares a los plásticos derivados del petróleo (Mutlu *et al.*, 2010; Huu Phong *et al.*, 2016).

Se estima que para el 2020, la producción de polímeros de origen biológico se triplique, pasando de 5,1 millones de toneladas en 2013 a 17 para los próximos años, donde el 1.1% corresponde a PHAs de origen bacteriano, evidenciando una tasa de crecimiento anual de casi el 20% en comparación con polímeros de origen petroquímico, que se encuentran entre el 3-4%, convirtiéndose este en un mercado con constante progreso dado su capacidad de producción y constante desarrollo (Aeschelman y Carus, 2015).

De acuerdo con el instituto de bioplásticos y biocompuestos la producción de polímeros biodegradables en Europa se alcanzó los 1,7 millones de toneladas y se espera que en el 2018 crezca a 6,7 millones de toneladas (Mozejko y Kiewisz, 2016). No obstante, la obtención a gran escala de estos biopolímeros está limitada principalmente por los altos costos de producción; se estima que 1 kg de PHAs cuesta entre 3,5 a 5 euros en donde el sustrato representa cerca del 35% a 40% del costo total, mientras que 1 kg de polipropileno se encuentra a 1 euro (Naranjo, 2010).

Es importante mencionar el persistente incremento en la capacidad de obtención de bioplásticos, resultados de investigaciones acerca de la producción de PHAs han arrojado rendimientos con concentraciones mínimas que varían desde 1,6 g L<sup>-1</sup> y 1,8 g L<sup>-1</sup> en medios de cultivo con aguas ricas en proteínas vegetales y azúcares reductores respectivamente (Elain, 2016), hasta concentraciones cercanas a 80 g L<sup>-1</sup> en cultivos puros, con potencial de producción de 50.000 toneladas al año (Gonzalez, 2013).



Por tal razón es necesario encontrar microorganismos capaces de aprovechar fuentes de carbono diferentes a la glucosa que sean económicas y de alta disponibilidad para la producción a gran escala de los PHAs (Ciesielski *et al.*, 2015), entre las que se destacan: suero de leche, melaza de caña, agua residual de rallanderías, aceites o materias primas lignocelulósicas (Bosco y Chiampo, 2010; Follonier *et al.*, 2014; Mohammad *et al.*, 2011; Van-Thuoc *et al.*, 2008). Sin embargo, una primera etapa para lograr utilizar estos sustratos alternativos como fuente de carbono para la producción de PHAs, es conocer los microorganismos que puedan aprovechar estos sustratos para tal fin. Consecuentemente en el presente trabajo se llevó a cabo la selección y evaluación de la producción de PHAs por bacterias silvestres presentes en el cepario del grupo de investigación Aprovechamiento de subproductos y residuos agroindustriales de la Universidad del Cauca en diferentes fuentes de carbono, los microorganismos con capacidad metabólica para transformar estas fuentes de carbono a Polihidroxicanoatos se pueden utilizar en procesos a escala para la producción de estos biopolímeros empleando como sustratos, residuos de actividades agroindustriales de la industria láctea, azucarera y de rallandería. Por lo tanto, en la presente investigación se determinó el potencial de bacterias silvestres para acumular Polihidroxicanoatos mientras crecen en fuentes de carbono glucosa, lactosa, sacarosa y/o almidón.

## 1. MARCO REFERENCIAL

### 1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Los Polihidroxicanoatos son un grupo de biopolímeros que se acumulan dentro de la estructura celular de los microorganismos bajo condiciones de estrés, ocasionado por un desbalance carbono-nitrógeno. Estructura común del polímero está compuesto por quirales (R) ácidos - hidroxialcanoicos y unidades monoméricas con (R) -3-ácidos hidroxialcanoicos, se han identificado más de 150 tipos de monómeros presentes en los PHAs (cuadro 1) entre ellos se destaca el poli-3-hidroxitirato (P3HB) (Chen, 2010).

Cuadro 1. Principales monómeros que conforman los PHAs producidos por microorganismos

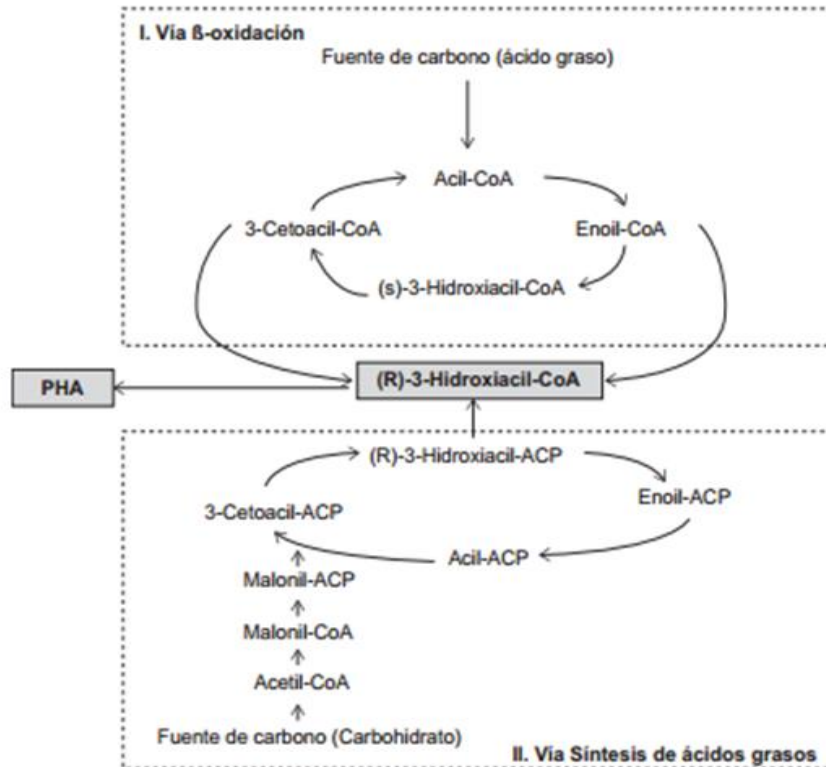
Símbolo	Nombre del monómero	Tamaño de la cadena (número de carbonos)	Posición del grupo hidroxilo
3HP	Ácido 3-hidroxi-propionico	3	3
3HB	Ácido 3-hidroxi-butírico	4	3
3HV	Ácido 3-hidroxi-valérico	5	3
3HHx	Ácido 3-hidroxi-hexanoico	6	3
3HHp	Ácido 3-hidroxi-heptanoico	7	3
3HO	Ácido 3-hidroxi-octanoico	8	3
3HN	Ácido 3-hidroxi-nonanoico	9	3
3HD	Ácido 3-hidroxi-decanoico	10	3
3HUD	Ácido 3-hidroxi-undecanoico	11	3
3HDD	Ácido 3-hidroxi-dodecanoico	12	3
3HTD	Ácido 3-hidroxi-tetradecanoico	14	3
3HHxD	Ácido 3-hidroxi-hexadecanoico	16	3
4HB	Ácido 4-hidroxi-butírico	4	4
4HV	Ácido 4-hidroxi-valérico	5	4
4HHx	Ácido 4-hidroxi-hexanoico	6	4
4HHp	Ácido 4-hidroxi-heptanoico	7	4
4HO	Ácido 4-hidroxi-octanoico	8	4
4HD	Ácido 4-hidroxi-decanoico	10	4
5HV	Ácido 5-hidroxi-valérico	5	5
5HHx	Ácido 5-hidroxi-hexanoico	6	5
6HDD	Ácido 6-hidroxi-dodecanoico	12	6

Fuente: Gonzáles, 2013.

Los polihidroxicanoatos se pueden clasificar como PHAs de cadena corta y media, los PHAs de cadena corta generalmente consisten en homopolímeros biosintetizados en procesos de tres pasos que es regulado por 3-cetotilasa (PHAa), acetoacetil-CoA reductasa (PHAb) y el PHA sintasa (PHAc). Para la síntesis de PHAs de cadena media existen tres tipos de vías, cada una usa un sustrato diferente para crear 3-ácidos hidroxialcanoicos (Koller *et al.*, 2012), en la primera vía se tienen fuentes de carbono

alifáticos que son degradados por vía  $\beta$ -oxidación para producir 3-hidroxiacil-CoA, en la segunda vía, los PHAs de longitud de cadena media son sintetizados por biosíntesis de ácidos grasos a partir de sustratos como: glucosa, gluconato o etanol, que se convierten en ácidos grasos (Madison & Huisman, 1999) (figura 1), finalmente, está el tercer tipo de vía de síntesis tratándose de la elongación de la cadena, en la que los restos de acetil-CoA se condensan a 3-hidroxiacil-CoA (Kellerhals *et al.*, 1999)

Figura 1. Síntesis de Polihidroxicanoatos de cadena media a partir de ácidos grasos



Fuente: Babel y Steinbüchel, 2001.

Existe una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas con capacidad para sintetizar PHAs (Nikodinovic *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2016), en el grupo de las Gram negativas se encuentra *Wautersiaeutropha*, *Methylobacterium organophyllum*, *Pseudomonas oleovorans* y recombinantes de *Escherichia coli*. En las bacterias Gram positivas encontramos del género *Clostridium*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Bacillus* (Valappil *et al.*, 2007).

Debido a que los PHAs se pueden obtener a partir de recursos renovables se consideran materiales amigables con el medio ambiente y tienen un gran potencial para sustituir a los plásticos sintéticos. No obstante, el principal obstáculo para la producción industrial y comercial del biopolímero es el costo elevado de los sustratos utilizados en la fermentación bacteriana, por consiguiente, los PHAs son 15 veces más costosos que los polímeros derivados del petróleo, como el polipropileno (Mamtesh *et al.*, 2009).

## 1.2 CONDICIONES DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs

Entre los factores a tener en cuenta para la producción de PHAs se destacan la fuente de carbono, pH, temperatura, relación Carbono - Nitrógeno (C/N) y principalmente los costos de producción (Hisashi, 2016) donde el sustrato representa el 40%, por lo cual, en los últimos años se ha impulsado la búsqueda de fuentes de carbono disponibles, renovables y económicas para que el biopolímero sea competitivo en el mercado. Entre las materias primas naturales que se utilizan para la producción de PHAs incluyen residuos de la industria de biodiesel, desechos de almidón, suero de leche, aceites vegetales y aguas residuales industriales (Canadasa *et al.*, 2014; Aires Da Silva *et al.*, 2014; Ciesielski *et al.*, 2015; Hisashi *et al.*, 2016; Verlinden *et al.*, 2011).

Referente al suero de leche, se ha reportado que contiene lactosa (46-52%), lípidos (0-5%) y proteínas solubles (6-10%) (Callejas *et al.*, 2012). Este sustrato se encuentra en grandes cantidades en el mundo y es uno de los residuos que contamina los afluentes de agua (Jay *et al.*, 2015; Valentino *et al.*, 2015). En estudios realizados por Povolo *et al.*, (2010), emplearon el microorganismo *Cupriavidus necator*, que fue capaz de sintetizar hasta  $4,8\text{gL}^{-1}$  de P(3HB), utilizando como fuente de carbono permeado de suero y permeado de suero de leche hidrolizada.

Por otra parte, el almidón por su alto contenido de carbohidratos se puede utilizar como una alternativa viable para la producción de PHAs; no obstante, la mayoría de los procesos de fermentación para la producción de PHAs exigen la conversión del almidón a sustratos fáciles de sintetizar para los microorganismos como es la glucosa, mediante procesos de hidrólisis o rompimiento enzimático de las cadenas (Ciesielski *et al.*, 2015).

Bhatia *et al.*, (2015), obtuvieron que la cepa *Ralstonia eutropha* alcanzó una producción máxima de  $1,24\text{ g L}^{-1}$  de PHB que contenía 2% (w / v) de almidón como única fuente de carbono en un medio modificado que contiene 0,15% (w / v) de extracto de levadura y 10 mM glicina. De la misma manera la cepa modificada *E. coli* SKB99 acumuló PHB intracelular hasta el 57,4% de masa seca de la célula a partir de almidón.

Otro subproducto agroindustrial es la melaza de caña, se considera que es una fuente de carbono económica, está compuesta casi con el 45% de sacarosa y azúcares simples que los microorganismos pueden aprovechar para la síntesis de PHAs (Albuquerque *et al.*, 2010). En estudios realizados por Bengtsson *et al.*, (2010), muestra que cultivos microbianos mixtos en presencia de melaza como única fuente de carbono, presentan una acumulación de  $3,5\text{ g L}^{-1}$  de PHAs.

Entre otros sustratos empleados para la producción de PHAs está el glicerol crudo, se considera el principal subproducto de la producción de biodiesel, por ser una fuente de carbono rica y económica se puede utilizar para la producción de PHAs (Canadasa *et al.*, 2014). Estudios realizados por Muangwong *et al.*, (2016), encontraron que la cepa

*Acinetobacter* en presencia de glicerol como única fuente de carbono produjo 17,5 g L<sup>-1</sup> de PHAs.

Vale la pena mencionar que para la selección del sustrato se tienen en cuenta parámetros como el precio y la disponibilidad continua. Además, algunas fuentes de carbono de bajo precio como los residuos agrícolas y subproductos agroindustriales incurrir en costos adicionales, ya que se requiere un pre tratamiento para que el microorganismo lo transforme con mayor eficiencia (Suchada, 2010).

Diferentes autores reportan algunos parámetros de fermentación en estudios donde se han usado sustancias puras o bien subproductos agroindustriales como sustrato para la obtención de PHAs, dentro de estos se resalta el rango ideal de pH, el cual se encuentra entre 7 -7,5, utilizando HCl 1M y NaOH 1M para controlarlo (Hisashi *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016; Pais *et al.*, 2014).

Otro factor que se debe tener en cuenta es la temperatura, en estudios realizados por Kumar *et al.* (2016), reporta que la temperatura ideal para producir PHAs con residuos biológicos hidrolizados con la cepa *Bacillus cereus* es de 37°C, de igual manera Rodríguez *et al.* (2016) reportó que 35°C es la temperatura ideal para la producción de PHAs en condiciones salinas con la cepa *Bacillus megaterium*. Para sustratos como, manglar, jugo de ensilado de pasto y almidón de yuca, reportan una temperatura óptima de 30°C para la producción de PHAs (Levine *et al.*, 2016; Moorkoth *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2014; Cerrone *et al.*, 2015; Poomipuk *et al.*, 2014).

Respecto a la relación Carbono-Nitrógeno (C/N), un estudio realizado por Shailesh *et al.*, (2015), evaluaron diferentes relaciones (20:0,5, 20:1, 20:1,5, 20:2, y 20:3 w / w), obteniendo como resultado que la mejor relación para la producción de PHAs es 20:1 (cuadro 2), del mismo modo Rojas *et al.*, 2016 realizó una evaluación de diferentes relaciones (12:1, 16:1, 20:1, 24:1, 28:1) con el fin de producir polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono y la mejor relación C/N fue la 20:1.

Cuadro 2. Efecto de la relación Carbono-Nitrógeno en el crecimiento celular y la acumulación de PHAs

Proporción	Tmax (h)	DCW (g/L)	PHA (%)	PPHA (g/L)	RGLU (g/L)	RXYL (g/L)	RCELI O (g/L)	QPHA (g/L/h)	Y PHA (g/g)
20:0,5	72	5,1 ± 0,30	67,8 ± 1,6	2,92 ± 0,02	15	14	1,2	0,04	0,183
20:1	72	7,3 ± 0,15	71,3 ± 0,96	4,56 ± 0,04	0	0,5	0,8	0,063	0,243
20:1,5	72	7,8 ± 0,14	58,8 ± 1,3	3,14 ± 0,26	0	0,4	0,3	0,043	0,162
20:2	72	8,3 ± 0,2	40,6 ± 1,1	1,97 ± 0,41	0	0,3	0,8	0,027	0,104
20:3	72	8,7 ± 0,20	36,1 ± 1,3	1,89 ± 0,12	0	0	0,6	0,026	0,097
Tmax: momento en que se obtiene la máxima producción de PHA						DCW: peso celular seco			
PHA (%): Contenido del PHA			PHA: concentración de PHA			Rglu: glucosa residual			
Y PHA: rendimiento de PHA (PHA g/gd azúcar consumido)						QPHA: productividad PHA (=PPHA/TMAX)			

Fuente: Shailesh *et al.*, 2015

### 1.3 PROPIEDADES ELASTÓMERAS DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS

Los biopolímeros (PHAs) presentan propiedades termoplásticas y elastoméricas similares a los plásticos convencionales como el polietileno de baja densidad y polipropileno (cuadro 3) y es necesario aclarar que, dependiendo de la cepa bacteriana usada en el proceso fermentativo, es posible producir biopolímeros (homo y copolímeros) con propiedades que abarcan desde los plásticos rígidos y quebradizos hasta los elastómeros (Poirier *et al.*, 1995; Molina, 2016). Como es el caso del género *Pseudomonas* que acumulan PHAs de cadena media (6-14 carbonos) que presentan propiedades elastoméricas de interés en el campo médico (Chardron *et al.*, 2010; Marchessault *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2011; Riaño *et al.*, 2011).

Cuadro 3. Propiedades termoplásticas y elastoméricas de PHAs frente a los plásticos convencionales

	Temperatura de Fusión Tm (°C)	Temperatura de Cristalización Tg(°C)	Fuerza de Tensión (Mpa)	Extensión hasta el quiebre (%)	Módulo de young (Gpa)
<b>P3HB</b>	180	4	40	5	3.5
<b>P(3HB-co-20% 3HV)</b>	145	-1	9	50	1.2
<b>P4HB</b>	53	-48	104	150	0.15
<b>mcl-PHAs</b>	61	-35	9	380	0.008
<b>Policilato</b>	-	-106	68	50	2.2
<b>Polietileno</b>	100	-78	23	200	1.13
<b>Polipropileno</b>	176	-10	38	400	1.7
<b>Poliestireno</b>	240	100	60	7	3

### 1.4 APLICACIONES DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS

Entre las aplicaciones industriales de los PHAs se reporta la fabricación de películas de recubrimiento alimentario, bolsas y botellas, ingeniería de tejidos e implantes médicos temporales (Muangwong *et al.*, 2016; Liya *et al.*, 2016). En estudios recientes realizados por Castro *et al.*, (2016) utilizan nanocompuestos antimicrobianos totalmente renovables y biodegradables en película y de recubrimiento para el envasado de alimentos. De igual manera Fabra *et al.*, (2016) realizaron una combinación de PHAs con nanokeratin para desarrollar películas alimenticias.

Los polihidroxicanoatos, además, tienen la posibilidad de ser utilizados en ingeniería de tejidos sanguíneos, útil en situaciones donde la regeneración no es posible y se requiere intervención médica (Salazar, 2010). A nivel neurológico estudios realizados por Yu *et al.*, (2009) demuestra que membranas de PHAs pueden ser utilizadas a nivel neuronal, beneficiando el transporte de nutrientes y productos metabólicos, esta investigación es base para lograr reemplazar células que no se regeneran de forma natural en el cuerpo.

Otras aplicaciones que tienen los polihidroxialcanoatos son la fabricación de botellas desechables (para el envase de alimentos), bolsas y otros productos como pañales, servilletas, rastrillos, vasos y cubiertos, lo que ayudaría a disminuir el mercado del material sintético y reemplazarlo por biodegradable y así contribuir con la disminución de los índices de contaminación mundial (Keshavarz *et al.*, 2010; González *et al.*, 2013).

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 SELECCIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS)

La selección de los microorganismos productores de polihidroxicarboxilatos, se realizó a partir de 160 bacterias silvestres presentes en el cepario del grupo de investigación ASUBAGROIN de la Universidad del Cauca. Para esto, los microorganismos previamente activados, se repicaron en agar plate count suplementado con glucosa y azul nilo; los aislados que presentaron fluorescencia positiva se evaluaron en tres fuentes de carbono (sacarosa, almidón y lactosa) y finalmente, los que presentaron fluorescencia intensa en los 4 sustratos se sometieron a tinción con sudan negro y tinción de Gram, además fueron identificados mediante la secuencia del gen 16S rRNA y se seleccionaron para el desarrollo del segundo objetivo.

**2.1.1 Activación de microorganismos.** La activación de los microorganismos se realizó a partir del conservado en glicerol, tomando una muestra con asa de argolla e inoculando en 9 mL de caldo nutritivo el cual se llevó a incubación por 24 horas a 35°C. Posteriormente, cada aislado se sembró por agotamiento en cajas con agar plate count, que fueron llevadas a incubación durante 24 o 48 horas a 35°C (Mesquita *et al.*, 2015).

**2.1.2 Evaluación de bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos en un medio con glucosa y azul Nilo.** Las bacterias previamente activadas se replicaron por agotamiento en cajas de Petri con agar Plate Count suplementado con glucosa (15 g L<sup>-1</sup>) y Azul Nilo (0,1% en 10 mL de acetona); las cajas se incubaron por 72 horas a 35°C. Cada 24 horas se observó fluorescencia en el equipo Benchtop UV transilluminators, las bacterias que presentaron fluorescencia azul y verde se seleccionaron para posteriormente ser evaluadas en sacarosa, lactosa y almidón (Otero y Fernandez, 2013).

**2.1.3 Evaluación de bacterias acumuladoras de polihidroxicarboxilatos en un medio con sacarosa, almidón, lactosa y azul Nilo.** Las bacterias seleccionadas en el ítem anterior, previamente activadas se sembraron por agotamiento en cajas de Petri con medio de cultivo compuesto por peptona bacteriológica 5 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 2,5 g L<sup>-1</sup>, agar bacteriológico 15 g L<sup>-1</sup>, azul nilo al 0,1% y sacarosa, almidón o lactosa 15 g L<sup>-1</sup> respectivamente con una relación C/N 3:1. Las cajas se incubaron por 72 horas a 35 °C. Cada 24 horas se observó fluorescencia en el equipo Benchtop UV transilluminators. Las bacterias que presentaron fluorescencia positiva en los cuatro sustratos evaluados se sometieron a una tinción con negro sudan y tinción de Gram (Zain *et al.*, 2016).

**2.1.4 Tinción con negro sudán.** A partir de un cultivo de 24 horas, se tomó una colonia con un asa y se realizó un extendido y fijación con calor. Posteriormente se adicionaron 3 gotas de negro sudan III, durante 15 minutos e inmediatamente se sumergió el



portaobjetos en xileno durante 10 segundos, se dejó evaporar el xileno y se adicionó safranina por 10 segundos como colorante de contraste, inmediatamente se lavó con agua y se dejó secar completamente. Las placas se observaron bajo el lente 100x del microscopio, en busca de gránulos de color negro dentro de las células, lo que indicó presencia de polihidroxialcanoatos (Burdón, 1946). Este procedimiento se repitió cada 24 horas hasta las 72 horas.

**2.1.5 Descripción macroscópica y tinción de Gram.** Las descripciones macroscópicas se realizaron a cultivos de 24 horas de incubación y se determinaron las características de los microorganismos a través de aspectos como: forma, margen, elevación, textura, características ópticas, tamaño y pigmentación (Cappuccino & Sherman, 2004).

Por otra parte, los microorganismos se sembraron e incubaron por 24 horas a 35°C y con ayuda de un asa de argolla se tomó una muestra y realizó un frotis en un portaobjetos con una gota de agua hasta tener una mezcla homogénea, se dejó secar. se adicionó una gota de cristal violeta, se dejó reposar por 1 minuto, transcurrido este tiempo se enjuagó con agua para adicionar 1 gota de lugol dejándolo actuar por un minuto, se lavó nuevamente con agua, para agregar etanol mas acetona por 30 segundos, a continuación se lavó con agua y añadió 1 gota de safranina por 45 segundos, finalmente se lavó y secó con papel absorbente, las muestras se observaron bajo el lente de 100x en el microscopio, para visualizar coloraciones violetas o rosadas según la morfología celular bacteriana (Cappuccino & Sherman, 2004).

**2.1.6 Identificación taxonómica mediante el gen ARNr 16s.** Las bacterias que presentaron fluorescencia intensa para la producción de PHAs en los sustratos glucosa, sacarosa, almidón y lactosa se identificaron taxonómicamente a nivel molecular mediante secuenciación del gen ARNr 16s y se compararon con bases de datos existentes.

**2.1.6.1 Extracción de DNA bacteriano.** Para la extracción de DNA bacteriano, inicialmente se realizó la activación de los microorganismos en tubos de ensayo con 9 mL de caldo Luria Bertani (LB) se incubó a 35°C durante 24 horas, posteriormente se activó cada cepa bacteriana seleccionada en 25 mL de caldo LB, el cual se llevó a incubación por 24 horas; después de este tiempo se realizó una centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos, el pellet celular se trató con 2,4 mL de tampón TE 1 M y los tubos siempre se mantuvieron en hielo, consecutivamente se les adicionó 62,5 µL de SDS al 10% y 6,25 µL de proteinasa K en una concentración de 20 mg mL<sup>-1</sup>, se agitó suavemente y se llevó a baño maría por 1 hora a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se colocó nuevamente los tubos sobre hielo se les adicionó 300 µL de NaCl 5 M, 188 µL de CTAB 10%, se agitó vigorosamente y se llevó a baño maría por 20 minutos a 65°C. Después de este tiempo, se dejó enfriar los tubos a temperatura ambiente y se agregó igual volumen de cloroformo - alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 10000 rpm por 20 minutos.

El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se le agregó 3 µL de RNAsa (10 mg mL<sup>-1</sup>), se incubó por 1 hora a 37 °C. Después de este tiempo se adicionó igual volumen de

cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 10000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se precipitó el DNA con 0,6 mL de isopropanol frío, se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 20 minutos, el pellet obtenido se lavó con 200 µL de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se secó a temperatura ambiente por 12 h. Finalmente el DNA se re suspendió en 500 µL de TE 1 M (Souza *et al.*, 2012).

**2.1.6.2 Electroforesis en gel de agarosa.** La integridad del DNA extraído se verificó en geles de agarosa al 0,8 %, como agente revelador se utilizó el colorante safeview Green “ABMgood” a los cuales se les adicionó 5 µL/30 ml de agarosa y se dejó solidificar. Para el montaje de las muestras en cada pozo se adicionaron 2 µL de azul de bromofenol y 5 µL del DNA obtenido (Sambrook *et al.*, 1989). Como marcador de tamaño molecular se utilizó lambda *Hind* III y las condiciones de corrida fueron 70V, 73mA, 37w por 1 hora y 30 minutos. Finalmente, el gel se visualizó en un foto-documentador Benchtop UV transilluminators a una longitud de onda de 302nm.

**2.1.6.3 Amplificación en cadena de la polimerasa.** Una vez obtenido DNA de buena calidad se procedió a amplificar el gen en un volumen de PCR de 50 µL, para lo cual se preparó una mezcla de reacción que contenía: 1µL de primer 27F 5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' (Lane, 1991) (20 µM), 1µL de primer 1041R 5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3' (Nubel *et al.*, 1996) (20 µM), 25 µL de safe Green 2x PCR taq maxter mix “QIAGEN” casa comercial, 22 µL de agua grado molecular y 1 µL de DNA. El proceso de termociclado se realizó en el equipo MULTIGENE Optimax bajo los siguientes parámetros: 95°C por 2 minutos; 30 ciclos de: 94°C por 2 minutos, 55°C por 1 minuto y 72°C por 3 minutos y una extensión final de 10 minutos a 72°C (Souza *et al.*, 2012). Una vez finalizado el proceso se verificó la calidad de los amplificados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% utilizando 1 Kb ladder como marcador de tamaño molecular.

**2.1.6.4 Secuenciación y edición de secuencias.** Los amplificados que presentaron el tamaño esperado (1500 pb) y una banda de buena calidad se enviaron a la compañía CORPOGEN para su secuenciación. Las secuencias se visualizaron en el programa Chromas lite version 2.6.2; cada una se verificó en su totalidad y se descartaron las que presentaron ruidos propios del secuenciador utilizado. Posteriormente, las secuencias seleccionadas se editaron en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.4 (Altschul *et al.*, 1990; Cole *et al.*, 2009; Tamura *et al.*, 2011).

**2.1.6.5 Comparación con las bases de datos.** Las secuencias obtenidas después del proceso de edición se compararon en la base de datos Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) para esto, se ingresó al enlace “Classifier” y se cargó el archivo que se guardó en BioEdit con las secuencias de interés, y se envió la información, en este punto se obtuvo una información preliminar de la secuenciación, posteriormente se ingresó en el enlace “Seqmatch”, se cargó nuevamente la secuencia guardada en BioEdit y se seleccionaron las opciones: Strain (Both), Source (Both), Size (>1200), Quality (Good), Taxonomy (Nomenclatural), KNN Matches (5), se envió la información.

Finalmente se seleccionó la opción “Show printer friendly results” para visualizar el resultado de acuerdo con el número de secuencias a comparar escogidas (Cole, J *et al.*, 2009).

Por otra parte, la secuencia parcial final obtenida después del proceso de edición también se comparó con la base de datos del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) para lo cual se ingresó en la opción BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) específicamente nucleotide blast, se cargó la secuencia editada en formato fasta, se seleccionó nucleotide collection (nr/nt), Highly similar sequences (megablast) y finalmente se aplicó la opción BLAST para visualizar el resultado (Altschul *et al.*, 1990).

## **2.2 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR LAS BACTERIAS SELECCIONADAS EMPLEANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

Las bacterias seleccionadas se sometieron a una fermentación tipo batch utilizando glucosa, sacarosa, lactosa y almidón como fuentes de carbono. En cada fermentación se realizó seguimiento de biomasa, consumo de sustrato y formación de producto el cual finalmente se caracterizó por cromatografía líquida acoplada a un detector de masas (HPLC-MS) y con la prueba de Infrarrojo espectral transformada de Fourier (IR-FT).

**2.2.1 Activación de bacterias.** Las bacterias ya seleccionadas se activaron en tubos de ensayo de 9 mL de caldo nutritivo y se incubaron a 35°C por 24 horas; se replicó en un tubo de ensayo con 9 mL de medio de cultivo utilizado para la fermentación, compuesto por extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g L<sup>-1</sup>, y la respectiva fuente de carbono así: glucosa 27,75 g L<sup>-1</sup>, sacarosa 26,38 g L<sup>-1</sup>, lactosa 26,38 g L<sup>-1</sup> y almidón 25,22 g L<sup>-1</sup>, cantidades previamente balanceadas para mantener la relación Carbono:Nitrógeno 20:1; seguidamente se incubaron los tubos a 35°C por 24 horas y se sembraron 5 mL del cultivo activado en 50 mL del medio de cultivo MC1 manteniendo las mismas condiciones de incubación con una velocidad de agitación de 100 rpm (Rodríguez *et al.*, 2016).

**2.2.2 Cinética de crecimiento para la determinación de la fase estacionaria.** Con el fin de conocer la fase estacionaria de cada una de las cepas evaluadas en los diferentes sustratos, estas fueron sometidas a una fermentación tipo Batch, en erlenmeyers de 250 mL con un volumen de trabajo de 220 mL y un inóculo al 10% de las bacterias previamente activadas manteniendo las mismas condiciones de incubación (Levine *et al.*, 2016; Shailesh, *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). En el transcurso de la fermentación se hicieron mediciones periódicas de biomasa por gravimetría (cada 6 horas en el día y cada 12 horas en la noche) durante tres días (72 horas).

**2.2.3 Cinética de las bacterias *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia sp* UC-082 Y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAVE2M4 en los sustratos glucosa, sacarosa, lactosa y almidón.** Conociendo la fase estacionaria de cada una de las cepas se prosiguió a determinar la acumulación del biopolímero en los diferentes sustratos a evaluar, para esto

se realizó una fermentación tipo Batch en erlenmeyers de 300 mL con un volumen de trabajo de 250 mL y un inóculo al 10% de las bacterias previamente activadas. La temperatura de fermentación fue de 35°C, con una agitación de 100 rpm y una relación Carbono-Nitrógeno de 20:1 (Levine *et al.*, 2016; Shailesh *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). En el transcurso de la fermentación se hizo una medición inicial y luego en la fase estacionaria se realizaron mediciones periódicas (cada 6 horas) respectivamente de biomasa, sustrato y producto de cada bacteria con su respectiva fuente de carbono.

**2.2.4 Cuantificación de biomasa.** Para la cuantificación de la biomasa por gravimetría se utilizaron tubos falcón de 15 mL previamente lavados, secados, desecados y pesados, donde se transfirieron 14 mL de muestra de cada reactor y se sometieron a centrifugación a 10000 rpm por 20 minutos, transcurrido este tiempo se eliminó el sobrenadante y los pellets obtenidos en cada uno de los tubos se sometieron a un proceso de secado a 80°C hasta obtener peso constante, posteriormente las muestras pasaron al desecador para evitar que absorbieran humedad (Cruz *et al.*, 2016). Finalmente, se calculó la biomasa formada por cada una de las cepas, calculando la diferencia entre el peso del falcón con biomasa y el peso del falcón vacío.

**2.2.4.1 Cuantificación de sustrato.** La cuantificación del consumo del sustrato se realizó por DNS para glucosa y lactosa y por el método de fenol ácido sulfúrico para sacarosa y almidón.

**2.2.4.2 Determinación de azúcares por el método de Ácido Dinitrosalicílico (DNS).** Se inició con la preparación de la solución DNS, disolviendo 0,5 g de ácido 3,5 Dinitrosalicílico en 20 mL de agua destilada, a continuación se adicionaron 15 g de hidróxido de sodio disuelto previamente en 7,5 mL de agua destilada, se mezclaron y colocaron en baño con agua a 60°C con agitación constante, transcurrido este tiempo se añadió en fracciones, 15 g de tartrato de sodio y potasio, se aforó a 50 mL con agua destilada, se dejó reposar por 24 horas y finalmente se filtró y envasó en un frasco ámbar.

La curva de calibración para DNS se realizó con una solución madre de glucosa anhidra de 5000 ppm, las concentraciones de glucosa utilizadas para la curva patrón fueron: 200; 400; 600; 800; 1000 y 1200 ppm (cuadro 4).

Cuadro 4: Concentraciones de la curva de calibración de DNS

Concentración de glucosa mg L <sup>-1</sup>	200	400	600	800	1000	1200
mL stock glucosa	0,4	0,8	1,2	1,6	2	2,4
mL de agua destilada	9,6	9,2	8,8	8,4	8	7,6

Para cuantificar el consumo de azúcar, en las fermentaciones con glucosa y lactosa se tomaron de cada reactor 14 mL de muestra en tubos falcón de 15 mL y se centrifugó a

10000 rpm por 20 min, el sobrenadante obtenido fue sometido a esterilización en baño maría a 90°C por 10 minutos, de esta muestra se transfirieron 2 mL de sobrenadante que se conservaron en freezer hasta tener todas las muestras del seguimiento. Posteriormente las muestras fueron filtradas con ayuda de una bomba de vacío, seguida de una dilución de las muestras, de 250 µL y 300 µL para glucosa y lactosa respectivamente, que fueron aforadas a 10 mL, con agua destilada, de esta dilución se transfirió 1 mL en un tubo de ensayo recubierto con foil de aluminio para evitar el contacto directo con la luz, más 1 mL de solución con reactivo DNS y 3 mL de agua destilada, el mismo proceso se llevó a cabo para un blanco con la diferencia de que se adiciono 1 mL de agua destilada en vez de la muestra ya diluida, las soluciones fueron sometidas a agitación fuerte y se llevó por 5 minutos a un baño termostato en ebullición, pasado este tiempo las muestras se llevaron a un baño con hielo por 10 minutos más; finalmente se leyó la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro (Miller,1959).

**2.2.4.3 Determinación de azúcares por el método de Fenol ácido sulfúrico.** Se inició con la realización de la curva de calibración para el método fenol ácido sulfúrico con una solución madre de glucosa 400 ppm, para esto se tomaron 10,20 g de glucosa anhidra, y se llevó la solución de fenol del 99,5% al 5% las concentraciones de glucosa utilizadas para la curva patrón fueron: 10; 20; 30; 40; 50 y 60 ppm (Cuadro 5).

Cuadro 5: Concentraciones de la curva de calibración de fenol ácido sulfúrico

<b>Concentración de glucosa mg L<sup>-1</sup></b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>50</b>	<b>60</b>
mL stock glucosa	0,25	0,50	0,75	1,0	1,25	1,50
mL de agua destilada	9,75	9,50	9,25	9,0	8,75	8,5

Para cuantificar el consumo de azúcar en las fermentaciones con sacarosa y almidón se tomaron 14 mL de muestra en tubos falcón y se centrifugaron a 10000 rpm por 20 min, el sobrenadante obtenido fue sometido a esterilización en baño maría a 90°C por 10 minutos, seguidamente se tomaron 2 mL de sobrenadante y se conservaron en freezer hasta tener todas las muestras del seguimiento.

La realización de la prueba consistió en tomar 10 µL de fermentado con sacarosa como fuente de carbono hasta las 42 hr del seguimiento, para los tiempos restantes se aumentó la concentración a 30 µL, estas muestras fueron previamente filtradas y aforadas a 10 mL, de estas diluciones se tomó 1 mL de muestra en tubos de ensayo cubiertos con foil de aluminio para evitar el contacto directo con la luz, se continuó con la adición de 0,5 mL de solución de fenol y 2,5 mL de ácido sulfúrico, el mismo proceso se llevó a cabo para un blanco con la diferencia de que se adiciono 1 mL de agua destilada en vez de las muestras ya diluidas.

Las muestras se dejaron en reposo por 15 minutos, pasado este tiempo se las agito vigorosamente con la ayuda de un vortex y fueron sometidas a un baño termostato a 30°C por 15 minutos, finalmente se leyó la absorbancia a 492 nm.

El mismo tratamiento se realizó al fermentado con almidón como fuente de carbono con la diferencia que para esta prueba se tomaron 10 µL de fermentado hasta las 48 hr y en adelante se aumentó la concentración a 30 µL hasta el final del seguimiento (Galvao *et al.*, 2014; Poomipuk *et al.*, 2014).

**2.2.5 Caracterización del biopolímero.** Se realizó la extracción y purificación del biopolímero, el cual fue caracterizado mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de masas HPLC-MS e IR-FT.

**2.2.5.1 Extracción de PHAs.** Para la extracción de PHAs se tomaron de cada reactor 14 mL y se centrifugó a 10000 rpm por 20 min, el sobrenadante se eliminó y el pellet se sometió a un lavado con 5 mL de agua y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se eliminó y el pellet se trató con 3 mL de hipoclorito de sodio al 5% más ácido etilendiaminotetraacético 10 mM. Posteriormente se llevó a baño maría por hora y media a 60°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 20 min y se eliminó el sobrenadante, el pellet obtenido se lavó con 5 mL de agua destilada, acetona y etanol realizando centrifugaciones a 10000 rpm por 10 min entre cada solución agregada. Finalmente, el precipitado obtenido se llevó a secar a 70°C hasta peso constante (Castro *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2015; Otero y Fernández, 2013; Fernández *et al.*, 2006; Jacquél *et al.*, 2008; Cha *et al.*, 2015).

**2.2.5.2 Caracterización del polímero obtenido por cromatografía líquida de ultra alta precisión acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS).** Para la caracterización de PHAs se utilizaron 12 muestras, las cuales se sometieron a una hidrólisis ácida de PHAs con el fin de caracterizar los monómeros presentes en el biopolímero. Para esto fue necesario colocar 12 mg de muestra en tubos de ensayo de vidrio con tapa rosca y se les adicionó 12 mL de solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M), el tubo de ensayo se cerró herméticamente y se incubó a 90° C en un baño de arena durante 12 h. Después de enfriar, la solución se trató con NaOH (1 M), para neutralizar la solución e inmediatamente se retiró un mililitro y se adicionó a un vial con un mililitro de cloroformo y se le aplicó vortex durante 1 minuto, posteriormente se retiró la parte orgánica y se pasó por un filtro de 2 µm depositando la muestra en un vial que fue llevado al cromatógrafo UHPLC Dionex 3000 con bomba binaria (Ge *et al.*, 2016).

El análisis se llevó a cabo en un UHPLC Dionex 3000 con bomba binaria, los parámetros de cromatografía líquida son los siguientes: Columna C18, referencia titan C18, diámetro 2.09 mm, largo 10 cm, tamaño de partícula de 1,9 µm, solventes (A) Agua y (B) Acetonitrilo, flujo 300 µL/min, gradiente equilibrio 5 min, duración 10 min (0% a 100% (B)), constante 5 min, retorno 4 min y compartimiento de columna 40°C (Murugan *et al.* 2016).

Los parámetros de análisis para detector de masas Thermo Exactive Plus Orbitrap, son los siguientes: Sheath gas 30, S-Lens 50, spray voltage 2,5, temperatura gas aux 150 °C, AGC target 1,00E+06 y temperatura capilar de 112°C(Tan *et al.* 2014).

### 2.2.5.3 Caracterización del polímero obtenido por espectroscopía Infrarroja (IR-FT).

En la prueba de Infrarrojo espectral transformada de Fourier (IR-FT), se prepararon pastillas transparentes por prensado, las cuales están compuestas por bromuro de potasio (KBr) grado analítico y PHAs altamente macerado. Las pastillas se colocaron en el compartimiento del equipo (IRAffinity-1s Fourier transform infrared spectrophotometer, SHIMADZU) y se procedió a hacer un barrido en toda la franja de infrarrojo. Finalmente se obtuvo el espectro para su posterior análisis (Rojas *et al.*, 2016).

**2.2.6 Diseño experimental.** Para evaluar la producción de Polihidroxilcanoatos por las bacterias seleccionadas empleando diferentes sustratos, se aplicó inicialmente un diseño de medidas repetidas simple con un solo factor intra-sujeto que fue el tiempo de toma de muestra para cada bacteria en cada sustrato, con el fin de encontrar el punto máximo de producción de producto y biomasa (cuadro 6). Posteriormente, se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3 x 4, el primer factor fueron las bacterias seleccionadas (3) y el segundo factor los sustratos evaluados (4), la variable de respuesta fue la producción de polihidroxilcanoatos (cuadro 7), todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Cuadro 6. Diseño de medidas repetidas simple

Diseño	Factor intrasujeto (FW)	niveles de FW	Factor intersujeto (FB)	Variables de respuesta
Medidas repetidas simples	Tiempo	Horas de seguimiento	-	Producción máxima de PHAs (g/L)
				Producción máxima de Biomasa (g/L)

Cuadro 7. Diseño completamente al azar con arreglo factorial

Factores	Niveles	Variables de Respuesta
Bacterias	Bac082	Producto PHAs (g/L)
	Bac036	
	PSAV2EM4	
Sustrato	Glucosa	
	Sacarosa	
	Lactosa	
	Almidón	

### 3. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1 SELECCIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS

A continuación, se presentan los resultados de la selección de las bacterias productoras de PHAs de la colección de aislamientos presentes en el cepario del grupo de investigación ASUBAGROIN de la Universidad del Cauca, a partir de glucosa, sacarosa, lactosa y almidón.

**3.1.1 Evaluación de bacterias acumuladoras de Polihidroxicanoatos en un medio con glucosa y azul nilo.** De las 160 bacterias evaluadas por medio de la técnica de tinción Azul Nilo, 31 presentaron fluorescencia (19,375%), de las cuales 25 mostraron fluorescencia azul y 6 fluorescencia verde (anexo A, figura 2).

Figura 2. Fluorescencia emitida. a) Azul, bacterias PSAVE2M4; b) Verde, BAC UC 131



Diferentes autores han reportado que la tinción de azul Nilo identifica cualitativamente bacterias productoras de PHAs (Ansari y Fatma, 2016; Mesquita et al., 2015; Zain *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016; Masood *et al.* 2012), dado que al oxidarse forman compuestos solubles en lípidos neutros que al unirse al polímero emiten fluorescencia (Ostle & Holt, 1982 y Solaiman *et al.*, 2000).

**3.1.2 Selección de bacterias acumuladoras de Polihidroxicanoatos por fluorescencia en medio con sacarosa, almidón y lactosa suplementado con azul nilo.** Las 31 bacterias seleccionadas anteriormente se evaluaron en tres fuentes de carbono diferentes: sacarosa, lactosa y almidón. De los aislados evaluados el 48,39% (15 aislados) presentaron fluorescencia en almidón, el 45,16% en sacarosa (14 aislados) y finalmente el 32,26% (10 aislados) en lactosa (cuadro 8).



Cuadro 8. Crecimiento y fluorescencia de bacterias evaluadas en medios con glucosa, sacarosa, lactosa y almidón suplementado con azul nilo a las 72 horas de crecimiento

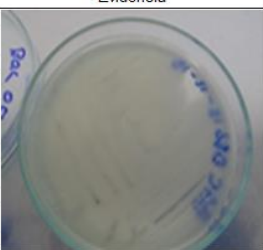



Bacteria	Glucosa		Sacarosa		Lactosa		Almidón	
	Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia
BAC 052	+	Azul tenue	+	Azul tenue	-	-	+	Azul tenue
BAC UC 130	+	Verde tenue	-	-	+	Verde tenue	+	Verde tenue
PSAR3M4	+	Verde tenue	+	Verde tenue	-	-	+	Verde tenue
BAC 017	+	Azul tenue	+	Azul tenue	+	Azul tenue	+	Azul tenue
PCAR3M4	+	Verde tenue	+	verde intenso	+	Verde tenue	-	-
PSAV2EM4	+	Azul intenso	+	Azul intenso	+	Azul intenso	+	Azul tenue
BAC 065	+	Azul tenue	+	Azul tenue	-	-	-	-
BAC 062	+	Azul tenue	+	Azul tenue	-	-	+	Azul tenue
BAC UC 097	+	Azul tenue	+	Azul intenso	-	-	+	Azul intenso
BAC 057	+	Azul tenue	-	-	-	-	-	-
BAC 048	+	Azul tenue	+	Azul tenue	-	-	-	-
BAC UC 131	+	Verde tenue	-	-	-	-	-	-
BAC 045	+	Azul tenue	-	-	-	-	-	-
BAC UC 115	+	Verde tenue	+	Verde tenue	+	Verde tenue	-	-
BAC 036	+	Azul tenue	+	Azul intenso	+	Azul intenso	-	Azul intenso
BAC 035	+	Azul tenue	-	-	-	-	-	-
BAC 033	+	Azul tenue	-	-	-	-	-	-
BAC 082	+	Azul tenue	+	Azul intenso	+	Azul intenso	+	Azul intenso
BAC UC 104	+	Azul tenue	-	-	-	-	-	-
BAC UC 133	+	Azul tenue	-	-	-	-	+	Azul intenso
BAC 056	+	Azul tenue	+	Azul tenue	-	-	+	Azul tenue
BAC UC 189	+	Verde tenue	-	-	-	-	-	-
BAC 011	+	Azul tenue	-	-	-	-	+	Azul tenue
BAC 014	+	Azul tenue	-	-	+	Azul tenue	-	-
BAC 004	+	Azul tenue	-	-	-	-	+	Azul tenue
BAC 001	+	Azul tenue	-	-	+	Azul tenue	-	-
BAC UC 111	+	Azul tenue	-	-	+	Azul tenue	+	Azul tenue
BAC UC 093	+	Azul tenue	-	-	-	-	-	-
BAC 006	+	Azul tenue	-	-	-	-	+	Azul tenue
BAC 009	+	Azul tenue	+	Azul tenue	-	-	-	-
BAC 010	+	Azul tenue	-	-	-	-	-	-

**3.1.3 Tinción con negro sudán.** De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionaron las bacterias BAC 017, BAC 036, BAC 082, PSAV2EM4 ya que presentaron fluorescencia bajo la luz UV en los cuatro sustratos. Para corroborar que las bacterias seleccionadas producían PHAs se realizó la prueba de negro sudan, y en esta

prueba resultaron positivas solo las cepas BAC 036, BAC 082 y PSAV2EM4. En contraste, la adherencia de color negro en la bacteria BAC 017 fue mínima, indicando la poca formación de gránulos (Barbosa, *et al.* 2005).

**3.1.4 Descripción macroscópica y tinción de Gram.** La descripción macro y microscópica de las 4 bacterias seleccionadas indican que existen diferencias y similitudes entre ellas, las diferencias más evidentes se ubicaron en su forma, elevación, textura, propiedad óptica, margen y configuración, mientras que parte de sus semejanzas se presentaron en la tinción diferencial de Gram, donde tres de las cuatro bacterias (BAC 017, BAC 036, PSAV2EM4) corresponden a bacilos esporulados Gram positivos, a diferencia de la bacteria BAC 082 que se trata de un bacilo Gram negativo (figura 3).

Figura 3. Descripción macro y microscópica de las bacterias BAC 082, BAC 036, PSAVE2M4, BAC 017

		BAC 082		Evidencia
Descripción Macroscópica	Forma	irregular		
	Margen	filamentosa		
	Elevación	plana		
	Superficie	pulvulenta		
	Textura	membranosa		
	Propiedad Óptica	opaca		
	Tamaño	grande		
	Configuración	filamentosa		
	Color	blanca		
	Tinción de gram	Gram -		
Fluorescencia	azul			
		BAC 036		Evidencia
Descripción Macroscópica	Forma	irregular		
	Margen	irregular		
	Elevación	elevada		
	Superficie	pulvulenta		
	Textura	membranosa		
	Propiedad Óptica	opaca		
	Tamaño	grande		
	Configuración	filamentosa		
	Color	blanca		
	Tinción de gram	Gram +		
Fluorescencia	Azul			
		PSAV2EM4		Evidencia
Descripción Macroscópica	Forma	irregular		
	Margen	ondulada		
	Elevación	plana		
	Superficie	pegajosa		
	Textura	cremosa		
	Propiedad Óptica	traslucida		
	Tamaño	Grande		
	Configuración	irregular		
	Color	beige		
	Tinción de gram	Gram +		
Fluorescencia	Azul			
		BAC 017		Evidencia
Descripción Macroscópica	Forma	circular		
	Margen	ondulada		
	Elevación	convexa		
	Superficie	lisa		
	Textura	cremosa		
	Propiedad Óptica	brillante		
	Tamaño	grande		
	Configuración	redonda con margen elevado		
	Color	beige		
	Tinción de gram	Gram +		
Fluorescencia	Azul			

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se decidió continuar el proceso de fermentación con tres bacterias (PSAV2EM4, BAC 036, BAC 082), dado que presentaron fluorescencia intensa en la tinción de azul nilo y mayor adherencia de color negro manifestando presencia de gránulos pigmentados en la prueba negro sudán, indicando versatilidad y capacidad de producción de Polihidroxicarboxilatos.

Silva *et al.*, (2016) evaluaron la capacidad de cultivo de 24 aislados provenientes de la selva atlántica (AL, Brasil) y de lodos Agroindustriales (Coruripe-AL, Brasil), en un medio de sales minerales, con diferentes fuentes de carbono como: glucosa, aceite de soja, glicerol y suero de leche, aquellos que presentaron mayor turbidez en su medio de cultivo, fueron seleccionados para hacer tinción con Negro sudan y Azul Nilo donde se encontró que la detección de microorganismos con capacidad de acumular el polímero mediante cualquiera de estos colorantes es eficiente, además de ser fiable para estimar la concentración de polihidroxicarboxilatos en las células. La tinción con Nilo azul según este autor otorga propiedades de mayor selectividad y sensibilidad para la identificación de gránulos intracelulares de Polihidroxicarboxilatos, ya que los lípidos de las membranas celulares y otros componentes celulares no absorben cantidades suficientes de colorante para emitir fluorescencia, indicando que estas tinciones junto con Negro sudan son funcionales para estimar la conglomeración de polihidroxicarboxilatos en las células.

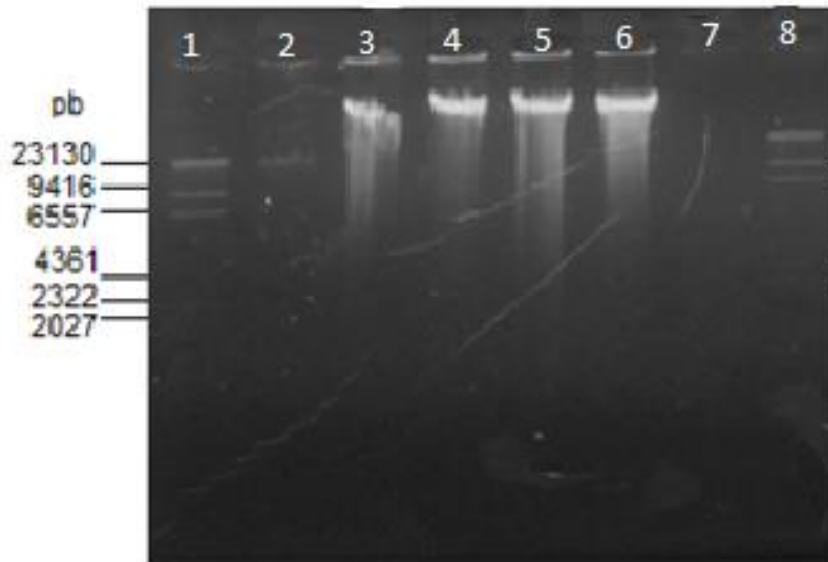
Diferentes autores han reportado que la tinción con azul Nilo identifica cualitativamente bacterias productoras de PHAs (Ansari y Fatma, 2016; Mesquita *et al.*, 2015; Zain *et al.*, 2016; Masood *et al.* 2012).

la mayoría de autores citados han identificado la producción de Polihidroxicarboxilatos a través de tinción directa con azul nilo sobre la biomasa bacteriana a diferencia de autores como Otero y Fernández (2013) que suplementaron este colorante al medio de cultivo como lo realizado en esta investigación.

Así mismo, las tinciones con negro sudan ha sido ampliamente utilizada por varios autores con el fin de detectar bacterias que producen Polihidroxicarboxilatos (Ganapathy *et al.*, 2016; Sabbir & Tasneem., 2016; Mesquita *et al.*, 2015; Priyanka *et al.*, 2015). Las coloraciones con negro sudan demuestran el contenido graso intracelular de las bacterias formando una película bacteriana de color negro o azul oscuro que contrasta con la safranina, hecho que permite visualizar la presencia o ausencia del polímero de naturaleza lipídica en forma de gránulos intracelulares (Burdon, 1946; Blanco, 2010; Salgaonkar *et al.*, 2013; Urtuvia *et al.*, 2014).

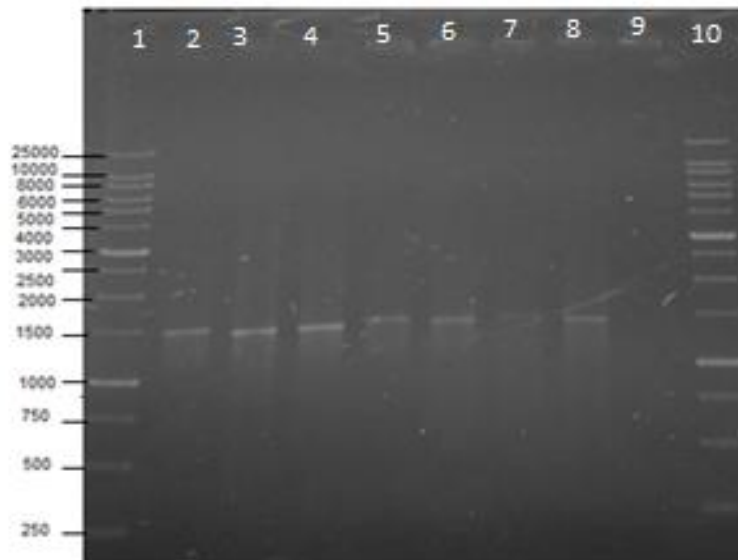
**3.1.5 Identificación taxonómica de las bacterias seleccionadas mediante el gen ARNr 16s.** En la figura 4 se presenta el resultado del DNA total obtenido de los aislados BAC 082, BAC 036 y PSAV2EM4 se puede apreciar que en el carril 4, 5 y 6 se obtuvo una banda definida con fluorescencia intensa ubicadas cerca a la banda de mayor tamaño molecular (23130pb).

Figura 4. Gel de agarosa al 0,8% para verificar la calidad del DNA. 1 y 8 marcador lambda Hind III, carriles 2 al 6 contienen muestras de DNA extraído de cepas BAC 082, BAC 036, PSAVE2M4, BAC 082, BAC 036



En cuanto al gen amplificado mediante PCR, es posible evidenciar que se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 1500pb para cada cepa, con lo que se puede concluir que se obtuvieron amplificados esperados del gen 16S rRNA los cuales se enviaron a secuenciar a la compañía CORPOGEN.

Figura 5. Gel de agarosa al 0,8%. 1 y 10 marcador de tamaño molecular 1Kb ladder; carriles 2 a 8 fragmentos amplificados usando cebadores universales para el gen ARNr 16s de las cepas BAC 082; BAC 036; PSAVE2M4; BAC 082; BAC 036; PSAVE2M4; BAC 082; control negativo agua



Las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados se editaron, con el fin de eliminar errores del proceso de secuenciación, arrojando finalmente tamaños de 819pb, 876pb y 865pb para la bacteria BAC 082, BAC 036 y PSAV2EM4 respectivamente (Anexo B).

El análisis en la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) de las tres secuencias, indicó con un 99,6% certeza que la identidad de la cepa BAC 082 corresponde a una bacteria perteneciente al género *Serratia sp*, la bacteria BAC 036 se identificó como *Bacillus sp.*, con un porcentaje de identidad del 100%. La PSAV2EM4 con un 100% de identidad corresponde a *Bacillus amyloliquefaciens*. De la misma manera al comparar las secuencias editadas con la base de datos del GenBank se ratificó con un 99% de identidad que la bacteria BAC 082 pertenece al género *Serratia sp* y las bacterias BAC 036 y PSAV2EM4 se identificaron como *Bacillus thuringiensis strain* y *Bacillus amyloliquefaciens* respectivamente, con un porcentaje de certeza del 100%.

De acuerdo con lo obtenido se puede concluir que los géneros identificados para cada una de las bacterias son confiables, ya que coinciden con porcentajes similares en los programas empleados, es necesario aclarar que la caracterización del gen ribosómico ARNr 16s solo especifica género para asegurar especie y subespecie se recomienda realizar la amplificación de genes como: *gyrB*, *rpoB* ARNr 23S y ARNr 23S (Fernández *et al.*, 2010).

Las bacterias del género *Bacillus* se han reportado como productoras de PHAs con rendimientos que oscilan entre un 11 a 69% en peso seco, es decir hasta 70g L<sup>-1</sup>, así mismo, capaces de producir PHAs con una amplia gama de composiciones que varían de PHB, P (3HB-co-3HV: copolímero de butirato y valerato), P (3HB-co-3HHx: copolímero de butirato y hexanoato), P (3HB-co-4HB-co-3HHx: copolímero de 3-hidroxi, 4-hidroxibutiratos y hexanoato) a P (3HB-co-6HHx-co-3HHx: terpolímero de butirato, 6-hidroxi y 3- Hidroxi hexanoatos) dependiendo del sustrato (Singh *et al.*, 2009).

Estudios realizados en los últimos años por Ray & Chandra Kalia (2016) evaluaron la capacidad de producción de PHAs en *Bacillus thuringiensis*, en medios de cultivos mixtos con el fin de mejorar el contenido de copolímero obtenido, por su parte Kumar *et al.*, (2016) realizó un estudio con *Bacillus thuringiensis* en presencia de ácidos grasos libres como fuente de carbono para la producción de Polihidroxicanoatos donde obtuvo 60 mg/L<sup>-1</sup>, del igual manera Alarfaj *et al.*, (2015) investigó la producción de PHB en 50 cepas aisladas del manglar de Arabia Saudita, donde obtuvo que *Bacillus thuringiensis*, fue la cepa con mayor producción de PHB con 1,70 gL<sup>-1</sup>. Para el género *Bacillus amyloliquefaciens*, se ha reportado en la literatura la realización de fermentaciones a gran escala donde sintetizaron polihidroxibutirato (PHB) (Liu *et al.*, 2014).

En cuanto a la evaluación de la producción de PHAs en bacterias del género *Serratia sp*. es poco común, uno de los estudios existentes es el realizado por Macaskie *et al.* (2008) donde se reporta la fabricación de un biocristal (hidroxiapatita) con potencial uso en

aplicaciones dentales y ortopédicas además de una acumulación de polihidroxibutirato (PHB) del 77% del peso seco bacteriano a partir de la biosíntesis del cristal biológico (HA) utilizando citrato de calcio y glicerol 2-fosfato, demostrando así que esta cepa enterobacteriana tiene potencial tanto en la producción de HA como de PHB. Por su parte la investigación hecha por Lugg *et al.* (2008) encontró que *Serratia sp.* en presencia de glicerol y citrato como fuente de carbono posee una capacidad de acumulación de PHAs del 55% con respecto al peso seco de la célula.

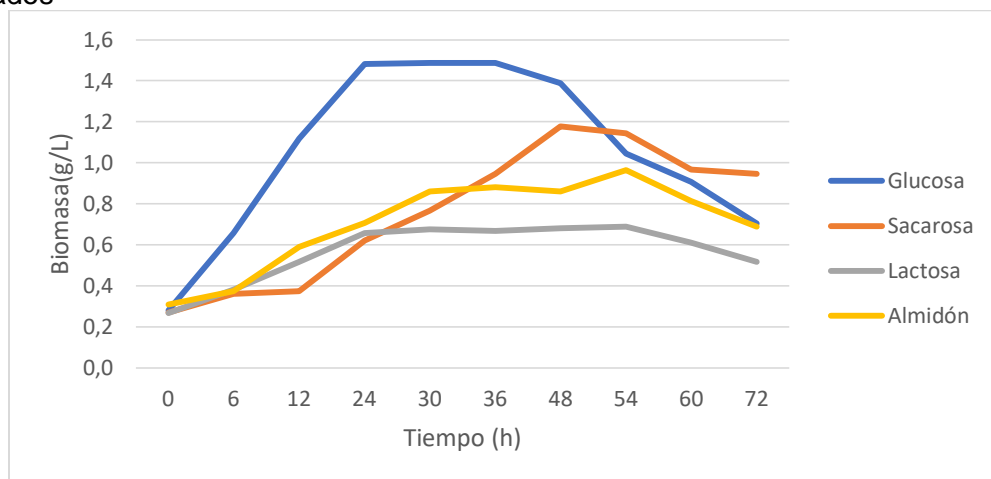
### **3.2 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR LAS BACTERIAS SELECCIONADAS, EMPLEANDO DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

Para el desarrollo del segundo objetivo fue necesario iniciar con una cinética de crecimiento de las tres bacterias seleccionadas en diferentes fuentes de carbono con el fin de conocer la fase estacionaria de las mismas, llevar a cabo su fermentación y obtener finalmente datos correspondientes a producto, generación de biomasa y consumo de sustrato.

**3.2.1 Cinética de crecimiento para la determinación de la fase estacionaria.** En la figura 6 se visualiza la cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* UC-036 en los cuatro sustratos evaluados. Se observó que glucosa fue el sustrato en el que se alcanzó mayor crecimiento  $1,48 \text{ gL}^{-1}$  seguido de sacarosa  $1,17 \text{ gL}^{-1}$ , de almidón  $0,96 \text{ gL}^{-1}$  y finalmente de lactosa  $0,70 \text{ gL}^{-1}$ ; en este sentido en glucosa se encontró una fase exponencial y estacionaria de 24 y 12 horas respectivamente, en cuanto al crecimiento de la bacteria en almidón y lactosa muestran una fase de adaptación de 6 horas, no obstante, en lactosa se observa una fase exponencial hasta las 24 horas mientras que en almidón fue hasta la hora 30. Por último, en sacarosa se encontró una fase de adaptación de 6 horas más respecto a lo observado en almidón y lactosa, donde su fase exponencial se prolongó hasta las 48 horas y la fase estacionaria en esta fuente de carbono tuvo una permanencia de 6 horas previo a la fase de descenso.

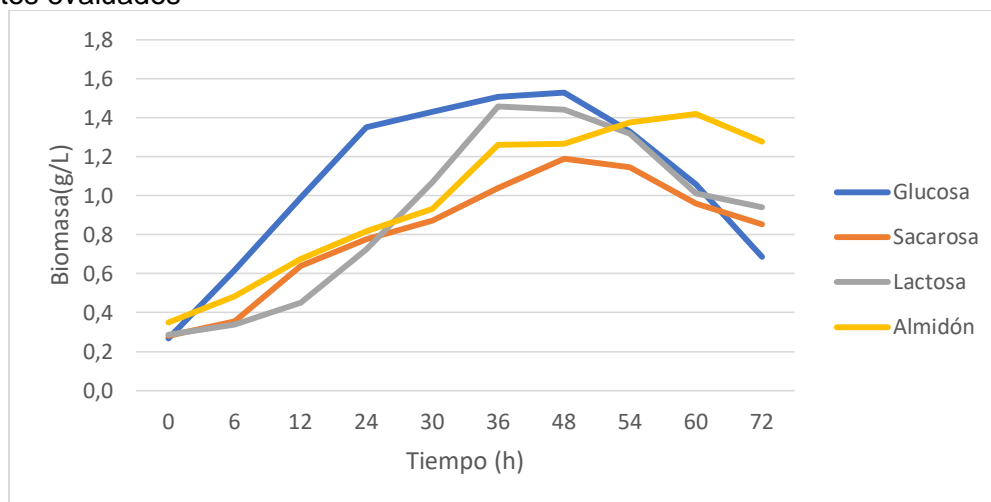
La mayor velocidad de crecimiento para *B. thuringiensis* UC-036 se presentó en glucosa ( $0,5508 \text{ h}^{-1}$ ) que, a diferencia de los demás sustratos, el crecimiento en esta fuente de carbono fue inmediato mientras que sacarosa ( $0,2711 \text{ h}^{-1}$ ), almidón ( $0,2675 \text{ h}^{-1}$ ) y lactosa ( $0,1945 \text{ h}^{-1}$ ) requieren de una fase de adaptación que posiblemente interfiere en la formación de biomasa. En la cinética de crecimiento de *B. amyloliquefancies* UC-PSAV2EM4 (figura 7), se encontró que para glucosa existe una fase exponencial y estacionaria de 18 horas antes de entrar a la etapa de muerte. Por su parte en las fuentes de carbono lactosa y almidón el microorganismo alcanzó una fase exponencial a las 36 horas y su fase estacionaria tuvo una duración de 6 y 18 horas respectivamente, entre tanto en sacarosa *B. amyloliquefancies* UC-PSAV2EM4 inicia su fase exponencial desde la hora 6 hasta la 48 seguida de una fase estacionaria de 6 horas; cuantitativamente el mayor incremento de biomasa lo obtuvo en glucosa con  $1,53 \text{ gL}^{-1}$ , seguido de lactosa donde alcanzó un crecimiento de  $1,46 \text{ gL}^{-1}$ , en almidón consiguió un incremento de  $1,42 \text{ gL}^{-1}$  y finalmente en sacarosa se obtuvo un máximo de  $1,14 \text{ gL}^{-1}$  de biomasa.

Figura 6. Cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* UC-036 en los cuatro sustratos evaluados



Las velocidades de crecimiento alcanzadas por *B. amyloliquefancias* UC-PSAV2EM4 fueron de  $0,2183 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,2451 \text{ h}^{-1}$ ,  $0,3779 \text{ h}^{-1}$  y  $0,5323 \text{ h}^{-1}$  para sacarosa, almidón, lactosa y glucosa respectivamente, comportamiento en el que se observó que glucosa a diferencia de los otros sustratos mostró un crecimiento exponencial inmediato al no presentar fase de adaptación además de mostrar mayor durabilidad en fase estacionaria, aspectos que favorecen el proceso de fermentación.

Figura 7. Cinética de crecimiento *B. amyloliquefancias* UC-PSAV2EM4 en los cuatro sustratos evaluados

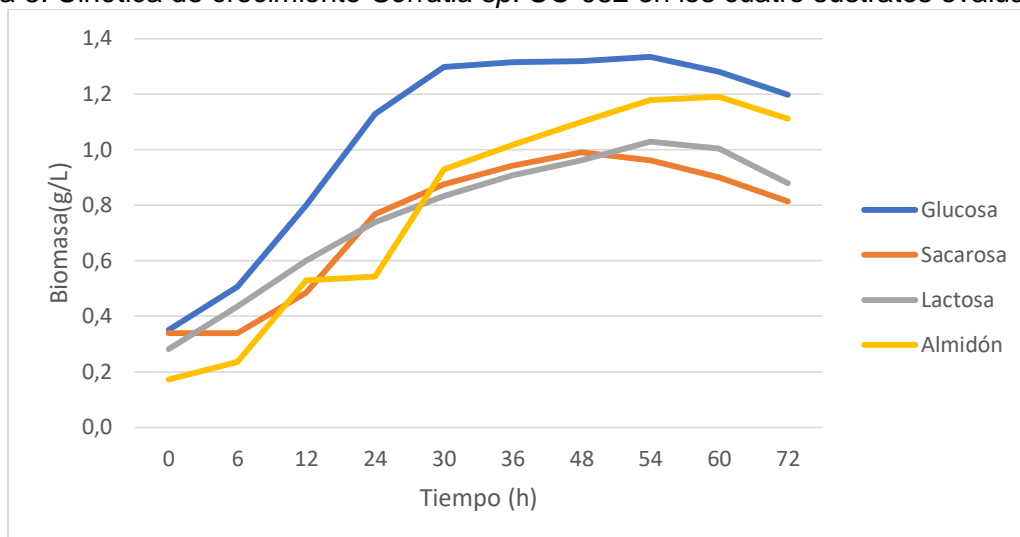


El comportamiento de *Serratia sp.* UC-082 en los cuatro sustratos, indicó que glucosa fue la fuente de carbono con mayor crecimiento  $1,33 \text{ gL}^{-1}$  seguido por el crecimiento en almidón con  $1,18 \text{ gL}^{-1}$ , en lactosa la máxima biomasa formada fue de  $1,02 \text{ gL}^{-1}$ , por último, este microorganismo en sacarosa presentó el crecimiento más bajo con  $0,96 \text{ gL}^{-1}$ .

De esta manera se pudo identificar que *Serratia sp.* UC-082 en presencia de glucosa presentó una fase de adaptación de 6 horas antes de continuar con 18 horas de fase exponencial y estacionaria, el comportamiento de este microorganismo en los sustratos sacarosa y almidón muestran una fase de adaptación de 6 horas seguida de una fase exponencial que se extendió por 32 y 38 horas respectivamente y continuó con 6 horas más de fase estacionaria; para finalizar en lactosa se obtuvo un crecimiento exponencial con una duración de 54 horas acompañado de una fase estacionaria de 6 horas antes de seguir con su fase de muerte (figura 8).

Respecto a las velocidades de crecimiento se tuvo que glucosa presentó la mayor velocidad de crecimiento ( $0,3160 \text{ h}^{-1}$ ) cuya rapidez se vio afectada posiblemente por su fase de adaptación, posteriormente se encuentra almidón ( $0,2472 \text{ h}^{-1}$ ), lactosa ( $0,2135 \text{ h}^{-1}$ ) y sacarosa ( $0,1717 \text{ h}^{-1}$ ) en donde sus tiempos de crecimiento son extensos y sus fases de acumulación cortos, hecho que afecta la productividad del proceso.

Figura 8. Cinética de crecimiento *Serratia sp.* UC-082 en los cuatro sustratos evaluados



La cinética de crecimiento realizada tuvo como finalidad encontrar la fase estacionaria de cada una de las tres cepas evaluadas, etapa de mayor acumulación de gránulos de Polihidroxicanoatos, debido al agotamiento de nutrientes esenciales para su crecimiento, generando una condición de estrés que favorece la acumulación del mismo (McCool *et al.*, 1996) (Pal *et al.*, 2009).

De acuerdo a lo obtenido en esta investigación las células del género *Bacillus* en glucosa entraron en fase estacionaria después de las 24 horas de incubación con una duración de 48 horas, después de lo cual su crecimiento disminuyó en 72 horas, estos resultados coinciden con lo encontrado en los estudios de Mizuno *et al.* (2010) y Pal *et al.* (2009) cuyo rango de acumulación oscila entre la hora 16 y la hora 40 cuando inicia su descenso, presentando un incremento máximo a las 24 horas, de la misma manera que lo reportado



por esta investigación. Para los sustratos sacarosa, lactosa y almidón según Rohini *et al* (2006) se presenta una fase estacionaria desde la hora 36 hasta la hora 60 resultado similar a los tiempos señalados anteriormente.

Finalmente, el comportamiento en la producción de polihidroxicanoatos por *Serratia sp.* en fuentes de carbono como las aquí estudiadas es poco reportado en la literatura, sin embargo Lugg *et al.* (2008) enfatiza principalmente la capacidad acumuladora del polímero biodegradable en el microorganismo, reportando cinéticas de crecimiento con una duración que va desde 7 a 10 días logrando acumulaciones considerables de biopolímero, la cinética registrada en el presente documento para este microorganismo tiene un tiempo de duración menor logrando rendimientos similares; en el cuadro 9 se muestran las horas de inicio y final de la fase estacionaria encontrada para cada uno de los microorganismos, lapsos de tiempo tomados como parámetros de medida para continuar con el seguimiento.

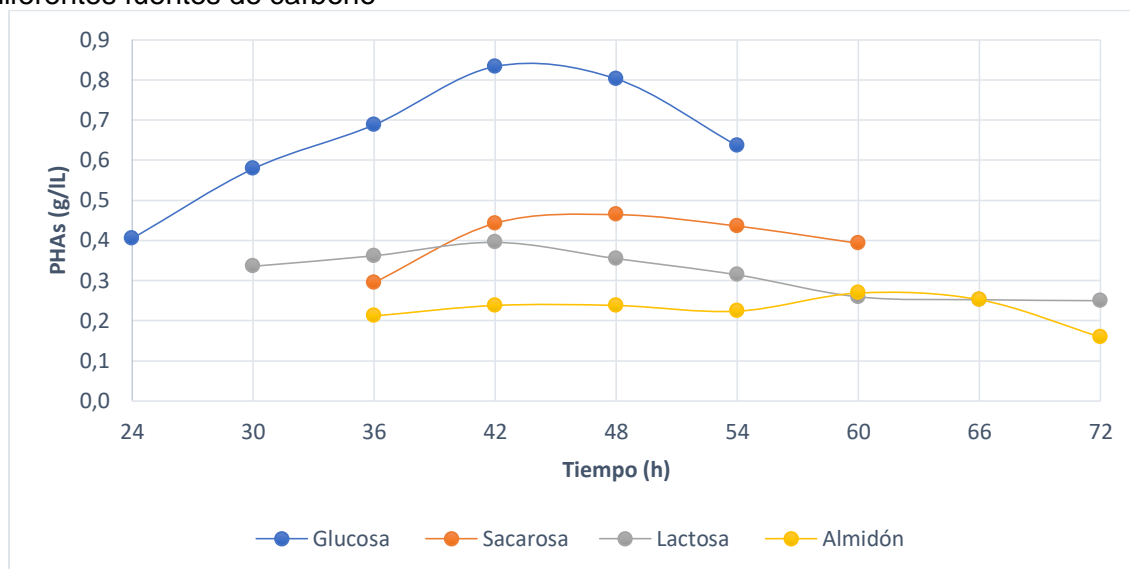
Cuadro 9. Periodos de tiempo promedio correspondientes a la fase estacionaria de *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia sp* UC-082 y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAVE2M4 en los diferentes sustratos

Sustrato	Fase Estacionaria					
	<i>B. thuringiensis</i> UC-036		<i>Serratia sp.</i> UC-082		<i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAVE2M4	
	Hora Inicio	Hora Final	Hora Inicio	Hora Final	Hora Inicio	Hora Final
Glucosa	24	54	24	54	24	54
Sacarosa	36	60	42	66	24	54
Lactosa	30	72	30	72	30	72
Almidón	36	72	36	72	36	72

**3.2.2 Cinética de las bacterias *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia sp* UC-082 Y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAVE2M4 en los sustratos glucosa, sacarosa, lactosa y almidón.** El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el software IBM SPSS Statics 20, con el modelo de medidas repetidas simples, reportados con una significancia  $P < 0,05$  mediante el cual se demostró que hay efecto del tiempo (factor intrasujeto) en la producción de biomasa y producto de los microorganismos *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia sp* UC-082 y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAVE2M4 en los cuatro sustratos evaluados (Anexos D, E, F).

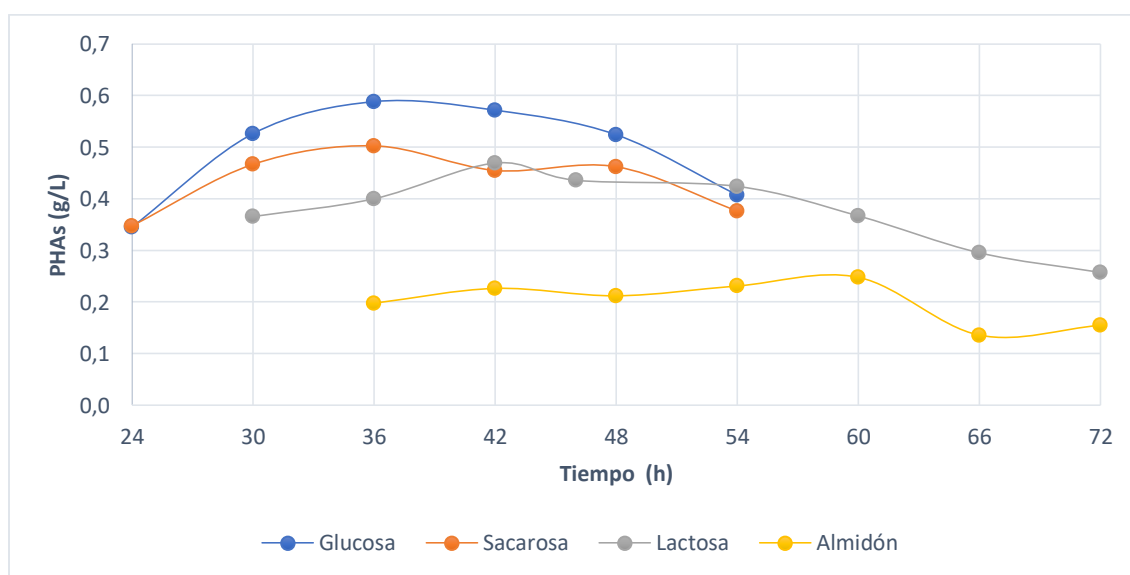
A partir de la comparación por pares, procedimiento que relacionó los datos obtenidos del factor producto con el factor tiempo, se determinó el tiempo en el que se alcanzó la mayor producción de polihidroxicanoatos, en el caso de *B. thuringiensis* UC-036 se presentó en glucosa ( $0,8333 \text{ gL}^{-1}$ ) a las 42 horas de fermentación, seguida de sacarosa ( $0,4429 \text{ gL}^{-1}$ ) y lactosa ( $0,3952 \text{ gL}^{-1}$ ) a las 48 horas, finalmente en almidón ( $0,2690 \text{ gL}^{-1}$ ) se alcanzó un máximo en producción a las 60 horas de fermentación, posteriormente la producción de biopolímero empieza a decaer (figura 9.).

Figura 9. Producción de Polihidroxicanoatos en *B. thuringiensis* UC-036, en las diferentes fuentes de carbono



De igual manera para la bacteria *Serratia sp.* UC-082 la relación entre los factores producto y tiempo o comparación por pares mostró una máxima producción de Polihidroxicanoatos a las 36 horas en los sustratos sacarosa y glucosa con una obtención de  $0,5024 \text{ gL}^{-1}$  y  $0,5881 \text{ gL}^{-1}$  respectivamente, en lactosa el punto más alto fue alcanzado a las 42 horas con una producción de  $0,4690 \text{ gL}^{-1}$  finalmente en almidón alcanzó su máxima producción a las 60 horas con  $0,2310 \text{ gL}^{-1}$  (Figura 10, Anexo E).

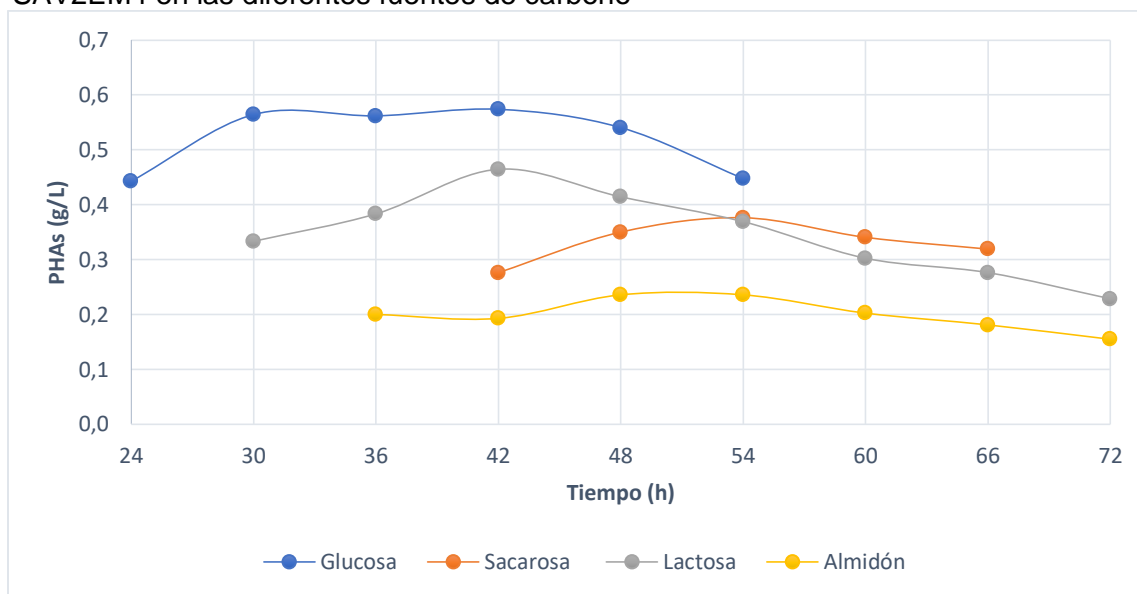
Figura 10. Producción de Polihidroxicanoatos en *Serratia Sp* UC-082 en las diferentes fuentes de carbono



Para *Bacillus amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 la comparación por pares en presencia de glucosa produjo  $0,5643 \text{ gL}^{-1}$  de PHAs a las 30 horas de fermentación, en sacarosa alcanzó su punto más alto a las 54 horas con una producción de  $0,3762 \text{ gL}^{-1}$ .

Por otra parte, en lactosa produjo  $0,4645 \text{ gL}^{-1}$  a las 42 horas y en el medio de cultivo suplementado con almidón alcanzó un máximo de biopolímero de  $0,2357 \text{ gL}^{-1}$  a las 54 horas de fermentación (Figura 11, Anexo E).

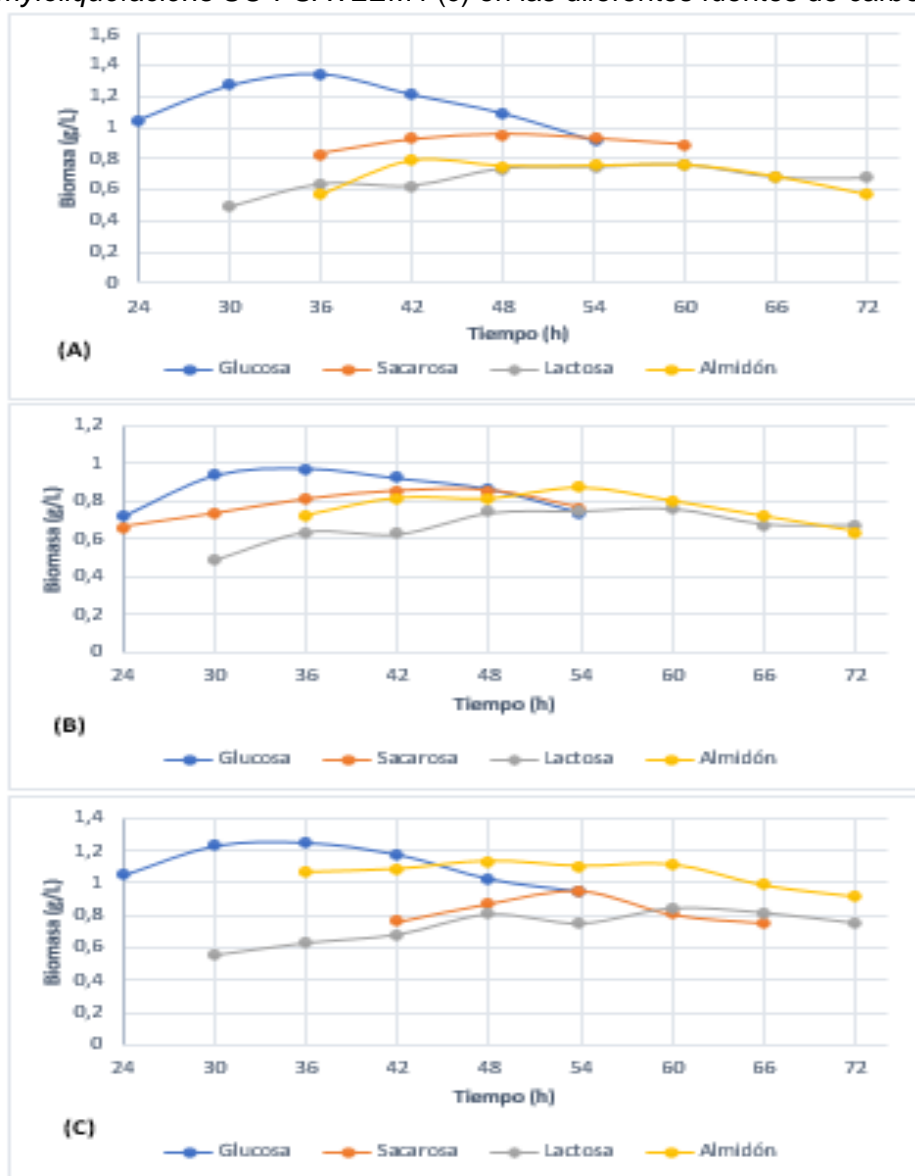
Figura 11. Producción de Polihidroxicanoatos en la bacteria *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en las diferentes fuentes de carbono



La comparación por pares de los datos obtenidos para aumento de biomasa de *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia sp* UC-082 y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en los diferentes sustratos (glucosa, sacarosa, lactosa y almidón), no mostró diferencias significativas en el tiempo, lo cual corrobora que los periodos de tiempo evaluados para cada microorganismo (cuadro 8) corresponden a su fase estacionaria, fase de mayor acumulación de biopolímero (Figura 12, Anexo G).

El valor de significancia fue menor a 0,05, lo que indica que los diferentes factores (bacteria, fuente de carbono y en la interacción bacteria-fuente de carbono) tienen incidencia en la producción de Polihidroxicanoatos (cuadro 10). El análisis de Tukey formó 6 grupos los cuales se representan en el cuadro 11 donde se puede destacar que la máxima producción de Polihidroxicanoatos se presentó en el grupo F conformado por el tratamiento 12 (*B. thuringiensis* UC-036 en glucosa) y la mínima producción se obtuvo en el grupo A conformado por los tratamientos 1, 2 y 3 (*Serratia sp.* UC-082 en almidón, *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en almidón, *B. thuringiensis* UC-036 en almidón).

Figura 12. Crecimiento de las bacterias *B. thuringiensis* UC-036 (a), *serratia sp* UC-082 (b) y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 (c) en las diferentes fuentes de carbono



Cuadro 10. Grado de significancia del análisis estadístico del diseño experimental de bloques completamente al azar

Variable dependiente: producto					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GI	Cuadrático promedio	F	Sig
Modelo corregido	0,988 <sup>a</sup>	11	0,09	408,39	0
Interceptación	7,131	1	7,131	32416,349	0
Bacteria	0,027	2	0,014	61,857	0

Cuadro 10. (Continuación)

Variable dependiente: producto					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GI	Cuadrático promedio	F	Sig
Fuente C	0,821	3	0,274	1243,802	0
Bacteria * Fuente C	0,14	6	0,023	106,194	0
Error	10,005	24	0		
Total	8,124	36			
Total corregido	0,993	35			
a. R al cuadrado = 0,995 (R al cuadrado ajustada = 0,992)					

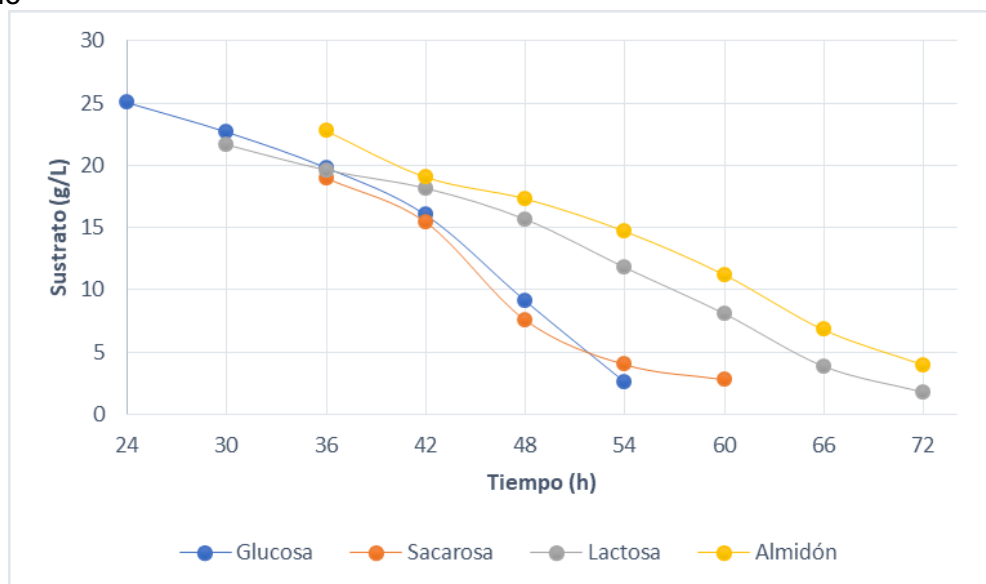
Cuadro 11. Prueba de Tukey del análisis estadístico del diseño experimental de bloques completamente al azar. Las diferentes letras indican los subconjuntos formados de acuerdo con la producción de PHAs

PRODUCTO	
Tratamiento	PHAs (g/L)
<b>HSD Tukey</b>	
<i>Serratia sp.</i> UC-082 en almidón (1)	0,2309 <sup>a</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en almidón (2)	0,2357 <sup>a</sup>
<i>B. thuringiensis</i> UC-036 en almidón (3)	0,2381 <sup>a</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en sacarosa (4)	0,3762 <sup>b</sup>
<i>B. thuringiensis</i> UC-036 en lactosa (5)	0,3952 <sup>b</sup>
<i>B. thuringiensis</i> UC-036 en sacarosa (6)	0,4428 <sup>c</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en lactosa (7)	0,4645 <sup>cd</sup>
<i>Serratia sp.</i> UC-082 en lactosa (8)	0,4690 <sup>cd</sup>
<i>Serratia sp.</i> UC-082 en sacarosa (9)	0,5024 <sup>d</sup>
<i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4 en glucosa (10)	0,5642 <sup>e</sup>
<i>Serratia sp.</i> UC-082 en glucosa (11)	0,5881 <sup>e</sup>
<i>B. thuringiensis</i> UC-036 en glucosa (12)	0,8333 <sup>f</sup>

En cuanto al consumo de sustrato *B. thuringiensis* UC-036 tuvo una disponibilidad de sustrato en glucosa, sacarosa, lactosa y almidón de 27,4737 g L<sup>-1</sup>, 26,1344 g L<sup>-1</sup>, 26,0793 g L<sup>-1</sup> y 24,1739 g L<sup>-1</sup> respectivamente.

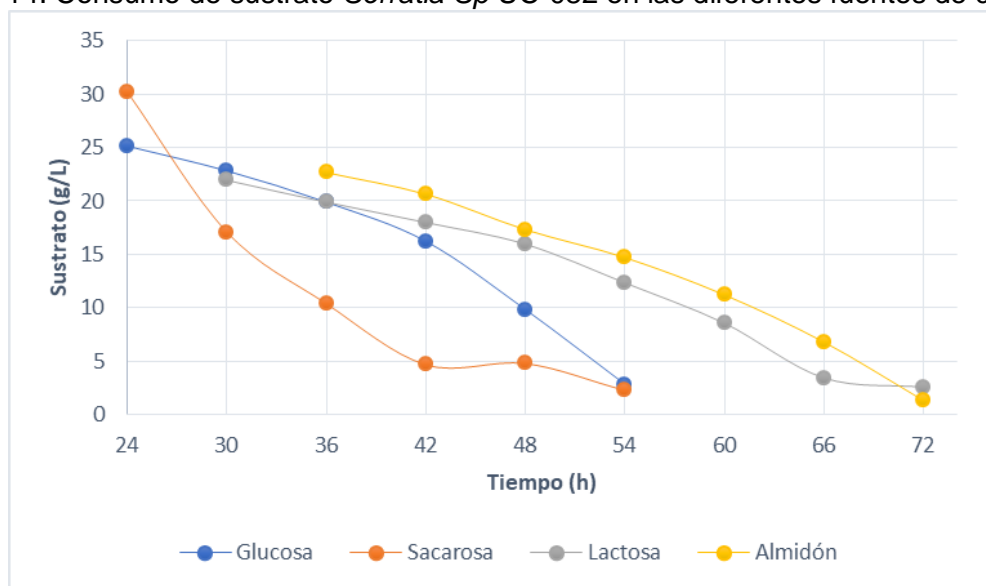
La cantidad de sustrato no consumido fue de 1,467 g L<sup>-1</sup> para glucosa, 2,575 g L<sup>-1</sup> para sacarosa, 1,7753 g L<sup>-1</sup> para lactosa y 3,3326 g L<sup>-1</sup> para el almidón, de esta manera, el microorganismo presentó un mayor consumo de sustrato en glucosa con 26,0067 g L<sup>-1</sup>, en segundo lugar, en lactosa con 24,3039 g L<sup>-1</sup> y el sustrato sacarosa se encuentra en tercer lugar con 23,5559 g L<sup>-1</sup> finalmente el microorganismo consumió 20,8162 g L<sup>-1</sup> de almidón (figura 13).

Figura 13. Consumo de sustrato *B. thuringiensis* UC-036 en las diferentes fuentes de carbono



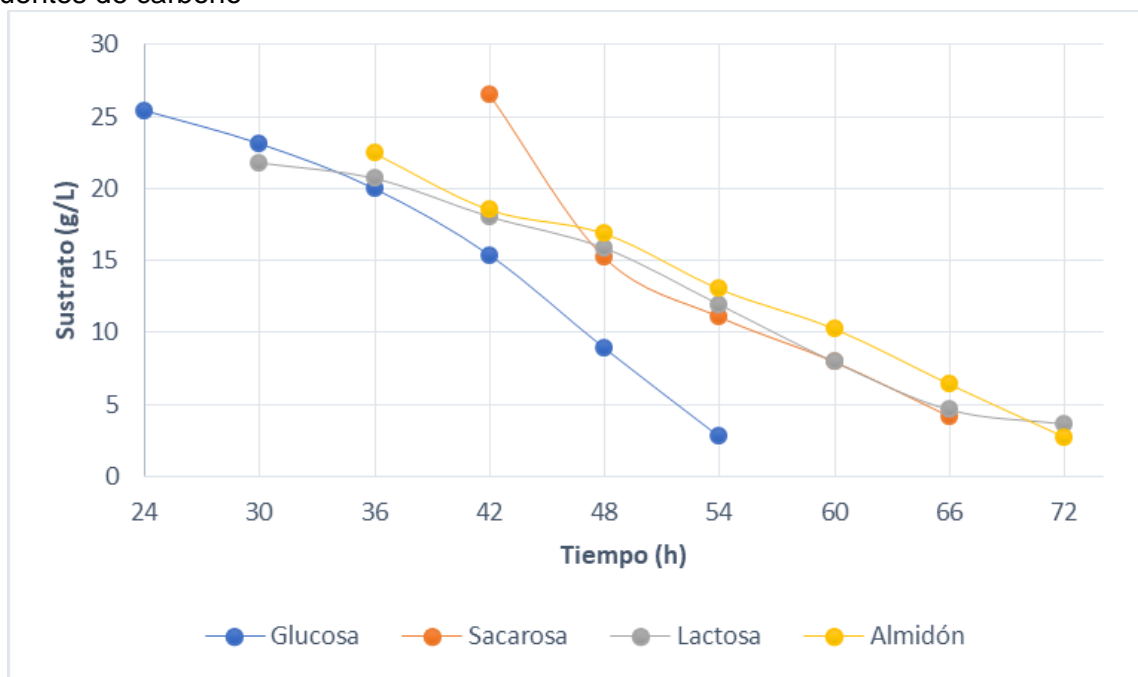
De igual manera, *Serratia sp.* UC-082 contó con una cantidad de glucosa como sustrato inicial de 27,4472 gL<sup>-1</sup>, sacarosa 25,8328 gL<sup>-1</sup>, lactosa 26,0350 gL<sup>-1</sup> y almidón 25,0033 gL<sup>-1</sup>, dejando un remanente de 2,8204 gL<sup>-1</sup>, 2,2769 gL<sup>-1</sup>, 2,5494 gL<sup>-1</sup> y 2,7293 gL<sup>-1</sup> en glucosa, sacarosa, lactosa y almidón respectivamente presentando mayor consumo de glucosa respecto a los demás sustratos, consumiendo aproximadamente 24,6268 gL<sup>-1</sup>, en lactosa presentó un consumo de 23,4856 gL<sup>-1</sup>, en sacarosa un consumo de 23,0638 gL<sup>-1</sup> finalmente se encontró un consumo en almidón de 22,2739 gL<sup>-1</sup> (Figura 14).

Figura 14. Consumo de sustrato *Serratia Sp* UC-082 en las diferentes fuentes de carbono



Por último, la bacteria *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 presentó una disponibilidad de sustrato inicial de 27,3410 gL<sup>-1</sup>, 26,2098 gL<sup>-1</sup>, 26,0793 gL<sup>-1</sup> y 24,8525 gL<sup>-1</sup> y un remanente final de 2,3968 gL<sup>-1</sup>, 3,6091 gL<sup>-1</sup>, 2,6599 gL<sup>-1</sup> y 2,7293 gL<sup>-1</sup> en glucosa, sacarosa, lactosa y almidón respectivamente, del mismo modo en glucosa presentó mayor consumo con 24,9452 gL<sup>-1</sup>, en sacarosa mostró una buena afinidad consumiendo 23,5559 gL<sup>-1</sup>, en lactosa con 23,4194 gL<sup>-1</sup> de consumo y por último se encuentra el consumo de almidón con 22,1734 gL<sup>-1</sup> (Figura 15).

Figura 15. Consumo de sustrato *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en las diferentes fuentes de carbono



### 3.2.3 Caracterización del biopolímero por Cromatografía líquida de ultra alta precisión acoplado a espectrometría de masas (UHPLC-MS) y Espectroscopía infrarroja (FTIR).

Los cromatogramas correspondientes al análisis de Polihidroxicanoatos de las muestras obtenidas de *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia sp.* UC-082 y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en los diferentes sustratos presentaron tiempos de retención de 1,22 y 5,96 minutos que corresponden a los pesos moleculares del polihidroxibutirato (PHB) (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> =104,04765 g mol<sup>-1</sup>) y polihidroxivalerato (PHV) (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>=118,06346) g mol<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 16).

Los análisis de las masas moleculares de las muestras indicaron que los polihidroxicanoatos producidos por *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia Sp* UC-082 y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en los cuatro sustratos son de tipo butirato y valerato con un peso molecular de 104,04837 g mol<sup>-1</sup> y 118,06418 g mol<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 17, Anexo G).

Figura 16. Cromatograma de *B. thuringiensis* UC-036 en glucosa

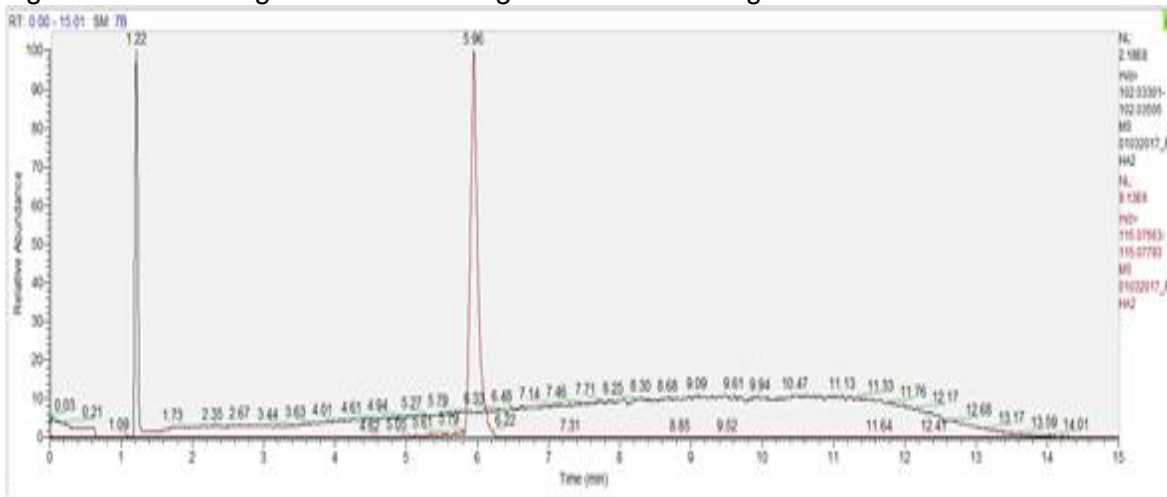
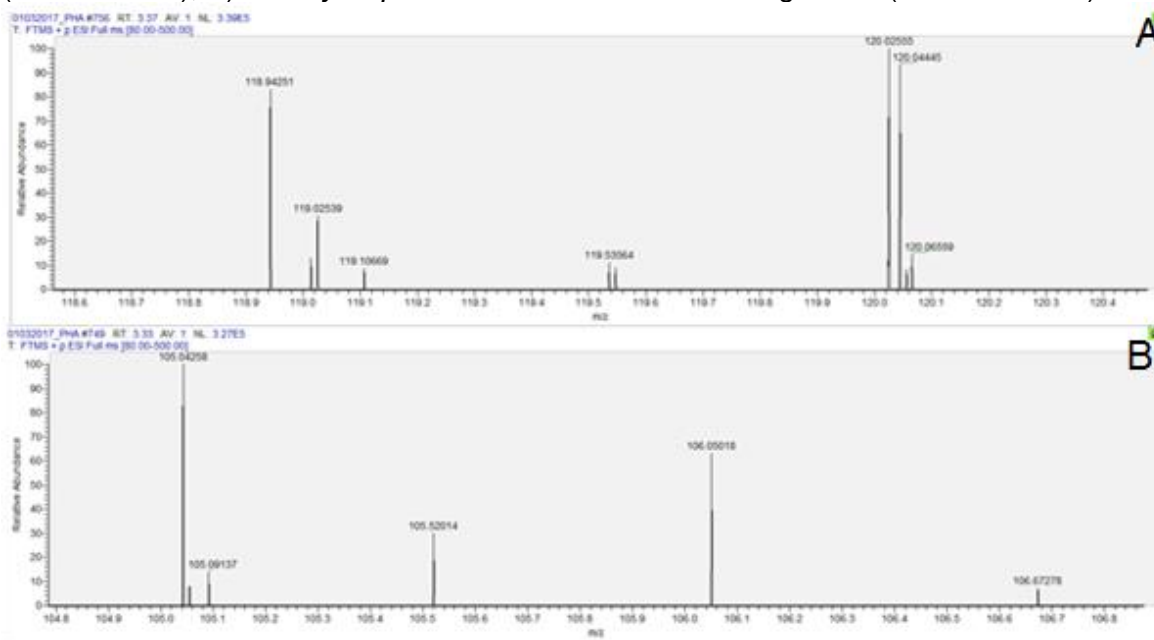


Figura 17. Espectros de masas. A) *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en glucosa (hidroxiburato); B) *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en glucosa (hidroxivalerato)



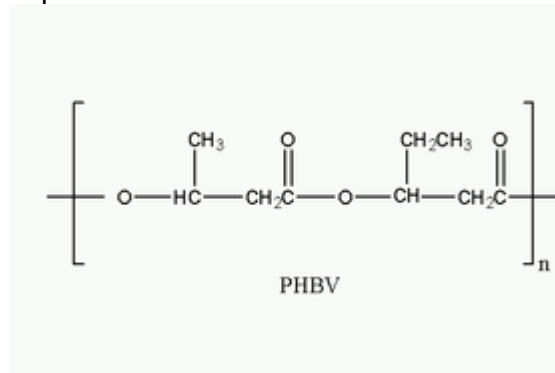
De manera simultánea se realizó la búsqueda del copolímero polihidroxibutirato-polihidroxivalerato (PHB-PHV) ( $C_9H_{16}O_5$ ) en todas las muestras, donde se encontraron tiempos de retención de 2,46 minutos que corresponden al peso molecular del copolímero con masa de  $205,10705 \text{ g mol}^{-1}$ , confirmando la presencia del mismo (Figura 19).

La presencia de polihidroxialcanoatos también se confirmó por análisis de espectrofotometría infrarrojo (FTIR) para tener certeza de la presencia del copolímero



PHB-PHV. Los espectros de IR de las bacterias *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia Sp* UC-082 y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en los diferentes sustratos (Anexo H), presentaron picos de alta intensidad en la región  $1630-1735\text{ cm}^{-1}$ , asociada al estiramiento del enlace C=O en compuestos orgánicos (carbonílicos) característicos de los biopolímeros (Rojas *et al.*,2016), igualmente se encontraron picos intensos en el intervalo  $1378-1475\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la formación asimétrica del enlace CH<sub>3</sub>, del mismo modo se observaron una serie de picos intensos en la región  $1019-1227\text{ cm}^{-1}$  pertenecientes al estiramiento del enlace C-O del grupo éster, otros picos se encontraron en el rango de  $1000-1500$ , propios a las vibraciones o estiramiento del enlace CH<sub>2</sub>, los picos del rango  $2832-2949\text{ cm}^{-1}$  encontrados se deben al estiramiento del enlace simple entre el carbono y el hidrógeno (C-H) lo que nos indica presencia de HV en el biopolímero (CHCH<sub>3</sub>).

Figura 18. Molécula del copolímero Polihidroxitirato-Co-Poihidroxivalerato



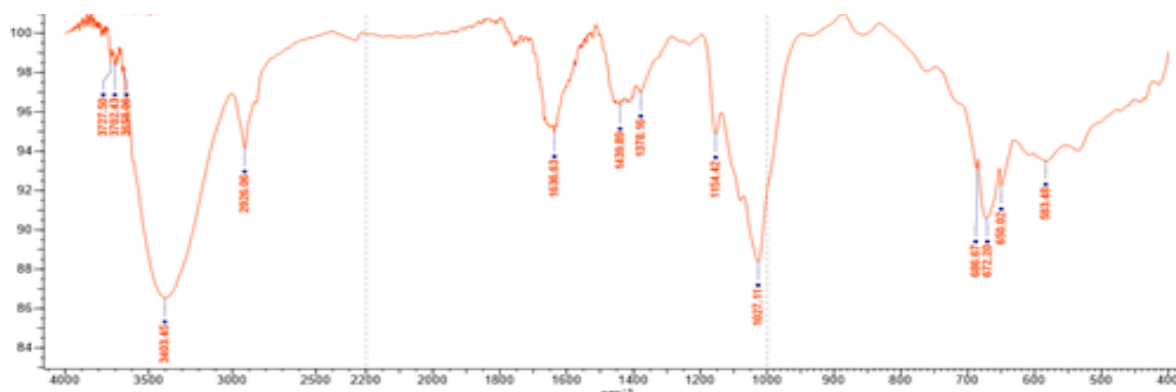
Fuente: Zhang, 1994

Figura 19. Cromatograma y espectro de masas del copolímero polihidroxitirato-polihidroxitirato



También se encontraron absorciones en la banda 900-600  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a las vibraciones del grupo C-C, además se observaron bandas en el intervalo 3403-3857  $\text{cm}^{-1}$  indicando humedad en la muestra (agua) (Figura 20). El análisis FTIR de las muestras nos permite confirmar la presencia del copolímero PHB-PHV y es necesario recalcar, que al no contar con una muestra patrón de los monómeros de Polihidroxicanoatos, la posición del grupo R en la estructura química no fue posible cuantificar.

Figura 20. FTIR del copolímero polihidroxitirato-polihidroxicalerato producido por la bacteria *Serratia Sp* UC-082 en almidón



En la literatura se encuentran diferentes investigaciones donde reportan la caracterización de los biopolímeros por medio de cromatografía y FTIR, entre las que se destacan la investigación de Ahn *et al.*, (2016) donde caracterizaron el copolímero poly (3-hidroxitirato-co-3-hidroxicalerato) sintetizado a partir de paja de arroz, por cromatografía de gases, para identificar picos de concentración propios los monómeros 3HB y 3HV, encontrando concentraciones de 53% y 47% de 3HB y 3HV respectivamente. Así mismo Andrew *et al.*, (2016) caracterizaron el copolímero poly (hidroxitirato-co-hidroxicalerato) producido a partir de metano y se analizaron las concentraciones de valerato con HPLC, encontraron una fracción de hidroxicalerato en el polímero del 50% y finalmente, Yang *et al.*, (2013) sintetizó polihidroxicanoatos con una serie de sales el cual caracterizó y cuantificó por GC-MS, donde obtuvieron porcentajes de concentración de los biopolímeros 3-hidroxitirato (62,41%), 3-hidroxicalerato (34,17%) y 3-hidroxicanoato (3,24%).

Es destacable la inexistencia de investigaciones acerca de la caracterización de polihidroxicanoatos haciendo uso de la tecnología de masas Orbitrap<sup>®</sup>, este trabajo contribuye con los resultados proporcionados por la misma, haciendo un aporte innovador en la literatura actual.

Los resultados de los FTIR son congruentes con lo reportado por diferentes autores como Sang *et al.*, (2016) que obtuvieron el copolímero 3-hidroxitirato-co-3-hidroxicalerato a partir de lodos de aguas residuales y lo caracterizaron por FTIR donde mostraron una alta absorbancia en 2923-2924  $\text{cm}^{-1}$  indicando vibraciones en C-H y picos de absorción intensos en 1720  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde al enlace C=O de los compuestos orgánicos,

también encontraron absorbancias de 1378  $\text{cm}^{-1}$  y en el rango de 1100  $\text{cm}^{-1}$  y 1300  $\text{cm}^{-1}$  que concuerdan a las vibraciones de CH<sub>3</sub> y C-O respectivamente. Del mismo modo Fernández *et al.*, (2005) caracterizaron el copolímero hidroxibutirato-co-hidroxivalerato producido por la cepa silvestre *Bacillus mycoides*, FLB2, con FTIR donde encontraron una alta absorción en 1736,5  $\text{cm}^{-1}$ , 1053  $\text{cm}^{-1}$ -1177  $\text{cm}^{-1}$ -1295  $\text{cm}^{-1}$  y 1458,2  $\text{cm}^{-1}$  que pertenecen a las vibraciones de C=O, C-O-C y CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, en orden. Aramvash *et al.*, (2016) sintetizaron 3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato a partir de la cepa *Cupriavidus necator* y caracterizaron por FTIR donde reportaron picos de absorción de 3428  $\text{cm}^{-1}$  que hacen referencia a la humedad de la muestra y el pico de absorción 2934  $\text{cm}^{-1}$  perteneciente a la vibración de grupo C-H, de igual manera se encontraron los picos en 1631  $\text{cm}^{-1}$ , 1440  $\text{cm}^{-1}$  y en el rango de 1026-1036  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de los grupos C=O, CH<sub>3</sub>, C-O-C.

Finalmente, en el cuadro 12 se muestra la síntesis de los resultados obtenidos en esta investigación donde se destacan aspectos como rendimientos, porcentajes de acumulación y concentraciones máximas de biomasa, producto (PHAs) y sustrato consumido, alcanzados por cada microorganismo en cada una de las cuatro fuentes de carbono evaluadas.

Cuadro 12. Rendimientos de producción PHAs de las bacterias *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia Sp* UC-082 y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en las diferentes fuentes de carbono

Bacteria	Sustrato	Concentración de azúcar total inicial (g/L)	Concentración de azúcar total final (g/L)	Biomasa máxima (g/L)	Concentración de PHAs máxima (g/L)	Rendimiento g de PHAs/g de biomasa	PHA contenido máximo (%)	Rendimiento máximo de PHAs (g/g de azúcar total consumida)
<i>B. thuringiensis</i> UC-036	Glucosa	27,4737	1,4670	1,3476	0,8333	0,618359	61,8359	0,0320
	Sacarosa	26,1344	2,5785	0,9571	0,4429	0,462752	46,2752	0,0188
	Lactosa	26,0793	1,7754	0,8524	0,3952	0,463632	46,3632	0,0163
	Almidón	24,1739	3,3577	0,7857	0,2381	0,303042	30,3042	0,0114
<i>Serratia sp.</i> UC-082	Glucosa	27,4472	2,8204	0,9738	0,5881	0,603923	60,3923	0,0239
	Sacarosa	25,8328	2,7690	0,8548	0,5024	0,58774	58,774	0,0218
	Lactosa	26,0350	2,5494	0,7643	0,4690	0,613633	61,3633	0,0200
	Almidón	25,0033	2,7294	0,8738	0,2310	0,264363	26,4363	0,0104
<i>B. amyloliquefaciens</i> UC-PSAV2EM4	Glucosa	27,3410	2,3958	1,2476	0,5643	0,452308	45,2308	0,0226
	Sacarosa	26,1344	2,5785	0,9548	0,3762	0,394009	39,4009	0,0160
	Lactosa	26,0793	2,6599	0,8476	0,4645	0,548018	54,8018	0,0198
	Almidón	24,8525	2,6791	1,1667	0,2357	0,202023	20,2023	0,0106

Se evidenció la afinidad de producción que tienen las cepas en glucosa, en contraste a lo obtenido en almidón, asimismo permite identificar las diferencias en cuanto a acumulación

de biopolímero que presentaron los microorganismos de la especie bacillus entre si, lo anterior se puede deber a que *Bacillus amyloliquefanciens* UC-PSAV2EM4 como su nombre lo indica es un microorganismo encargado principalmente de la hidrólisis enzimática del almidón, hecho por el cual su capacidad para producir polihidroxicanoatos se ve reducida (Gangadharan *et al.*, 2006), además se observó el potencial que presentó *Serratia sp.* UC-082 para acumular gránulos de Polihidroxicanoatos en los diferentes sustratos, a pesar de tratarse de un microorganismo poco estudiado en este ámbito.

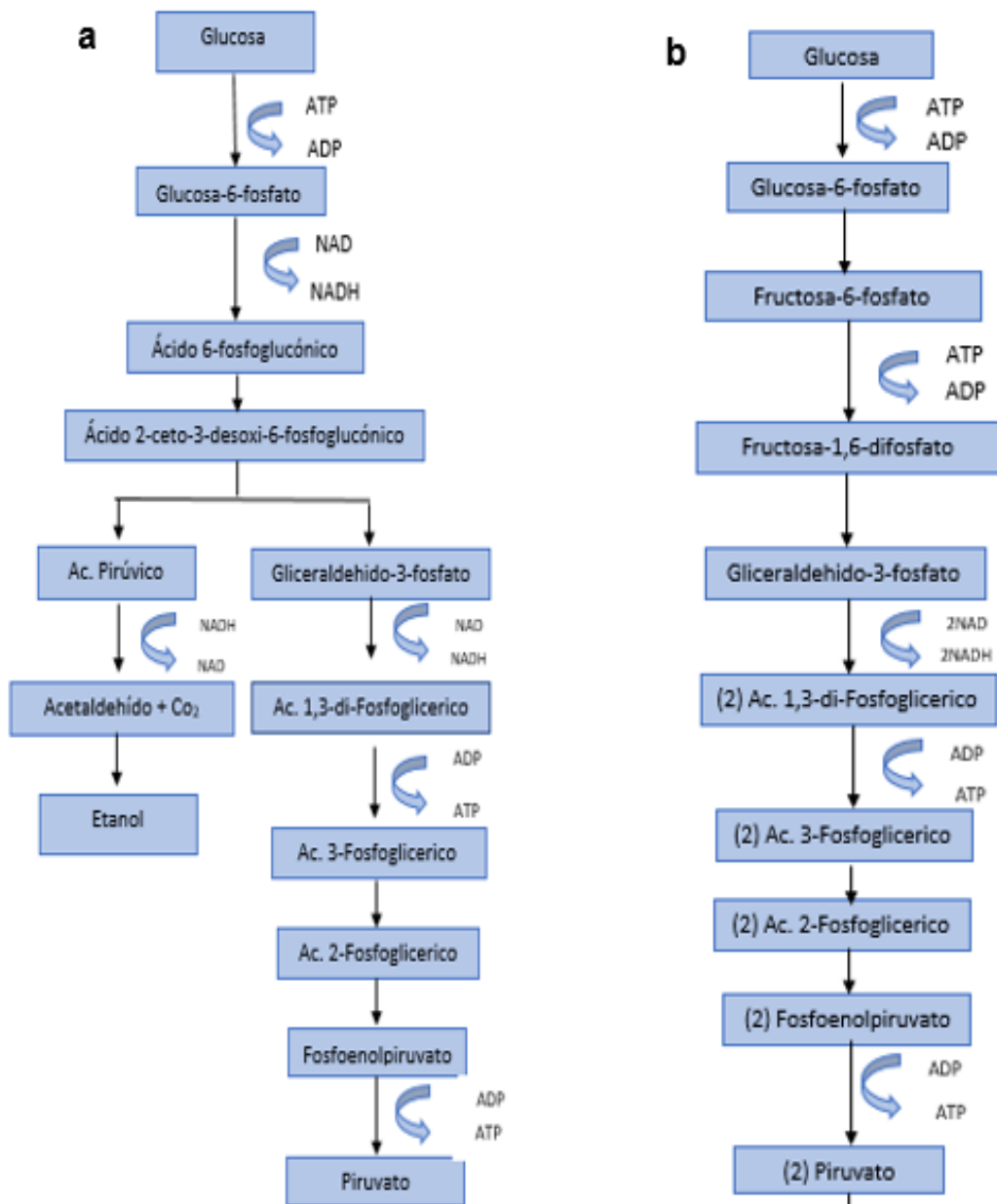
De acuerdo a lo expuesto en esta investigación se tiene que las bacterias identificadas como *Bacillus thuringiensis* UC-036, *Bacillus amyloliquefanciens* UC-PSAV2EM4 y *Serratia sp.* UC 082, son microorganismos capaces de sintetizar polihidroxicanoatos (PHAs) en condiciones de crecimiento caracterizadas por un exceso de fuente de carbono como glucosa, sacarosa, lactosa y almidón que según Kessler y Witholt (2001) ocasionaron un incremento en los niveles intracelulares de NADH o NAD(P)H que generó una inhibición de la actividad del citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa dando lugar a una desaceleración del ciclo de Krebs, por consiguiente, la Acetil CoA se acumula y toma otra ruta metabólica que para el caso de las bacterias productoras de PHAs conduce a la síntesis de estos biopolímeros. Egli (1991) por su parte afirma que la limitación de nutrientes como el nitrógeno, aseguran que el contenido de proteínas y ácidos nucleicos sea bajo, lo que facilita la aglomeración del polímero biodegradable durante la fase estacionaria.

La mayor acumulación de polihidroxicanoatos se obtuvo a partir de glucosa con un 61.83% para *Bacillus thuringiensis* UC-036, seguido de *Serratia sp.* UC-082 con un 60,39% y 45,23% para *Bacillus amyloliquefanciens* UC-PSAV2EM4, esto se debe a que la glucosa es la fuente de carbono mas simple de metabolizar al ingresar de manera directa a las respectivas rutas metabólicas (Lehninger *et al.*, 2008).

De acuerdo con Valappil *et al.* (2007) la síntesis de polihidroxicanoatos a partir de glucosa en géneros de bacilos se lleva cabo posiblemente a través de la vía Entner-Doudoroff (figura 21a).

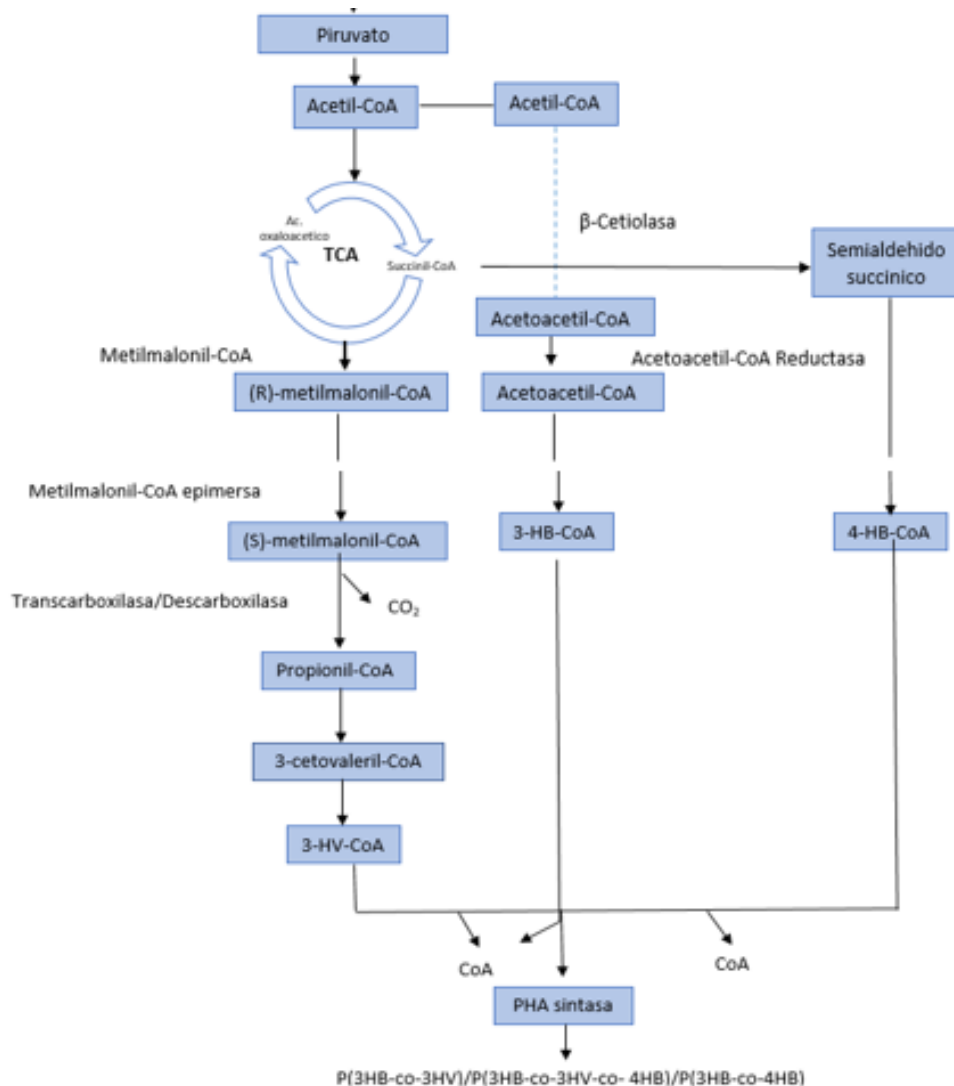
En *Serratia sp.* UC-082, la acumulación de Polihidroxicanoatos según Grimont & Grimont (2015), se llevó a cabo a través de la vía glucolítica o de Embden Meyerhof Parnas (figura 21b). En cualquiera de las rutas descritas anteriormente, la degradación de glucosa genera piruvato que ingresa al ciclo de ácido cítrico (TCA) (Figura 22) hacia la formación de Acetil CoA, proporcionando finalmente el monómero 3HV para la síntesis del polímero, polihidroxicanoato (PHV). De manera análoga la formación de los monómeros 4HB y 3HB se polimerizan por acción de una PHA sintasa y dan lugar a la formación de diversos copolímeros entre ellos se encuentran poli-3-hidroxicanoato-co-3-hidroxicanoato-co-4-hidroxicanoato P(3HB-co-3HV-co-4HB), poli-3-hidroxicanoato-co-3-hidroxicanoato P(3HB-co-3HV) y poli-3-hidroxicanoato-co-4-hidroxicanoato P(3HB-co-4HB) (Otero y Fernandez, 2012; Rojas *et al.*, 2016).

Figura 21. (a) Vía Entner-Doudoroff para *Bacillus*. (b) Via Embden-Meyerhof para *Serratia sp*



Entre otras investigaciones, las realizadas por Wang *et al.*, 2016, obtuvieron 52.1% de PHAs de cadena media a partir de *Pseudomonas mendocina* NK-01 en un medio suplementado con glucosa, por su parte Hori *et al.*, 2002 con el fin de potencializar la producción de Polihidroxicanoatos utilizó bacterias de *Escherichia coli* recombinante con genes *phaC* de *B. amyloliquenfaciens* donde alcanzó una producción de hasta 2 gL<sup>-1</sup> de PHB, por último Rohini, D. *et al* (2006) ha reportado *B. thuringiensis* como productor de polihidroxicanoatos con un rendimiento de 1,45 gL<sup>-1</sup>. Otros estudios a partir de glucosa se mencionan en el cuadro 13.

Figura 22. Posibles rutas metabólicas implicadas en la producción de copolímero P(3HB-co-3HV-co-4HB), P(3HB-co-3HV) y P(3HB-co-4HB)



Cuadro 13. Polihidroxialcanoatos sintetizados por microorganismos cultivados en glucosa, sacarosa, lactosa y almidón como fuentes de carbono

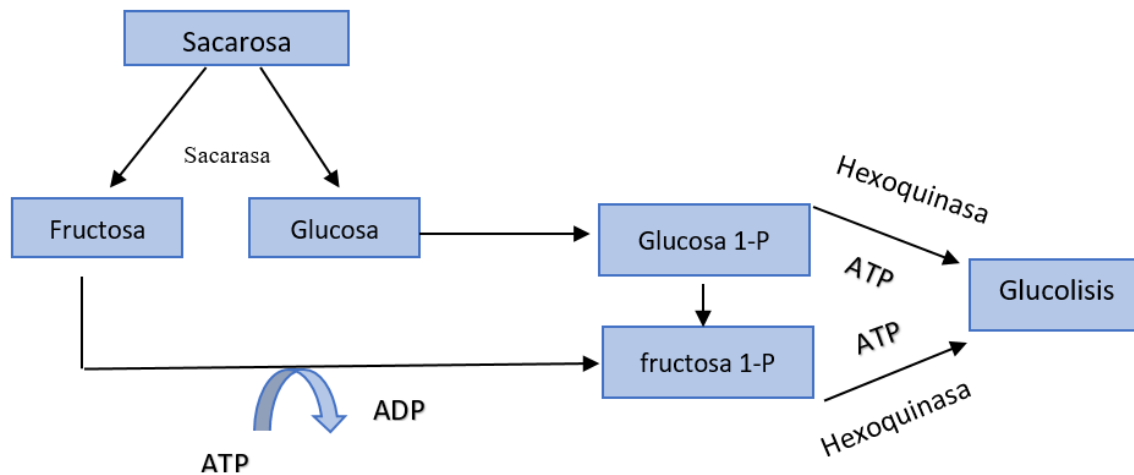
Cepa	Fuente de carbono	Tipo de PHAs	%PHAs acumulado	Referencia
<i>Bacillus cereus</i>	Glucosa	PHB	41,7%	Patel et al., 2016
<i>Bacillus sp. MFD11</i>	Glucosa	PHB-PHV	79,0%	Naheed et al., 2016
<i>Bacillus sp. Ti3</i>	Glucosa	PHB	41,0%	Israni & Shicakumar, 2015
<i>Burkholderia sacchari sp</i>	Sacarosa	P(3HB-co-3HV)	65,9%	Brämer et al., 2001
<i>Pseudomonas stutzeri E114</i>	Sacarosa	PHB	37,9%	Belal, 2013

Cuadro 13. (Continuación)

Cepa	Fuente de carbono	Tipo de PHAs	%PHAs acumulado	Referencia
<i>Rhizobium elti</i> E1	Sacarosa	PHB	55,0%	
<i>Thermus thermophilus</i>	Lactosa	PHB	36,4%	Pantazaki et al., 2009
<i>Cupriavidus necator</i>	Lactosa	PHB	22,0%	Povolo et al., 2010
<i>B. megaterium</i>	Suero de leche	PHB	31,0%	Gómez et al, 2016
<i>Bacillus sp. ND153</i>	Almidón	3PHB-co-3PHV	79,0%	Thuoc et al., 2014
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Almidón	PHB	46,0%	Kim & Chang, 1998

El mayor rendimiento de PHAs en sacarosa lo obtuvo *Serratia sp.* UC- 082 (58,77%), seguida de *Bacillus thuringiensis* UC-036 (46,27%) y *Bacillus amyloliquefanciens* UC-PSAV2EM4 (39,40%), para la síntesis del copolímero (PHB-PHV) según Zhang et al. (1994) el carbohidrato se degradó en glucosa y fructosa (Figura 23), monosacáridos que ingresaron como glucosa y fructosa 6-fosfato a las rutas metabólicas correspondientes para las dos especies, moléculas que son transformadas en piruvato y se incorporan a la ruta del biopolímero indicada por Valappil et al. (2007) (Figura 22).

Figura 23. Degradación de la molécula de sacarosa en sus respectivos azúcares antes de ingresar vía glucólisis y continuar con la síntesis de PHAs

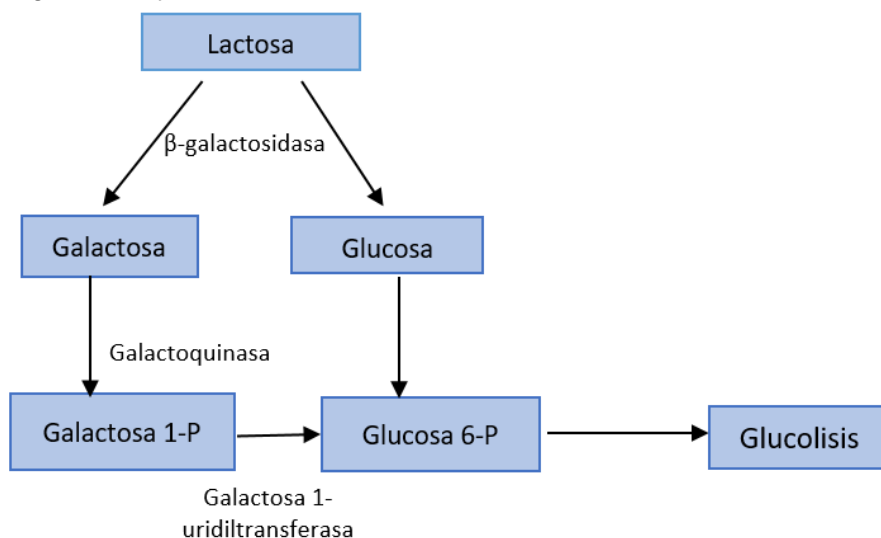


En la literatura se encuentran estudios a cerca de la producción de los polihidroxicanoatos a partir de diferentes sustratos, entre ellos sacarosa bajo condiciones limitadas de nitrógeno, alcanzando un rendimiento cercano al 50% de P(3HB) en la cepa *A. latus* (Choi & Lee 1999), de igual manera Valapill et al. (2007) han reportado acumulaciones del polímero biodegradable del 30,2% para *B. sphaericus* y 69,4% *B. mycoides* RLJB-107 utilizando sacarosa como única fuente de carbono, los resultados

obtenidos en esta investigación no están del todo alejados en comparación con los resultados de los autores mencionados (cuadro 13), ya que se trata de investigaciones llevadas a cabo con diferentes bacterias implicando así una síntesis de sustrato, expresión de enzimas y transporte de azúcares diferentes además de que las condiciones de crecimiento no fueron 100% idénticas a las reportadas por otros autores, elementos que hacen que los porcentajes de producción varíen.

Continuando con la producción de Polihidroxicanoatos en lactosa como se observa en el cuadro 11 *Serratia sp* UC-082, fue el microorganismo que alcanzó mayor acumulación de copolímero con un 61,30%, seguido de un 54,80% en *Bacillus amyloliquefanciens* UC-PSAV2EM4, la menor acumulación se presentó en *Bacillus thuringiensis* UC-036 con una producción del 46,36%, la degradación de este disacárido según Lapage & Jayaraman, (1964), Chen *et al.*, (2008) y Bakken *et al.*, (1992) se llevó a cabo hidrolizando la molécula en glucosa y galactosa, este último monosacárido es convertido en glucosa 6-fosfato (figura 24), que ingresa como glucosa vía Entner-doudoroff para los *Bacillus* y vía Embden Meyerhof para *serratia sp.*(figura 21), para continuar con la síntesis del copolímero reportada por Valappil *et al.* (2007) (figura 22).

Figura 24. Degradación de la molécula de lactosa en sus respectivos azúcares antes de ingresar vía glucolisis y continuar con la síntesis de PHAs



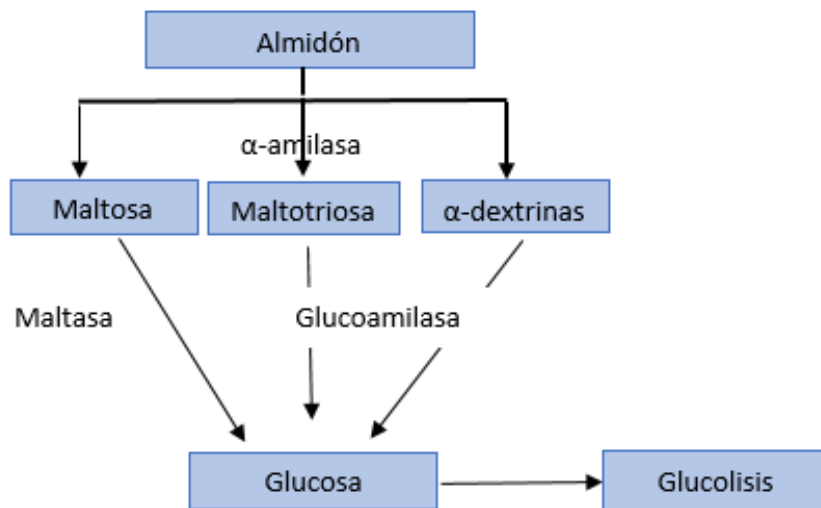
Autores como Nikel *et al.*, (2006) lograron una producción del 72,9% de P(3HB) en una fermentación a base de lactosuero, licor de maíz como fuente de carbono y nitrógeno haciendo uso de una cepa recombinante de *E. coli*, asimismo estudios hechos por Nair *et al.* (2013) evalúan la producción de polihidroxicanoatos en la cepa *Bacillus subtilis* a partir de un medio compuesto por suero de leche suplementado con 1.0 gL<sup>-1</sup> de triptona, 0.5 gL<sup>-1</sup> de extracto de levadura y 1.0 gL<sup>-1</sup> de NaCl con un pH de trabajo de 6.6–7.2, obteniendo una producción de 0,99 gL<sup>-1</sup> de PHAs (cuadro 13), los estudios mencionados anteriormente junto con los resultados obtenidos en almidón en esta investigación demuestran el potencial y capacidad de producir biopolímero a partir de lactosa como



sustrato puro o bien sea que se encuentre en subproductos de carácter industrial a partir de diferentes especies de bacterias que amplían la factibilidad de producción a gran escala del mismo.

Finalmente, la fermentación realizada en almidón, fue la que presentó menor acumulación de copolímero biodegradable en comparación con los sustratos antes mencionados, obteniendo 30,30, 26,43 y 20,20% de Polihidroxitirato-Polihidroxiclaurato para *Bacillus thuringiensis* UC-036, *Serratia sp.* UC 082 y *Bacillus amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 respectivamente, esto se debe al resultado del gasto adicional de energía que deben realizar cada uno de los microorganismos para degradar una molécula de gran tamaño como lo es el almidón a azúcares metabolizables, según Fisher & Sonenshein (1991) y Venil & Laksmanaperumalsamy (2008) la degradación del polisacárido para ambos géneros (*Bacillus* y *Serratia*) es efectuada por la enzima  $\alpha$ -amilasa que hidroliza la amilosa en maltosa, maltotriosa y  $\alpha$ -dextrinas (Figura 25) moléculas que requieren de una degradación más para ingresar a sus respectivas rutas y continuar con la síntesis del copolímero esquematizada en la Figura 22 durante la fase estacionaria.

Figura 25. Degradación de la molécula de almidón en sus respectivos azúcares antes de ingresar vía glucólisis y continuar con la síntesis de PHAs



En la literatura existen referencias que aluden al tema, entre ellos se encuentra Halami (2008), en sus investigaciones ha reportado acumulaciones de Polihidroxiclaurato del 48% aproximadamente en *Bacillus cereus*, a partir de almidón como única fuente de carbono, en donde menciona la secreción de un gran número de amilasas y proteasas características de esta especie además de la favorable acumulación de polímero registrada en esta fuente de carbono.

Shamala *et al.* (2012) por su parte evaluó la producción de PHAs de la bacteria *Bacillus sp.*CFR-67 utilizando almidón como fuente de carbono, obteniendo rendimientos del 60%

de biopolímero (2.5 g de biomasa y 1.5 gramos de PHAs), que, al caracterizarlo, se trataba del copolímero PHB-PHV con una concentración del 90 y 10% respectivamente, resultando buen candidato para la producción de polímero a partir de una fuente de carbono de bajo costo como el almidón. En el cuadro 13 se recopilan los datos correspondientes a acumulaciones de polímero biodegradable presentadas por diferentes autores en los sustratos aquí evaluados.

Por tanto, se puede concluir que en glucosa se alcanzó mayor acumulación de Polihidroxialcanoatos puesto que se trata de la fuente de carbono más sencilla de metabolizar y por lo tanto requiere un mínimo gasto energético, el bajo rendimiento obtenido en sacarosa pudo deberse a que la molécula de fructosa que conforma este disacárido es más estable a las reacciones de oxidación en comparación con la glucosa disminuyendo la eficiencia durante su degradación, en contraste la acumulación de Polihidroxialcanoatos en lactosa fue mayor que en sacarosa esto debido seguramente a que los monosacáridos de este azúcar se degradan a glucosa, haciendo más productiva su síntesis, finalmente el proceso de degradación de una molécula tan compleja como lo es el almidón limita la producción de biopolímero, ya que los microorganismos efectúan un considerable gasto energético en su degradación, razón por la cual la acumulación presentada en este sustrato para los tres microorganismos es mínima.

#### 4. CONCLUSIONES

De las 160 bacterias conservadas en el cepario del grupo de investigación ASUBAGROIN 3 demostraron potencial de acumulación de Polihidroxicanoatos a partir de glucosa, sacarosa, lactosa y almidón como fuentes de carbono.

Las cepas evaluadas fueron identificadas molecularmente como *B. thuringiensis* UC-036, *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 y *Serratia sp.* UC-082, donde el género *Bacillus* ha sido altamente reportado por diferentes autores debido a su capacidad de acumulación de PHAs, mientras que el potencial de producción de biopolímero en *Serratia sp.* ha sido poco reportado.

Se observó como el tipo de sustrato utilizado interfirió en la producción de Polihidroxicanoatos debido a que entre más compleja sea su degradación menor es la acumulación de biopolímero.

Los contenidos máximos de producción de Polihidroxicanoatos de los microorganismos en los cuatro sustratos se presentaron durante la fase estacionaria, condición relacionada con la bioacumulación de gránulos de PHA como metabolitos secundarios no asociados al crecimiento y obtención de energía del microorganismo.

La caracterización realizada al biopolímero por UHPLC-Masas y espectroscopía Infrarroja (IR-FT) determinó que el polímero obtenido en las fermentaciones se trata de un polihidroxibutirato-polihidroxivalerato.

## 5. RECOMENDACIONES

Realizar estudios acerca del proceso de escalamiento a nivel piloto para la producción de Polihidroxicanoatos con las bacterias seleccionadas utilizando residuos agroindustriales como suero de leche, melaza de caña, agua derivada del procesamiento de almidón para su posible implementación a escala industrial.

Evaluar un consorcio de las bacterias seleccionadas para la producción de PHAs utilizando residuos agroindustriales.

Complementar la identificación de las bacterias seleccionadas empleando genes como: *gyrB* y *rpoB*.

Utilizar técnicas moleculares para la detección de los genes de PHA sintasa involucrados en la acumulación del copolímero de las bacterias seleccionadas.

Continuar con la caracterización del copolímero obtenido siguiendo metodologías como Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-Ray Diffraction (XRD), Cell Dry Weight (CDW) y Thermogravimetric Analysis (TGA) que confirmen su naturaleza.

## BIBLIOGRAFÍA

ACOPLASTICOS. Editorial. Ante el nuevo entorno [en línea], 2013 [citado 17, abril, 2016], Disponible en internet en: <[http://www.acoplasticos.org/images/banners/publicaciones/PEC2016\\_2Editorial.pdf](http://www.acoplasticos.org/images/banners/publicaciones/PEC2016_2Editorial.pdf)>.

AESCHELMAN, F. y CARUS, M. Bio Based building blocks and polymers in the world-capacities, production and applications: status quo and trends towards 2020 [en línea]. Inova Institute. Hurth, Alemania: diciembre, 2015 [citado 06, marzo, 2017], pp. 1-23. Disponible en internet en: <[http://www.biobased.eu/market\\_study/media/files/15-05-13\\_Bio-based\\_Polymers\\_and\\_Building\\_Blocks\\_in\\_the\\_World-nova\\_Booklet.pdf](http://www.biobased.eu/market_study/media/files/15-05-13_Bio-based_Polymers_and_Building_Blocks_in_the_World-nova_Booklet.pdf)>.

AHN, J. *et al.* Increased 3HV concentration in the bacterial production of 3-Hydroxybutyrate (3HB) and 3-Hydroxyvalerate (3HV) copolymer with acid-digested rice straw waste. En: Journal of Polymers and the Environment, junio, 2016, vol. 24, no. 2, pág. 98-103.

AIRES DA SILVA, D. *et al.* Production of medium-chain-length by *Pseudomonas oleovorans* grown in sugary cassava extract supplemented with andiroba oil Food. En: Food Science and Technology. Campinas, Brasil: noviembre, 2014, vol. 34, pág. 738-745.

ALARFAJ, A. *et al.* Extraction and Characterization of Polyhydroxybutyrates (PHB) from *Bacillus thuringiensis* KSADL127 Isolated from Mangrove Environments of Saudi Arabia. En: Brazilian Archives of Biology and Technology. Arabia Saudi, 2015, vol. 58, pág. 781-788.

ALBUQUERQUE, M.G.; TORRES, M. and REIS, M. Polyhydroxyalkanoate (PHAs) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: effect of the influent substrate concentration on culture selection. En: Water Research. Portugal: junio, 2010, vol. 44, pág. 3419-3433.

ALTSCHUL, S., *et al.* Basic local alignment search tool. En: Journal of Molecular Biology. Estados Unidos: mayo, 1990, vol. 215, pág. 403-410.

ANDREW, J. *et al.* Methanotrophic production of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate with high hydroxyvalerate content. En: International Journal of Biological Macromolecules, vol. 87, junio, 2016, pág. 302–307.

ANSARI, S. y FATMA, T. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization. En: PLoS ONE, 2016, vol. 11, no. 6, pág. 158-168.

ARAMVASH, A. *et al.* Effective enhancement of hydroxyvalerate content of PHBV in *Cupriavidus necator* and its characterization. En: International Journal of Biological Macromolecules, vol. 87, junio, 2016, pág. 397-404.

BABEL W. y STEINBÜCHEL A. Biopolyesters. Special issue of advances in Biochem. Eng. Biotechnology. 1 ed., Springer-Verlag. Berlin, Alemania: 2001, pág. 11-18.

BAKKEN, A.P. *et al.* Hydrolysis of lactose in skim milk by immobilized  $\beta$ -galactosidase (*Bacillus circulans*). En: Biotechnology and Bioengineering, 1992, vol. 39, pág. 408-417.

BARBOSA, M. *et al.* Producción de Poli-b-Hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. En: Universitas Scientiarum, Colombia: 2005, vol. 10, pág. 45-54.

BHATIA, S. *et al.* Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered *Escherichia coli*. En: Bioprocess and biosystem engineering, 2015, vol. 38, pág. 1479-1484.

BELAL, E. B. Production of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyric Acid (PHB) by *Rhizobium elti* and *Pseudomonas stutzeri*. En: Current Research Journal of Biological Sciences, Egipto: 2013, vol. 5, pág. 273–284.

BENGTSSON, S. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from fermented sugar cane molasses by a mixed culture enriched in glycogen accumulating organisms. En: Journal of Biotechnology, Portugal: febrero, 2010, vol. 145.

BLANCO, K. Detección de gránulos de polihidroxialcanoatos en la cepa USBA 355 *Tistlia consotensis*. Trabajo de grado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C.: 2010.

BOSCO, F. y CHIAMPO, F. Production of polyhydroxyalcanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge: Production of bioplastics using dairy residues. En: Journal of bioscience and bioengineering, Torino, Italia: abril, 2010, vol. 109, no. 4, pág. 418-421.

BRÄMER, C. *et al.* Polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. En: International journal of systematic and evolutionary microbiology, Alemania: 2001, vol. 51, pág. 1709–1713.

BURDON, K. Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations. Department of Bacteriology and Immunology. Baylor University College of Medicine. Houston. Texas: 1946.

CALLEJAS, J. *et al.* Caracterización físicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. En: Revista Acta Universitaria, México: febrero, 2012, vol. 21, pág. 11-18.

CAMACHO-MUÑOZ, R. y HOYOS-CONCHA, J. Biodegradación anaerobia de un material biodegradable bajo digestión anaerobia termófila. En: Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial, Popayán, Colombia: 2014, vol. 12, no. 2, pág. 20-29.

CANADASA, R. *et al.* Polyhydroxyalkanoates: Waste glycerol upgrade into electrospun fibrous scaffolds for stem cells culture. En: International Journal of Biological Macromolecules, Portugal: noviembre, 2014, vol. 71, pág.131–140.

CAPPUCCINO, J., & SHERMAN, N. Microbiology: A Laboratory Manual [en línea]. Benjamin Cummings. 7 ed. E.U.: abril, 2004 [citado 9, febrero, 2017], pág. 544. Disponible en internet en: < <https://faculty.washington.edu/korshin/Class->>.

CASTRO, J., FABRA, M. y LAGARON, J. Stabilized nanosilver based antimicrobial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) nanocomposites of interest in active food packaging. En: Innovative Food Science & Emerging Technologies, Valencia, España: febrero, 2016, vol. 33, pág. 524–533.

CERRONE, F. *et al.* Use of a mannitol rich ensiled grass press juice (EGPJ) as a sole carbon source for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production through high cell density cultivation. En: Bioresource Technology, Irlanda: septiembre, 2015, vol. 191, pág. 45–52.

CHA, S. *et al.* Characterization of polyhydroxyalkanoates extracted from wastewater sludge under different environmental conditions. En: Biochemical Engineering Journal, Korea: diciembre, 2015, vol. 112, pág. 1-12.

CHEN, G. Introduction of bacterial plastics PHAs, PLA, PBS, PE, PTT and PPP. En: Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications, 2010, vol. 14, pág. 450.

CHEN, W., *et al.* Production, purification, and characterization of a potential thermostable galactosidase for milk lactose hydrolysis from bacillus stearothermophilus. En: Journal of Dairy Science, 2008, vol. 91, pág. 1751- 1758.

CIESIELSKI, S.; MOŻEJKO, J. and PISUTPAISAL. Plant oils as promising substrates for polyhydroxyalkanoates production. En: Journal of cleaner production, Polonia: noviembre, 2015, vol. 106, pág. 408-421.

CHARDRON, S. *et al.* Characterization of bionanocomposites based on medium chain length polyhydroxyalkanoates synthesized by *Pseudomonas oleovorans*. En: *Polymer Testing*, 2010, vol. 29, pág. 966-971.

CHRISTELLE S., *et al.* Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from alkanoates and glucose. En: *International Journal of Biological Macromolecules*, Francia: diciembre, 2012, vol. 51, pág. 1063-1069.

\_\_\_\_\_. Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from various carbon sources. En: *Reactive and Functional Polymers*. Francia: noviembre, 2008, vol. 68, pág. 1534-1541.

CHOI, J. & LEE, S.Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, vol. 51, pág. 13-21.

CRUZ, M. *et al.* Valorization of fatty acids-containing wastes and byproducts into short- and medium-chain length polyhydroxyalkanoates. En: *New Biotechnology*, Portugal: enero, 2016, vol. 33, no. 1, pág. 206–215.

COLE, J., *et al.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. En: *Nucleic Acids Research*, Michigan: octubre, 2008, vol. 37, pág. 141-145.

EGLI, T. On multiple-nutrient-limited growth of microorganisms, with special reference to dual limitation by carbon and nitrogen substrates. En: *Antonie van Leeuwenhoek*, 1991, vol. 60, pág. 225-234.

ELAIN, A. *et al.* Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production. En: *Industrial Crops and Products*, Lorient, France: febrero, 2016, vol. 80, pág. 1-5.

FABRA, M. *et al.* Combining polyhydroxyalkanoates with nanokeratin to develop novel biopackaging structures. En: *Journal of applied polymer science*. Valencia, España: enero, 2016, vol. 133, no. 2, pág. 1-15.

FERNANDEZ, A. *et al.* Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología [en línea]. España: 2010 [citado 6, febrero, 2017]. Disponible en internet en: <<https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>>. ISBN-978-84-614-7932-0.



FERNANDEZ, C. *et al.* Biobased Monoliths for Adenovirus Purification. En: ACS Applied materials & interfaces, Portugal: abril, 2015, vol. 7, pág. 6605-6612.

FERNANDEZ, P. *et al.* Caracterización de poli-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycooides*, FLB2. En: Sistema Institucional de Gestión de Revistas Académicas Universidad de Nariño, 2005, vol. 1, no. 6.

\_\_\_\_\_. Influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno en el crecimiento bacteriano y síntesis de polihidroxialcanoatos de una cepa de *Bacillus Micooides* FBL2. En: Revista Centro de Estudios en Salud, San Juan de Pasto: marzo, 2006, vol. 3, pág. 34-42.

FISHER, S.H. & SONENSHEIN, A.L. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. En: Annual Reviews in Microbiology, Boston, Massachusetts: 1991, vol. 45, pág. 107-135.

FOLLONIER, S. *et al.* Fruit pomace and waste frying oil as sustainable resources for the bioproduction of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. En: International Journal of Biological Macromolecules, Suiza: mayo, 2014, vol. 71, pág. 42-52.

GANAPATHY, K. *et al.* Optimization of polyhydroxybutyrate production utilizing waste water as nutrient source by *Botryococcus braunii* Kutz using response surface methodology. En: International Journal of Biological Macromolecules, vol. 93 part A, diciembre, 2016, pág. 534-542.

GALVAO, M. *et al.* Validation of a spectrophotometric methodology for the quantification of polysaccharides from roots of *Operculina macrocarpa* (jalapa). En: Revista Brasileira de Farmacognosia. Brasil: noviembre-diciembre, 2014, vol. 24, no. 6, pág. 683-690.

GANGADHARAN, D., *et al.* Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. En: Food Technology and Biotechnology, India: marzo, 2006, vol. 44, no. 2, pág. 269-274.

GOMÉZ, J., *et al.* Production and Characterization of Polyhydroxyalkanoates and Native Microorganisms Synthesized from Fatty Waste. En: International Journal of Polymer Science, Medellín: enero, 2016, vol. 2016, pág. 1-13.

GONZALEZ, Y. *et al.* Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. En: Rev. Int. Contam. Ambient., México: febrero, 2013, vol. 29, no. 1, pág. 77-115.

GRIMONT, F. & GRIMONT, P.A.D. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Serratia. John Wiley & Sons, Ltd. Francia: 2015, pág. 1-22.

HALAMI, P.M. Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. En: *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, India: 2008, vol. 24, pág. 805-812.

HISASHI, A. *et al.* A study on the relation between Poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator* H16. En: *Journal of Biotechnology*, 2016, vol. 227, pág. 94-102.

HORI, K. *et al.* Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. En: *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 59, no. 2-3, pág. 211-216.

HUU PHONG, T.; VAN THUOC, D. y SUDESH, K. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers by *Yangia* sp. ND199 from different carbon sources. En: *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, vol. 84, pág. 361-366.

ISRANI, N., & SHIVAKUMAR, S. Evaluation of Upstream Process parameters influencing the growth associated PHAs accumulation in *Bacillus* sp. Ti3. En: *Journal of Scientific & Industrial Research*, India, 2015, vol. 74, pág. 290-296.

JACQUEL, N. *et al.* Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). En: *Biochemical Engineering Journal*, Taiwan: Abril, 2008, vol. 39, no. 1, pág. 15-27.

JAY SHANKAR, S. *et al.* Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. En: *Biotechnology Advances*, Canada: noviembre, 2015, vol. 33, pág. 756-774.

KELLERHALS, M., KESSLER, B. and WITHOLT, B. Closed-loop control of bacterial high-cell-density fed-batch cultures: production of mcl-PHAs by *Pseudomonas putida* KT2442 under single-substrate and cofeeding conditions. En: *Biotechnol Bioeng.*, Zurich, Suiza: noviembre, 1999, vol. 65, no. 3, pág. 306.

KESHAVARZ, T. y ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. En: *Current Opinion in Microbiology*, Reino Unido: junio, 2010, vol. 13, no. 3, pág. 321-326.

KESSLER, B. & WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. En: *Journal of Biotechnology*, 2001, vol. 86, pág. 97-104.

KIM, B. y CHANG, N. Production of Poly (3-Hydroxybutyrate) from Starch by *Azotobacter Chroococcum*. En: *Biotechnology Letters*, Korea: febrero, 2016, vol. 20, no. 2, pág. 109–112.

KOLLER, M; *et al.* Sustainable and efficient production of biopolymers from industrial waste streams [en línea]. En: *European Roundtable on Sustainable Consumption and Production (15: Bregenz, Austria: 2-4, mayo, 2012, ERSCP)* [Citado 06, marzo, 2017]. Disponible en internet en: <[http://erscp2012.eu/upload/doc/ERSCP\\_Full\\_Papers/Koller\\_ERSCP\\_2012\\_fullpaper.pdf](http://erscp2012.eu/upload/doc/ERSCP_Full_Papers/Koller_ERSCP_2012_fullpaper.pdf)>.

KOLLER, M., *et al.* Microbial PHAs Production from Waste Raw Materials. *Plastics from Bacteria*. En: *Microbiology Monographs*, Berlín: 2010, vol. 14, pág. 85-119.

KUMAR, P. *et al.* Ecobiotechnological approach for exploiting the abilities of *Bacillus* to produce co-polymer of polyhydroxyalkanoates [en línea]. En: *Indian Journal of Microbiology*, India: febrero, 2014, vol. 54, no. 2, pág. 1–7.

KUMAR, P.; RAY, S. y KALIA, V. Production of co-polymers of polyhydroxyalkanoates by regulating the hydrolysis of biowastes. En: *Bioresource Technology*, India: enero, 2016, vol. 200, pág. 413–419.

LANE, D. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. 16S/23S Rna sequencing. Stackebrandt, E. & Oudfellow, M. (Ed). John Wiley & Sons. Chichester, England: 1991, pág. 115-163.

LAPAGE, S.P., & JAYARAMAN, M.S. Beta-galactosidase and lactose fermentation in the identification of enterobacteria including salmonellae. En: *Journal of Clinical Pathology*, Colindale, 1964, vol. 17, pág. 117-121.

LEHNINGER, A. *et al.*, *Lehninger principles of Biochemistry* (2008). W. H. Freeman.

LEVINE A.; HEBERLIG, G. and NOMUR, C. Use of thiol-ene click chemistry to modify mechanical and thermal properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs). En: *International Journal of Biological Macromolecules*. Estados Unidos: febrero, 2016, vol. 83, pág. 358–365.

LIYA, G. Determination of monomeric composition in polyhydroxyalkanoates by liquid chromatography coupled with on-line mass spectrometry and off-line nuclear magnetic resonance. En: *Talanta*, Singapur: enero, 2016, vol. 146, pág. 107–113.

LIU, Y. *et al.* Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 from a biotrickling filter for the production of polyhydroxybutyrate. En: Journal of Environmental Sciences, 2014, vol.26, no. 7, pág. 1453-1462.

LOPEZ, M. Óxidos mixtos del tipo  $CO_x CO_y / MgO - Al_2O_3$  y su promoción con rutenio como catalizadores para la síntesis Fischer-Tropsch. En: Revista académica colombiana cienc., marzo, 2014, vol. 38, pág. 93-103.

LÓPEZ, S., ESPINAL, C. and MOLLINEDO, P. Quality assessment of glucose syrup produced by enzymatic hydrolysis of alpha-amylase and amyloglucosidase from starch of manihot esculenta. En: Bolivian Journal of Chemistry, 2015, vol. 32, no. 2, pág. 24-29.

LUGG, H. *et al.* Polyhydroxybutyrate accumulation by a *serratia* sp. En: Biotechnology letters, Reino Unido: marzo, 2008, vol. 30, pág. 481-491.

MACASKIE, L.E., *et al.* Accumulation of polyhydroxybutyrate by a *Serratia* sp. En: Journal of Biotechnology, Reino Unido: 2008, vol. 136, pág. S406-S407.

MADISON, L. & HUISMAN, G. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic Microbiological. En: Microbiology and molecular biology reviews, Massachusetts, Estados Unidos: marzo, 1999, vol. 63, no.1, pág. 21-53.

MAMTESH, S.; SANJAY, A. and VIPIN, K. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. En: Microbial cell factories, India: 2009, vol. 8. no.1, pág. 1.

MARCHESSAULT, R. *et al.* Microbial medium chainlength poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] shows liquid crystal behaviour. En: International Journal of Biological Macromolecules. 2011, vol. 48, pág. 271-275.

MASOOD, F. *et al.* Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from *Bacillus cereus* FA11 isolated from TNT-contaminated soil. En: Annals of microbiology, vol. 62, no. 4, pág. 1377-1384.

McCOOL, G.J. *et al.*, Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. En: FEMS Microbiology Letters, 1996, vol. 138, pág. 41-48.

MESQUITA, D. *et al.* Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. En: Analytica Chimica Acta, Portugal: marzo, 2015, vol. 865, pág. 8-15.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. En: Anal. Chem., vol. 31, pág. 426-428.

MIZUNO, K. *et al.* Isolation of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from a polluted soil and characterization of the isolated strain *Bacillus cereus* YB-4. En: Polymer Degradation and Stability, Japón: 2010, vol. 95, pág. 1335-1339.

MOHAMMAD A., *et al.* Bahklia. Polyhydroxyalkanoates production via *Bacillus* plastic composite support (PCS) biofilm and date palm syrup. En: Journal of Medicinal Plants Research, Arabia Saudita: julio, 2011, vol. 5, no. 14, pág. 3312-3320.

MOORKOTH, D. and NAMPOOTHIRI, K. Production and characterization of poly (3-hydroxy butyrate-co-3 hydroxyvalerate) (PHBV) by a novel halotolerant mangrove isolate. En: Bioresource Technology, India: febrero, 2016, vol. 201, pág. 253–260.

MOZEJKO, J. y KIEWISZ, R. Bacterial Polyhydroxyalkanoates: Still Fabolous?. En: Microbiological ressearch, Olsztyn, Polonia: julio, 2016, vol. 192, pág. 271-282.

MUANGWONG, A. *et al.* Medium chain length polyhydroxyalkanoates consisting primarily of unsaturated 3-hydroxy-5-cis-dodecanoate synthesized by newly isolated bacteria using crude glicerol. En: Microbial Cell Factories, Tahilandia: marzo, 2016, vol. 15, pág. 15-55.

MURUGAN, P. *et al.* A New Biological Recovery Approach for PHA Using Mealworm, *Tenebrio Molitor*. En: Journal of Biotechnology, Malaysia: diciembre, 2016, vol. 239, pág. 98–105.

MUTLU, H. y MEIER, M. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. En: European journal of lipid science and technology, enero, 2010, vol. 112, pág. 10-30.

NAHEED, N. & JAMIL, N. Analysis of Polyhydroxyalkanoates Granules in *Bacillus* sp. MFD11 and *Enterobacter* sp. SEL2. En: Journal of the Chemical Society of Pakistan, 2016, vol. 38, pág. 1139–1150.

NAIR, A.M. *et al.* Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Bacillus subtilis* isolated from soil samples. En: Malay Journal Biosciences, Korea del Sur: 2013, vol. 1, pág. 8–12.

NARANJO, J. Producción de polihidroxibutirato a partir de residuos agroindustriales [en línea]. Trabajo de grado Magister en Ingeniería Química. Universidad Nacional de

Colombia sede Manizales. Colombia: 2010 [Citado 06, marzo, 2017], 127p. Disponible en internet: <<http://www.bdigital.unal.edu.co/2315/1/javiermauricionaranjovasco.2010.pdf>>.

NAYAK, P. *et al.* Rapid identification of polyhydroxyalkanoate accumulating members of bacillales using internal primers for *phaC* gene of *Bacillus megaterium*. En: Bacteriology, India: junio, 2013, pág. 1-12.

NIKODINOVIC-RUNIC, M. *et al.* Carbon-rich wastes as feedstocks for biodegradable polymer (polyhydroxyalkanoate) production using bacteria. En: Appl. Microbiol. Dublin: junio, 2013, vol. 84, pág. 139–200.

NIKEL, P.I. *et al.* New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. En: Applied and Environmental Microbiology, Buenos Aires, Argentina: 2006, vol. 72, pág. 3949-3954.

NUBEL, U. *et al.* Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. En: Journal of Bacteriology, Alemania: 1996, vol. 178, pág. 5636-5643.

ORTIZ, M. El impacto de los plásticos en el ambiente. Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) [en línea]. México: 27, mayo, 2013 [citado 06, marzo, 2017]. Disponible en internet en: <<http://www.jornada.unam.mx/2013/05/27/eco-f.html>>.

OSTLE, A.G. & HOLT, J.G. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. En: Applied and Environmental Microbiology, Estados Unidos: 1982, vol. 44, no. 1, pág. 238-241.

OTERO, I. y FERNÁNDEZ, P. Bioprospección de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHAs) en el departamento de Nariño. En: Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial. Popayán, Colombia: 2013, Ed. Especial, pág. 12-19.

OTERO, I. y FERNÁNDEZ, P. Remoción de materia orgánica de las aguas residuales vertidas al Río Pasto con bacterias productoras de polihidroxialcanoatos [en línea]. Trabajo de grado Biólogo. Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Departamento de Biología. Pasto, Colombia: 2012 [citado 14, marzo, 2017]. , 127p. Disponible en <<http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/85371.pdf>>.

PAIS, J. *et al.* Improvement on the yield of polyhydroxyalkanotes production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide methodology. En: Enzyme and Microbial Technology, Sevilla, España: febrero, 2014, vol. 55, pág. 151–158.

PAL, A. *et al.* Optimization of process parameters for maximum Poly(-beta-) hydroxybutyrate(PHB) production by bacillus thuringiensis IAM 12077. En: Polish Journal Microbiology, Bangalora: 2009, vol. 58, pág. 149-154.

PANTAZAKI, A. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from whey by Thermus thermophilus HB8. En: Process Biochemistry, Grecia: 2009, vol. 44, no. 8, pág. 847-853.

PATEL, S. *et al.*, Integrative Approach for Producing Hydrogen and Polyhydroxyalkanoate from Mixed Wastes of Biological Origin. En: Indian Journal of Microbiology, vol. 56, no. 3.

POOMIPUK, N.; REUNGSANG, A. and PLANGKLANG, P. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates production from cassava starch hydrolysate by Cupriavidus sp. KCU38. En: International Journal of Biological Macromolecules. Tahilandia: abril, 2014, vol. 65, pág. 51–64.

POVOLO, S. *et al.* Polyhydroxyalkanoates production by engineered Cupriavidus necator from waste material containing lactose. En: Bioresource technology. Padova, Italia: octubre, 2010, vol. 101, no. 20, pág. 7902-7907.

PRIYANKA, L. *et al.* Optimization of culture parameters for maximum polyhydroxybutyrate production by selected bacterial strains isolated from rhizospheric soils. En: Polish journal of microbiology, 2015, vol. 64, no. 3, pág. 227-239.

RAI, R. *et al.* Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. En: Materials Science and Engineering. 2016, vol. 72, pág. 29-47.

RAY, S. & KALIA, V.C. Co-metabolism of substrates by Bacillus thuringiensis regulates polyhydroxyalkanoate co-polymer composition. En: Bioresource Technology, India: 2016, vol. 224, pág. 743-747.

RIAÑO *et al.* Analysis of polyhydroxyalkanoate synthases (PhaC1 and PhaC2) in a strain of Pseudomonas fluorescens IBUN S1602 isolated from Colombian soil. En: Rev. colomb. Biotecnol, Bogota: 2011, vol.13 no. 2.

RODRIGUEZ, A. *et al.* Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel Bacillus megaterium strain. En: New Biotechnology, Tahilandia: enero, 2016, vol. 33, no. 1, pág. 73–77.

RODRIGUEZ-COLINAS, B. *et al.* Galactooligosaccharides formation during enzymatic hydrolysis of lactose: towards a prebiotic-enriched milk. En: Food Chemistry, Madrid, España: febrero, 2014, vol. 145, pág. 388-394.

ROHINI, D. *et al.* Synthesis and characterization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. En: Indian Journal of Biotechnology, India: 2006, vol. 5, no. 3, pág. 276-283.

ROJAS E., *et al.* Producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de *Ralstonia eutropha* en un medio con harina de yuca como fuente de carbono. En: Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial, vol. 14, no. 1. Popayán, Colombia: 2016.

SABBIR, A. & TASNEEM, F. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization. En: PLOS ONE, 2016, vol. 11, no. 6.

SALAZAR, D.P. Estudio del desarrollo industrial en la producción de polihidroxialcanoatos en la primera década del siglo XXI [en línea]. Trabajo de grado Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá D.C.: 2010 [citado 06, marzo, 2017], pág. 5-28. Disponible en internet en: <<http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8461/1/tesis427.pdf>>.

SALGAONKAR, B. *et al.* Characterization of polyhydroxyalkanoates accumulated by a moderately halophilic salt pan isolate *Bacillus megaterium* strain H16. En: Journal of applied microbiology, 2013, vol. 114, no. 5, pág. 1347-1356.

SAMBROOK, J., *et al.* Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: 1989, pág. 4748-4750.

SANG H., *et al.* Characterization of polyhydroxyalkanoates extracted from wastewater sludge under different environmental conditions. En: Biochemical Engineering Journal, agosto, 2016, vol. 112, pág. 1-12.

SAQIB, A. y WHITNEY, P. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. En: Biomass and Bioenergy, Reino Unido: noviembre, 2011, vol. 35, no.11, pág. 4748-4750.

SHAMALA, T. *et al.* Agro-industrial residues and starch for growth and co-production of polyhydroxyalkanoate copolymer and  $\alpha$ -amylase by *Bacillus* sp. CFR-67. En: Brazilian Journal of Microbiology, India: septiembre, 2012, vol. 43, pág. 1094-1102.

SHIVAKUMAR, S. Polyhydroxybutyrate (PHB) production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. En: International Journal of ChemTech Research, India: septiembre, 2012, vol. 4, pág. 1158-1162.



SILVA, A. *et al.* Seleção polifásica de microrganismos produtores de polihidroxicanoatos. En: Quim. Nova, 2016, vol. 39, no. 7, pág. 782-788.

\_\_\_\_\_. Poliphasic screening of polyhydroxyalkanoate-producing microorganisms. En: Química Nova. Maceió: mayo, 2016, vol. 39, pág. 782–788.

SINGH, M. *et al.* Bacillus subtilis as potential producer for polyhydroxyalkanoates. En: Microbial Cell Factories, 2009, vol. 8, no. 1, pág. 38.

STACKEBRANDT, E. y GOODFELLOW, M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley Interscience Publishers. England: 1997, pág. 115-163.

SHAILESH, S.; BIPINCHANDRA, K. and SALUNKE, B. Degradation of corn stover by fungal cellulase cocktail for production of polyhydroxyalkanoates by moderate halophile Paracoccus sp. LL1. En: Bioresource Technology, Republica de Korea: octubre, 2015, vol. 194, pág. 247–255.

SOUZA, C. *et al.* Chitinolytic bacteria diversity isolated from marine ecosystems with different levels of anthropogenic activity in São Paulo State, Brazil. En: Applied and Environmental Microbiology. Sao Paolo, Brasil: abril, 2011, vol. 77, pág. 4208-4216.

SOLAIMAN, D.K.; ASHBY, R.D. and FOGLIA, T.A. Rapid and specific identification of medium-chain-length Polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. En: Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, vol. 53, pág. 690-694.

SUCHADA, C. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. En: Journal of Bioscience and Bioengineering, Tailandia: diciembre, 2010, vol. 110, no 6, pág. 621–632.

TANAMOOL, V. *et al.* Screening, identification and production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by sucrose utilizing microbes isolated from soil environments. En: Journal of Biotechnology, Tailandia: noviembre, 2010, vol. 150, pág. 361-361.

TAJIMA, K. *et al.* In vitro synthesis of polyhydroxyalkanoates using thermostable acetyl-CoA synthetase, CoA transferase, and PHAs synthase from thermotolerant bacteria. En: Journal of Bioscience and Bioengineering, diciembre, 2016, vol. 122, no. 6, pág. 660–665.

TAMURA, K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. En: Molecular Biology and Evolution, Japón: octubre, 2011, vol. 28, pág. 2731-2739.

TAN, G. *et al.* Enhanced Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method for Bacterial Polyhydroxyalkanoates Analysis. En: Journal of Bioscience and Bioengineering, Singapore: agosto, 2013, vol.117, no. 3, pág.379–382.

THUOC, D.V. and QUILLAGUAMÁN, J. Improving culture conditions for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *Bacillus* sp. ND153, a bacterium isolated from a mangrove forest in Vietnam. En: Annals of Microbiology, 2014, vol. 64, pág. 991-997.

URTUVIA, V. *et al.* Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. En: International Journal of Biological Macromolecules, septiembre, 2014, vol. 70, pág. 208–213.

VALAPPIL, S. *et al.* Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: Insights from the genera bacillus and streptomyces. En: Antonie van Leeuwenhoek, mayo, 2007, vol. 91, pág. 1-17.

VALENTINO, F. *et al.* Fate of  $\beta$ -hexachlorocyclohexane in the mixed microbial cultures (MMCs) three-stage polyhydroxyalkanoates (PHAs) production process from cheese whey. En: Bioresource Technology, Roma, Italia: septiembre, 2015, vol. 192, pág. 304–311.

VALERO V., M.; ORTEGON, Y. and USCATEGUI, Y. Biopolímeros: avances y perspectivas. En: Dyna Rev.Fac.Nac.Minas, Medellín, Colombia: 2013, vol. 80, no. 181, pág. 171-180.

VALLE, F. Estrategia de comunicación para promover el uso de biodigestores plásticos en las fincas del Cantón Salitre. En: Yachana revista científica, Guayaquil, Ecuador: noviembre, 2015, vol. 4, edición especial, pág. 49-53.

VAN-THUOC, D; QUILLUAGUAMAN, J. and MAMO, G. Utilization of agricultural residues for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1. En: Journal of applied microbiology, Suecia: febrero, 2008, vol. 104, no. 2, pág. 420-428.

VENIL, C.K. and LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *serratia marcescens* SB08. En: Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, Pakistán: 2008, vol. 51, pág. 333-339.

VERLINDEN, R. *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*. En: Biochemical Engineering Journal. 2011, vol. 97, pág. 92-100.

WANG, Y. *et al.* Enhancement of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates biosynthesis from glucose by metabolic engineering in *Pseudomonas mendocina*. En: *Biotechnology Letters*, Tiajin, China: 2016, vol. 38, pág. 313-320.

YANG, C. *et al.* Analysis of polyhydroxyalkanoate (PHAs) synthase gene and PHAs-producing bacteria in activated sludge that produces PHAs containing 3-hydroxydodecanoate. En: *Microbiology Letters*, julio, 2013, vol. 346, no. 1.

YEE, L. *et al.*, Polyhydroxyalkanoate synthesis by recombinant *Escherichia coli* JM109 expressing PHAs biosynthesis genes from *Comamonas* sp. EB172. En: *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, Malasia: 2012, vol. 4, pág. 103-110.

YU *et al.* The response of rat cerebellar granule neurons (rCGNs) to various polyhydroxyalkanoate (PHAs) films. En: *Desalination*, República de China: febrero, 2009, vol. 245, pág. 639-646.

ZAIN, N. *et al.* Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates (PHAs) producing bacteria from brackish stream. En: *Journal Technology*, julio, 2016, vol. 78, no. 7, pág. 75-81.

ZHANG, H., *et al.* The roles of starch metabolic pathways in the cold-induced sweetening process in potatoes: Starch metabolic pathways in the process of potato cold-induced sweetening. En: *Starch - Stärke*, enero, 2017, vol. 69, pág. 1-2.

ZHANG, H., *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. En: *Applied and Environmental Microbiology*, Harrisonburg, Virginia: 1994, vol. 60, pág. 1198-1205.

ZIRUI G. *et al.* Strategy to reduce the acclimation period for enrichment of PHA accumulating cultures. En: *Desalination and water treatment*, 2016, vol. 57, no. 60, pág. 29286-29294.

## ANEXOS

### ANEXO A. EVALUACIÓN DE 160 BACTERIAS EN AZUL NILO EN PRESENCIA DE GLUCOSA COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO

Nº	Bacterias	24 horas		48 horas		72 horas	
		Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia
1	BAC 044	X		X		X	
2	BAC 058	X		X		X	
3	BAC 024	X		X		X	
4	BAC 018	X		X		X	
5	BAC 051	X		X		X	
6	BAC 039	X		X		X	
7	BAC 037	X		X		X	
8	BAC 020	X		X		X	
9	BAC 031	X		X		X	
10	BAC 025	X		X		X	
11	BAC 026	X		X		X	
12	BAC 027	X		X		X	
13	BAC 022	X		X		X	
14	BAC 038	X		X		X	
15	BAC 019	X		X		X	
16	BAC 040	X		X		X	
17	BAC 016	X		X		X	
18	BAC 043	X		X		X	
19	BAC 042	X		X		X	
20	BAC 041	X		X		X	
21	BAC 031	X		X		X	
22	BAC 057	X		X	azul	X	azul
23	BAC 060	X		X		X	
24	BAC 034	X		X		X	
25	BAC 056	X		X		X	azul
26	BAC 030	X		X		X	
27	BAC 066	X		X		X	
28	BAC 017	X		X		X	azul
29	BAC 048	X		X	azul	X	azul
30	BAC 065	X		X	azul	X	azul
31	BAC 035	X		X	azul	X	azul
32	BAC 033	X		X	azul	X	azul
33	BAC 036	X		X	azul	X	azul
34	BAC 045	X		X	azul	X	azul
35	BAC 062	X		X	azul	X	azul
36	BAC 052	X		X	azul	X	azul
37	PCALLM35	X		X		X	
38	PSAV2EM4	X		X	azul	X	azul
39	PCALLM45	X		X		X	
40	PCA23M9	X		X		X	
41	PCALLM37	X		X		X	

N°	Bacterias	24 horas		48 horas		72 horas	
		Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia
42	PCAR3M1	X		X		X	
43	PSAR2M3	X		X		X	
44	PSAVLEM2	X		X		X	
45	PSML2M6	X		X		X	
46	PCAR3M4	X		X	verde	X	verde
47	PCAVTM9	X		X		X	
48	PSMR2M5	X		X		X	
49	PCALLM44	X		X		X	
50	SML2EM5	X		X		X	
51	SMR2M6PCA	X		X		X	
52	SMLRM2PCA	X		X		X	
53	SMR2M4PCA	X		X		X	
54	SMR2M6PCA	X		X		X	
55	SMR2M4PCA	X		X		X	
56	PSAVLEM3	X		X		X	
57	PSAVTM11	X		X		X	
58	PSMR2M1	X		X		X	
59	PSMR2M4	X		X		X	
60	PSALM8	X		X		X	
61	PSMLRM2	X		X		X	
62	PCALLM32	X		X		X	
63	PCMR2EM2	X		X		X	
64	PSALM2	X		X		X	
65	PCAVTM1	X		X		X	
66	PSAV2EM5	X		X		X	
67	YGCVTM2	X		X		X	
68	PSMRM3	X		X		X	
69	PSAR3L3	X		X		X	
70	PSALL41	X		X		X	
71	PSMLRM5	X		X		X	
72	PSAR3M4	X		X	verde	X	verde
73	PSML2M5	X		X		X	
74	PCALLM31	X		X		X	
75	PCALLM42	X		X		X	
76	PSMR2M3	X		X		X	
77	PSML2M4	X		X		X	
78	PSAELPM9	X		X		X	
79	PCALLM37	X		X		X	
80	PCALLM	X		X		X	
81	PSMRL5M5	X		X		X	
82	SMLRM2PCA	X		X		X	
83	PSMLRM8	X		X		X	
84	BAC 047	X		X		X	
85	BAC 008	X		X		X	
86	BAC 067	X		X		X	
87	BAC 068	X		X		X	
88	BAC 069	X		X		X	
89	BAC 070	X		X		X	

N°	Bacterias	24 horas		48 horas		72 horas	
		Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia
90	BAC 071	X		X		X	
91	BAC 072	X		X		X	
92	BAC 073	X		X		X	
93	BAC 074	X		X		X	
94	BAC 075	X		X		X	
95	BAC 076	X		X		X	
96	BAC 077	X		X		X	
97	BAC 078	X		X		X	
98	BAC UC 079	X		X		X	
99	BAC 080	X		X		X	
100	BAC 081	X		X		X	
101	BAC 082	X		X	azul	X	azul
102	BAC 083	X		X		X	
103	BAC 084	X		X		X	
104	BAC 085	X		X		X	
105	BAC 086	X		X		X	
106	BAC 087	X		X		X	
107	BAC 088	X		X		X	
108	BAC UC 089	X		X		X	
109	BAC 089	X		X		X	
110	BAC UC 09	X		X		X	
111	BAC 091	X		X		X	
112	BAC 092	X		X		X	
113	BAC 093	X		X		X	
114	BAC 094	X		X		X	
115	BAC 095	X		X		X	
116	BAC 096	X		X		X	
117	BAC UC 097	X		X	azul	X	azul
118	BAC 098	X		X		X	
119	BAC 099	X		X		X	
120	BAC UC 100	X		X		X	
121	BAC 101	X		X		X	
122	BAC UC 102	X		X		X	
123	BAC UC 115	X		X		X	
124	BACUC 120	X		X		X	
125	BAC UC 117	X		X		X	
127	BAC UC 108	X		X		X	
128	BAC UC V6	X		X		X	
129	BAC UC 119	X		X		X	
130	BAC UC 131	X		X	verde	X	verde
131	BAC UC 189	X		X	verde	X	verde
132	BAC UC 130	X		X	verde	X	verde
133	BAC UC 133	X		X	azul	X	azul
134	BAC UC 104	X		X	azul	X	azul
135	BAC UC 122	X		X		X	
136	BAC UC 101	X		X		X	
137	BAC UC 128	X		X		X	
138	BAC 011	X		X	azul	X	azul

N°	Bacterias	24 horas		48 horas		72 horas	
		Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia	Crecimiento	Fluorescencia
139	BAC 014	X		X	azul	X	azul
140	BAC 015	X		X		X	
141	BAC 004	X		X	azul	X	azul
142	BAC 002	X		X		X	
143	BAC 013	X		X		X	
144	BAC 003	X		X		X	
145	BAC 001	X		X	azul	X	azul
146	BAC UC 111			X	azul	X	azul
147	BAC UC 109	X		X		X	
148	BAC UC 093			X	azul	X	azul
149	BAC UC 116			X		X	
150	BAC UC 129	X		X		X	
151	BAC UC 132	X		X		X	
152	BAC UC 094	X		X		X	
153	BAC UC 112	X		X		X	
154	BAC 006	X		X	azul	X	azul
155	BAC 009	X		X	azul	X	azul
156	BAC 010	X		X	azul	X	azul
157	BAC 012	X		X		X	
158	BAC UC 106	X		X		X	
159	BAC UC 125	X		X		X	
160	BAC UC 134	X		X		X	

**ANEXO B. SECUENCIAS EDITADAS DEL GEN 16s rRNA DE LAS BACTERIAS  
082,036 Y PSAVE2M4**

<Bacteria 082

TGCAGTCGAGCGGTAGCACAAAGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGCGGACGGG  
TGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCCGATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCT  
AATACCGCATAACGTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCACACCATCGG  
ATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGATC  
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCC  
ATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAA  
GGGTTCCGGTGTTAATAGCACCGTTCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTA  
ACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGT  
GGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGAGCTTAAC  
TTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCC  
AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC  
CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCG  
TGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCG

<Bacteria 036

GCTATACATGCAGTCGAGCGAATGGATTGAGAGCTTGCTCTCAAGAAGTTAGCGGCG  
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA  
CCGGGGCTAATACCGGATAATATTTTGAAGTGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTT  
CGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCT  
CACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACG  
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCT  
GTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAAC  
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC  
GTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGA  
AGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACAC  
CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTG  
TTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG  
AGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA

<Bacteria PSAVE2M4

TGCTAATACATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCG  
GACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA  
CCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCT  
TCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT  
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGAC



GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTC  
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAA  
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAG  
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGT  
GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAAAGTGGGGAAGTTGAGTGCAG  
AAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC  
ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTG  
GGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG  
TGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
GGAGTACGGTCGCAAGA

**ANEXO C. PRUEBA DE EFECTO INTRA-SUJETO PRODUCCIÓN DE PHAS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL PROGRAMA SPSS DE LAS BACTERIAS *Bacillus thuringiensis*, *Serratia sp.* Y *Bacillus amyloliquefaciens* EN GLUCOSA, SACAROSA, LACTOSA Y ALMIDÓN**

*B. thuringiensis* UC-036

• Glucosa

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
TIEMPO	Esfericidad asumida	1,102	6	,184	587,765	,000	,997	3526,589	1,000
	Greenhouse-Geisser	1,102	1,799	,612	587,765	,000	,997	1057,502	1,000
	Huynh-Feldt	1,102	6,000	,184	587,765	,000	,997	3526,589	1,000
	Límite inferior	1,102	1,000	1,102	587,765	,002	,997	587,765	1,000
Error(TIEMPO)	Esfericidad asumida	,004	12	,000					
	Greenhouse-Geisser	,004	3,598	,001					
	Huynh-Feldt	,004	12,000	,000					
	Límite inferior	,004	2,000	,002					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

• Sacarosa

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
TIEMPO	Esfericidad asumida	,257	5	,051	150,371	,000	,987	751,854	1,000
	Greenhouse-Geisser	,257	1,793	,143	150,371	,000	,987	269,601	1,000
	Huynh-Feldt	,257	5,000	,051	150,371	,000	,987	751,854	1,000
	Límite inferior	,257	1,000	,257	150,371	,007	,987	150,371	,999
Error(TIEMPO)	Esfericidad asumida	,003	10	,000					
	Greenhouse-Geisser	,003	3,586	,001					
	Huynh-Feldt	,003	10,000	,000					
	Límite inferior	,003	2,000	,002					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

- Lactosa

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,228	8	,028	197,766	,000	,990	1582,132	1,000
	Greenhouse-Geisser	,228	1,799	,127	197,766	,000	,990	355,739	1,000
	Huynh-Feldt	,228	8,000	,028	197,766	,000	,990	1582,132	1,000
	Límite inferior	,228	1,000	,228	197,766	,005	,990	197,766	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,002	16	,000					
	Greenhouse-Geisser	,002	3,598	,001					
	Huynh-Feldt	,002	16,000	,000					
	Límite inferior	,002	2,000	,001					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

- Almidón

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
TIEMPO	Esfericidad asumida	,090	7	,013	97,685	,000	,980	683,796	1,000
	Greenhouse-Geisser	,090	1,707	,053	97,685	,001	,980	166,769	1,000
	Huynh-Feldt	,090	7,000	,013	97,685	,000	,980	683,796	1,000
	Límite inferior	,090	1,000	,090	97,685	,010	,980	97,685	,992
Error(TIEMPO)	Esfericidad asumida	,002	14	,000					
	Greenhouse-Geisser	,002	3,414	,001					
	Huynh-Feldt	,002	14,000	,000					
	Límite inferior	,002	2,000	,001					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

*Serratia* sp. UC-082

- Glucosa

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,519	6	,086	285,189	,000	,993	1711,135	1,000
	Greenhouse-Geisser	,519	1,520	,341	285,189	,000	,993	433,358	1,000
	Huynh-Feldt	,519	5,325	,097	285,189	,000	,993	1518,764	1,000
	Límite inferior	,519	1,000	,519	285,189	,003	,993	285,189	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,004	12	,000					
	Greenhouse-Geisser	,004	3,039	,001					
	Huynh-Feldt	,004	10,651	,000					
	Límite inferior	,004	2,000	,002					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

- Sacarosa

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,242	6	,040	93,423	,000	,979	560,535	1,000
	Greenhouse-Geisser	,242	1,777	,136	93,423	,001	,979	166,018	1,000
	Huynh-Feldt	,242	6,000	,040	93,423	,000	,979	560,535	1,000
	Límite inferior	,242	1,000	,242	93,423	,011	,979	93,423	,990
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,005	12	,000					
	Greenhouse-Geisser	,005	3,554	,001					
	Huynh-Feldt	,005	12,000	,000					
	Límite inferior	,005	2,000	,003					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

- Lactosa

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,352	8	,044	162,102	,000	,988	1296,817	1,000
	Greenhouse-Geisser	,352	1,296	,272	162,102	,002	,988	210,047	1,000
	Huynh-Feldt	,352	2,680	,131	162,102	,000	,988	434,425	1,000
	Límite inferior	,352	1,000	,352	162,102	,006	,988	162,102	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,004	16	,000					
	Greenhouse-Geisser	,004	2,592	,002					
	Huynh-Feldt	,004	5,360	,001					
	Límite inferior	,004	2,000	,002					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

- Almidón

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,073	7	,010	182,092	,000	,989	1274,646	1,000
	Greenhouse-Geisser	,073	1,865	,039	182,092	,000	,989	339,692	1,000
	Huynh-Feldt	,073	7,000	,010	182,092	,000	,989	1274,646	1,000
	Límite inferior	,073	1,000	,073	182,092	,005	,989	182,092	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,001	14	5,723E-5					
	Greenhouse-Geisser	,001	3,731	,000					
	Huynh-Feldt	,001	14,000	5,723E-5					
	Límite inferior	,001	2,000	,000					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

*B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4

- Glucosa

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,429	6	,071	364,504	,000	,995	2187,023	1,000
	Greenhouse-Geisser	,429	1,502	,285	364,504	,000	,995	547,634	1,000
	Huynh-Feldt	,429	5,039	,085	364,504	,000	,995	1836,638	1,000
	Límite inferior	,429	1,000	,429	364,504	,003	,995	364,504	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,002	12	,000					
	Greenhouse-Geisser	,002	3,005	,001					
	Huynh-Feldt	,002	10,077	,000					
	Límite inferior	,002	2,000	,001					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

- Sacarosa

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,098	5	,020	85,148	,000	,977	425,742	1,000
	Greenhouse-Geisser	,098	1,909	,051	85,148	,001	,977	162,532	1,000
	Huynh-Feldt	,098	5,000	,020	85,148	,000	,977	425,742	1,000
	Límite inferior	,098	1,000	,098	85,148	,012	,977	85,148	,985
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,002	10	,000					
	Greenhouse-Geisser	,002	3,818	,001					
	Huynh-Feldt	,002	10,000	,000					
	Límite inferior	,002	2,000	,001					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

- Lactosa

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>	
Tiempo	Esfericidad asumida	,274	8	,034	128,016	,000	,985	1024,125	1,000
	Greenhouse-Geisser	,274	1,595	,172	128,016	,001	,985	204,194	1,000
	Huynh-Feldt	,274	6,878	,040	128,016	,000	,985	880,525	1,000
	Límite inferior	,274	1,000	,274	128,016	,008	,985	128,016	,998
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,004	16	,000					
	Greenhouse-Geisser	,004	3,190	,001					
	Huynh-Feldt	,004	13,757	,000					
	Límite inferior	,004	2,000	,002					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

- Almidón

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: Producto

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada <sup>a</sup>	
tiempo	Esfericidad asumida	,043	7	,006	118,772	,000	,983	831,404	1,000
	Greenhouse-Geisser	,043	1,390	,031	118,772	,002	,983	165,101	1,000
	Huynh-Feldt	,043	3,558	,012	118,772	,000	,983	422,607	1,000
	Límite inferior	,043	1,000	,043	118,772	,008	,983	118,772	,997
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,001	14	5,137E-5					
	Greenhouse-Geisser	,001	2,780	,000					
	Huynh-Feldt	,001	7,116	,000					
	Límite inferior	,001	2,000	,000					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

**ANEXO D. PRUEBA DE EFECTO INTRA-SUJETO PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL PROGRAMA SPSS DE LAS BACTERIAS *Bacillus thuringiensis*, *Serratia sp* Y *Bacillus amyloliquefaciens* EN GLUCOSA, SACAROSA, LACTOSA Y ALMIDÓN**

*B. thuringiensis* UC-036

• Glucosa

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
Tiempo	Esfericidad asumida	2,459	6	,410	193,613	,000	,990	1161,677	1,000
	Greenhouse-Geisser	2,459	1,707	1,440	193,613	,000	,990	330,529	1,000
	Huynh-Feldt	2,459	6,000	,410	193,613	,000	,990	1161,677	1,000
	Límite-inferior	2,459	1,000	2,459	193,613	,005	,990	193,613	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,025	12	,002					
	Greenhouse-Geisser	,025	3,414	,007					
	Huynh-Feldt	,025	12,000	,002					
	Límite-inferior	,025	2,000	,013					

a. Calculado con alfa = ,05

• Sacarosa

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	1,391	5	,278	154,375	,000	,987	771,874	1,000
	Greenhouse-Geisser	1,391	1,662	,837	154,375	,001	,987	256,630	1,000
	Huynh-Feldt	1,391	5,000	,278	154,375	,000	,987	771,874	1,000
	Límite-inferior	1,391	1,000	1,391	154,375	,006	,987	154,375	,999
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,018	10	,002					
	Greenhouse-Geisser	,018	3,325	,005					
	Huynh-Feldt	,018	10,000	,002					
	Límite-inferior	,018	2,000	,009					

a. Calculado con alfa = ,05



- Lactosa

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,762	8	,095	124,982	,000	,984	999,853	1,000
	Greenhouse-Geisser	,762	1,880	,405	124,982	,000	,984	234,956	1,000
	Huynh-Feldt	,762	8,000	,095	124,982	,000	,984	999,853	1,000
	Límite-inferior	,762	1,000	,762	124,982	,008	,984	124,982	,998
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,012	16	,001					
	Greenhouse-Geisser	,012	3,760	,003					
	Huynh-Feldt	,012	16,000	,001					
	Límite-inferior	,012	2,000	,006					

a. Calculado con alfa = ,05

- Almidón

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,497	7	,071	56,510	,000	,966	395,568	1,000
	Greenhouse-Geisser	,497	1,770	,281	56,510	,002	,966	100,042	1,000
	Huynh-Feldt	,497	7,000	,071	56,510	,000	,966	395,568	1,000
	Límite-inferior	,497	1,000	,497	56,510	,017	,966	56,510	,940
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,018	14	,001					
	Greenhouse-Geisser	,018	3,541	,005					
	Huynh-Feldt	,018	14,000	,001					
	Límite-inferior	,018	2,000	,009					

a. Calculado con alfa = ,05

*Serratia sp.* UC-082

- Glucosa

Pruebas de efectos intra-sujetos Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	1,571	6	,262	628,203	,000	,997	3769,219	1,000
	Greenhouse-Geisser	1,571	1,555	1,010	628,203	,000	,997	976,973	1,000
	Huynh-Feldt	1,571	5,993	,262	628,203	,000	,997	3764,529	1,000
	Límite-inferior	1,571	1,000	1,571	628,203	,002	,997	628,203	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,005	12	,000					
	Greenhouse-Geisser	,005	3,110	,002					
	Huynh-Feldt	,005	11,985	,000					
	Límite-inferior	,005	2,000	,003					

a. Calculado con alfa = ,05

- Sacarosa

Pruebas de efectos intra-sujetos Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,732	6	,122	145,909	,000	,986	875,455	1,000
	Greenhouse-Geisser	,732	1,599	,458	145,909	,001	,986	233,278	1,000
	Huynh-Feldt	,732	6,000	,122	145,909	,000	,986	875,455	1,000
	Límite-inferior	,732	1,000	,732	145,909	,007	,986	145,909	,999
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,010	12	,001					
	Greenhouse-Geisser	,010	3,198	,003					
	Huynh-Feldt	,010	12,000	,001					
	Límite-inferior	,010	2,000	,005					

a. Calculado con alfa = ,05

- Lactosa

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	1,041	8	,130	142,555	,000	,986	1140,436	1,000
	Greenhouse-Geisser	1,041	1,522	,684	142,555	,001	,986	216,980	1,000
	Huynh-Feldt	1,041	5,370	,194	142,555	,000	,986	765,463	1,000
	Límite-inferior	1,041	1,000	1,041	142,555	,007	,986	142,555	,999
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,015	16	,001					
	Greenhouse-Geisser	,015	3,044	,005					
	Huynh-Feldt	,015	10,739	,001					
	Límite-inferior	,015	2,000	,007					

a. Calculado con alfa = ,05

- Almidón

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	,775	7	,111	54,247	,000	,964	379,727	1,000
	Greenhouse-Geisser	,775	1,862	,416	54,247	,002	,964	101,002	1,000
	Huynh-Feldt	,775	7,000	,111	54,247	,000	,964	379,727	1,000
	Límite-inferior	,775	1,000	,775	54,247	,018	,964	54,247	,933
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,029	14	,002					
	Greenhouse-Geisser	,029	3,724	,008					
	Huynh-Feldt	,029	14,000	,002					
	Límite-inferior	,029	2,000	,014					

a. Calculado con alfa = ,05

*B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4

- Glucosa

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	2,311	6	,385	350,043	,000	,994	2100,256	1,000
	Greenhouse-Geisser	2,311	1,237	1,869	350,043	,001	,994	432,981	1,000
	Huynh-Feldt	2,311	2,242	1,031	350,043	,000	,994	784,810	1,000
	Límite-inferior	2,311	1,000	2,311	350,043	,003	,994	350,043	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,013	12	,001					
	Greenhouse-Geisser	,013	2,474	,005					
	Huynh-Feldt	,013	4,484	,003					
	Límite-inferior	,013	2,000	,007					

a. Calculado con alfa = ,05

- Sacarosa

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	1,101	5	,220	336,096	,000	,994	1680,480	1,000
	Greenhouse-Geisser	1,101	1,712	,643	336,096	,000	,994	575,303	1,000
	Huynh-Feldt	1,101	5,000	,220	336,096	,000	,994	1680,480	1,000
	Límite-inferior	1,101	1,000	1,101	336,096	,003	,994	336,096	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,007	10	,001					
	Greenhouse-Geisser	,007	3,423	,002					
	Huynh-Feldt	,007	10,000	,001					
	Límite-inferior	,007	2,000	,003					

a. Calculado con alfa = ,05

- Lactosa

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	1,079	8	,135	176,287	,000	,989	1410,297	1,000
	Greenhouse-Geisser	1,079	1,406	,767	176,287	,001	,989	247,855	1,000
	Huynh-Feldt	1,079	3,734	,289	176,287	,000	,989	658,206	1,000
	Límite-inferior	1,079	1,000	1,079	176,287	,006	,989	176,287	1,000
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,012	16	,001					
	Greenhouse-Geisser	,012	2,812	,004					
	Huynh-Feldt	,012	7,467	,002					
	Límite-inferior	,012	2,000	,006					

a. Calculado con alfa = ,05

- Almidón

Pruebas de efectos intra-sujetos

Medida: Biomasa

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad Parámetro	Potencia observada <sup>a</sup>
tiempo	Esfericidad asumida	1,606	7	,229	34,445	,000	,945	241,113	1,000
	Greenhouse-Geisser	1,606	1,354	1,186	34,445	,012	,945	46,644	,951
	Huynh-Feldt	1,606	3,193	,503	34,445	,000	,945	109,998	1,000
	Límite-inferior	1,606	1,000	1,606	34,445	,028	,945	34,445	,823
Error(tiempo)	Esfericidad asumida	,093	14	,007					
	Greenhouse-Geisser	,093	2,708	,034					
	Huynh-Feldt	,093	6,387	,015					
	Límite-inferior	,093	2,000	,047					

a. Calculado con alfa = ,05

**ANEXO E. COMPARACIONES POR PARES PRODUCCIÓN DE PHAs DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL PROGRAMA SPSS DE LAS BACTERIAS *Bacillus thuringiensis*, *Serratia sp* Y *Bacillus amyloliquefaciens* EN GLUCOSA, SACAROSA, LACTOSA Y ALMIDÓN**

*B. thuringiensis* UC-036

- Glucosa

Comparaciones por parejas

Medida: Producto

(I) TIEMPO	(J) TIEMPO	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,281	,010	,029	-,493	-,069
	3	-,455	,010	,011	-,668	-,242
	4	-,564	,015	,015	-,868	-,261
	5	-,710	,006	,002	-,839	-,580
	6	-,679	,023	,024	-1,149	-,209
	7	-,512	,006	,003	-,641	-,383
2	1	,281	,010	,029	,069	,493
	3	-,174	,010	,074	-,386	,038
	4	-,283	,023	,133	-,747	,181
	5	-,429	,007	,006	-,574	-,283
	6	-,398	,017	,039	-,749	-,046
	7	-,231	,013	,069	-,502	,040
3	1	,455	,010	,011	,242	,668
	2	,174	,010	,074	-,038	,386
	4	-,110	,014	,358	-,406	,187
	5	-,255	,005	,007	-,352	-,157
	6	-,224	,013	,073	-,495	,047
	7	-,057	,007	,323	-,204	,089
4	1	,564	,015	,015	,261	,868
	2	,283	,023	,133	-,181	,747
	3	,110	,014	,358	-,187	,406
	5	-,145	,016	,238	-,464	,174
	6	-,114	,026	,991	-,641	,413
	7	,052	,009	,658	-,142	,247
5	1	,710	,006	,002	,580	,839
	2	,429	,007	,006	,283	,574
	3	,255	,005	,007	,157	,352
	4	,145	,016	,238	-,174	,464
	6	,031	,017	1,000	-,310	,372
	7	,198	,006	,021	,068	,327
6	1	,679	,023	,024	,209	1,149
	2	,398	,017	,039	,046	,749
	3	,224	,013	,073	-,047	,495
	4	,114	,026	,991	-,413	,641
	5	-,031	,017	1,000	-,372	,310
	7	,167	,020	,306	-,250	,583

(I) TIEMPO	(J) TIEMPO	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
7	1	,512 <sup>*</sup>	,006	,003	,383	,641
	2	,231	,013	,069	-,040	,502
	3	,057	,007	,323	-,089	,204
	4	-,052	,009	,658	-,247	,142
	5	-,198 <sup>*</sup>	,006	,021	-,327	-,068
	6	-,167	,020	,306	-,583	,250

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

● Sacarosa

Comparaciones por parejas

Medida: Producto

(I) TIEMPO	(J) TIEMPO	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,174	,009	,036	-,322	-,026
	3	-,321 <sup>*</sup>	,011	,017	-,510	-,133
	4	-,343 <sup>*</sup>	,011	,015	-,532	-,154
	5	-,314 <sup>*</sup>	,011	,018	-,503	-,125
	6	-,271	,018	,065	-,582	,039
2	1	,174	,009	,036	,026	,322
	3	-,148	,019	,244	-,477	,182
	4	-,169	,013	,092	-,398	,060
	5	-,140	,019	,256	-,462	,181
	6	-,098	,025	,909	-,533	,338
3	1	,321	,011	,017	,133	,510
	2	,148	,019	,244	-,182	,477
	4	-,021	,019	1,000	-,349	,306
	5	,007	,011	1,000	-,182	,196
	6	,050	,017	1,000	-,235	,335
4	1	,343	,011	,015	,154	,532
	2	,169	,013	,092	-,060	,398
	3	,021	,019	1,000	-,306	,349
	5	,029	,011	1,000	-,160	,217
	6	,071	,015	,612	-,186	,328
5	1	,314	,011	,018	,125	,503
	2	,140	,019	,256	-,181	,462
	3	-,007	,011	1,000	-,196	,182
	4	-,029	,011	1,000	-,217	,160
	6	,043	,007	,399	-,080	,166
6	1	,271	,018	,065	-,039	,582
	2	,098	,025	,909	-,338	,533
	3	-,050	,017	1,000	-,335	,235
	4	-,071	,015	,612	-,328	,186
	5	-,043	,007	,399	-,166	,080

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

● Lactosa Comparaciones por parejas Medida: Producto

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,267	,006	,020	-,436	-,097
	3	-,293	,008	,028	-,513	-,072
	4	-,326	,013	,059	-,682	,029
	5	-,286	,008	,030	-,506	-,065
	6	-,245	,006	,024	-,415	-,076
	7	-,190	,005	,023	-,318	-,063
	8	-,183	,006	,042	-,351	-,015
	9	-,181	,009	,080	-,411	,049
	2	1	,267	,006	,020	,097
3		-,026	,012	1,000	-,345	,293
4		-,060	,019	1,000	-,571	,452
5		-,019	,013	1,000	-,374	,336
6		,021	,011	1,000	-,272	,314
7		,076	,009	,450	-,154	,307
8		,083	,013	,793	-,254	,421
9		,086	,015	1,000	-,313	,484
3		1	,293	,008	,028	,072
	2	,026	,012	1,000	-,293	,345
	4	-,033	,017	1,000	-,480	,414
	5	,007	,014	1,000	-,375	,390
	6	,048	,013	1,000	-,308	,403
	7	,102	,013	,532	-,235	,440
	8	,110	,009	,218	-,120	,339
	9	,112	,010	,305	-,166	,390
	4	1	,326	,013	,059	-,029
2		,060	,019	1,000	-,452	,571
3		,033	,017	1,000	-,414	,480
5		,040	,006	,848	-,129	,210
6		,081	,009	,398	-,149	,311
7		,136	,011	,230	-,157	,428
8		,143	,008	,120	-,079	,365
9		,145	,006	,068	-,024	,315
5		1	,286	,008	,030	,065
	2	,019	,013	1,000	-,336	,374
	3	-,007	,014	1,000	-,390	,375
	4	-,040	,006	,848	-,210	,129
	6	,041	,002	,121	-,022	,103
	7	,095	,005	,089	-,032	,222
	8	,102	,006	,135	-,066	,271
	9	,105	,006	,129	-,064	,273
	6	1	,245	,006	,024	,076
2		-,021	,011	1,000	-,314	,272
3		-,048	,013	1,000	-,403	,308
4		-,081	,009	,398	-,311	,149
5		-,041	,002	,121	-,103	,022
7		,055	,002	,068	-,009	,119
8		,062	,006	,369	-,107	,231
9		,064	,007	,437	-,127	,256



(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
7	1	,190	,005	,023	,063	,318
	2	-,076	,009	,450	-,307	,154
	3	-,102	,013	,532	-,440	,235
	4	-,136	,011	,230	-,428	,157
	5	-,095	,005	,089	-,222	,032
	6	-,055	,002	,068	-,119	,009
	8	,007	,007	1,000	-,184	,198
	9	,010	,009	1,000	-,220	,239
	8	1	,183	,006	,042	,015
2		-,083	,013	,793	-,421	,254
3		-,110	,009	,218	-,339	,120
4		-,143	,008	,120	-,365	,079
5		-,102	,006	,135	-,271	,066
6		-,062	,006	,369	-,231	,107
7		-,007	,007	1,000	-,198	,184
9		,002	,002	1,000	-,062	,067
9		1	,181	,009	,080	-,049
	2	-,086	,015	1,000	-,484	,313
	3	-,112	,010	,305	-,390	,166
	4	-,145	,006	,068	-,315	,024
	5	-,105	,006	,129	-,273	,064
	6	-,064	,007	,437	-,256	,127
	7	-,010	,009	1,000	-,239	,220
	8	-,002	,002	1,000	-,067	,062

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

- Almidón

Comparaciones por parejas

Medida: Producto

(I) TIEMPO	(J) TIEMPO	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,145	,009	,097	-,348	,057
	3	-,171	,007	,048	-,340	-,003
	4	-,171	,004	,016	-,269	-,074
	5	-,157	,007	,058	-,326	,011
	6	-,202	,005	,016	-,315	-,089
	7	-,186	,011	,096	-,443	,072
	8	-,093	,004	,055	-,190	,005
	2	1	,145	,009	,097	-,057
3		-,026	,010	1,000	-,251	,198
4		-,026	,013	1,000	-,324	,271
5		-,012	,006	1,000	-,161	,137
6		-,057	,012	1,000	-,350	,236
7		-,040	,005	,381	-,153	,072
8		,052	,013	1,000	-,245	,350

(I) TIEMPO	(J) TIEMPO	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
3	1	,171	,007	,048	,003	,340
	2	,026	,010	1,000	-,198	,251
	4	,000	,008	1,000	-,195	,195
	5	,014	,012	1,000	-,278	,306
	6	-,031	,006	1,000	-,180	,119
	7	-,014	,008	1,000	-,209	,180
	8	,079	,008	,304	-,117	,274
	4	1	,171	,004	,016	,074
2		,026	,013	1,000	-,271	,324
3		,000	,008	1,000	-,195	,195
5		,014	,011	1,000	-,243	,272
6		-,031	,002	,165	-,087	,025
7		-,014	,014	1,000	-,352	,323
8		,079	,000	.	,079	,079
5		1	,157	,007	,058	-,011
	2	,012	,006	1,000	-,137	,161
	3	-,014	,012	1,000	-,306	,278
	4	-,014	,011	1,000	-,272	,243
	6	-,045	,012	1,000	-,327	,236
	7	-,029	,011	1,000	-,286	,229
	8	,064	,011	,772	-,193	,322
	6	1	,202	,005	,016	,089
2		,057	,012	1,000	-,236	,350
3		,031	,006	1,000	-,119	,180
4		,031	,002	,165	-,025	,087
5		,045	,012	1,000	-,236	,327
7		,017	,013	1,000	-,297	,330
8		,110	,002	,013	,053	,166
7		1	,186	,011	,096	-,072
	2	,040	,005	,381	-,072	,153
	3	,014	,008	1,000	-,180	,209
	4	,014	,014	1,000	-,323	,352
	5	,029	,011	1,000	-,229	,286
	6	-,017	,013	1,000	-,330	,297
	8	,093	,014	,640	-,245	,430
	8	1	,093	,004	,055	-,005
2		-,052	,013	1,000	-,350	,245
3		-,079	,008	,304	-,274	,117
4		-,079	,000	.	-,079	-,079
5		-,064	,011	,772	-,322	,193
6		-,110	,002	,013	-,166	-,053
7		-,093	,014	,640	-,430	,245

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

Serratia sp. UC-082

• Glucosa

Comparaciones por parejas

Medida: Producto

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,236	,007	,019	-,382	-,090
	3	-,417	,006	,005	-,545	-,288
	4	-,479	,004	,002	-,564	-,394
	5	-,462	,017	,027	-,803	-,121
	6	-,414	,012	,019	-,668	-,161
	7	-,298	,010	,025	-,510	-,085
2	1	,236	,007	,019	,090	,382
	3	-,181	,010	,069	-,393	,031
	4	-,243	,004	,006	-,327	-,159
	5	-,226	,010	,044	-,438	-,014
	6	-,179	,019	,231	-,565	,208
	7	-,062	,012	,736	-,305	,182
3	1	,417	,006	,005	,288	,545
	2	,181	,010	,069	-,031	,393
	4	-,062	,010	,483	-,257	,133
	5	-,045	,017	1,000	-,387	,296
	6	,002	,016	1,000	-,317	,322
	7	,119	,017	,399	-,222	,460
4	1	,479	,004	,002	,394	,564
	2	,243	,004	,006	,159	,327
	3	,062	,010	,483	-,133	,257
	5	,017	,014	1,000	-,279	,312
	6	,064	,015	1,000	-,241	,369
	7	,181	,009	,047	,006	,356
5	1	,462	,017	,027	,121	,803
	2	,226	,010	,044	,014	,438
	3	,045	,017	1,000	-,296	,387
	4	-,017	,014	1,000	-,312	,279
	6	,048	,029	1,000	-,545	,640
	7	,164	,022	,360	-,282	,610
6	1	,414	,012	,019	,161	,668
	2	,179	,019	,231	-,208	,565
	3	-,002	,016	1,000	-,322	,317
	4	-,064	,015	1,000	-,369	,241
	5	-,048	,029	1,000	-,640	,545
	7	,117	,013	,240	-,141	,374
7	1	,298	,010	,025	,085	,510
	2	,062	,012	,736	-,182	,305
	3	-,119	,017	,399	-,460	,222
	4	-,181	,009	,047	-,356	-,006
	5	-,164	,022	,360	-,610	,282
	6	-,117	,013	,240	-,374	,141

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

- Sacarosa

Comparaciones por parejas

Medida: Producto

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,183	,017	,171	-,524	,158
	3	-,302	,017	,064	-,644	,039
	4	-,338	,009	,013	-,513	-,163
	5	-,290	,009	,022	-,485	-,096
	6	-,298	,017	,066	-,639	,044
	7	-,212	,017	,129	-,553	,129
2	1	,183	,017	,171	-,158	,524
	3	-,119	,017	,401	-,460	,222
	4	-,155	,009	,064	-,331	,021
	5	-,107	,023	,901	-,577	,362
	6	-,114	,022	,727	-,561	,333
	7	-,029	,011	1,000	-,252	,195
3	1	,302	,017	,064	-,039	,644
	2	,119	,017	,401	-,222	,460
	4	-,036	,017	1,000	-,374	,302
	5	,012	,026	1,000	-,524	,548
	6	,005	,006	1,000	-,125	,134
	7	,090	,006	,101	-,038	,219
4	1	,338	,009	,013	,163	,513
	2	,155	,009	,064	-,021	,331
	3	,036	,017	1,000	-,302	,374
	5	,048	,014	1,000	-,248	,343
	6	,040	,019	1,000	-,358	,439
	7	,126	,013	,228	-,145	,398
5	1	,290	,009	,022	,096	,485
	2	,107	,023	,901	-,362	,577
	3	-,012	,026	1,000	-,548	,524
	4	-,048	,014	1,000	-,343	,248
	6	-,007	,026	1,000	-,534	,519
	7	,079	,026	1,000	-,448	,605
6	1	,298	,017	,066	-,044	,639
	2	,114	,022	,727	-,333	,561
	3	-,005	,006	1,000	-,134	,125
	4	-,040	,019	1,000	-,439	,358
	5	,007	,026	1,000	-,519	,534
	7	,086	,012	,425	-,168	,339
7	1	,212	,017	,129	-,129	,553
	2	,029	,011	1,000	-,195	,252
	3	-,090	,006	,101	-,219	,038
	4	-,126	,013	,228	-,398	,145
	5	-,079	,026	1,000	-,605	,448
	6	-,086	,012	,425	-,339	,168

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

● Lactosa Comparaciones por parejas Medida: Producto

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,292	,011	,055	-,596	,013
	3	-,326	,016	,082	-,745	,093
	4	-,395	,010	,025	-,673	-,117
	5	-,362	,014	,058	-,750	,026
	6	-,350	,008	,020	-,571	-,129
	7	-,293	,004	,007	-,404	-,182
	8	-,221	,007	,037	-,413	-,030
	9	-,183	,005	,024	-,312	-,055
2	1	,292	,011	,055	-,013	,596
	3	-,035	,004	,546	-,150	,081
	4	-,104	,005	,100	-,250	,043
	5	-,070	,025	1,000	-,739	,598
	6	-,058	,005	,279	-,197	,080
	7	-,001	,012	1,000	-,335	,332
	8	,070	,016	1,000	-,352	,492
	9	,108	,007	,133	-,069	,286
3	1	,326	,016	,082	-,093	,745
	2	,035	,004	,546	-,081	,150
	4	-,069	,009	,545	-,299	,161
	5	-,036	,029	1,000	-,810	,739
	6	-,024	,009	1,000	-,254	,207
	7	,033	,017	1,000	-,414	,480
	8	,105	,020	1,000	-,418	,628
	9	,143	,011	,208	-,150	,435
4	1	,395	,010	,025	,117	,673
	2	,104	,005	,100	-,043	,250
	3	,069	,009	,545	-,161	,299
	5	,033	,025	1,000	-,633	,700
	6	,045	,009	1,000	-,184	,275
	7	,102	,010	,307	-,153	,357
	8	,174	,017	,326	-,273	,620
	9	,212	,006	,032	,043	,381
5	1	,362	,014	,058	-,026	,750
	2	,070	,025	1,000	-,598	,739
	3	,036	,029	1,000	-,739	,810
	4	-,033	,025	1,000	-,700	,633
	6	,012	,020	1,000	-,534	,557
	7	,069	,017	1,000	-,378	,516
	8	,140	,010	,165	-,115	,396
	9	,179	,019	,397	-,328	,685
6	1	,350	,008	,020	,129	,571
	2	,058	,005	,279	-,080	,197
	3	,024	,009	1,000	-,207	,254
	4	-,045	,009	1,000	-,275	,184
	5	-,012	,020	1,000	-,557	,534
	7	,057	,011	1,000	-,235	,350
	8	,129	,011	,257	-,164	,421
	9	,167	,005	,029	,040	,294

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
7	1	,293	,004	,007	,182	,404
	2	,001	,012	1,000	-,332	,335
	3	-,033	,017	1,000	-,480	,414
	4	-,102	,010	,307	-,357	,153
	5	-,069	,017	1,000	-,516	,378
	6	-,057	,011	1,000	-,350	,235
	8	,071	,011	,812	-,221	,364
	9	,110	,006	,119	-,060	,279
	8	1	,221	,007	,037	,030
2		-,070	,016	1,000	-,492	,352
3		-,105	,020	1,000	-,628	,418
4		-,174	,017	,326	-,620	,273
5		-,140	,010	,165	-,396	,115
6		-,129	,011	,257	-,421	,164
7		-,071	,011	,812	-,364	,221
9		,038	,010	1,000	-,240	,316
9		1	,183	,005	,024	,055
	2	-,108	,007	,133	-,286	,069
	3	-,143	,011	,208	-,435	,150
	4	-,212	,006	,032	-,381	-,043
	5	-,179	,019	,397	-,685	,328
	6	-,167	,005	,029	-,294	-,040
	7	-,110	,006	,119	-,279	,060
	8	-,038	,010	1,000	-,316	,240

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

- Almidón

#### Comparaciones por parejas

Medida: Producto

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,124	,005	,041	-,236	-,011
	3	-,152	,006	,048	-,302	-,003
	4	-,138	,002	,008	-,195	-,081
	5	-,157	,008	,077	-,353	,039
	6	-,174	,009	,068	-,377	,029
	7	-,062	,002	,041	-,118	-,006
	8	-,081	,002	,024	-,137	-,025
	2	1	,124	,005	,041	,011
3		-,029	,004	,568	-,126	,069
4		-,014	,004	1,000	-,112	,083
5		-,033	,005	,559	-,146	,080
6		-,050	,004	,189	-,148	,048
7		,062	,006	,285	-,087	,211
8		,043	,004	,252	-,054	,140

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
3	1	,152	,006	,048	,003	,302
	2	,029	,004	,568	-,069	,126
	4	,014	,004	1,000	-,083	,112
	5	-,005	,009	1,000	-,208	,198
	6	-,021	,004	,984	-,119	,076
	7	,090	,009	,249	-,113	,293
	8	,071	,004	,093	-,026	,169
	4	1	,138	,002	,008	,081
2		,014	,004	1,000	-,083	,112
3		-,014	,004	1,000	-,112	,083
5		-,019	,009	1,000	-,223	,185
6		-,036	,007	1,000	-,205	,133
7		,076	,005	,109	-,036	,189
8		,057	,000	,000	,056	,058
5		1	,157	,008	,077	-,039
	2	,033	,005	,559	-,080	,146
	3	,005	,009	1,000	-,198	,208
	4	,019	,009	1,000	-,185	,223
	6	-,017	,006	1,000	-,165	,132
	7	,095	,009	,227	-,109	,299
	8	,076	,009	,349	-,127	,279
	6	1	,174	,009	,068	-,029
2		,050	,004	,189	-,048	,148
3		,021	,004	,984	-,076	,119
4		,036	,007	1,000	-,133	,205
5		,017	,006	1,000	-,132	,165
7		,112	,010	,238	-,133	,357
8		,093	,007	,164	-,076	,261
7		1	,062	,002	,041	,006
	2	-,062	,006	,285	-,211	,087
	3	-,090	,009	,249	-,293	,113
	4	-,076	,005	,109	-,189	,036
	5	-,095	,009	,227	-,299	,109
	6	-,112	,010	,238	-,357	,133
	8	-,019	,005	1,000	-,131	,093
	8	1	,081	,002	,024	,025
2		-,043	,004	,252	-,140	,054
3		-,071	,004	,093	-,169	,026
4		-,057	,000	,000	-,058	-,056
5		-,076	,009	,349	-,279	,127
6		-,093	,007	,164	-,261	,076
7		,019	,005	1,000	-,093	,131

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

*B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4

● Glucosa

Comparaciones por parejas

Medida: Producto

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,302	,010	,025	-,515	-,090
	3	-,424	,002	,001	-,472	-,375
	4	-,421	,014	,024	-,713	-,130
	5	-,433	,006	,004	-,562	-,305
	6	-,400	,007	,007	-,546	-,254
2	7	-,307	,000	,000	-,308	-,306
	1	,302	,010	,025	,090	,515
	3	-,121	,011	,167	-,344	,102
	4	-,119	,024	,813	-,613	,375
	5	-,131	,013	,212	-,402	,140
3	6	-,098	,017	,584	-,438	,243
	7	-,005	,010	1,000	-,216	,207
	1	,424	,002	,001	,375	,472
	2	,121	,011	,167	-,102	,344
	4	,002	,013	1,000	-,269	,273
4	5	-,010	,009	1,000	-,185	,166
	6	,024	,009	1,000	-,151	,199
	7	,117	,002	,009	,068	,165
	1	,421	,014	,024	,130	,713
	2	,119	,024	,813	-,375	,613
5	3	-,002	,013	1,000	-,273	,269
	5	-,012	,017	1,000	-,353	,329
	6	,021	,012	1,000	-,232	,275
	7	,114	,014	,321	-,178	,407
	1	,433	,006	,004	,305	,562
6	2	,131	,013	,212	-,140	,402
	3	,010	,009	1,000	-,166	,185
	4	,012	,017	1,000	-,329	,353
	6	,033	,005	,411	-,063	,130
	7	,126	,006	,052	-,002	,255
7	1	,400	,007	,007	,254	,546
	2	,098	,017	,584	-,243	,438
	3	-,024	,009	1,000	-,199	,151
	4	-,021	,012	1,000	-,275	,232
	5	-,033	,005	,411	-,130	,063
7	6	,093	,007	,123	-,053	,239
	1	,307	,000	,000	,306	,308
	2	,005	,010	1,000	-,207	,216
	3	-,117	,002	,009	-,165	-,068
	4	-,114	,014	,321	-,407	,178
7	5	-,126	,006	,052	-,255	,002
	6	-,093	,007	,123	-,239	,053

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.



- Sacarosa

Comparaciones por parejas

Medida: Producto

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,124	,014	,201	-,374	,126
	3	-,198	,006	,015	-,306	-,089
	4	-,224	,012	,042	-,430	-,018
	5	-,188	,013	,073	-,416	,040
	6	-,167	,002	,003	-,208	-,125
2	1	,124	,014	,201	-,126	,374
	3	-,074	,017	,752	-,371	,223
	4	-,100	,018	,465	-,411	,211
	5	-,064	,008	,242	-,207	,078
	6	-,043	,015	1,000	-,300	,215
3	1	,198	,006	,015	,089	,306
	2	,074	,017	,752	-,223	,371
	4	-,026	,006	,806	-,135	,083
	5	,010	,013	1,000	-,208	,227
	6	,031	,009	1,000	-,118	,180
4	1	,224	,012	,042	,018	,430
	2	,100	,018	,465	-,211	,411
	3	,026	,006	,806	-,083	,135
	5	,036	,011	1,000	-,153	,224
	6	,057	,014	,862	-,190	,305
5	1	,188	,013	,073	-,040	,416
	2	,064	,008	,242	-,078	,207
	3	-,010	,013	1,000	-,227	,208
	4	-,036	,011	1,000	-,224	,153
	6	,021	,015	1,000	-,235	,278
6	1	,167	,002	,003	,125	,208
	2	,043	,015	1,000	-,215	,300
	3	-,031	,009	1,000	-,180	,118
	4	-,057	,014	,862	-,305	,190
	5	-,021	,015	1,000	-,278	,235

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

● Lactosa Comparaciones por parejas Medida: Producto

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,224	,010	,077	-,501	,053
	3	-,274	,009	,035	-,503	-,044
	4	-,355	,015	,060	-,744	,034
	5	-,305	,013	,061	-,642	,033
	6	-,260	,013	,094	-,615	,096
	7	-,193	,012	,148	-,525	,139
	8	-,167	,010	,139	-,446	,112
	9	-,119	,009	,186	-,350	,111
2	1	,224	,010	,077	-,053	,501
	3	-,050	,011	1,000	-,342	,242
	4	-,131	,023	1,000	-,742	,479
	5	-,081	,014	1,000	-,468	,306
	6	-,036	,016	1,000	-,478	,406
	7	,031	,020	1,000	-,514	,576
	8	,057	,018	1,000	-,424	,538
	9	,105	,013	,508	-,232	,442
3	1	,274	,009	,035	,044	,503
	2	,050	,011	1,000	-,242	,342
	4	-,081	,023	1,000	-,689	,527
	5	-,031	,020	1,000	-,576	,514
	6	,014	,021	1,000	-,560	,589
	7	,081	,021	1,000	-,475	,637
	8	,107	,019	1,000	-,400	,614
	9	,155	,017	,411	-,292	,601
4	1	,355	,015	,060	-,034	,744
	2	,131	,023	1,000	-,479	,742
	3	,081	,023	1,000	-,527	,689
	5	,050	,013	1,000	-,286	,387
	6	,095	,011	,435	-,188	,379
	7	,162	,002	,008	,095	,229
	8	,188	,005	,024	,058	,319
	9	,236	,011	,079	-,060	,532
5	1	,305	,013	,061	-,033	,642
	2	,081	,014	1,000	-,306	,468
	3	,031	,020	1,000	-,514	,576
	4	-,050	,013	1,000	-,387	,286
	6	,045	,002	,100	-,019	,109
	7	,112	,010	,305	-,166	,390
	8	,138	,009	,137	-,091	,367
	9	,186	,004	,018	,076	,296
6	1	,260	,013	,094	-,096	,615
	2	,036	,016	1,000	-,406	,478
	3	-,014	,021	1,000	-,589	,560
	4	-,095	,011	,435	-,379	,188
	5	-,045	,002	,100	-,109	,019
	7	,067	,009	,584	-,164	,297
	8	,093	,007	,211	-,098	,284
	9	,140	,005	,041	,013	,268

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
7	1	,193	,012	,148	-,139	,525
	2	-,031	,020	1,000	-,576	,514
	3	-,081	,021	1,000	-,637	,475
	4	-,162	,002	,008	-,229	-,095
	5	-,112	,010	,305	-,390	,166
	6	-,067	,009	,584	-,297	,164
	8	,026	,002	,295	-,038	,090
	9	,074	,009	,478	-,156	,304
	8	1	,167	,010	,139	-,112
2		-,057	,018	1,000	-,538	,424
3		-,107	,019	1,000	-,614	,400
4		-,188	,005	,024	-,319	-,058
5		-,138	,009	,137	-,367	,091
6		-,093	,007	,211	-,284	,098
7		-,026	,002	,295	-,090	,038
9		,048	,006	,613	-,121	,216
9		1	,119	,009	,186	-,111
	2	-,105	,013	,508	-,442	,232
	3	-,155	,017	,411	-,601	,292
	4	-,236	,011	,079	-,532	,060
	5	-,186	,004	,018	-,296	-,076
	6	-,140	,005	,041	-,268	-,013
	7	-,074	,009	,478	-,304	,156
	8	-,048	,006	,613	-,216	,121

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

- Almidón

Comparaciones por parejas

Medida: Producto

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,105	,005	,057	-,217	,007
	3	-,098	,002	,017	-,154	-,041
	4	-,136	,007	,077	-,304	,033
	5	-,140	,005	,032	-,253	-,028
	6	-,107	,004	,041	-,205	-,010
	7	-,086	,008	,256	-,281	,109
	8	-,059	,002	,044	-,115	-,004
	2	1	,105	,005	,057	-,007
3		,007	,004	1,000	-,090	,104
4		-,031	,006	1,000	-,180	,118
5		-,036	,000	,000	-,037	-,035
6		-,002	,006	1,000	-,151	,146
7		,019	,005	1,000	-,094	,132
8		,045	,002	,076	-,011	,101

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig. <sup>b</sup>	95% de intervalo de confianza para diferencia <sup>b</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
3	1	,098	,002	,017	,041	,154
	2	-,007	,004	1,000	-,104	,090
	4	-,038	,009	1,000	-,241	,165
	5	-,043	,004	,256	-,140	,055
	6	-,010	,002	1,000	-,066	,047
	7	,012	,009	1,000	-,191	,215
	8	,038	,002	,109	-,018	,094
	4	1	,136	,007	,077	-,033
2		,031	,006	1,000	-,118	,180
3		,038	,009	1,000	-,165	,241
5		-,005	,006	1,000	-,154	,144
6		,029	,011	1,000	-,229	,286
7		,050	,004	,189	-,048	,148
8		,076	,006	,189	-,073	,225
5		1	,140	,005	,032	,028
	2	,036	,000	,000	,035	,037
	3	,043	,004	,256	-,055	,140
	4	,005	,006	1,000	-,144	,154
	6	,033	,006	,955	-,116	,183
	7	,055	,005	,210	-,058	,167
	8	,081	,002	,025	,024	,138
	6	1	,107	,004	,041	,010
2		,002	,006	1,000	-,146	,151
3		,010	,002	1,000	-,047	,066
4		-,029	,011	1,000	-,286	,229
5		-,033	,006	,955	-,183	,116
7		,021	,011	1,000	-,237	,280
8		,048	,005	,276	-,065	,160
7		1	,086	,008	,256	-,109
	2	-,019	,005	1,000	-,132	,094
	3	-,012	,009	1,000	-,215	,191
	4	-,050	,004	,189	-,148	,048
	5	-,055	,005	,210	-,167	,058
	6	-,021	,011	1,000	-,280	,237
	8	,026	,006	1,000	-,123	,176
	8	1	,059	,002	,044	,004
2		-,045	,002	,076	-,101	,011
3		-,038	,002	,109	-,094	,018
4		-,076	,006	,189	-,225	,073
5		-,081	,002	,025	-,138	-,024
6		-,048	,005	,276	-,160	,065
7		-,026	,006	1,000	-,176	,123

Se basa en medias marginales estimadas

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Bonferroni.

**ANEXO F. COMPARACIONES POR PARES BIOMASA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS DEL PROGRAMA SPSS DE LAS BACTERIAS *Bacillus thuringiensis*, *Serratia sp* Y *Bacillus amyloliquefaciens* EN GLUCOSA, SACAROSA, LACTOSA Y ALMIDÓN**

*B. thuringiensis* UC-036

- Glucosa

Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,788	,037	,047	-1,549	-,027
	3	-1,024	,031	,019	-1,657	-,391
	4	-1,098	,010	,002	-1,310	-,885
	5	-,964	,008	,002	-1,133	-,795
	6	-,845	,040	,046	-1,655	-,035
	7	-,664	,023	,025	-1,134	-,194
2	1	,788	,037	,047	,027	1,549
	3	-,236	,021	,159	-,658	,187
	4	-,310	,032	,214	-,954	,335
	5	-,176	,045	1,000	-1,106	,753
	6	-,057	,065	1,000	-1,383	1,269
	7	,124	,060	1,000	-1,106	1,353
3	1	1,024	,031	,019	,391	1,657
	2	,236	,021	,159	-,187	,658
	4	-,074	,031	1,000	-,718	,570
	5	,060	,038	1,000	-,724	,843
	6	,179	,046	1,000	-,772	1,129
	7	,360	,051	,409	-,682	1,401
4	1	1,098	,010	,002	,885	1,310
	2	,310	,032	,214	-,335	,954
	3	,074	,031	1,000	-,570	,718
	5	,133	,017	,321	-,208	,474
	6	,252	,050	,769	-,764	1,269
	7	,433	,031	,108	-,205	1,072
5	1	,964	,008	,002	,795	1,133
	2	,176	,045	1,000	-,753	1,106
	3	-,060	,038	1,000	-,843	,724
	4	-,133	,017	,321	-,474	,208
	6	,119	,037	1,000	-,646	,884
	7	,300	,015	,051	-,004	,604
6	1	,845	,040	,046	,035	1,655
	2	,057	,065	1,000	-1,269	1,383
	3	-,179	,046	1,000	-1,129	,772
	4	-,252	,050	,769	-1,269	,764
	5	-,119	,037	1,000	-,884	,646
	7	,181	,034	,718	-,522	,883

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
7	1	,664	,023	,025	,194	1,134
	2	-,124	,060	1,000	-1,353	1,106
	3	-,360	,051	,409	-1,401	,682
	4	-,433	,031	,108	-1,072	,205
	5	-,300	,015	,051	-,604	,004
	6	-,181	,034	,718	-,883	,522

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

- Sacarosa

### Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,662	,021	,015	-1,020	-,303
	3	-,755	,028	,021	-1,239	-,270
	4	-,790	,017	,007	-1,087	-,494
	5	-,762	,031	,026	-1,306	-,218
	6	-,721	,027	,021	-1,189	-,254
2	1	,662	,021	,015	,303	1,020
	3	-,093	,021	,741	-,463	,277
	4	-,129	,029	,690	-,622	,365
	5	-,100	,045	1,000	-,871	,671
	6	-,060	,025	1,000	-,489	,370
3	1	,755	,028	,021	,270	1,239
	2	,093	,021	,741	-,277	,463
	4	-,036	,043	1,000	-,786	,715
	5	-,007	,033	1,000	-,573	,558
	6	,033	,045	1,000	-,748	,815
4	1	,790	,017	,007	,494	1,087
	2	,129	,029	,690	-,365	,622
	3	,036	,043	1,000	-,715	,786
	5	,029	,047	1,000	-,781	,838
	6	,069	,017	,805	-,219	,357
	5	1	,762	,031	,026	,218
5	2	,100	,045	1,000	-,671	,871
	3	,007	,033	1,000	-,558	,573
	4	-,029	,047	1,000	-,838	,781
	6	,040	,059	1,000	-,971	1,051
	1	,721	,027	,021	,254	1,189
	2	,060	,025	1,000	-,370	,489
6	3	-,033	,045	1,000	-,815	,748
	4	-,069	,017	,805	-,357	,219
	5	-,040	,059	1,000	-1,051	,971

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

• Lactosa

Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I) tiempo	(J) tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,479	,015	,035	-,876	-,081
	3	-,557	,025	,073	-1,230	,115
	4	-,567	,031	,107	-1,396	,263
	5	-,540	,016	,030	-,959	-,122
	6	-,529	,008	,009	-,751	-,306
	7	-,498	,010	,016	-,776	-,219
	8	-,383	,013	,039	-,722	-,045
	9	-,371	,004	,004	-,481	-,262
2	1	,479	,015	,035	,081	,876
	3	-,079	,040	1,000	-1,144	,987
	4	-,088	,037	1,000	-1,091	,914
	5	-,062	,025	1,000	-,737	,613
	6	-,050	,023	1,000	-,666	,566
	7	-,019	,024	1,000	-,657	,619
	8	,095	,023	1,000	-,533	,724
	9	,107	,012	,469	-,224	,438
3	1	,557	,025	,073	-,115	1,230
	2	,079	,040	1,000	-,987	1,144
	4	-,010	,030	1,000	-,824	,805
	5	,017	,021	1,000	-,550	,584
	6	,029	,018	1,000	-,453	,510
	7	,060	,017	1,000	-,387	,506
	8	,174	,025	,713	-,492	,839
	9	,186	,029	,822	-,580	,951
4	1	,567	,031	,107	-,263	1,396
	2	,088	,037	1,000	-,914	1,091
	3	,010	,030	1,000	-,805	,824
	5	,026	,016	1,000	-,392	,444
	6	,038	,032	1,000	-,821	,897
	7	,069	,023	1,000	-,559	,697
	8	,183	,041	1,000	-,923	1,290
	9	,195	,035	1,000	-,731	1,121
5	1	,540	,016	,030	,122	,959
	2	,062	,025	1,000	-,613	,737
	3	-,017	,021	1,000	-,584	,550
	4	-,026	,016	1,000	-,444	,392
	6	,012	,017	1,000	-,435	,459
	7	,043	,008	1,000	-,178	,263
	8	,157	,026	,929	-,533	,847
	9	,169	,019	,468	-,353	,691
6	1	,529	,008	,009	,306	,751
	2	,050	,023	1,000	-,566	,666
	3	-,029	,018	1,000	-,510	,453
	4	-,038	,032	1,000	-,897	,821
	5	-,012	,017	1,000	-,459	,435
	7	,031	,009	1,000	-,200	,262
	8	,145	,009	,153	-,109	,400
	9	,157	,011	,173	-,136	,450

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
7	1	,498	,010	,016	,219	,776
	2	,019	,024	1,000	-,619	,657
	3	-,060	,017	1,000	-,506	,387
	4	-,069	,023	1,000	-,697	,559
	5	-,043	,008	1,000	-,263	,178
	6	-,031	,009	1,000	-,262	,200
	8	,114	,018	,860	-,368	,596
	9	,126	,014	,465	-,262	,514
8	1	,383	,013	,039	,045	,722
	2	-,095	,023	1,000	-,724	,533
	3	-,174	,025	,713	-,839	,492
	4	-,183	,041	1,000	-1,290	,923
	5	-,157	,026	,929	-,847	,533
	6	-,145	,009	,153	-,400	,109
	7	-,114	,018	,860	-,596	,368
	9	,012	,012	1,000	-,308	,332
9	1	,371	,004	,004	,262	,481
	2	-,107	,012	,469	-,438	,224
	3	-,186	,029	,822	-,951	,580
	4	-,195	,035	1,000	-1,121	,731
	5	-,169	,019	,468	-,691	,353
	6	-,157	,011	,173	-,450	,136
	7	-,126	,014	,465	-,514	,262
	8	-,012	,012	1,000	-,332	,308

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

- Almidón

Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,233	,024	,296	-,805	,338
	3	-,452	,035	,167	-1,281	,376
	4	-,417	,023	,083	-,953	,120
	5	-,419	,038	,231	-1,325	,487
	6	-,424	,029	,130	-1,108	,261
	7	-,350	,029	,188	-1,032	,332
	8	-,233	,006	,021	-,383	-,084
	2	1	,233	,024	,296	-,338
3		-,219	,031	,543	-,950	,512
4		-,183	,017	,242	-,589	,222
5		-,186	,044	1,000	-1,217	,846
6		-,190	,042	1,000	-1,186	,805
7		-,117	,005	,046	-,229	-,005
8		,000	,027	1,000	-,639	,639



(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
3	1	,452	,035	,167	-,376	1,281
	2	,219	,031	,543	-,512	,950
	4	,036	,015	1,000	-,316	,387
	5	,033	,017	1,000	-,361	,428
	6	,029	,025	1,000	-,565	,622
	7	,102	,031	1,000	-,642	,846
	8	,219	,031	,561	-,525	,963
	4	1	,417	,023	,083	-,120
2		,183	,017	,242	-,222	,589
3		-,036	,015	1,000	-,387	,316
5		-,002	,027	1,000	-,629	,625
6		-,007	,027	1,000	-,647	,632
7		,067	,019	1,000	-,383	,516
8		,183	,021	,365	-,316	,683
5		1	,419	,038	,231	-,487
	2	,186	,044	1,000	-,846	1,217
	3	-,033	,017	1,000	-,428	,361
	4	,002	,027	1,000	-,625	,629
	6	-,005	,015	1,000	-,348	,338
	7	,069	,045	1,000	-1,004	1,143
	8	,186	,033	,831	-,588	,959
	6	1	,424	,029	,130	-,261
2		,190	,042	1,000	-,805	1,186
3		-,029	,025	1,000	-,622	,565
4		,007	,027	1,000	-,632	,647
5		,005	,015	1,000	-,338	,348
7		,074	,045	1,000	-,995	1,143
8		,190	,023	,389	-,346	,727
7		1	,350	,029	,188	-,332
	2	,117	,005	,046	,005	,229
	3	-,102	,031	1,000	-,846	,642
	4	-,067	,019	1,000	-,516	,383
	5	-,069	,045	1,000	-1,143	1,004
	6	-,074	,045	1,000	-1,143	,995
	8	,117	,031	1,000	-,627	,861
	8	1	,233	,006	,021	,084
2		,000	,027	1,000	-,639	,639
3		-,219	,031	,561	-,963	,525
4		-,183	,021	,365	-,683	,316
5		-,186	,033	,831	-,959	,588
6		-,190	,023	,389	-,727	,346
7		-,117	,031	1,000	-,861	,627

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

Serratia Sp. UC-082

• Glucosa

Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,602	,014	,012	-,899	-,306
	3	-,817	,014	,007	-1,113	-,520
	4	-,852	,012	,004	-1,096	-,609
	5	-,800	,007	,002	-,946	-,654
	6	-,743	,014	,008	-1,036	-,450
	7	-,617	,021	,024	-1,042	-,192
2	1	,602	,014	,012	,306	,899
	3	-,214	,016	,123	-,551	,123
	4	-,250	,008	,023	-,419	-,081
	5	-,198	,016	,129	-,516	,121
	6	-,140	,006	,042	-,270	-,011
	7	-,014	,019	1,000	-,401	,373
3	1	,817	,014	,007	,520	1,113
	2	,214	,016	,123	-,123	,551
	4	-,036	,008	1,000	-,204	,133
	5	,017	,021	1,000	-,416	,449
	6	,074	,021	1,000	-,360	,507
	7	,200	,032	,525	-,459	,859
4	1	,852	,012	,004	,609	1,096
	2	,250	,008	,023	,081	,419
	3	,036	,008	1,000	-,133	,204
	5	,052	,017	1,000	-,288	,393
	6	,110	,013	,303	-,162	,382
	7	,236	,025	,234	-,278	,749
	5	1	,800	,007	,002	,654
2	,198	,016	,129	-,121	,516	
3	-,017	,021	1,000	-,449	,416	
4	-,052	,017	1,000	-,393	,288	
6	,057	,012	,918	-,196	,310	
7	,183	,014	,130	-,113	,480	
6	1	,743	,014	,008	,450	1,036
	2	,140	,006	,042	,011	,270
	3	-,074	,021	1,000	-,507	,360
	4	-,110	,013	,303	-,382	,162
	5	-,057	,012	,918	-,310	,196
	7	,126	,013	,206	-,131	,384
7	1	,617	,021	,024	,192	1,042
	2	,014	,019	1,000	-,373	,401
	3	-,200	,032	,525	-,859	,459
	4	-,236	,025	,234	-,749	,278
	5	-,183	,014	,130	-,480	,113
	6	-,126	,013	,206	-,384	,131

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

- Sacarosa

Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error tít.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,369	,016	,038	-,689	-,050
	3	-,474	,019	,032	-,855	-,093
	4	-,538	,027	,052	-1,087	,010
	5	-,569	,013	,010	-,827	-,311
	6	-,571	,021	,027	-,994	-,149
	7	-,479	,026	,061	-1,005	,048
2	1	,369	,016	,038	,050	,689
	3	-,105	,027	1,000	-,648	,438
	4	-,169	,041	1,000	-1,018	,680
	5	-,200	,023	,272	-,670	,270
	6	-,202	,027	,377	-,765	,360
	7	-,110	,041	1,000	-,954	,735
3	1	,474	,019	,032	,093	,855
	2	,105	,027	1,000	-,438	,648
	4	-,064	,022	1,000	-,510	,382
	5	-,095	,006	,092	-,225	,034
	6	-,098	,002	,012	-,146	-,049
	7	-,005	,027	1,000	-,553	,544
4	1	,538	,027	,052	-,010	1,087
	2	,169	,041	1,000	-,680	1,018
	3	,064	,022	1,000	-,382	,510
	5	-,031	,020	1,000	-,447	,385
	6	-,033	,023	1,000	-,512	,446
	7	,060	,009	,422	-,116	,235
5	1	,569	,013	,010	,311	,827
	2	,200	,023	,272	-,270	,670
	3	,095	,006	,092	-,034	,225
	4	,031	,020	1,000	-,385	,447
	6	-,002	,009	1,000	-,178	,173
	7	,091	,023	1,000	-,389	,570
6	1	,571	,021	,027	,149	,994
	2	,202	,027	,377	-,360	,765
	3	,098	,002	,012	,049	,146
	4	,033	,023	1,000	-,446	,512
	5	,002	,009	1,000	-,173	,178
	7	,093	,029	1,000	-,497	,683
7	1	,479	,026	,061	-,048	1,005
	2	,110	,041	1,000	-,735	,954
	3	,005	,027	1,000	-,544	,553
	4	-,060	,009	,422	-,235	,116
	5	-,091	,023	1,000	-,570	,389
	6	-,093	,029	1,000	-,683	,497

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

● Lactosa Comparaciones por pares Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,343	,004	,005	-,453	-,232
	3	-,517	,017	,040	-,977	-,057
	4	-,505	,009	,010	-,735	-,275
	5	-,619	,023	,048	-1,227	-,011
	6	-,629	,019	,033	-1,135	-,122
	7	-,643	,025	,053	-1,306	,020
	8	-,560	,017	,032	-1,007	-,112
	9	-,633	,023	,046	-1,243	-,024
2	1	,343	,004	,005	,232	,453
	3	-,174	,017	,327	-,621	,273
	4	-,162	,006	,054	-,331	,007
	5	-,276	,025	,296	-,952	,399
	6	-,286	,022	,209	-,871	,300
	7	-,300	,023	,209	-,916	,316
	8	-,217	,016	,186	-,635	,202
	9	-,291	,019	,161	-,813	,232
3	1	,517	,017	,040	,057	,977
	2	,174	,017	,327	-,273	,621
	4	,012	,023	1,000	-,597	,621
	5	-,102	,017	,916	-,549	,344
	6	-,112	,017	,772	-,558	,335
	7	-,126	,010	,204	-,382	,129
	8	-,043	,032	1,000	-,907	,821
	9	-,117	,033	1,000	-1,004	,771
4	1	,505	,009	,010	,275	,735
	2	,162	,006	,054	-,007	,331
	3	-,012	,023	1,000	-,621	,597
	5	-,114	,031	1,000	-,949	,720
	6	-,124	,027	1,000	-,860	,613
	7	-,138	,028	1,000	-,891	,615
	8	-,055	,010	1,000	-,310	,201
	9	-,129	,014	,437	-,512	,255
5	1	,619	,023	,048	,011	1,227
	2	,276	,025	,296	-,399	,952
	3	,102	,017	,916	-,344	,549
	4	,114	,031	1,000	-,720	,949
	6	-,009	,005	1,000	-,136	,117
	7	-,024	,025	1,000	-,690	,643
	8	,060	,039	1,000	-,991	1,110
	9	-,014	,045	1,000	-1,210	1,182
6	1	,629	,019	,033	,122	1,135
	2	,286	,022	,209	-,300	,871
	3	,112	,017	,772	-,335	,558
	4	,124	,027	1,000	-,613	,860
	5	,009	,005	1,000	-,117	,136
	7	-,014	,026	1,000	-,705	,676
	8	,069	,035	1,000	-,872	1,010
	9	-,005	,041	1,000	-1,113	1,103

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
7	1	,643	,025	,053	-,020	1,306
	2	,300	,023	,209	-,316	,916
	3	,126	,010	,204	-,129	,382
	4	,138	,028	1,000	-,615	,891
	5	,024	,025	1,000	-,643	,690
	6	,014	,026	1,000	-,676	,705
	8	,083	,037	1,000	-,920	1,087
	9	,009	,035	1,000	-,931	,950
	8	1	,560	,017	,032	,112
2		,217	,016	,186	-,202	,635
3		,043	,032	1,000	-,821	,907
4		,055	,010	1,000	-,201	,310
5		-,060	,039	1,000	-1,110	,991
6		-,069	,035	1,000	-1,010	,872
7		-,083	,037	1,000	-1,087	,920
9		-,074	,013	1,000	-,412	,264
9		1	,633	,023	,046	,024
	2	,291	,019	,161	-,232	,813
	3	,117	,033	1,000	-,771	1,004
	4	,129	,014	,437	-,255	,512
	5	,014	,045	1,000	-1,182	1,210
	6	,005	,041	1,000	-1,103	1,113
	7	-,009	,035	1,000	-,950	,931
	8	,074	,013	1,000	-,264	,412

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

- Almidón

### Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,458	,021	,059	-,955	,040
	3	-,550	,023	,047	-1,082	-,019
	4	-,546	,037	,130	-1,428	,337
	5	-,605	,031	,075	-1,348	,137
	6	-,534	,020	,039	-1,006	-,062
	7	-,453	,026	,095	-1,077	,172
	8	-,372	,022	,094	-,884	,140
	2	1	,458	,021	,059	-,040
3		-,093	,043	1,000	-1,120	,934
4		-,088	,053	1,000	-1,329	1,153
5		-,148	,040	1,000	-1,084	,789
6		-,076	,014	,960	-,418	,266
7		,005	,041	1,000	-,957	,966
8		,086	,027	1,000	-,553	,724

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
3	1	,550	,023	,047	,019	1,082
	2	,093	,043	1,000	-,934	1,120
	4	,005	,033	1,000	-,782	,792
	5	-,055	,039	1,000	-,981	,871
	6	,017	,041	1,000	-,945	,978
	7	,098	,023	1,000	-,439	,635
	8	,179	,032	,869	-,583	,940
	4	1	,546	,037	,130	-,337
2		,088	,053	1,000	-1,153	1,329
3		-,005	,033	1,000	-,792	,782
5		-,060	,019	1,000	-,499	,380
6		,012	,041	1,000	-,949	,973
7		,093	,055	1,000	-1,196	1,382
8		,174	,058	1,000	-1,191	1,539
5		1	,605	,031	,075	-,137
	2	,148	,040	1,000	-,789	1,084
	3	,055	,039	1,000	-,871	,981
	4	,060	,019	1,000	-,380	,499
	6	,071	,026	1,000	-,537	,680
	7	,152	,055	1,000	-1,157	1,461
	8	,233	,053	1,000	-1,020	1,486
	6	1	,534	,020	,039	,062
2		,076	,014	,960	-,266	,418
3		-,017	,041	1,000	-,978	,945
4		-,012	,041	1,000	-,973	,949
5		-,071	,026	1,000	-,680	,537
7		,081	,046	1,000	-,997	1,159
8		,162	,036	1,000	-,689	1,013
7		1	,453	,026	,095	-,172
	2	-,005	,041	1,000	-,966	,957
	3	-,098	,023	1,000	-,635	,439
	4	-,093	,055	1,000	-1,382	1,196
	5	-,152	,055	1,000	-1,461	1,157
	6	-,081	,046	1,000	-1,159	,997
	8	,081	,017	1,000	-,313	,475
	8	1	,372	,022	,094	-,140
2		-,086	,027	1,000	-,724	,553
3		-,179	,032	,869	-,940	,583
4		-,174	,058	1,000	-1,539	1,191
5		-,233	,053	1,000	-1,486	1,020
6		-,162	,036	1,000	-1,013	,689
7		-,081	,017	1,000	-,475	,313

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

B. amyloliquefaciens UC-PSAV2EM4

• Glucosa

Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error tít.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,850	,039	,045	-1,655	-,045
	3	-1,017	,035	,025	-1,735	-,299
	4	-1,036	,015	,004	-1,340	-,732
	5	-,962	,013	,004	-1,233	-,691
	6	-,812	,012	,005	-1,055	-,568
	7	-,736	,012	,006	-,988	-,483
2	1	,850	,039	,045	,045	1,655
	3	-,167	,017	,207	-,508	,174
	4	-,186	,025	,373	-,699	,328
	5	-,112	,033	1,000	-,794	,570
	6	,038	,027	1,000	-,524	,600
	7	,114	,051	1,000	-,923	1,151
3	1	1,017	,035	,025	,299	1,735
	2	,167	,017	,207	-,174	,508
	4	-,019	,021	1,000	-,444	,406
	5	,055	,035	1,000	-,663	,772
	6	,205	,025	,312	-,311	,721
	7	,281	,047	,574	-,690	1,252
4	1	1,036	,015	,004	,732	1,340
	2	,186	,025	,373	-,328	,699
	3	,019	,021	1,000	-,406	,444
	5	,074	,016	,878	-,245	,393
	6	,224	,005	,010	,126	,321
	7	,300	,027	,168	-,253	,853
5	1	,962	,013	,004	,691	1,233
	2	,112	,033	1,000	-,570	,794
	3	-,055	,035	1,000	-,772	,663
	4	-,074	,016	,878	-,393	,245
	6	,150	,011	,110	-,073	,373
	7	,226	,019	,154	-,173	,625
6	1	,812	,012	,005	,568	1,055
	2	-,038	,027	1,000	-,600	,524
	3	-,205	,025	,312	-,721	,311
	4	-,224	,005	,010	-,321	-,126
	5	-,150	,011	,110	-,373	,073
	7	,076	,023	1,000	-,403	,556
7	1	,736	,012	,006	,483	,988
	2	-,114	,051	1,000	-1,151	,923
	3	-,281	,047	,574	-1,252	,690
	4	-,300	,027	,168	-,853	,253
	5	-,226	,019	,154	-,625	,173
	6	-,076	,023	1,000	-,556	,403

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

- Sacarosa

Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,600	,021	,018	-,956	-,244
	3	-,679	,023	,017	-1,075	-,282
	4	-,757	,029	,022	-1,256	-,258
	5	-,612	,009	,003	-,760	-,463
	6	-,560	,002	,000	-,601	-,518
2	1	,600	,021	,018	,244	,956
	3	-,079	,025	1,000	-,506	,349
	4	-,157	,033	,620	-,727	,413
	5	-,012	,016	1,000	-,281	,257
	6	,040	,023	1,000	-,352	,433
3	1	,679	,023	,017	,282	1,075
	2	,079	,025	1,000	-,349	,506
	4	-,079	,008	,163	-,221	,064
	5	,067	,016	,761	-,203	,337
	6	,119	,023	,518	-,273	,512
4	1	,757	,029	,022	,258	1,256
	2	,157	,033	,620	-,413	,727
	3	,079	,008	,163	-,064	,221
	5	,145	,023	,354	-,247	,538
	6	,198	,028	,294	-,287	,683
5	1	,612	,009	,003	,463	,760
	2	,012	,016	1,000	-,257	,281
	3	-,067	,016	,761	-,337	,203
	4	-,145	,023	,354	-,538	,247
	6	,052	,010	,475	-,113	,217
6	1	,560	,002	,000	,518	,601
	2	-,040	,023	1,000	-,433	,352
	3	-,119	,023	,518	-,512	,273
	4	-,198	,028	,294	-,683	,287
	5	-,052	,010	,475	-,217	,113

Basadas en las medias marginales estimadas.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.



● Lactosa Comparaciones por pares Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,393	,019	,083	-,900	,114
	3	-,476	,016	,038	-,894	-,058
	4	-,502	,010	,013	-,757	-,247
	5	-,648	,027	,065	-1,384	,089
	6	-,590	,020	,043	-1,136	-,045
	7	-,686	,004	,001	-,796	-,575
	8	-,657	,007	,004	-,849	-,465
	9	-,593	,022	,049	-1,178	-,008
2	1	,393	,019	,083	-,114	,900
	3	-,083	,025	1,000	-,759	,592
	4	-,109	,023	1,000	-,719	,500
	5	-,255	,032	,539	-1,100	,590
	6	-,198	,027	,631	-,908	,513
	7	-,293	,023	,219	-,909	,323
	8	-,264	,019	,183	-,771	,242
	9	-,200	,023	,466	-,816	,416
3	1	,476	,016	,038	,058	,894
	2	,083	,025	1,000	-,592	,759
	4	-,026	,006	1,000	-,195	,142
	5	-,171	,043	1,000	-1,325	,983
	6	-,114	,036	1,000	-1,077	,849
	7	-,210	,017	,225	-,656	,237
	8	-,181	,023	,554	-,790	,428
	9	-,117	,037	1,000	-1,107	,874
4	1	,502	,010	,013	,247	,757
	2	,109	,023	1,000	-,500	,719
	3	,026	,006	1,000	-,142	,195
	5	-,145	,037	1,000	-1,136	,846
	6	-,088	,030	1,000	-,887	,711
	7	-,183	,010	,115	-,462	,095
	8	-,155	,017	,411	-,602	,292
	9	-,091	,031	1,000	-,927	,746
5	1	,648	,027	,065	-,089	1,384
	2	,255	,032	,539	-,590	1,100
	3	,171	,043	1,000	-,983	1,325
	4	,145	,037	1,000	-,846	1,136
	6	,057	,007	,553	-,135	,249
	7	-,038	,027	1,000	-,774	,698
	8	-,010	,020	1,000	-,555	,536
	9	,055	,009	,855	-,175	,285
6	1	,590	,020	,043	,045	1,136
	2	,198	,027	,631	-,513	,908
	3	,114	,036	1,000	-,849	1,077
	4	,088	,030	1,000	-,711	,887
	5	-,057	,007	,553	-,249	,135
	7	-,095	,020	1,000	-,640	,449
	8	-,067	,013	1,000	-,421	,288
	9	-,002	,006	1,000	-,171	,166

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
7	1	,686	,004	,001	,575	,796
	2	,293	,023	,219	-,323	,909
	3	,210	,017	,225	-,237	,656
	4	,183	,010	,115	-,095	,462
	5	,038	,027	1,000	-,698	,774
	6	,095	,020	1,000	-,449	,640
	8	,029	,008	1,000	-,193	,250
	9	,093	,023	1,000	-,522	,708
	8	1	,657	,007	,004	,465
2		,264	,019	,183	-,242	,771
3		,181	,023	,554	-,428	,790
4		,155	,017	,411	-,292	,602
5		,010	,020	1,000	-,536	,555
6		,067	,013	1,000	-,288	,421
7		-,029	,008	1,000	-,250	,193
9		,064	,015	1,000	-,334	,462
9		1	,593	,022	,049	,008
	2	,200	,023	,466	-,416	,816
	3	,117	,037	1,000	-,874	1,107
	4	,091	,031	1,000	-,746	,927
	5	-,055	,009	,855	-,285	,175
	6	,002	,006	1,000	-,166	,171
	7	-,093	,023	1,000	-,708	,522
	8	-,064	,015	1,000	-,462	,334

Basadas en las medias marginales estimadas.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

- Almidón

### Comparaciones por pares

Medida: Biomasa

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-,764	,039	,074	-1,694	,165
	3	-,783	,048	,104	-1,912	,345
	4	-,831	,056	,126	-2,155	,493
	5	-,800	,097	,400	-3,084	1,484
	6	-,810 <sup>*</sup>	,027	,032	-1,459	-,160
	7	-,686 <sup>*</sup>	,018	,019	-1,110	-,261
	8	-,619 <sup>*</sup>	,016	,018	-,988	-,250
	2	1	,764	,039	,074	-,165
3		-,019	,062	1,000	-1,485	1,447
4		-,067	,027	1,000	-,716	,582
5		-,036	,099	1,000	-2,364	2,293
6		-,045	,038	1,000	-,951	,860
7		,079	,043	1,000	-,934	1,092
8		,145	,045	1,000	-,929	1,219

(I)tiempo	(J)tiempo	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig. <sup>a</sup>	Intervalo de confianza al 95 % para la diferencia <sup>a</sup>	
					Límite inferior	Límite superior
3	1	,783	,048	,104	-,345	1,912
	2	,019	,062	1,000	-1,447	1,485
	4	-,048	,089	1,000	-2,143	2,048
	5	-,017	,144	1,000	-3,420	3,387
	6	-,026	,074	1,000	-1,773	1,720
	7	,098	,030	1,000	-,607	,802
	8	,164	,033	1,000	-,609	,937
	4	1	,831	,056	,126	-,493
2		,067	,027	1,000	-,582	,716
3		,048	,089	1,000	-2,048	2,143
5		,031	,078	1,000	-1,821	1,883
6		,021	,039	1,000	-,908	,951
7		,145	,066	1,000	-1,410	1,700
8		,212	,067	1,000	-1,373	1,797
5		1	,800	,097	,400	-1,484
	2	,036	,099	1,000	-2,293	2,364
	3	,017	,144	1,000	-3,387	3,420
	4	-,031	,078	1,000	-1,883	1,821
	6	-,010	,070	1,000	-1,670	1,651
	7	,114	,114	1,000	-2,588	2,817
	8	,181	,112	1,000	-2,471	2,833
	6	1	,810	,027	,032	,160
2		,045	,038	1,000	-,860	,951
3		,026	,074	1,000	-1,720	1,773
4		-,021	,039	1,000	-,951	,908
5		,010	,070	1,000	-1,651	1,670
7		,124	,044	1,000	-,927	1,175
8		,190	,043	1,000	-,824	1,205
7		1	,686	,018	,019	,261
	2	-,079	,043	1,000	-1,092	,934
	3	-,098	,030	1,000	-,802	,607
	4	-,145	,066	1,000	-1,700	1,410
	5	-,114	,114	1,000	-2,817	2,588
	6	-,124	,044	1,000	-1,175	,927
	8	,067	,005	,142	-,046	,179
	8	1	,619	,016	,018	,250
2		-,145	,045	1,000	-1,219	,929
3		-,164	,033	1,000	-,937	,609
4		-,212	,067	1,000	-1,797	1,373
5		-,181	,112	1,000	-2,833	2,471
6		-,190	,043	1,000	-1,205	,824
7		-,067	,005	,142	-,179	,046

Basadas en las medias marginales estimadas.

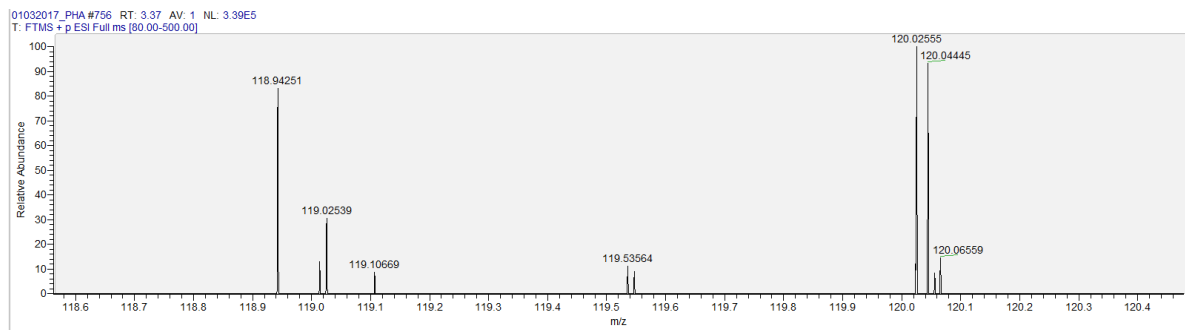
a. Ajuste para comparaciones múltiples: Bonferroni.

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

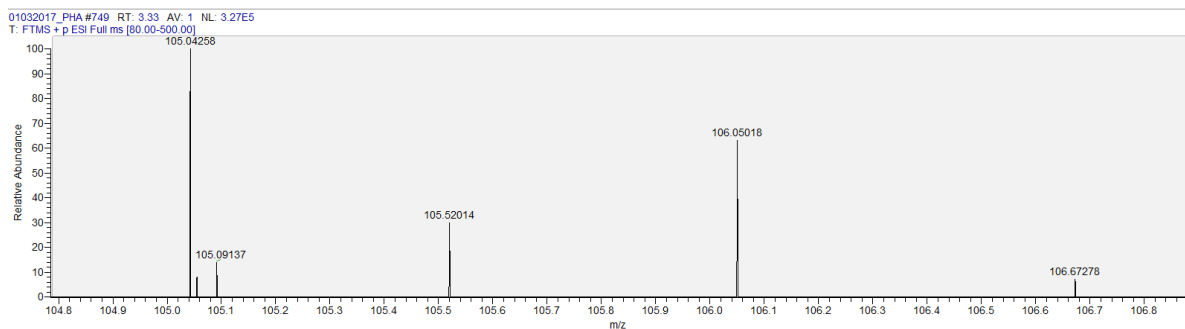
# ANEXO G. ESPECTRO DE MASAS DE LAS BACTERIAS *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia sp.* UC-082 Y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 EN LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

*B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en glucosa

## Hidroxicvalerato

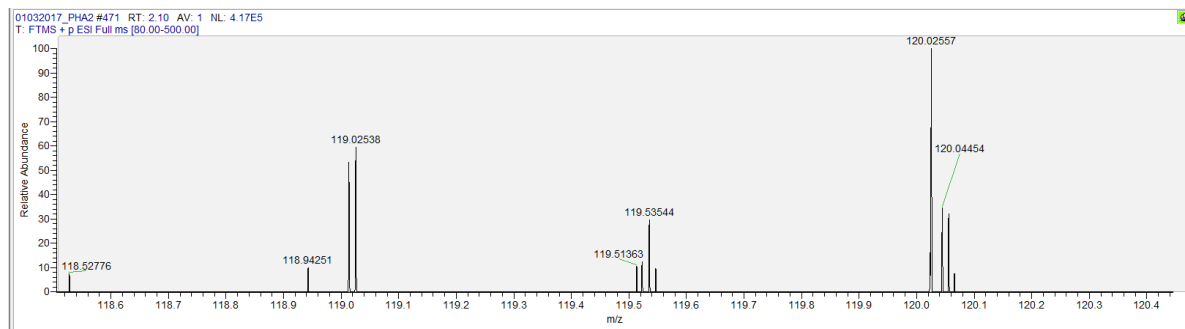


## Hidroxiurato

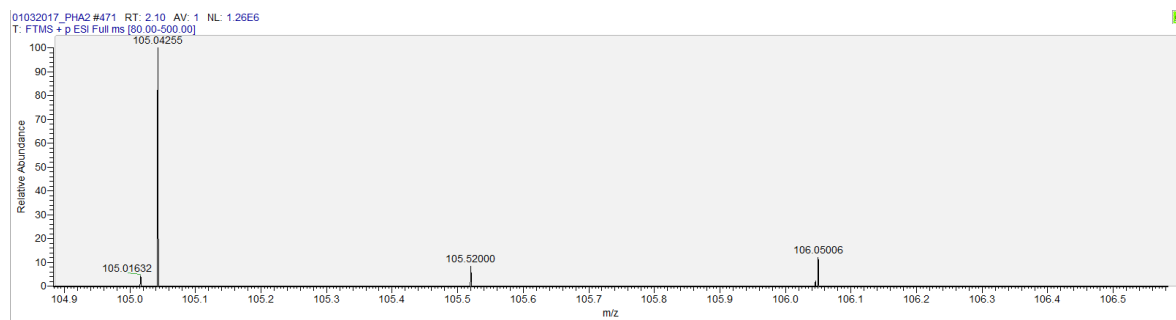


*B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en sacarosa

## Hidroxicvalerato

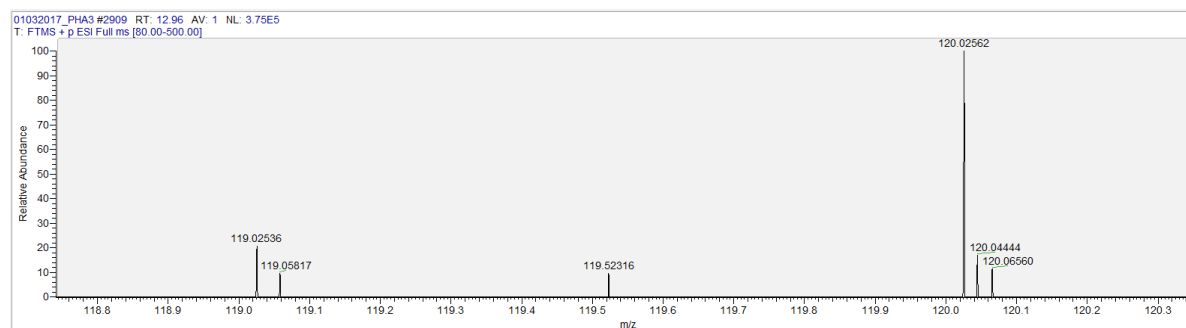


## Hidroxiurato

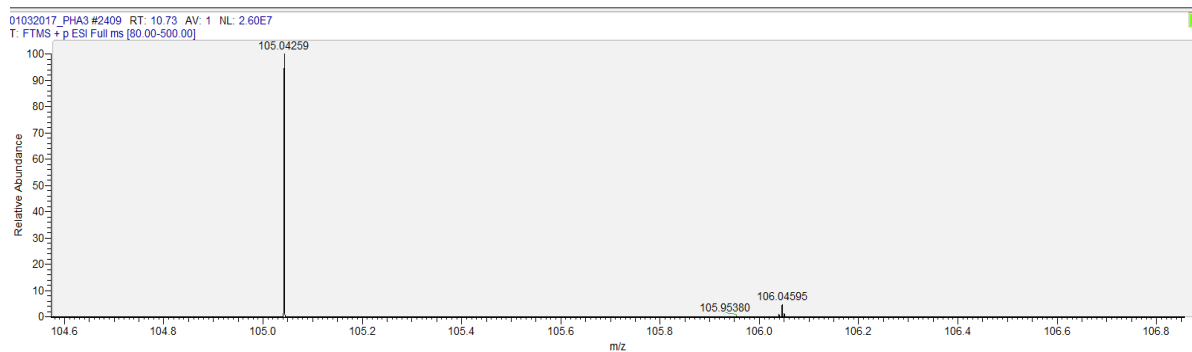


## *B. amyloliquifaciens* UC-PSAV2EM4 en lactosa

## Hidroxi valerato

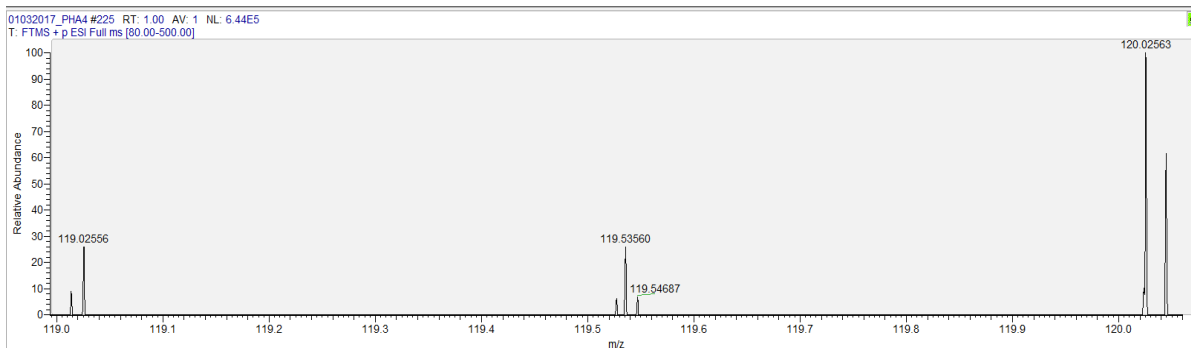


## Hidroxiurato

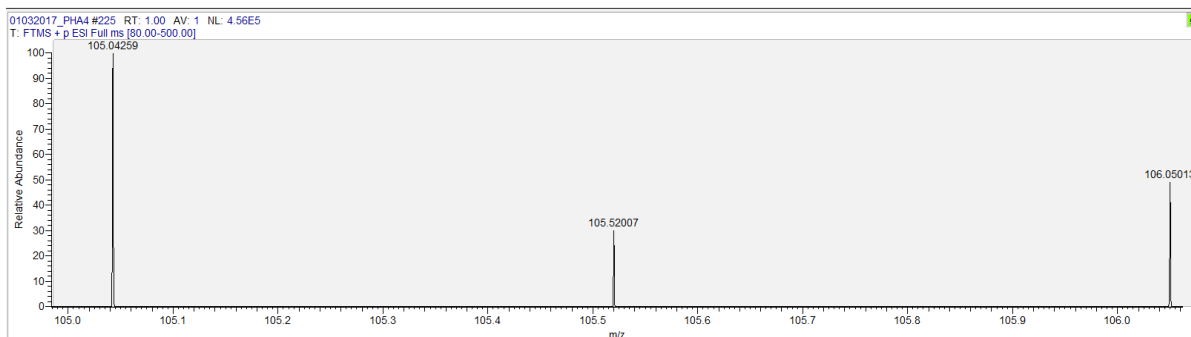


## *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en almidón

### Hidroxicvalerato

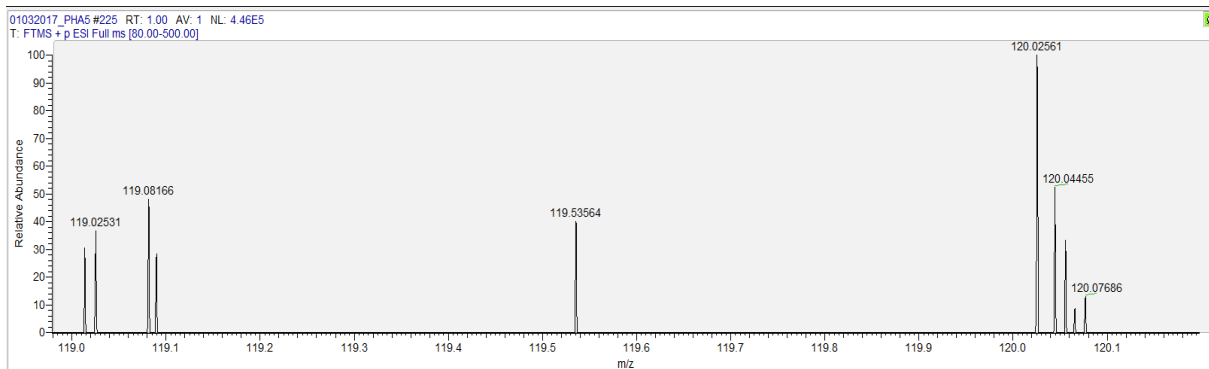


### Hidroxiurato

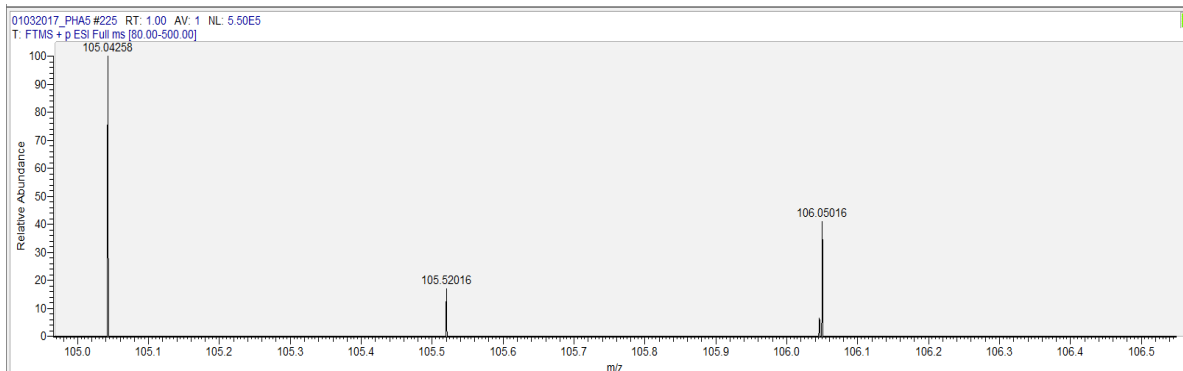


## *Serratia* sp. UC-082 en glucosa

### Hidroxicvalerato

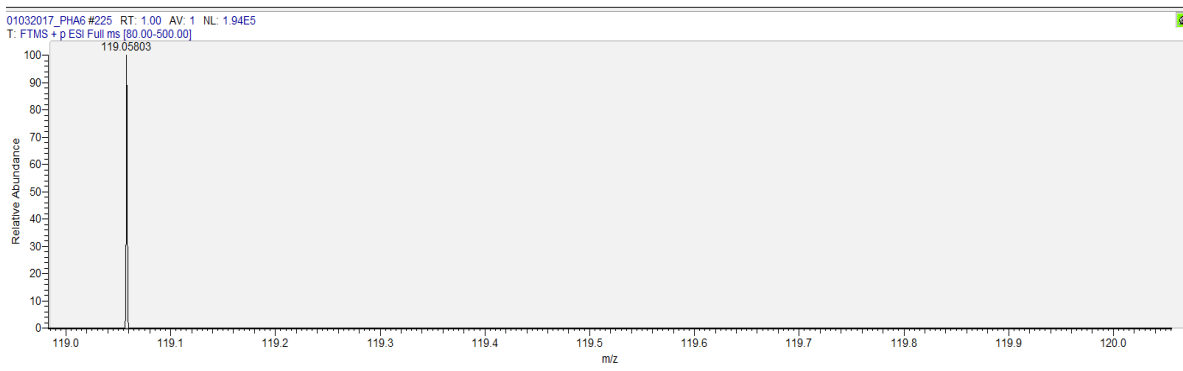


## Hidroxiurato

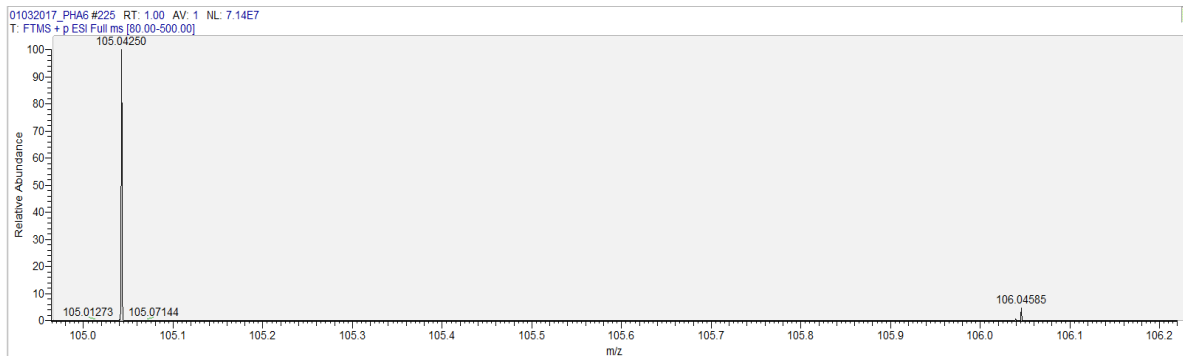


## *Serratia Sp* UC-082 en sacarosa

## Hidroxi valerato

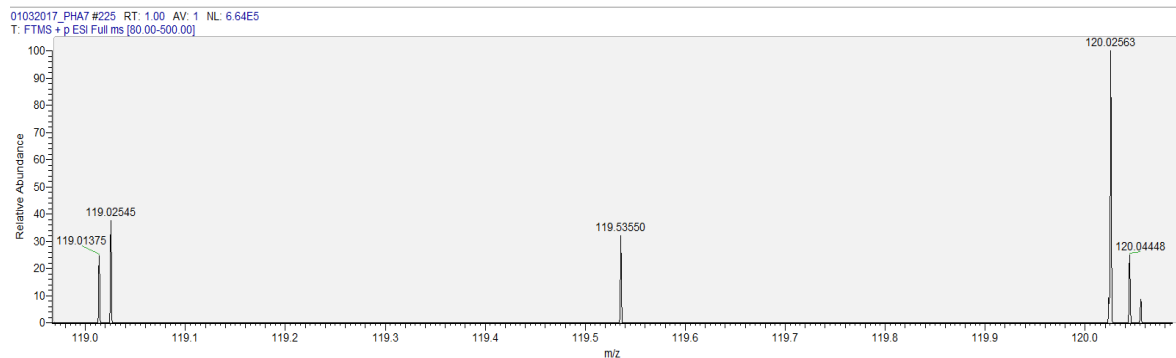


## Hidroxiurato

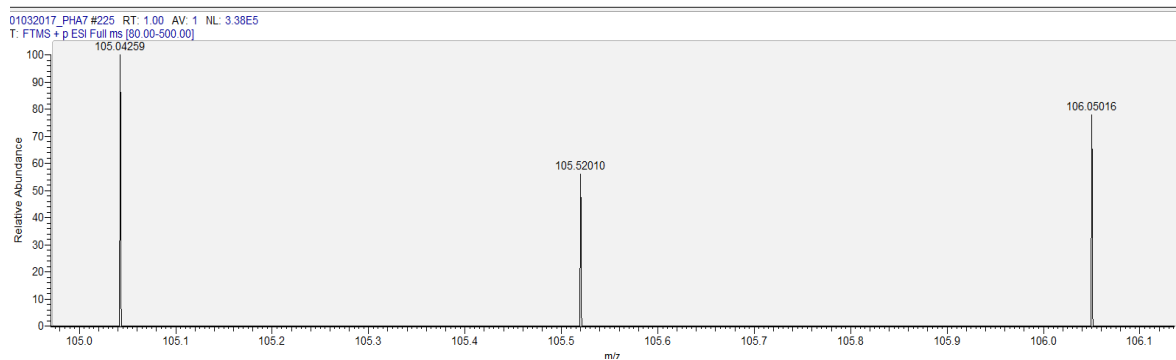


## Serratia Sp UC-082 en lactosa

### Hidroxivalerato

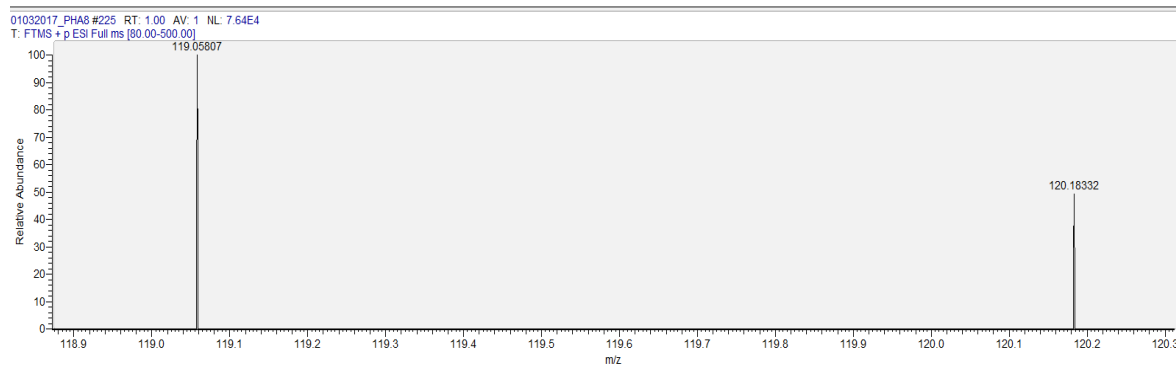


### Hidroxiburato



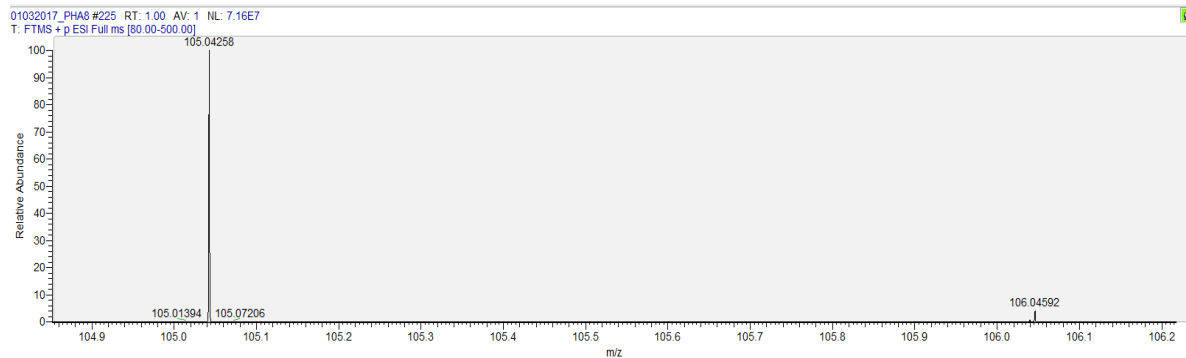
## Serratia Sp UC-082 en almidón

### Hidroxivalerato



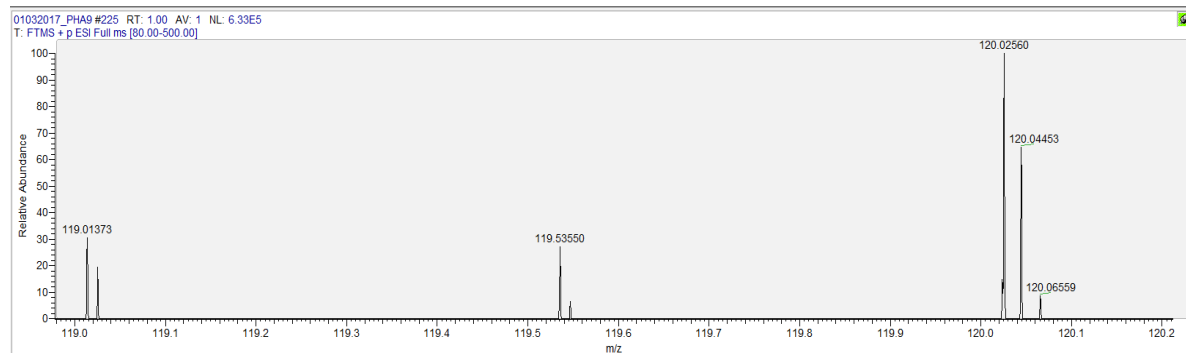


## Hidroxiurato

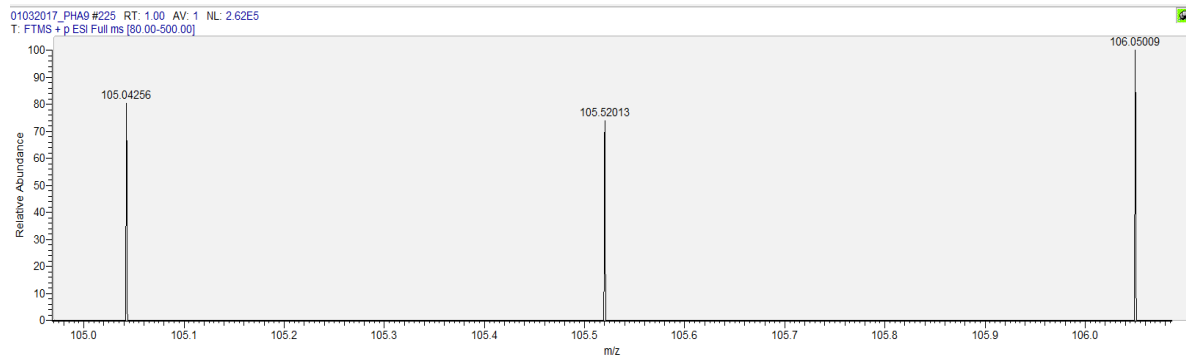


## *B. thuringiensis* UC-036 en glucosa

## Hidroxi valerato

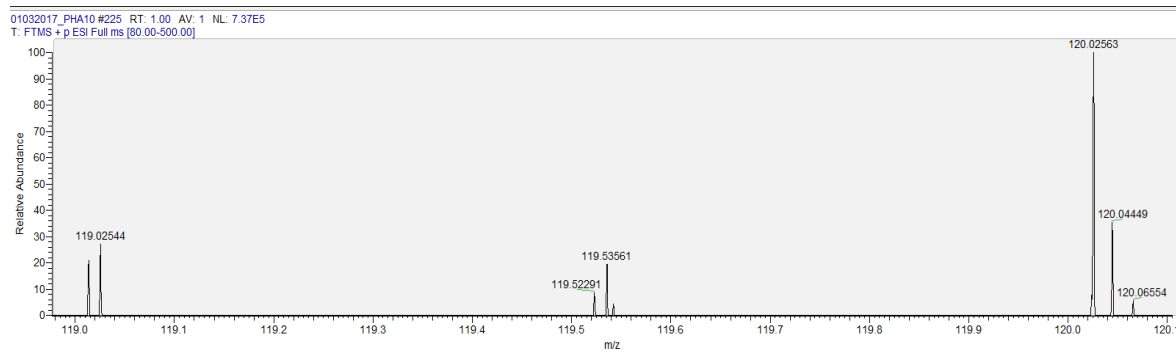


## Hidroxiurato

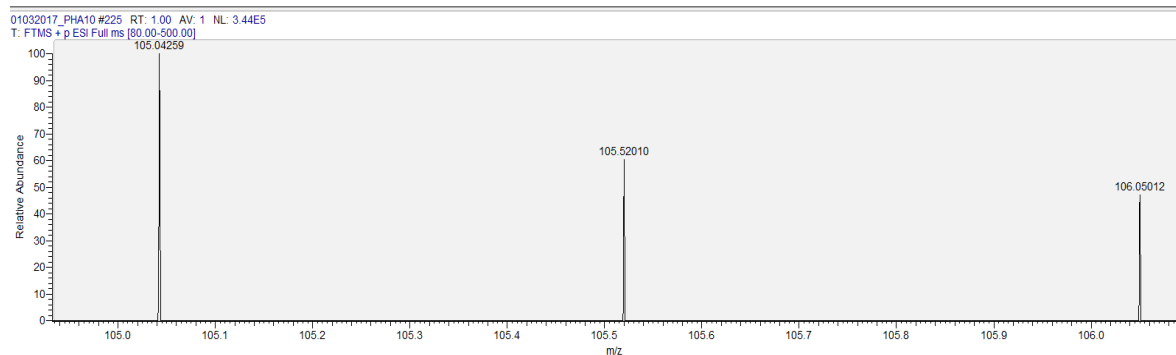


## *B. thuringiensis* UC-036 en sacarosa

### Hidroivalerato

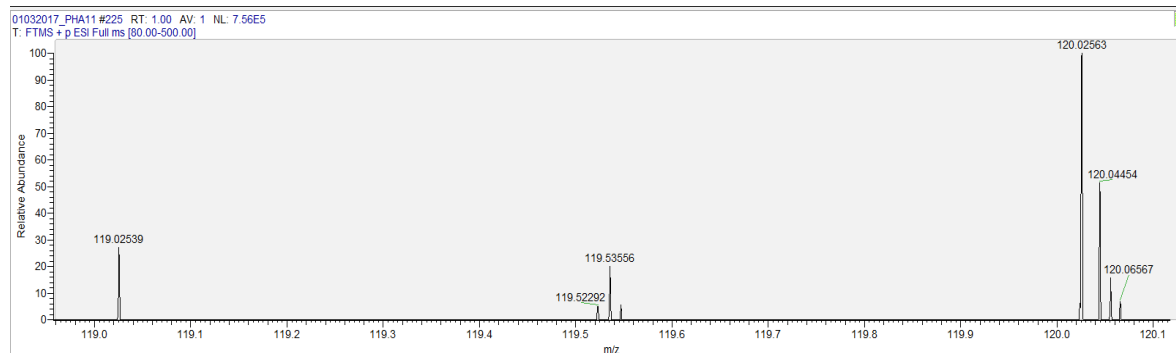


### Hidroxiurato

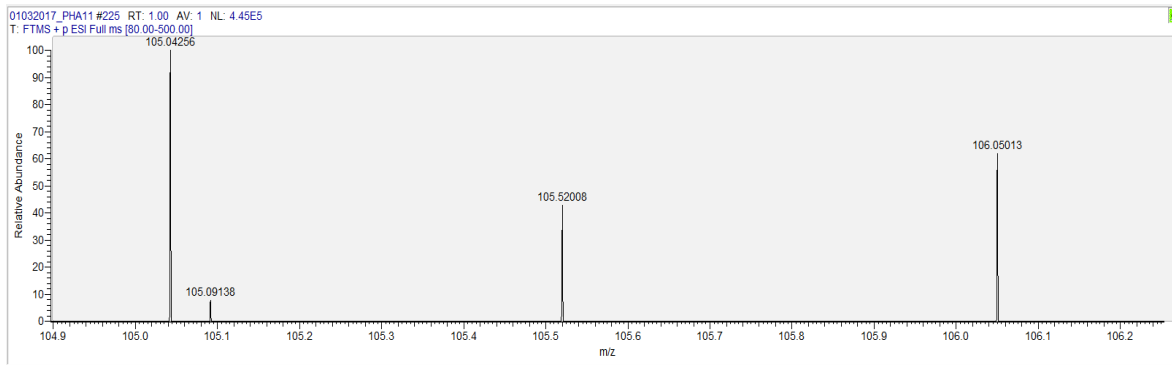


## *B. thuringiensis* UC-036 en lactosa

### Hidroivalerato

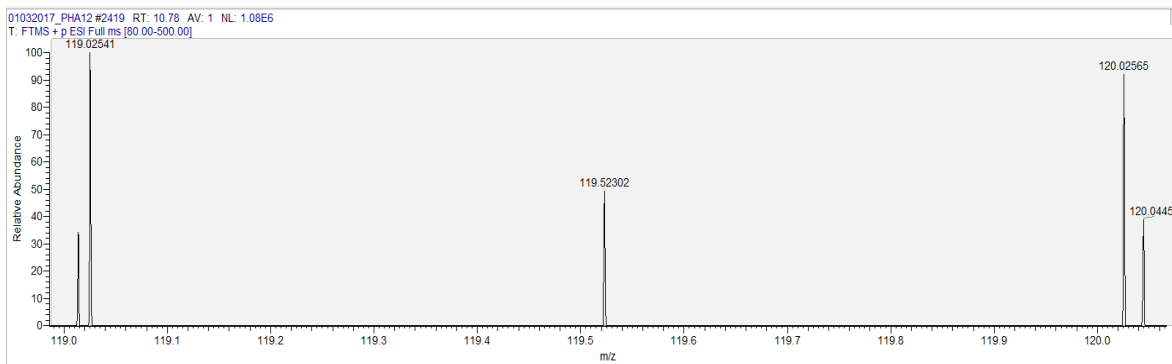


## Hidroxiburato

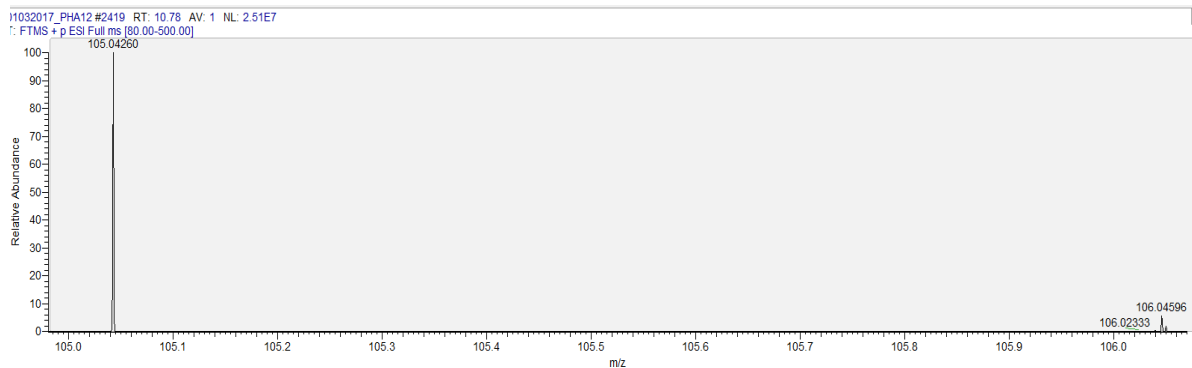


## *B. thuringiensis* UC-036 en almidón

## Hidroxivalerato

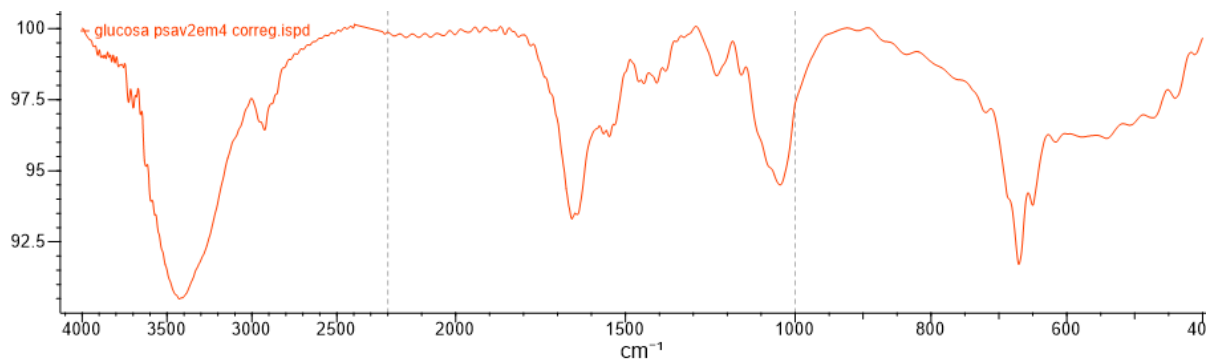


## Hidroxiburato

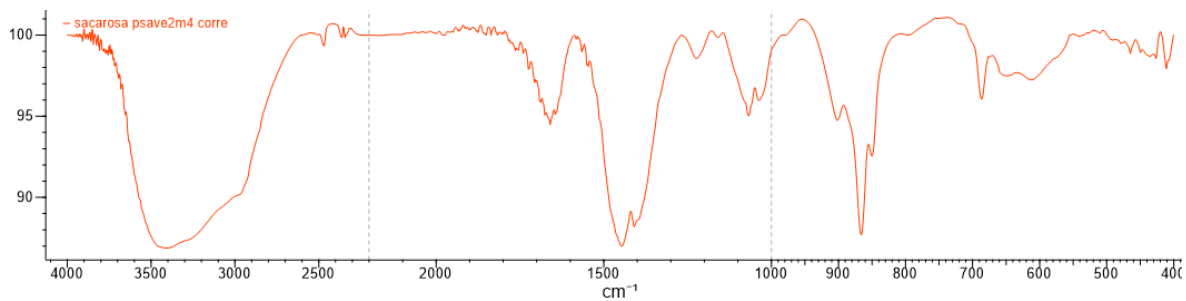


**ANEXO H. FT-IR DE LAS BACTERIAS *B. thuringiensis* UC-036, *Serratia Sp* UC-082 Y *B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 EN LAS DIFERENTES FUENTES DE CARBONO**

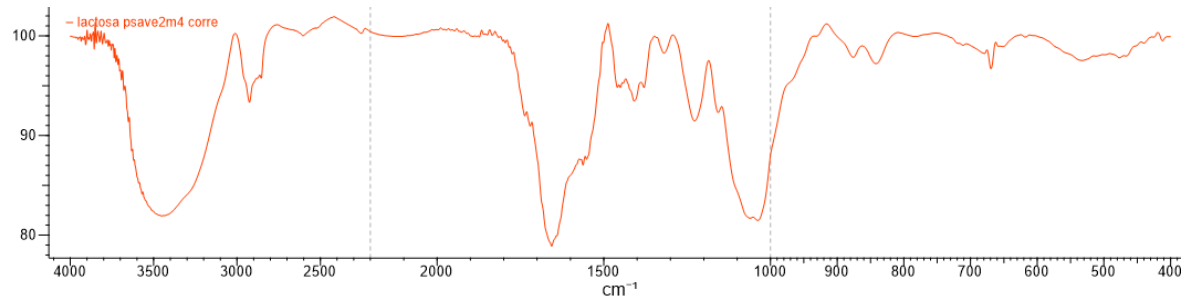
*B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en glucosa



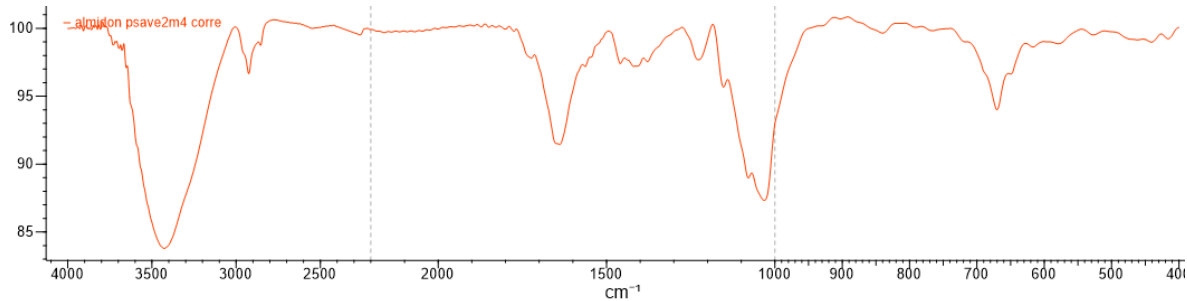
*B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en sacarosa



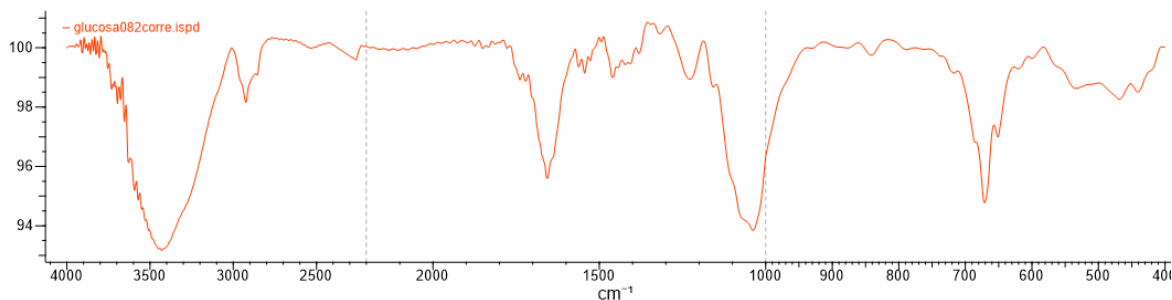
*B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en lactosa



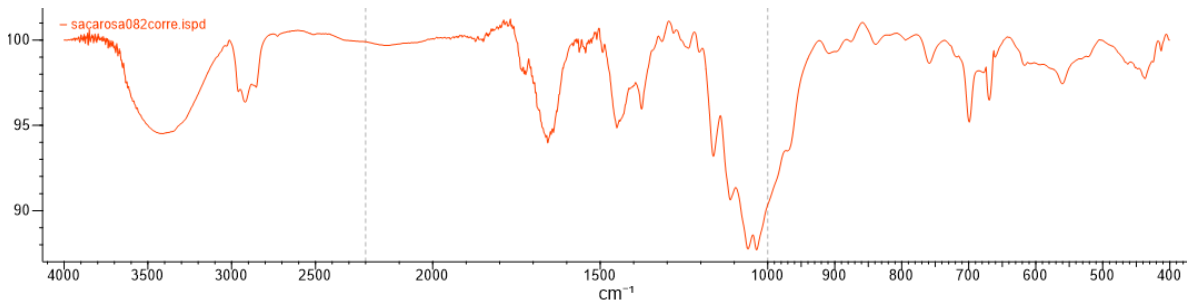
*B. amyloliquefaciens* UC-PSAV2EM4 en almidón



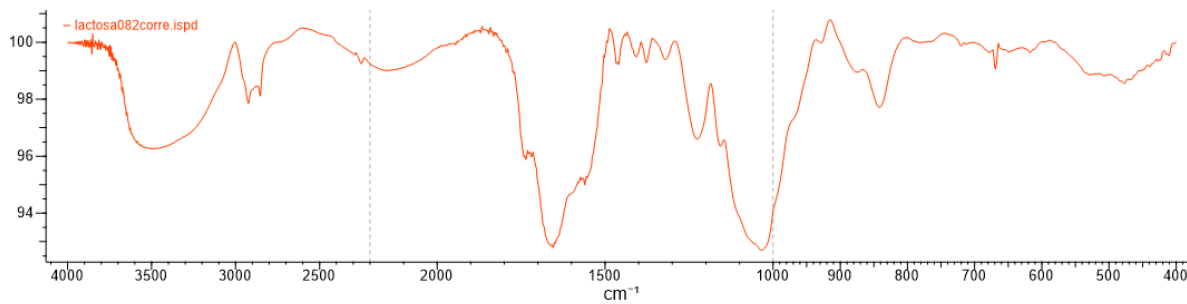
*Serratia* Sp UC-082 en glucosa



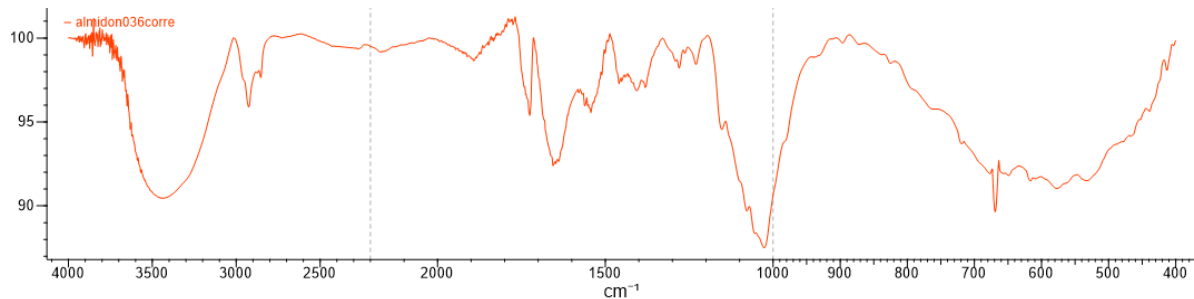
*Serratia* Sp UC-082 en sacarosa



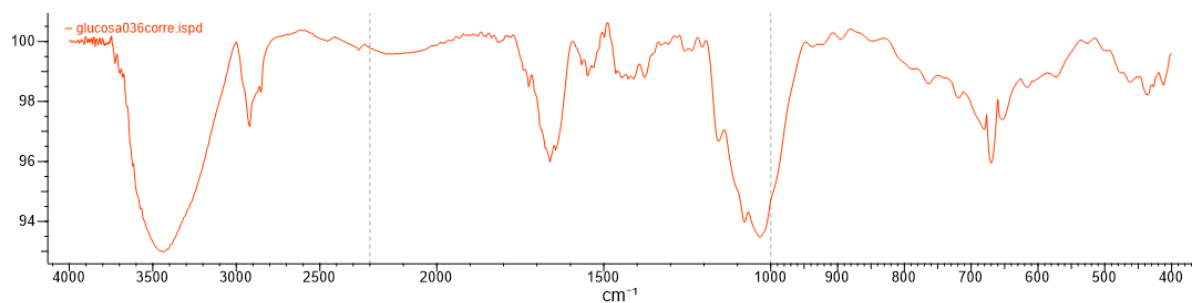
*Serratia* Sp UC-082 en lactosa



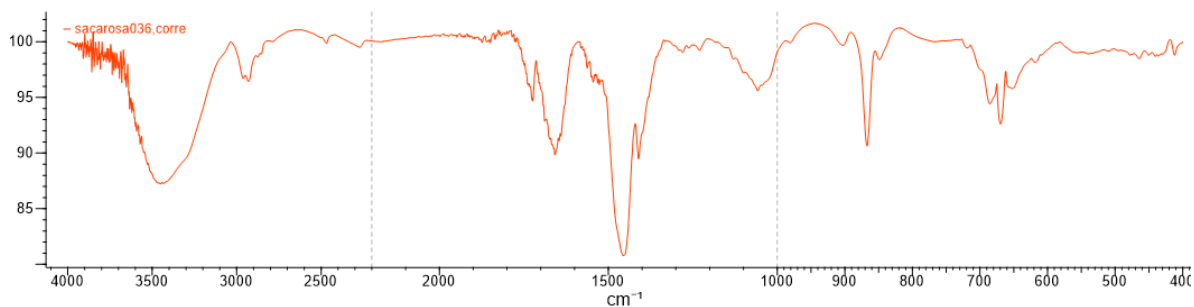
*Serratia Sp UC-082* en almidón



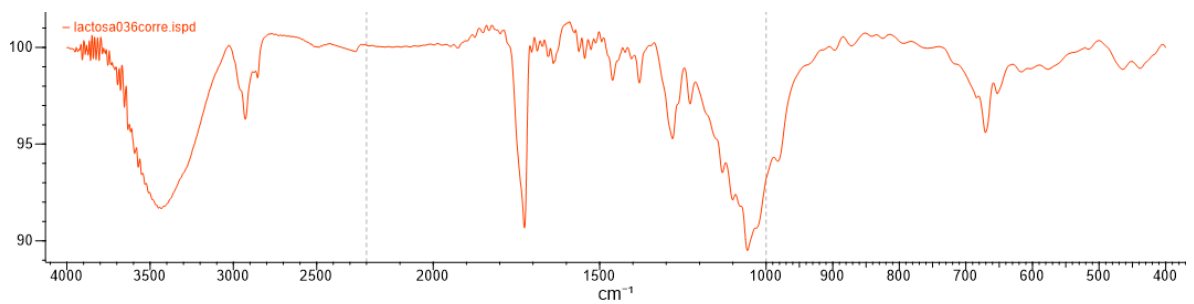
*B. thuringiensis UC-036* en glucosa



*B. thuringiensis UC-036* en sacarosa



*B. thuringiensis UC-036* en lactosa



*B. thuringiensis* UC-036 en almidón

