

Estudio de la producción de biopolímeros bacterianos como vía para la sustitución de plásticos convencionales

Dra. Andrea M. Rivas-Castillo¹, Ing. Brandon Daniel Pérez-García², Ing. Carlos Alberto Hernández-Duarte³, Dra. Norma G. Rojas-Avelizapa⁴

Resumen: Hoy en día existe la problemática a nivel mundial de contaminación ambiental por el uso de plásticos que, debido a su lenta degradabilidad y por ende a su acumulación, generan afectaciones a los ecosistemas y a la salud. Además, la demanda de este tipo de productos sigue en aumento y, aunque los biopolímeros representan una opción viable para la sustitución de los polímeros convencionales, esta no ha sido satisfactoria debido a los bajos rendimientos obtenidos y al alto costo generado por los recursos necesarios para su producción. Por ello, se ha explorado la posibilidad de identificar y caracterizar cepas bacterianas con elevado potencial de producción de biopolímeros, destacando las cepas de *Bacillus* spp., y *Klebsiella pneumoniae* E22, reportadas con altas capacidades de producción, además con rendimientos sostenidos en medios de cultivo de bajo costo producidos a partir de residuos agrícolas. Debido a la importancia de la sustitución de los plásticos derivados del petróleo, el presente estudio compila avances relevantes en referencia a la producción de biopolímeros bacterianos.

Palabras clave: Biopolímeros bacterianos, PHA, PHB, *Bacillus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, medios de cultivo de bajo costo.

Introducción

Los polímeros son utilizados actualmente para generar una gran diversidad de productos. Sin embargo, debido a su lenta degradación y al inminente agotamiento de las reservas mundiales de petróleo, el uso de estos compuestos trae consigo problemas ambientales significativos. Es ampliamente conocido que, debido al ciclo de vida de los plásticos obtenidos a partir de la industria petroquímica, se producen serios impactos negativos en el ambiente, como son: a) el uso de petróleo como fuente de materia prima; b) el consumo energético durante su producción; c) las emisiones de gases de efecto invernadero; y, d) la contaminación de los ecosistemas. Por ello, es necesario reemplazar los plásticos convencionales por productos más amigables con el ambiente, como los bioplásticos, producidos a partir de biopolímeros (BP), que se degradan en periodos cortos de tiempo cuando están expuestos a ambientes biológicamente activos (Rodríguez-Contreras et al., 2013; Dash et al., 2017).

Dentro de los tipos BP que existen, se destacan los polihidroxiclcanoatos (PHA), que son poliésteres termoplásticos sintetizados por microorganismos procariotas, específicamente bacterias, generados a través de los procesos de fermentación de azúcares o lípidos. Los PHA son poliésteres alifáticos constituidos por monómeros de entre 1000 y 3000 unidades. Estos poseen, en general, características fisicoquímicas similares a las de los poliésteres sintéticos (Kucera et al., 2018) y se les han encontrado utilidades relevantes en un amplio campo de aplicación, pudiendo utilizarse en la fabricación de envases para productos de limpieza, higiene y cosméticos, así como en aplicaciones industriales de vida corta, principalmente en aquellos sectores en los cuales las características como pureza y biodegradabilidad son necesarias. Además, por tratarse de materiales biocompatibles y fácilmente absorbidos por el organismo humano, los PHA han podido emplearse en el área médico-farmacéutica con gran éxito (Dash et al., 2017).

Aunque se conocen los beneficios de los BP bacterianos, la problemática principal que existe para la producción de éstos, a escala industrial, es su elevado costo de obtención, que es de aproximadamente 10 USD/Kg, en comparación con el costo de producción de los plásticos convencionales, que está alrededor de 1 USD/Kg (Bello et al., 2009). Este alto costo de producción está asociado principalmente a la elevada inversión necesaria para adquirir los medios de cultivo utilizados para sostener el crecimiento microbiano y otras materias primas necesarias para la extracción del PHA contenido en la biomasa, así como los bajos rendimientos de obtención de los BP bacterianos (Rivas-Castillo et al., 2019). Por ello, en los últimos años nuestro grupo de trabajo se ha dedicado a la tarea de hacer una revisión bibliográfica extensiva, de identificar experimentalmente cepas bacterianas con alta capacidad de

¹ Dra. Andrea M. Rivas Castillo es Profesora de la Universidad Tecnológica de la Zona Metropolitana del Valle de México a.rivas@utvam.edu.mx

² Ing. Brandon Daniel Pérez García es Profesor de la Universidad Tecnológica de la Zona Metropolitana del Valle de México. y estudiante de la Maestría en el Centro de Investigaciones en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Unidad Querétaro b.perez@utvam.edu.mx

³ Ing. Carlos A. Hernández Duarte es Profesor de la Universidad Tecnológica de la Zona Metropolitana del Valle de México c.duarte@utvam.edu.mx

⁴ Dra. Norma Gabriela Rojas Avelizapa es Profesora del Centro de Investigaciones en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Unidad Querétaro nrojasa@ipn.mx (autor corresponsal)

producción de PHA, así como de desarrollar medios de cultivo de bajo costo que puedan sostener dicha producción, considerando que los residuos agro-industriales pueden ser una fuente nutricional bacteriana viable de bajo costo para la sustitución de los medios de cultivo tradicionales (Rivas-Castillo et al., 2019; Valdez-Calderón et al., 2020). Parte de los hallazgos de estos esfuerzos, así como los reportes relevantes en este sentido, se comparten en el presente documento.

Antecedentes

Debido a su relevancia, los procesos bacterianos de producción de estos BP son investigados en la actualidad, ya que estos compuestos son acumulados de manera citoplasmática bajo determinadas condiciones de crecimiento, específicamente bajo condiciones de estrés. Dentro de los PHA, los polihidroxibutiratos (PHB) son los miembros más estudiados de la familia, ya que son producidos por una amplia gama de géneros bacterianos, dentro de los cuales se han reportado más de 300 cepas. Por ejemplo, destacan los miembros del género *Bacillus*, como *B. subtilis* y *B. safensis*, que han sido reportados con la capacidad de acumular más del 80% de su peso en PHB; además, diversas especies de este género son consideradas como organismos modelo para la industria, ya que son abundantes en la naturaleza, poseen una gran estabilidad genética, una velocidad rápida de crecimiento y producen una gran variedad de enzimas de interés industrial (Valappil-Sabeel et al., 2007).

Así mismo, se han identificado cepas Gram negativas productoras de PHA, como *Klebsiella* spp., específicamente pertenecientes a las especies *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* y *K. aerogenes* (Mohapatra et al., 2017; Valdez-Calderón et al., 2020). Es importante señalar que, aunque es conocida la patogenicidad de *K. pneumoniae*, ha sido reportado que miembros de esta especie presentan un potencial relevante para ser utilizados en diferentes aplicaciones biotecnológicas, como la producción de compuestos de interés industrial, remoción de metales y producción de PHA, y que es posible controlar dicha patogenicidad al escalar los procesos a nivel industrial (Valdez-Calderón et al., 2020).

En general, las cepas bacterianas son flexibles metabólicamente, adaptándose al consumo de diversos sustratos para crecer y, además, contrarrestar la carencia de ciertos nutrientes para subsistir, condiciones bajo las cuales les es posible producir PHA; la diversidad de enzimas hidrolíticas que poseen (Manna et al., 2019) como las celulasas, xilanasas, enzimas lignocelulósicas, etc., les confieren una gran ventaja en el uso de sustratos baratos, derivados del sector agroindustrial o de otro tipo de industrias (Bocchini-Martins et al., 2011; Naranjo et al., 2013).

Así mismo, para lograr una alta producción de BP bacterianos, es necesario trabajar la adecuación (optimización) de las condiciones de crecimiento del cultivo que se esté utilizando, tomando en cuenta parámetros como: pH, temperatura, volumen y agitación de los medios de crecimiento (Valdez-Calderón et al., 2020). El manejo de estas variables en un sistema para mejorar el rendimiento de producción es de suma importancia para lograr aumentar su factibilidad industrial. Este es el caso del experimental realizado con la cepa de *Klebsiella pneumoniae* E22, en donde se implementó el uso de suministros de bajo costo para la elaboración de medios de cultivo en donde se pudiera sostener la producción de PHB por dicha cepa (Rivas-Castillo et al., 2019), utilizando una temperatura de 30°C y 150 rpm, con un periodo de incubación de 72 horas, aplicando además un método de extracción modificado y con base en el uso de hipoclorito de sodio y cloroformo (Rivas-Castillo et al., 2019). Con dicha cepa, se logró obtener un rendimiento de producción de hasta 20 g/L, tanto en medios de cultivo comúnmente utilizados en laboratorio como en medios de cultivo producidos a partir de residuos de cáscara de frutas (Ángeles-Padilla, 2019; Valdez-Calderón et al., 2020).

Objetivo

El objetivo de la presente investigación fue determinar los avances relevantes sobre el estudio de la producción de PHA para la potencial sustitución de polímeros derivados del petróleo, identificando, para ello, los diversos microorganismos utilizados hasta la fecha, los medios de cultivo de bajo costo que han sido probados y el tipo de BP obtenido.

Metodología

Tipo de investigación

El enfoque del presente trabajo fue documental, encaminado en realizar un estudio teórico sobre los avances reportados en referencia de la producción de PHA en medios de cultivo de bajo costo, utilizando diversos microorganismos y analizando también los rendimientos de producción obtenidos en los diferentes casos.

Participantes, muestreo, recolección de datos e información

Para la recopilación de la información y los datos utilizados, la búsqueda se realizó recabando información sobre los resultados obtenidos en la producción de PHA, tipos de medios de cultivo o sustratos utilizados, variables físico-

químicas implementadas en cada sistema de producción, métodos de extracción de BP, cepas bacterianas empleadas y tipo de BP producido, tomando en cuenta las investigaciones reportadas en los últimos 10 años.

Materiales, equipo, sistemas, programas computacionales utilizados

La recopilación de datos se llevó a cabo mediante una búsqueda bibliográfica utilizando plataformas como: Google académico, PubMed, ScienceDirect, WorldWideScience y SciELO. Para la parte de vigilancia tecnológica, se consultaron las plataformas de SIGA, Patentscope y Google Patents principalmente.

Procedimiento

Búsqueda bibliográfica

La búsqueda bibliográfica comprendió tanto resultados referentes al estado del arte del tema (artículos científicos) como vigilancia tecnológica, es decir, documentos relacionados con propiedad intelectual (Lara-Carmona, 2020). Específicamente para los fines del presente estudio, se consideraron los documentos basados en la producción de PHA mediante el uso de microorganismos, pues son un referente del cómo se ha desarrollado el conocimiento y la tecnología en este sentido. Para esta búsqueda se utilizaron principalmente los criterios del tipo de microorganismo, medio de cultivo, productividad y tipo de BP producido.

Crecimiento bacteriano en medios de cultivo de bajo costo

Para el crecimiento bacteriano en medios de cultivo que pudieran abaratar los costos de producción de BP, ha sido reportada metodología diversa, en donde generalmente se prepara un pre-inóculo, utilizando cultivos bacterianos frescos, empleando comúnmente medios de cultivo de laboratorio (Mohapatra et al., 2017). Posteriormente, para el crecimiento de los cultivos en medios de bajo costo, se utilizan residuos ricos en nutrientes (Tanamool et al., 2013; Rivas-Castillo et al., 2019) y se incuban a temperaturas con agitación (Berwig et al., 2016), encontrándose recurrentemente la utilización de 30°C y 150 rpm (Rodríguez-Contreras et al., 2013). Después de un periodo de incubación determinado, el cual varía entre 48 y 72 h (Mohapatra et al., 2016), se determina el crecimiento bacteriano.

Técnicas de extracción de PHA

Han sido aplicadas diferentes técnicas de extracción para obtener BP bacterianos, sin embargo, las más utilizadas son los métodos de hipoclorito de sodio-cloroformo (Angeles-Padilla, 2019), de etilen y propilen carbonato (González-García et al., 2013), el método de refluo por cloroformo (Ortega-Arias-Carbajal y Bell-García, 2014) y por baño ultrasónico (González-García et al., 2013). Dichas técnicas cumplen la función de la extracción del BP, en donde se destruyen las membranas biológicas y todos los componentes celulares, permitiendo la liberación del compuesto; para finalizar, la etapa de precipitación se realiza comúnmente utilizando metanol o etanol (González-García et al., 2013; Ortega-Arias-Carbajal y Bell-García, 2014).

Análisis y Resultados

Búsqueda bibliográfica y vigilancia tecnológica

Los resultados bibliográficos que se compilaron muestran que las investigaciones y desarrollos tecnológicos referentes a la producción de BP bacterianos han ido en aumento desde el año 2010 hasta el año 2021, pudiéndose observar la relevancia del PHB, ya que representa alrededor de un tercio de los trabajos publicados al respecto, como se puede observar en la Figura 1. En el caso de las patentes, se encontró que principalmente se patentan cassettes genéticos (Díaz-Fernández y Sanz-Mata, 2021), materiales basados en BP (Moradali y Rehm, 2020) y microorganismos productores de BP, modificados y no modificados (Wang et al., 2021). En lo que respecta a secuenciación genética, se refiere a vías importantes de las rutas metabólicas responsables de la producción de BP, donde hay un interés por aquellas que tienden a incrementar el rendimiento en la producción. Los materiales, por otra parte, van desde aquellos preparados con una combinación de BP, hasta aplicaciones muy particulares de estos BP obtenidos, como en el caso de películas aislantes. Finalmente, los microorganismos reportados y patentados son organismos modificados o no modificados que han demostrado a nivel de laboratorio ser capaces de aprovechar diferentes fuentes de nutrientes para una producción importante de BP, con potencial para ser extraídos y utilizados en la industria. Aun teniendo este nivel de producción bibliográfica y de desarrollo tecnológico, la producción de BP bacterianos no ha alcanzado el nivel de desarrollo suficiente para remplazar a los polímeros derivados del petróleo, por las causas ya mencionadas.

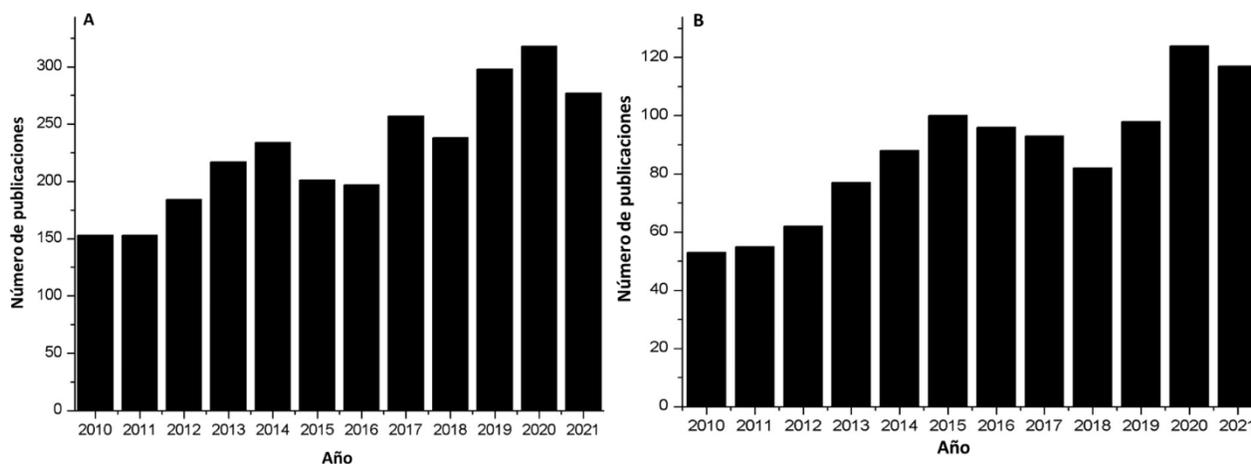


Figura 1. Productos de investigación y desarrollo tecnológico referentes a la producción de PHA (A) y específicamente de PHB (B) a partir del año 2010 hasta la fecha.

Utilización de residuos para sostener el crecimiento bacteriano durante la producción de PHA

Debido a la necesidad de desarrollar medios de cultivo de bajo costo que incrementen la factibilidad de la producción de PHA a escala industrial, se ha investigado la utilización de diferentes residuos para esta disminución de costos. Como se observa en la Tabla 1, existen investigaciones en donde se han utilizado diferentes residuos agroindustriales y orgánicos. Estos residuos van desde residuos de tipo biológico, cáscaras de fruta, lácteos, etc. En los estudios mencionados destacan los medios de cultivo a base de residuos agroindustriales, debido a que su uso permite el crecimiento bacteriano y se pueden obtener altos rendimientos de producción de PHA.

Determinación de los rendimientos de producción de PHA con diversas cepas bacterianas

Las cepas bacterianas son flexibles metabólicamente, adaptándose a condiciones de estrés y al consumo de diversos sustratos y, a partir de ellos, producir diversos tipos de PHA, como PHB, ácido polihidroxibutírico P(3HB) y polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato P(3HB-co-3HV) (Tabla 1); además, las enzimas hidrolíticas que poseen les confieren la ventaja del uso de sustratos baratos para su crecimiento y para la producción del PHA de alto valor (Naranjo et al., 2013), lo cual ha permitido la identificación de microorganismos altamente productores para un futuro escalamiento (Ángeles-Padilla, 2019). Además, ha sido estudiada la realización de procesos de optimización en la producción de BP bacteriano, al variar condiciones de crecimiento, como fuentes de carbono, nitrógeno y aireación (Kucera et al., 2018).

Microorganismo	Medio de cultivo	Rendimiento (g/L)	Tipo de PHA	Referencia
<i>Alcaligenes latus</i>	Sobrenadante de suero en polvo + aditivos	1.28	PHB	Berwig et al., 2016
<i>Bacillus cereus</i> PHA 008	Efluente de almazara de palma	1.91	P(3HB)	Sangkharak y Prasertsan, 2012
<i>Bacillus megaterium</i> BA-019	Melaza	4.16	PHB	Kulpreecha et al., 2009
<i>Bacillus cereus</i> M5	Extracto de levadura + Peptona	0.09	PHB	Yilmaz et al., 2005
<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22	Sacarosa, fructuosa y glucosa	1.74	PHA	Tanamool et al., 2013
<i>Bacillus licheniformis</i>	Glucosa	0.44	PHB	Rodríguez-Contreras et al., 2013
<i>Bacillus megaterium</i>	Sobrenadante de suero + aditivos	1.06	PHB	Obruca et al., 2011
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 6748	Melaza de caña de azúcar	1.3	PHB	Chaijamrus y Udpay, 2008
<i>Bacillus megaterium uyuni</i> S29	Glucosa	8.5	PHB	Rodríguez-Contreras et al., 2013
<i>Bacillus</i> SA	Jarabe de dátiles	65	PHA	Khiyami et al., 2011
<i>Bacillus</i> sp. AS 3-2	Extracto de levadura	1.44	2-metil-3-HB	Shah et al., 2012
<i>Bacillus subtilis</i> KP172548	Glucosa	3.08	PHA	Mohapatra et al., 2017
<i>Bacillus subtilis</i>	Residuos sólidos de pescado	3.09	PHB	Hungund et al., 2013
<i>Haloferax mediterranei</i>	Suero de queso	3.99	P (3HB-co-3HV)	Pais et al., 2016
<i>Halomonas halophila</i>	Suero hidrolizado + aditivos	3.68	PHB	Kucera et al., 2018
<i>Klebsiella pneumoniae</i> E22	Residuos de cáscaras de frutas	23.82	PHB	Valdez-Calderón et al., 2020
<i>Lysinibacillus</i> sp. 3HHX	Glucosa	4.00	PHB	Mohapatra et al., 2016
<i>Paenibacillusdurus</i> BV-1	Fructuosa	0.93	PHB	Hungund et al., 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Suero + aditivos	0.30	PHB	Singh y Mallick, 2009
<i>Pseudomonas hydrogenovora</i>	Permeado de suero hidrolizado + aditivos	0.24	3 (HB-co-HV)	Koller et al., 2008
<i>Bacillus megaterium</i> M14	Extracto de levadura + Peptona	0.522	PHB	Yilmaz et al., 2005
<i>E. coli</i> modificada	Glucosa	2.30	PHB	Wang et al., 2021

Tabla 1. Producción de PHA en medios de cultivo de bajo costo.

Resumen de resultados

Los resultados hasta la fecha en este campo de investigación demuestran el potencial de los PHA para la sustitución de los polímeros convencionales, y su estudio ha ido en aumento en los últimos 10 años, debido a la necesidad de buscar materiales que sean más amigables con el ambiente. Así mismo, los reportes muestran que las cepas *Bacillus* SA y *Klebsiella pneumoniae* E22 presentan una mayor capacidad de producción en medios de cultivo de bajo costo que la mayoría de las cepas bacterianas reportadas hasta el momento de concluir la escritura del presente documento. También, es importante mencionar que el método de extracción de hipoclorito de sodio y cloroformo ha resultado más favorable que otros métodos en cuestiones de eficiencia y costos (Angeles-Padilla, 2019), y estos métodos para la extracción y precipitación de PHA han sido y están siendo mejorados para lograr mayores rendimientos (González-García et al., 2013; Ortega-Arias-Carbajal y Bell-García, 2014; Rivas-Castillo et al., 2019).

Conclusiones

En la presente investigación, se han identificado miembros de los géneros *Bacillus* y *Klebsiella* con una alta capacidad de producción de BP. Los resultados obtenidos demuestran que es factible producir BP de interés industrial a partir de medios de cultivo de bajo costo, utilizando residuos agro-industriales, permitiendo así obtener altos rendimientos con un mayor potencial para ser escalados. Con la gran variedad de cepas bacterianas capaces de producir PHA, se vislumbra que mediante esta vía se pueden obtener diferentes tipos de BP, los cuales pueden encontrar aplicaciones en diversos sectores.

Limitaciones

Las investigaciones realizadas sobre la obtención de BP de fuentes bacterianas han ido en aumento en los últimos 10 años. Sin embargo, los rendimientos generados aún no pueden competir con la productividad derivada de los polímeros convencionales. Por ello, es necesario disminuir los costos de producción para poder escalar este tipo de procesos biotecnológicos a nivel industrial.

Recomendaciones

Aunque los hallazgos referentes a la producción de PHA a partir de diversas cepas bacterianas en medios de cultivo de bajo costo son prometedores, es importante continuar con los procesos de optimización que permitan establecer las condiciones adecuadas para llevar dichos procesos a mayor escala. Además, se visualiza la utilización de cepas modificadas genéticamente, que permitan exacerbar la producción y potencializar así su aplicación.

Referencias

- Ángeles Padilla, A.F. “Estudio de la generación de un biopolímero bacteriano utilizando residuos de naranja como medio de cultivo”, Tesina para obtener el grado de Técnico Superior Universitario, Universidad Tecnológica de la Zona Metropolitana del Valle de México, 2019.
- Berwig, H., C. Baldasso y A. Dettmer. “Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) generated by *Alcaligenes latus* using lactose and whey after acid protein precipitation process”, *Bioresource Technology*, Vol. 218, No. 1, 2016.
- Bello, D., M.A. Otero, G. Ortega y E. Carrera. “Estado del arte en la producción microbiológica de un medio de cultivo para la fermentación de *Bacillus*”, *ICIDCA, Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, Vol. 1, No. 1, 2009.
- Bocchini-Martins, D.A., H. Ferreira-Alves do Prado, R. Simões-Ribeiro-Leite, H. Ferreira, M.M. de Souza-Moretti, R. da Silva y E. Gomes. “Agroindustrial wastes as substrates for microbial enzymes production and source of sugar for bioethanol production”, in: *Integrated Waste Management*, Vol. II. Intech Open Book Series 18493.
- Chaijamrus S. y N. Udpuay. “Production and characterization of poly-hydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748”, *Agricultural Engineering International: the CIGR E-journal*, Vol. X, No. FP07030, 2008.
- Dash, S., S. Mohapatra, D.P. Samantaray y A.K. Sethi, “Production of poly-hydroxyalkanoates by sugar cane rhizospheric soil bacterial isolates”, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, Vol. 1, No. 1, 2017.
- Díaz-Fernández E., y D. Sanz-Mata. “Genetic cassette comprising the PHT pathway genes, recombinant host cells comprising it and their use in the degradation and valorization of phthalates”, Patent Application No. PCT/EP2021/055322, 2021.
- González-García, Y., J.C. Meza-Contreras, O. González-Reynoso y J.A. Córdova-López. “Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano”, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 29, No. 1, 2013.
- Hungund B., V.S. Shyama, P. Patwardhan y A.M. Saleh. “Production of poly-hydroxyalkanoate from *Paenibacillus durus* BV-1 isolated from oil mill soil”, *Journal of Microbiology and Biochemical Technology*, Vol. 1, No. 1, 2013.
- Khiyami M.A., S.M. Fadual, y A.H. Bahklia. “Polyhydroxyalkanoates production via *Bacillus* plastic composite support (PCS) biofilm and date palm syrup”, *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 1, No. 1, 2011.
- Kucera D., I. Pernicová, A. Kovalcik, M. Koller, L. Mullerova y P. Sedlacek. “Characterization of the promising halophilic bacteria *Halomonas halophila* producing poly (3-hydroxybutyrate)”, *Bioresources Technology*, Vol. 256, No. 1, 2018.
- Kulprecha S., A. Boonruangthavorn, B. Meksiriporn y N. Thongchul. “Inexpensive fed-batch cultivation for high poly (3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*”, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 1, No. 1, 2009.
- Koller M., R. Bona, E. Chiellini, E.G. Fernandes, P. Horvat y C. Kutschera. “Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*”, *Bioresources Technology*, Vol. 99, No. 1, 2008.
- Lara-Carmona, B.F. “Análisis del estado del arte y la vigilancia tecnológica de la utilización de extractos de plantas como biostimulantes”, Tesis para obtener el grado de Ingeniería en Tecnología Ambiental, Universidad Tecnológica de la Zona Metropolitana del Valle de México, 2020.
- Manna, V., P. Del Negro y M. Celussi. “Modulation of hydrolytic profiles of cell-bound and cell-free exoenzymes in Antarctic marine bacterial isolates”, *Advances in Oceanography and Limnology*, Vol. 10, No.1, 2019.
- Mohapatra S., D.P. Samantaray, S.M. Samantaray, B.B. Mishra, S. Das, S. Majumdar, S.K. Pradhan, S.N. Rath, C.C. Rath, J. Akthar y K.G. Achary. “Structural and thermal characterization of PHAs produced by *Lysinibacillus* sp. through submerged fermentation process”, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 93, No. 1, 2016.
- Mohapatra, S., B. Sarkar y P. Samantaray. “Bioconversion of fish solid waste into PHB using *Bacillus subtilis* based submerged fermentation process”, *Environmental Technology*, Vol. 38, No. 24, 2017.
- Moradali, M.F. y B.H.A. Rehm. “Bacterial biopolymers: from pathogenesis to advanced materials”, *Nature*, Vol. 18, No. 1, 2020.
- Naranjo, M., A. Posada y C. Higueta. “Valorization of glycerol through the production of biopolymers: The PHB case using *Bacillus megaterium*”, *Bioresource Technology*, Vol. 133, No. 1, 2013.
- Obruca S., I. Marova, S. Melusova y L. Mravcova. “Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037”, *Annals of Microbiology*, Vol. 61, No. 1, 2011.
- Ortega-Arias-Carbajal, G.M. y A. Bell-García. “Separación, purificación y caracterización de polihidroxibutirato”, *ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, Vol. 48, No. 1, 2014.
- Pais J., L. Serafim, F. Freitas y M. Reis. “Conversion of cheese whey to poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*”, *New Biotechnology*, Vol. 33, No. 1, 2016.
- Rivas-Castillo A.M. A. Valdez-Calderón y N.G. Rojas-Avelizapa. Medio de cultivo para promover la producción de biopolímeros. Solicitud de patente No. MX/2020/000934, 2019.

- Rodríguez-Contreras A.R., M. Koller, M.M. Sousa-Dias, M. Calafell-Monfort, G. Braunegg y M.S. Marqués-Calvo. "High production of poly (3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 114, No. 5, 2013.
- Sangkharak, K. y P. Prasertsan. "Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application", *The Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 1. No. 1, 2012.
- Shah K.R. "FTIR analysis of polyhydroxyalkanoates by novel *Bacillus* sp. AS 3-2 from soil of Kadi region, North Gujarat", *Journal of Biochemical Technology*, Vol. 1, No. 1, 2012.
- Singh A.K. y N. Mallick. "Exploitation of inexpensive substrates for production of a novel SCL-LCL-PHA co-polymer by *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7925", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 36, No. 1, 2009.
- Tanamool, V., T. Imai, P. Danvirutai y P. Kaewkannetra. "Biopolymer generation from sweet sorghum juice: screening, isolation, identification and fermentative polyhydroxyalkanoate production by *Bacillus aryabhatai*", *Turkish Journal of Biology*, Vol. 37, No. 1, 2013.
- Valappil, P., R. Boccaccini, y C. Bucke. "Polyhydroxyalkanoates in gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*", *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 91, No. 1, 2007.
- Valdez-Calderón, A., M. Barraza-Salas, M. Quezada-Cruz, M.A. Islas-Ponce, A.F. Angeles-Padilla, S. Carrillo-Ibarra, M. Rodríguez, N.G. Rojas-Avelizapa, A. Garrido-Hernández y A.M. Rivas-Castillo. "Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by a novel *Klebsiella pneumoniae* strain using low-cost media from fruit peel residues", *Biomass Conversion and Biorefinery*, Vol. 1, No. 1, 2020.
- Wang, X., J. Wang, W. Ma y Y. Li. "Escherichia coli lipopolysaccharide simplified engineering bacteria and application thereof for high yield of PHB", *Solicitud de Patente No. PCT/CN2019/109099*, 2021.
- Yilmaz H., H. Soran, y Y. Beyatli. "Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp.", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 1, No. 1, 2005.