CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S. C.

Programa de Estudios de Posgrado

Producción de poli-hidroxialcanoatos por bacterias del género *Bacillus* de origen marino

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

María Getzabeth González Gutiérrez

La Paz, Baja California Sur, Diciembre de 2008

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las **14:00** horas del día **4** del Mes de **Diciembre del 2008**, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

Producción de poli-hidroxialacanoatos por bacterias del género *Bacillus* de origen marino

Presentada por el alumno:

María Getzabeth González Gutiérrez

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Alejandro López-Cortés
Director de Tesis

Dr. Humberto Mejía-Ruíz
Co- Tutor

Ricardo Vázquez Juarez

Dr. Ricardo Vázquez-Juárez
Co-Tutor

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité Tutoral y Comité Revisor de Tesis

Director de Tesis

Dr. Alejandro López Cortés
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Co- Tutores

Dr. Humberto Mejía Ruíz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Jurado de Examen de Grado

Director de Tesis
Dr. Alejandro López Cortés
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Co-Tutores
Dr. Humberto Mejía Ruíz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

Suplente

Dr. Norma Hernández Saavedra
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

RESUMEN

Los poli-hidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros de origen lipídico sintetizados por diversos grupos bacterianos como una estrategia de supervivencia ante situaciones de estrés. Los PHAs presentan características fisico-químicas que los colocan como una alternativa para sustituir a los polímeros de origen petroquímico. Dado su origen biológico, los PHAs poseen la capacidad de biodegradarse y su proceso de producción es totalmente compatible con el ciclo del carbono. En este estudio evaluamos la producción de PHAs en 3 cepas bajo diferentes condiciones de cultivo. El empleo de NH_4Cl (0.1 y 0.5 g/L) como fuente de nitrógeno mostró un efecto negativo sobre el crecimiento y producción de PHAs en las cepas C18 y E13, las cuales mostraron no necesitar de condiciones limitadas para producir PHAs. Por otro lado la cepa C19 mostró tolerancia a diferentes concentraciones de NH_4Cl y su crecimiento no se vio afectado, mientras que la producción de PHAs alcanzó porcentajes de producción del 62% con respecto al peso seco utilizando glucosa como fuente de carbono. Con base a la secuenciación del 16S ADNr se pudo establecer que las tres cepas corresponden al género *Bacillus*. En el caso de las cepas C18 y E13 poseen un 100% de similitud para *B. cereus y B. thuringiensis*, mientras que la cepa C19 mostró similitud de un 100% con cepas de *B. megaterium* y *B. flexus*. Para las 3 cepas se realizó la secuenciación parcial del gen *phaC* quien codifica para la enzima encargada de la polimerización de PHAs, denominada pha sintasa. Los resultados mostraron que las secuencias obtenidas para las cepas C18 y E13 poseen un 98% de similitud y para la C19 un 95% de similitud con secuencias reportadas para otras cepas pertenecientes al género *Bacillus*.

Palabras clave: *Bacillus, phaC,* PHAs

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHA)are natural, biodegradable polyesters. PHAs are produced and stored intracellularly in high concentrations as reserve materials for carbon and energy by a wide range of bacteria under imbalanced nutritional conditions. PHAs exhibit some physico-chemical features that are considered as a replacement for conventional plastics of petrochemical origin; they are biodegradable and biocomplatible. Tree strains were grown under nitrogen limiting culture conditions. NH_4Cl has a negative effect under growth and PHA production yield in strains C18 and E13. These strains showed that did PHA production without requiring a nutrient limitation. In strain C19, NH_4Cl was found to be more suitable for the PHA accumulation. Bacterial strains were identified and classified under the *Bacillus* group based on 16S DNAr gene sequences. Strain C19 had 100% homology with *B. megaterium* and *B. flexus* strains and strains C18 y E14 has 100% homology with *B. cereus* and *B. thuringiensis.* Sequence analysis of *phaC* gen showed that they are quite similar to other known *Bacillus* sequence.

A mis queridos padres Emma y Nicolás, por todo su amor, cariño, comprensión y apoyo

A toda mi hermosa familia que siempre está conmigo. A Adán por estar a mi lado en cada momento……. En ustedes esta la fortaleza de todo lo que hago y lo que soy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Comité Tutoral por su disponibilidad, paciencia y contribuciones.

Al Dr. Alejandro Lopéz-Cortés por compartirme sus conocimientos y experiencias acerca del maravilloso mundo de la Microbiología.

A CONACYT por la beca número 206611 otorgada para estudios de Maestría, así como a CIBNOR por las facilidades prestadas para la realización de esta Tesis.

Esta investigación fue realizada en el Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular del CIBNOR. Financiada por los proyectos: PC4.2 “Diversidad Microbiana” y por el proyecto SEP-CONACYT 45914/A-1 “Diversidad Microbiana: Fuente de innovación en biotecnología”.

Agradezco al Dr. Humberto Mejía por el diseño de los primers empleados para la secuenciación del *phaC*, así como al Biol. Mar. Hever Latisner Barragán por cederme su valioso tiempo y asesoría técnica.

Al personal de posgrado por su amabilidad y ayuda en la realización de trámites, así como al personal de la Biblioteca por su cálido trato.

A Angel Carillo y a todos mis compañeros de Lab: Quina, Yossef, Mario y Pau, sin ustedes hubiera esta súper cañón…..

A los laboratorios de Microbiología Ambiental y Fisiología Comparada por las facilidades prestadas.

A mis padres y a toda mi familia por su apoyo, psicológico, económico, y emocional en estos años y siempre.

A Adán por ser mi roomie, mi amigo, mi colega, compañero de parranda, mi amorcito, mi terapeuta….. y por todas las cosas maravillosas que representas en mi vida.

A todas las Morris: Angie, Arete, Nadia, Pau, Rosy, Tanisha, Vero, Yareli, Yssel, a mis amigos Sergio, Rodolfo, Jorge y Octavio por su buena vibra, experiencias compartidas, ayuda en momentos difíciles y por todos los buenos momentos Pacifico.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS ……..…… 1

LISTA DE TABLAS …… 2

LISTA DE ABREVIATURAS ……. 3

1. INTRODUCCIÓN…….. 4
1.1.Clasificación y Estructura de PHAs……... **5**
1.2. Propiedades físicas y características de los PHAs …… **6**
1.3. Síntesis y Regulación de la producción de PHAs…… **8**

2. ANTECEDENTES
2.1. Principales microorganismos estudiados para la producción a gran escala de PHAs……..... **13**
2.1.1. Síntesis de PHAs en Ralstonia eutropha……. **14**
2.1.2. Síntesis de PHAs por bacterias del género Psuedomonas ……. **15**
2.1.3. Producción de PHAs por cepas recombinantes de E. coli …… **15**
2.2. Producción de PHAs por cepas de Bacillus …….. **16**
2.3. Estudio de bacterias de origen marino productoras de PHAs …….. **17**

3. JUSTIFICACIÓN …… 19

4. HIPÓTESIS …….. 20

5. OBJETIVOS……. 20

6. MATERIALES Y MÉTODOS
6.1. Reactivación y criopreservación de las cepas …… **21**
6.2. Valoración fisiológica de la producción de PHA…….. **21**
6.2.1. Extracción de PHAs ……..... **23**
6.2.1.1. Extracción por solventes **23**
6.2.1.2. Extracción química por digestión …… **24**
6.3. Cuantificación de PHAs …… **24**
6.4. Evaluación de la producción de PHAs bajo diferentes fuentes de carbono …... **25**
6.5. Análisis Moleculares …….. **26**
6.51. Extracción y cuantificación de ADN…… **26**
6.5.2. Amplificación del 16S ADNr…… **27**
6.5.3. Amplificación del gen phaC …… **27**
6.5.4. Análisis bioinformático …… **28**

7. RESULTADOS
7.1. Valoración fisiológica de la producción de PHA……. **29**
7.1.2. Evaluación preliminar del efecto de la concentración de nitrógeno sobre el crecimiento y la detección microscópica de PHAs …… **29**
7.1.2. Extracción de PHAs ……..…….. **31**
7.1.3. Evaluación de la producción de PHAs bajo diferentes fuentes de carbono… **33**
7.2. Análisis moleculares ……. **44**
7.2.1. Amplificación del 16S ADNr ….…… **44**
7.2.2. *Amplificación parcial del gen phaC* ……. **46**
8. DISCUSIÓN
8.1. Evaluación preliminar del efecto de la concentración de nitrógeno sobre el crecimiento…… **49**
8.1.1. Métodos de extracción de PHAs……...…… **51**
8.1.2. Evaluación de la producción de PHAs bajo diferentes fuentes de Carbono..... **52**
8.1.3. Efecto en la producción de PHA……. **52**
8.2. Análisis moleculares…… **56**
8.2.1. Amplificación del 16S ADNr ……... **56**
8.2.2.Amplificación parcial del gen phaC ……. **57**

9. CONCLUSIONES……. **60**

10. PERSPECTIVAS …… **61**

11. REFERENCIAS……. **62**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los principales tipos de PHAs……...6

Figura 2. Evolución del número de publicaciones y patentes relacionadas con la producción de PHAs en los últimos 25 años…….….12

Figura 3. Valores obtenidos de cuenta viable de unidades formadoras de colonias de la cepa C19 cultivada durante 24 h en medio MBMG utilizando tres diferentes concentraciones de nitrógeno (NH_4Cl)……. .28

Figura 4. Análisis microscópico realizado para la detección de PHAs. A), B), C) y D) tinciones con Negro Sudán de células de cepa C19 cultivadas en medio MBMG con concentraciones de 0.1, 0.5 y 1g/L de NH_4Cl. IV-VI imágenes de microscopia de contraste de fases de la Cepa E13 cultivada en medio MBMG.

Figura 5. Valores obtenidos de la extracción de PHA realizada por dos diferentes métodos de extracción utilizando cultivos de la cepa C19 a 24 h de crecimiento bajo diferentes condiciones de crecimiento ……..……. 31

Figura 6. Cinéticas de crecimiento de las cepas C18 (I) y C19(II) bajo diferentes tratamientos de fuente de carbono, incubadas durante 48h a 32°C y agitación a 115 rpm……..…… 32

Figura 7. Cinéticas de crecimiento de las cepas C18 (A) y C19(B) bajo diferentes tratamientos de fuente de carbono, incubadas durante 48h a 32°C y agitación a 115 rpm…….. 33

Figura 8. Cinéticas de crecimiento de la cepa E13 bajo diferentes tratamientos de fuente de carbono, incubadas durante 48h a 32°C y agitación a 115 rpm …….. 3

Figura 9. Datos obtenidos de la cepa C18 sometida a 3 diferentes tratamientos a 24 h de crecimiento. ……. 36

Figura 10. Valores registrados para la cepa C18 sometida a 3 diferentes tratamientos a 48 h de crecimiento. ……. 37

Figura 11. Valores registrados para la cepa C19 sometida a 3 diferentes tratamientos a 24 h de incubación. …… 38

Figura 12. Datos obtenidos para la cepa C19 sometida a 3 diferentes tratamientos a 48 h de crecimiento. ……. 39

Figura 13. Valores obtenidos para la cepa E13 sometida a 3 diferentes tratamientos a 24 h de crecimiento. …… 40

Figura 14. Datos registrados para la cepa E13 sometida a 3 diferentes tratamientos 48 h de crecimiento. …….. 42

Figura 15. Valores registrados para densidad óptica y PHA producido por la cepa C19 durante 72 h de incubación con el tratamiento MBMS. Las barras corresponden al error estándar…….. 43

Figura 16. Valores registrados para densidad óptica y PHA producido por la cepa C19 durante 72 h de incubación con el tratamiento MBMG. Las barras corresponden al error estándar……... 43

Figura 17. Gel de agarosa al al 0.8% de los productos de PCR obtenidos de la amplificación del 16S ADNr. 1) Marcador de Peso Molecular VIII (Roche). 2) Cepa C18 3) Cepa C19 4) Cepa E13 4) Control negativo (ADN de abulón) 6) Control positivo (*Ralstonia* sp.)…..…..44

Figura 18. Gel de agarosa al al 0.8% de los productos de PCR obtenidos de la amplificación del 16S ADNr. …….. 46

Figura 19. Árbol filogenético de secuencias de 16S ribosomal de las cepas estudiadas (negritas), derivado de un análisis por el método de distancias Neighbor-Joing (NJ) con un análisis bootstrap de 700 replicas. …… 47

Figura 20. Árbol filogenético correspondiente a secuencias del gen *phaC* derivado de un análisis por el método de distancias Neighbor-Joing (NJ) utilizando un análisis bootstrap de 700 replicas. CLC Sequence Viewer 5.1. ……. 48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las propiedades físicas de PHAs y polipropileno…….7

Tabla 2. Estructura de los operones involucrados en la síntesis de PHAs…… 9

Tabla 3. Géneros microbianos productores de PHAs…….....13

Tabla 4. Formulación de los medios de cultivo utilizado para este experimento…….. 21

Tabla 5. Valores obtenidos de los parámetros celulares obtenidos para cada tratamiento. K= tasa de crecimiento, Tg=tiempo de generación (ND) no detectado……... 34

Tabla 6 Tabla 6. Porcentajes de producción total y biomasa obtenido a las 48 horas de crecimiento por las tres cepas bajo los diferentes tratamientos. ND= no detectado……. 41

Tabla 7. Números de acceso del Genbank de las secuencias del 16S ADNr de las cepas estudiadas y porcentajes de similitud de los organismos más cercanos……. 45

Tabla 8. Valores de identidad obtenidos del análisis BLAST y número de acceso de las secuencias parciales del gen *phaC* obtenidas en este estudio …… 47

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN-Ácido Desoxiribonucleico

PHA-Poli-hidroxialcanoatos

PHB-Poli-hidroxi-butirato

PCR-Polimerase chain reaccioin (Reacción en cadena de polimerasa)

MBMG-Medio Mineral Marino con Glucosa

MBMG-Medio Mineral Marino con Sacarosa

PYM-Peptona Yeast Marine

UFC-Unidades formadoras de colonias

1. INTRODUCCIÓN

El aumento de la población humana ha tenido como consecuencia una gran acumulación de materiales de desecho. A nivel mundial, más del 30% de los desechos sólidos producidos corresponden a plásticos de origen petroquímico que generan toxinas en su proceso de descomposición y actúan como contaminantes xenobióticos y recalcitrantes ocasionando severos daños al ambiente (Kim *et al.,* 2007; Suriyamongkol *et al.,* 2007).

La fabricación de plásticos está basada en la utilización de un recurso finito y ante este panorama surge la necesidad de buscar nuevas tecnologías que sean ambientalmente amigables (Prieto, 2007), siendo los poli-hidroxialcanoatos (PHAs) una alternativa viable para la sustitución de plásticos de origen petroquímico, debido a su biodegradabilidad, propiedades termoplásticas y biocompatibilidad (Gross y Kalra, 2002; Gavrilescua y Chisti, 2005).

Los PHAs son una clase de poliésteres alifáticos que pueden ser producidos por plantas o microorganismos. En plantas se ha reportado que los niveles de producción se encuentran por debajo del 10% de su peso seco y altos niveles de producción de PHAs (10-40%) pueden tener efectos negativos en su crecimiento y desarrollo. En contraste, algunos grupos bacterianos pueden llegar a acumular hasta el 90% del total de su biomasa (Verlinden *et al.,* 2007).

Diversos géneros bacterianos son capaces de sintetizar PHAs como una vía natural para el almacenamiento de energía y de carbono (Anderson and Dawes, 1990). Estos polímeros son acumulados en forma de gránulos intracelulares cuando las bacterias se encuentran un medio limitado de nitrógeno, fósforo y oxígeno aunado a un exceso en la fuente de carbono.

El proceso de síntesis y acumulación es utilizado por las bacterias como una estrategia para incrementar su supervivencia y su resistencia al estrés ambiental (Kadouri *et al.,* 2005), además de intervenir en la formación de biopelículas (Pham *et al.,* 2004), servir como fuente de carbono y energía en el proceso de esporulación en bacterias del género *Bacillus* (Slock y Sthaly, 1974).

1.1 Clasificación y Estructura de PHAs

Existen diferentes tipos de PHAs que pueden ser clasificados en base al número de átomos de carbonos que constituyen los monómeros que los componen, así como al tipo de molécula presente en su grupo radical. En el primer grupo se encuentran PHAs de cadena corta (ssc-PHAs) compuestos por 3 a 5 átomos de carbono en sus unidades monoméricas, y en el segundo grupo los PHAs de cadena media (msc PHAs) formados por unidades monoméricas de 6 a 14 carbonos (Reddy *et al.,* 2003). El tamaño y composición de las cadenas da como resultado una amplia gama de polímeros con propiedades específicas para cada tipo (Tsuge, 2002).

Su estructura consiste en una cadena de 3-hidroxi ácidos grasos (Figura 1), en la cual, el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero vecino (Kim y Lenz, 2001). La diversidad en la composición de estos polímeros es muy amplia y a la fecha se han identificado más de 150 monómeros (Pötter y Steinbüchel, 2006), siendo el PHB (poli3-hidroxibutirato) el polímero que más ha sido estudiado.

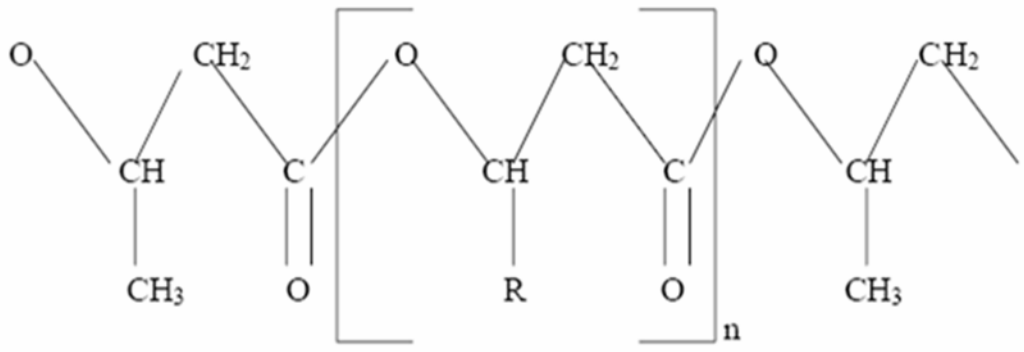

Figura 1. Estructura química de los principales tipos de PHAs (Lee, 1995)

1.2 Propiedades físicas y características de los PHAs

La estructura química de los PHAs les confiere propiedades físicas similares a los plásticos convencionales como el polipropileno (Tsz-Chun *et al.,* 2005); en la Tabla 1 se comparan algunas de las características presentes en los PHAs. Propiedades como son temperatura de transición, temperatura de fusión, cristalinidad y flexibilidad han sido bien estudiadas en polihridoxibutiratos (Pandermshoke *et al.,* 2005). Se ha reportado que los PHAs poseen varios picos en su temperatura de fusión y un comportamiento variado en los procesos de fusión-solidificación que permiten su fácil manipulación (Gunaratne y Shanks, 2005). Cabe destacar la importancia del estudio de las características físicas de los PHAs, debido a que afectan directamente los procesos de producción y degradación de estos polímeros (Carrasco *et al.,* 2006).

Tabla 1. Comparación de las propiedades físicas de PHAs y polipropileno (Tsuge, 2002)

Propiedad	PHB	PHBV	PHB4B	PHBHx	PP
Temperatura de fusión	177	145	150	127	176
Temperatura de transición	2	-1	-7	-1	-10
Cristalinidad (%)	60	56	45	34	50-70
Tensión (MPa)	43	20	26	21	38
Elastibilidad (%)	5	50	444	400	400

Temperaturas en C°. PHB (poli3-hidroxibutirato), PHBV (poli 3-hidroxibutirato-co-·-hidroxivalerato), PHB4B (poli3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato), PHBHx (poli3-hidroxihexanoato), PP (polipropileno).

Una de las cualidades más importantes de los PHAs es su capacidad de biodegradación (Bhatt *et al*., 2008). En la naturaleza existen microorganismos que son capaces de degradar enzimáticamente PHAs de forma extracelular e intracelular utilizando hidrolasas y PHA depolimerasas (Jendrossek y Handrick, 2002). Se ha reportado que los tiempos estándares de degradación de una pieza fabricada a partir de PHB varían desde un par de meses en suelos con temperatura constante (Mergaert *et al.,* 1993), hasta un par de años en ambientes marinos (Madison y Huisman, 1999).

Los procesos de degradación varían dependiendo de la composición del polímero y de las condiciones ambientales. Choi *et al.* (2004) sugieren que la degradación de ciertos PHAs de tipo poli(3HB-co3HV) producidos *Alcaligenes* sp. MT-16, es influida fuertemente por su cristalinidad. Asimismo, se ha reportado que los tiempos de degradación pueden ser acelerados bajo condiciones anaerobias y con la exposición a radiación UV (Shangguan *et al.,* 2006).

Dentro de las características más importantes de los PHAs se encuentra la naturaleza sustentable de su proceso de producción (Gross y Kalra, 2002). La producción de PHAs está basada en recursos renovables; la materia prima utilizada como fuente de carbono y energía

son azúcares y ácidos grasos que pueden ser obtenidos de desperdicios agro-industriales (Yu, 2001; Tsuge, 2002). La síntesis y degradación de PHAs es totalmente compatible con el ciclo de carbono: su degradación libera solo agua y dióxido de carbono (Gavrilescu y Chisti, 2005).

1.3 Síntesis y Regulación de la producción de PHAs

Los PHAs son sintetizados a partir de ácidos grasos ó de otras fuentes alifáticas de carbono, y la composición de poliéster producido depende del sustrato y de la cepa utilizada (Madison y Huisman, 1999). En general, la producción de PHAs en bacterias se encuentra ligada a tres rutas metabólicas: (1) ruta de síntesis de ácidos grasos, la cual produce precursores de (R)-hidroxiacil-CoA provenientes de fuentes de carbono como glucosa y gluconato; (2) la degradación de ácidos grasos vía β-oxidación; (3) la cadena de elongación, en la cual el acil-CoA es alargada por la acetil-CoA (Rhem, 2006).

La capacidad de síntesis de PHAs se encuentra genotípicamente determinada y no es realizada de manera permanente en los microorganismos, se encuentra regulada en respuesta a una condición sub óptima para el crecimiento y reproducción, además de estar conectada con otros procesos metabólicos de la célula (Babel *et al.,* 2001). Este proceso de síntesis es regulado a nivel transcripcional y enzimático y puede variar entre organismos (Aldor y Keasling, 2003). En general, la síntesis de PHAs consiste en tres pasos principales: en el primer paso la enzima β-cetiolasa PHA específica, codificada por el gen *phaA*, cataliza la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. En el segundo paso, la molécula de acetoacetil-CoA es reducida vía acetoacetil-CoA reductasa, codificada por el gen *phaB*, para producir β-hidroxiacil-CoA. Finalmente, la molécula de β-hidroxiacil-

CoA es polimerizada por la enzima PHA sintasa, la cual es codificada por el gen *phaC* (Kessler y Witholt, 2001; Potter y Steinbüchel, 2006).

Los genes involucrados en la síntesis de PHAs y aquellos relacionados con el metabolismo de PHAs (ensamble y degradación) se encuentran organizados en operones dentro del genoma bacteriano (Rehm y Steinbüchel, 1999). La estructura y organización de estos operones (Tabla 2) varía dependiendo del microorganismo (Steinbüchel y Hein, 2001).

Tabla 2. Estructura de los operones involucrados en la síntesis de PHAs

Clase	Estructura general del operon	Especies representativas
I	*phaC* → *phaA* → *phaB*	*Ralstonia eutropha* *Sinorhizobium melioti* *Burkholderia* sp.
II	*phaC1* → *phaZ* → *phaC2*	*Pseudomonas aeruginosa* *P. putida*
III	← *phaC* ← *phaE* → *phaA*	*Allochromatium vinosum* *Thiocapsa pfennigii* *Synechocystis* sp.
IV	*phaR* → *phaB* → *phaC*	*Bacillus megaterium* *Bacillus* sp. cepa INT005

De todas las moléculas involucradas en este proceso, las PHA sintasas y los genes involucrados en su codificación son piezas clave en el proceso de síntesis de PHAs, ya que son estas enzimas las encargadas de catalizar la unión de los monómeros para la formación de polímeros y determinar la composición y características físico-químicas del PHA sintetizado (Rhem y Steinbüchel, 1999). Actualmente, se han identificado 4 clases de PHA

sintasas que pueden ser diferenciadas con respecto a su especificidad en el sustrato y su composición bioquímica (Rhem, 2006).

Sin embargo, aunque algunos aspectos de la producción de PHAs han sido estudiados, el conocimiento de los mecanismos de regulación a nivel molecular solo se centra en algunos géneros bacterianos y aún es limitado. Es por ello, que el entendimiento total de estos mecanismos y su relación con los procesos metabólicos involucrados brinda estrategias para la optimización de la producción de PHAs (Galindo *et al.,* 2007).

No obstante las propiedades descritas y los beneficios ambientales que brindan la producción de PHAs, los altos costos de producción han frenado una expansión global en el mercado (Luengo *et al.,* 2003). Actualmente, las investigaciones relacionadas con el estudio de PHAs se encuentran dirigidas hacia la búsqueda de sustratos alternativos, nuevos métodos de extracción, modificación genética de microorganismos y el empleo de cultivos mixtos con la finalidad de hacer más eficiente el proceso de producción y abaratar los costos de producción de los PHAs (Verlinden *et a*l.,2007).

2. ANTECEDENTES

La producción de PHAs fue descrita por primera vez en 1926 por Lemoigne, quien aisló y caracterizó químicamente 3-hidroxibutirato a partir de observaciones por microscopía de inclusiones citoplasmáticas en *Bacillus megaterium*. En años posteriores a su descubrimiento, las investigaciones relacionadas con la producción de PHAs estuvieron dirigidas a conocer su importancia metabólica en los microorganismos y su papel en mecanismos celulares tales como la esporulación y su función como fuente de energía (Slock y Stahly, 1974; Nakata 1966; Kominek y Halvorson, 1965).

No fue hasta finales de la década de los 70s cuando comenzaron a estudiarse las enzimas involucradas en la producción de PHAs, así como sus características y composición química con potencial para uso en biotecnología (Oeding y Schlegel, 1973; Senior y Dawes, 1973). En el año de 1979 Shlegel y colaboradores entregaron varias de cepas de *Alcaligenes eutrophus* a ICI (Imperial Chemical Industries) con la finalidad de crear un programa de investigación enfocado al desarrollo de nuevos polímeros basados en procesos de fermentación. Finalmente en el año de 1982 ICI lanzó al mercado un nuevo tipo de termoplástico llamado BIOPOL™ compuesto principalmente de PHB, el cual podía ser utilizado en diversos productos tales como plásticos, películas y fibras (Anderson y Dawes, 1999; Lenz y Marchessault, 2004)

A partir de estos sucesos, el número de investigaciones dirigidas a aislar nuevos microorganismos productores de PHAs, así como a elucidar los procesos involucrados en su producción de PHAs ha aumentado (Braunegg et al. 2004; Khanna and Srivastava 2005; Verlinden *et al.,* 2007). Jaquel *et al.,* (2008) mencionan que en los últimos 25 años se ha

registrado un incremento en el número de patentes registradas, así como un aumento en el número de publicaciones relacionadas con la producción de PHAS (Fig. 2).

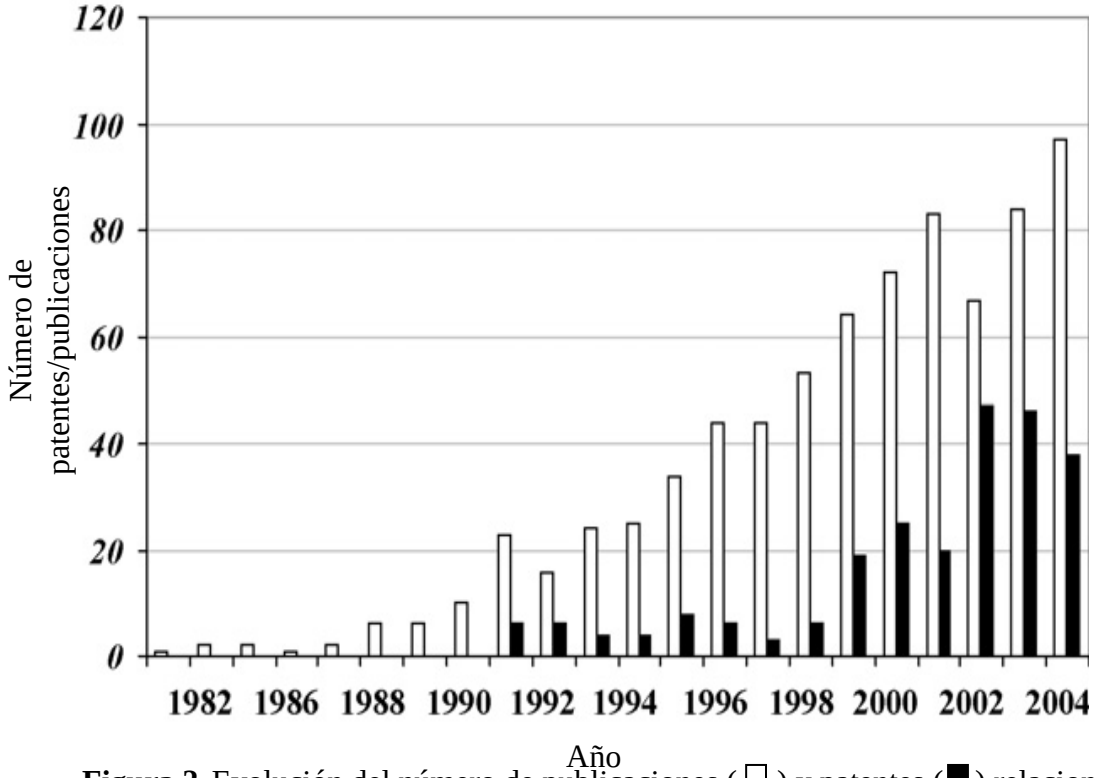

Figura 2. Evolución del número de publicaciones (□) y patentes (■) relacionadas con la producción de PHAs en los últimos 25 años. (Jaquel *et al.,* 2008)

A la fecha, se han identificado diversos géneros bacterianos con capacidad de producir PHAs (Tabla 3); aunque muchos de ellos han sido identificados como productores de PHAs, en la mayoría de los casos no existen datos de crecimiento, rendimientos y tipo de polímero producido (Lee, 1996)

Si bien la producción de PHAs fue descubierta por primera vez en *B. megaterium*, el organismo que ha sido utilizado como modelo de estudio en la producción de PHAs ha sido *Ralstonia eutropha* (conocida también como *Cupriavidus necator, Wautersia eutropha* ó *Alcaligenes eutrophus*), la cual ha sido la mejor caracterizada en los procesos involucrados en la síntesis de PHAs (Trotsenko y Belova, 2000).

Tabla 3. Géneros microbianos productores de polihidroxialcanoatos (Braunegg, 2004)

Acinetobacter	*Ectothiorhodospira*	*Paracoccus*
Actinomyces	*Escherichia*	*Pedomicrobium*
Aphanothece	*Ferrobacillus*	*Photobacterium*
Aquaspirillum	*Gamphospheria*	*Pseudomonas*
Asticcaulus	*Haemophilus*	*Ralstonia*
Azomonas	*Halobacterium*	*Rhizobium*
Azospirillum	*Hyphomicrobium*	*Rhodobacter*
Azotobacter	*Lampropedia*	*Rhodococcus*
Bacillus	*Leptothrix*	*Sphaerotilus*
Beggiatoa	*Methanomonas*	*Spirillum*
Beijerinckia	*Methylobacterium*	*Spirulina*
Beneckea	*Methylocystis*	*Stella*
Caryophanon	*Methylomonas*	*Stremtomyces*
Caulobacter	*Methylovibrio*	*Syntrophomonas*
Chloroflexus	*Micrococcus*	*Thiobacillus*
Chlorogloea	*Microcoleus*	*Thiocystis*
Chromatium	*Microcystis*	*Thiodictyon*
Chromobacterium	*Moraxella*	*Thiopedia*
Clostridium	*Mycoplana*	*Thioespedia*
Corynebacterium	*Nitrobacter*	*Vibrio*
Derxia	*Nitrococcus*	*Xanthobacter*
	Oceanospirillum	*Zoogloea*

2.1. Principales microorganismos estudiados para la producción a gran escala de PHAs

La selección de un microorganismo para la producción de PHAs se encuentra basada en varios factores que incluyen la capacidad de la célula para utilizar diversos sustratos, tasa de crecimiento, tasa de producción del polímero y el límite máximo de acumulación del polímero (Yamane, 1993).

Las bacterias utilizadas para la producción de PHAs pueden ser divididas en dos grupos basados en las condiciones de cultivo que requieren para la síntesis de PHAs. En el primer grupo de bacterias se encuentran aquellas que requieren condiciones limitadas en algún nutrimento esencial como nitrógeno, fosforo, magnesio ó azufre para la síntesis de PHAs. Las bacterias incluidas en este grupo son *R. eutropha, Protomonas extorquens* y *Protomonas*

oleovorans. En el segundo grupo, las bacterias no requieren una limitación en los nutrimentos para la producción de PHAs y pueden acumular el polímero durante su crecimiento; dentro de este grupo se pueden mencionar *A. latus*, cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii* y *E. coli* recombinante (Braunegg *et al., 1998;* Khanna y Srivastava, 2005).

2.1.1. Síntesis de PHAs en Ralstonia eutropha

Actualmente, cepas de *R. eutropha* son las más utilizadas para los procesos de producción a gran escala dada su capacidad de acumular grandes cantidades de PHB (Steiunbüchel, 2001). *R. eutropha* cepa H16 es capaz de producir PHB en un 80% con respecto a su peso seco utilizando fuentes simples de carbono como glucosa, fructosa y ácido acético; además su producción se ve incrementada a un 87% cuando es sometida a estrés por concentraciones bajas de nitrógeno (Wang y Lee, 1997). Sin embargo *R. eutropha* no puede metabolizar fácilmente molasas y carbohidratos complejos; por lo que el empleo de estos sustratos (que resultan muy económicos) implica un tratamiento previo que genera un alza en los costos de producción (González–García *et al.,* 2008).

Además, *R. eutropha* no sintetiza de manera natural co-polímeros como el polihidroxivalerato (P(3HB-3HV)) cuyas características físicas brindan mejores propiedades en comparación con polímeros compuestos solo de PHB (Madisson y Huismann). La producción de este tipo de co-polímeros en *R. eutropha* se ha implementado mediante la incorporación de sustratos precursores que puedan unirse a las cadenas sintetizadas; sin embargo el uso de precursores resulta altamente costoso para la producción a escala industrial y los rendimientos en la producción disminuyen (Aldor, 2003).

2.1.2. Síntesis de PHAs por bacterias del género Psuedomonas

Algunas especies bacterianas pertenecientes al género *Pseudomonas* presentan la particularidad de producir PHAs de cadena larga formando co-polímeros utilizando ácidos grasos como fuente de carbono. Esta característica resulta muy ventajosa ya que se pueden utilizar sustratos muy baratos, como son el cebo y otros productos de desecho de origen lipídico (Cromwick *et al.,* 1996). Sin embargo, los rendimientos en la producción de PHAs son muy bajos en comparación con otras especies. Ashby y Foglia (1998) reportan la síntesis de PHAs por *P. resinovorans* a partir de grasas animales y vegetales, resultando en una producción neta del 45% del peso seco total. Por otro lado, se ha logrado incrementar la productividad de PHAs en varias especies de *Pseudomonas* vía incorporación de fuentes de amonio y magnesio en diferentes etapas de la producción, no obstante esta alternativa resulta operacionalmente poco viable (Patnaik, 2005).

2.1.3. *Producción de PHAs por cepas recombinantes de E. coli*

E. coli es un organismo modelo que ha sido bien caracterizado genética y bioquímicamente lo que facilita su manipulación (Li *et al.,* 2007). Gracias al desarrollo de la ingeniería genética ha sido posible generar cepas *E. coli* con capacidad de producir PHAs. Recientemente, los tres genes de *R. eutropha* involucrados en la síntesis de PHAs han sido caracterizados y clonados en *E. coli* obteniendo hasta un 80% del peso seco total de rendimiento en la producción de PHB bajo diversas condiciones de cultivo y de estrés (Choi, 1998; Shi *et al.,* 2001; Kyuwa *et al.,* 2001; Law *et al.,* 2004).

Además de la incorporación de genes de *R. eutropha* en *E. coli,* también se han desarrollo cepas recombinantes con material genético proveniente de varias especies de *Pseudomonas* (Conte *et al., 2006;* Olivera *et al.,* 2001).

Es importante destacar que la construcción de cepas recombinantes de *E. coli* no solo incluye la transferencia de los genes involucrados en la síntesis de PHA, también debemos considerar que esta cepa posee un metabolismo propio que es regulado por otros mecanismos. Un ejemplo de esto es la producción de ciertos metabolitos de *E. coli* que actúan como inhibidores en la síntesis de PHA, lo que afecta directamente en los rendimientos en la producción (Patnaik, 2005). Otra desventaja de utilizar cepas recombinantes de *E. coli* es la poca estabilidad que posee el plásmido que transfiere la información genética; muchas veces el plásmido se pierde y los cultivos con estas cepas no pueden ser viables durante mucho tiempo (Khana y Srivastava, 2005).

2.2. *Producción de PHAs por cepas de Bacillus*

El estudio de la producción de PHA por bacterias del género *Bacillus* aún no ha sido explotado en su totalidad; solo algunos aspectos de su producción han sido estudiados para *B. megaterium* (Omar *et al.,* 2001), algunas cepas de *B. cereus* (Labuzek an Radecka, 2001) y para *B. mycoides* (Borah *et al.,* 2002). Principalmente, estos estudios se han enfocado al estudio del efecto en el crecimiento de diferentes fuentes de carbono, así como al uso de diferentes fuentes de nitrógeno y fosforo.

Recientemente, Valpipil *et al.* (2007a, 2007b y 2008) han realizado interesantes estudios en *B. cereus* cepa SPV evaluando no solo su producción a gran escala, sino también las

propiedades químicas de los polímeros sintetizados, así como los genes involucrados en las rutas de biosíntesis de producción de PHA.

Una de las grandes ventajas del empleo de bacterias del género *Bacillus* radica en su capacidad de poder sintetizar co-polímeros de manera natural, es decir, sin la adición de sustratos precursores. Además, cuando el PHA proviene de bacterias Gram negativas, este posee lipo-polisacáridos (LPS) que pueden causar reacciones inmunogenicas cuando son utilizados para aplicaciones médicas, a diferencia de los PHAs producidos por bacterias Gram positivas que carecen LPS (Valappil, 2007c).

2.3. Estudio de bacterias de origen marino productoras de PHAs

A la fecha, las bacterias utilizadas para la producción de PHA pertenecen al grupo de las Gram negativas y cuyo aislamiento se ha hecho de suelo y de rizósfera. Se tienen muy pocos reportes acerca de bacterias marinas productoras de PHAs. La mayoría de los reportes que se tienen acerca de la producción bacteriana de PHAs en bacterias marinas han estado dirigidos a aspectos ecológicos, como lo reportado por Rothermich *et al.* (2002) y, Berlanga *et al.* (2006), quienes han estudiado la variación estacional en la producción de PHA realizada en tapetes microbianos fotosintéticos aislados del Delta de río Ebro, España.

Recientemente, cepas de *Vibrio* han sido aisladas y caracterizadas en su producción de PHB (Chien *et al.,* 2007), mostrando altos porcentajes producción. Otro organismo marino estudiado para la producción de PHA es *Saccharophagus degradansuna* (González-García *et al.,* 2008), la cual es capaz de producir PHB a partir de polisacáridos complejos.

Además, se han realizado estudios de bioprospección de bacterias con potencial para la producción de PHAs provenientes de sedimentos marinos costeros contaminados por un efluente de una planta procesadora de productos pesqueros y un sitio prístino, mostraron diferencias en la composición de la comunidad microbiana. Los géneros bacterianos reconocidos fueron *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Paracoccus*, *Rhodococcus, Micrococcus* y *Methylobacterium*. Las estimaciones de los rendimientos de producción de biomasa y PHA en medio PYM mostraron valores máximos de 2 g/L y 66.5% respectivamente en la cepas C18, C19 y E13, correspondientes al género *Bacillus* (Lanz, 2006; Lopéz-Cortés *et al., 2008).*

En base a los antecedentes presentados, se pueden identificar puntos clave que necesitan ser desarrollados y estudiados para la optimización de la producción de PHAs (Verlinden, 2007):

1) Selección de cepas (aislamiento y caracterización) con porcentajes eficientes de producción de PHA
2) Modificación de cepas con porcentajes eficientes de producción de PHAs
3) Procesos de fermentación eficientes
4) Optimización de los procesos de recuperación y purificación
5) Uso de sustratos económicos

El desarrollo e implementación de estos puntos permitirían disminuir los costos de producción, que actualmente se encuentran en un orden de 10-20 €/kg, y así poder cumplir la meta de sustituir la producción no sustentable de plásticos provenientes de hidrocarburos por aquellos de origen biológico (Suriyamongkol *et al.,* 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

Los costos ambientales de la producción de plásticos comienzan a tener un fuerte impacto en los ecosistemas. Además, no debe perderse de vista que la producción de estos plásticos es dependiente del petróleo y las reservas de este recurso disminuyen día con día. El incremento en la producción de plásticos de origen biológico (PHAs) brindaría una disminución en la dependencia a los hidrocarburos, así como una reducción al impacto que tiene su producción y procesamiento. En este sentido, algunos aspectos de la producción de PHAs han sido estudiados, aunque este conocimiento solo se refiere a algunos géneros bacterianos y aún es limitado. Es por ello que la búsqueda y el estudio de nuevos microorganismos productores de PHAs brindan un panorama muy prometedor.

4. HIPÓTESIS

Si, la síntesis de PHAs por bacterias es estimulada por condiciones limitantes de nitrógeno y excesos de fuentes de carbono, entonces, para las cepas bacterianas de origen marino seleccionadas, E13, C18 y C19, la producción de PHAs se incrementará al ser expuestas a tratamientos en los cuales existe una deficiencia en las concentraciones de fuente de nitrógeno.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar características fisiológicas y moleculares de la producción de PHAs de las cepas C18, C19 y E13, con el propósito de profundizar en el conocimiento de la capacidad de producción de PHAs.

Objetivos particulares:

1) Evaluar la producción de PHA bajo diferentes condiciones de fuente de carbono y de nitrógeno.

2) Identificar la presencia del gen *phaC* involucrado en la síntesis de PHAs en las cepas C18, C19 y E13.

3) Secuenciar el 16S ADNr de las cepas E13, C18 y C19 con el propósito de identificarlas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivación y crio-preservación de las cepas

Las cepas utilizadas en este estudio son: C18, C19 y E13, las cuales fueron aisladas previamente (López-Cortés *et al*., 2008) y pertenecen a la Colección de Microorganismos del Laboratorio de Ecología Microbiana y Molecular del CIBNOR. Dichas cepas fueron reactivadas en caldo marino 2216 (Difco) incubadas 32°C con una agitación 150 rpm durante 24 h. Para la crio-preservación de las cepas se tomaron 15 mL de cada cepa por triplicado, los cuales fueron centrifugados a 4700 g durante 5 min; el sobrenadante se eliminó y el botón celular fue resuspendido en un criovial con 1 mL de medio 2216 y 50 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) como conservador. Los crio viales fueron almacenados en un contenedor de nitrógeno líquido a una temperatura de -195°C.

6.2. Valoración fisiológica de la producción de PHA

Evaluación preliminar del efecto de la concentración de nitrógeno sobre el crecimiento y la detección microscópica de PHAs

Se valoró en medio basal marino (Tabla 4) complementado con glucosa como fuente de carbono al 2% el efecto de la fuente de nitrógeno (NH_4Cl 0.1, 0.5 y 1 g/L) en el crecimiento bacteriano y en la presencia/ausencia de inclusiones de PHAs. Las concentraciones de NH_4Cl pueden considerarse como: 0.1= limitado, 0.5 = normal y 1= excedido.

El crecimiento fue determinado por cuenta viable por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC). Las tres cepas estudiadas fueron inoculadas por triplicado en matraces de

150 ml con 30 ml los cuales se tomo un 1 ml para realizar diluciones 10^{-4} y 10^{-5} a partir de la cual se realizo el conteo de UFC en placas incubadas a 32°C durante 24 h. El medio de cultivo utilizado para este experimento fue diseñado para este experimento y denominado Medio Basal Marino, el cual consiste en Agua de Mar Artificial (NaCl 9.34 g/L, KCl 0.6 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 9.88 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.16 g/L, amortiguado con 50 ml/L de Tris HCl buffer 1 M pH 7.5) adicionada con $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 76 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 28mg/L, Dextrosa anhidra 20g/L y agar 15 g/L;. A partir de los resultados obtenidos en este experimento se establecieron los medios de cultivo que serían utilizados para el resto de los experimentos (Tabla 4).

Tabla 4. Formulación de los medios de cultivo utilizados para este experimento

Medio Basal Marino Glucosa (MBMG)	**Medio Basal Marino Sacarosa (MBMS)**
-NaCl 9.34 g/L -KCl 0.6 g/L -$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 9.88 g/L -$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.16 g/L, -50 ml/L de Tris HCl buffer 1 M pH 7.5 -NH_4Cl 0.5 g/L -$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 76 mg/L -$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 28mg/L, -Dextrosa anhidra (glucosa) 20g/L	-NaCl 9.34 g/L -KCl 0.6 g/L -$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 9.88 g/L -$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.16 g/L, -50 ml/L de Tris HCl buffer 1 M pH 7.5 -NH_4Cl 0.5 g/L -$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 76 mg/L -$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 28mg/L, - Sacarosa 20 g/L

Para determinar la presencia de producción de PHAs se realizaron observaciones al microscopio detectando la ausencia o presencia de inclusiones citoplasmáticas refringentes con microscopia de contaste de fases. Además, se realizaron tinciones lipofílicas con Negro Sudán B (Bradshaw, 1979) para evidenciar la presencia de gránulos intracelulares; dicha tinción consiste en fijar la muestra con calor en un porta objetos, teñir por 10 minutos con

solución Negro Sudán B al 0.3% (0.3 g de reactivo Negro Sudán B en 75 mL de etanol al 95% aforado a 100 mL con agua destilada), secar con papel filtro Whatman No. 1, clarificar con gotas de Xileno al 98% y secar para finalmente teñir con safranina acuosa al 0.5% por contraste durante 5 a 10 segundos. Las observaciones fueron realizadas en un microscopio Nikon Labophot.

6.2.1. Extracción de PHAs

La extracción de PHAs es un paso estratégico en el proceso de producción de polihidroxialcanoatos (Jacquel *et al.,* 2008), por esta razón se decidió hacer una evaluación preeliminar de dos diferentes métodos de extracción, empleando solo la cepa C19, seleccionada por ser quién exhibió un crecimiento más rápido. La cepa C19 fue incubada en matraces de 500 mL con 200 mL de medio de cultivo a 32°C, con una agitación de 115 rpm durante 48 h. En este experimento fueron utilizados 3 diferentes medios de cultivo: MBMG, MBMS y Petone Yeast Medium (AMA, peptona 5 g/L, extracto de levadura 3 g/L y glucosa 20 g/L) con la finalidad de evaluar dos métodos de extracción bajo diferentes condiciones de cultivo.

6.2.1.1. Extracción por solventes

Para este método, fueron tomados 50 mL de medio de cultivo a 48 h de crecimiento y centrifugados a 4700 *g* durante 15 min en tubos cónicos. Para realizar la lisis celular, el pellet obtenido fue re suspendido en 15 mL de hipoclorito de sodio concentrado (Clorox) e incubado durante 1 h a 37°C. Después de este periodo de incubación el material obtenido fue centrifugado a 4700 *g* durante 15 min, el pellet recuperado fue lavado sucesivamente con agua deionizada estéril, cloroformo al 99% y etanol absoluto grado biología molecular y

finalmente, el producto obtenido fue secado en campana de extracción durante 4 horas (Rawte y Mavinkurve, 2002).

6.2.1.2. Extracción química por digestión

Se utilizó el método de digestión química propuesto Kim *et al.,* 2003 empleando SDS (sodium dodecyl sulfate) como surfactante. La extracción consistió en tomar 50 ml del medio de cultivo y traspasarlo a matraces de 250 ml estériles, posteriormente fueron agregados 1 gr de SDS (Sigma Chemical Co.) directamente al medio de cultivo. La reacción se llevo a cabo durante una hora a temperatura ambiente a 115 rpm de agitación, seguida de una incubación a 120°C durante 15 min sin agitación. Finalmente, el contenido de los matraces fue centrifugado a 4700 *g*, lavado con agua deionizada estéril y secado a 36°C durante 6 h.

De ambos métodos de extracción se obtuvieron finas películas de polvo blanco que fueron almacenadas para su posterior cuantificación.

6.3. Cuantificación de PHAs

Para la cuantificación de PHAs fue utilizado el método espectrofotométrico propuesto por Law y Slepecky 1961, el cual consiste en convertir el PHA extraído en acido crotónico mediante digestión. Para esto, se tomaron 1 mg de cada muestra y se coloco en tubos de ensaye de vidrio, posteriormente se añadieron directamente a la muestra 10 mL de ácido sulfúrico concentrado (98%). La digestión fue dirigida durante 30 min a 95° C en baño maría previamente calentado. Finalmente 1 mL de muestra fue transferido a una celda de cuarzo para cuantificar a 235 nm con un espectrofotómetro marca Jenway Mod. 6505 UV/Vis. Para extrapolar los valores obtenidos, fue necesario construir una curva de calibración utilizando PHB al 98% (DL-β-hydroxibutyric acid sodium salt Sigma™) como estándar.

6.4 Evaluación de la producción de PHAs bajo diferentes fuentes de carbono

6.4.1. Preparación del inoculo

Un pre-inoculo fue preparado tomando una asada (10 µL de calibre) de cultivo en placa de medio 2216 de cada cepa e inoculando tubos con tapón de rosca de 40 mL de capacidad con 15 mL con los diferentes tratamientos: MBMS y MBMG; como control negativo fue utilizado Medio Basal Marino sin fuente de carbono (Agua de Mar Artifical, NH_4Cl 0.5 gr/L, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 76 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 28mg/L) y como control positivo medio PYM (Peptone-Yeast Marine). Los tubos fueron incubados a 32°C y una agitación de 120 rpm durante 48 h.

A partir de este cultivo, se preparo el inóculo tomando una alícuota de 2 mL para transferir a matraces de 150 mL de capacidad con 30 mL para cada uno de los tratamientos incubados bajo las mismas condiciones arriba descritas. Una vez pasadas 48 h se tomaron 5 mL de cada cultivo y fueron inoculados por triplicado en matraces de 500 mL con 250 ml de medio e incubados bajo las condiciones anteriormente descritas durante 72 h.

Fueron obtenidas las curvas de crecimiento en cada tratamiento para las 3 cepas estudiadas mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm cada 3 h durante las primeras 24 h de incubación. Para la medición de la densidad óptica, fueron realizadas diluciones y los datos obtenidos fueron multiplicados por su respectivo factor de dilución. Con los valores registrados de densidad óptica fue calculada la tasa de crecimiento (*K*) como $K= Ln(N1/N0)/t_1 - t_0$ donde N1 y N0 es la densidad óptica al tiempo 1 y tiempo 0 respectivamente. El tiempo de generación (t_g) fue calculado como $t_g= Ln2/K$.

La determinación del peso seco se realizó a las 24 y 48 h tomando 50mL del medio de cultivo, los cuales fueron vertidos en tubos cónicos de plástico, lavados con agua,

centrifugados a 4700 *g* y secados a 87°C durante 6 h. La cuantificación de la producción de PHAs se realizó cada 6 h durante las primeras 24 h y a los 48 y 72 h siguiendo el protocolo anteriormente descrito.

Cada tratamiento fue realizado por triplicado, con dos repeticiones de cada corrida. Los datos fueron analizados con el programa SATISTICA 7 utilizando análisis de varianza multifactorial y aplicando la prueba de Tukey *Post hoc* para identificar diferencias significativas entre los tratamientos.

6.5 Análisis moleculares

6.1.1. *Extracción y cuantificación de ADN*

Las cepas fueron inoculadas en placas de Agar Marino 2216 (Difco) e incubadas durante 24 h a 30°C. La extracción de ADN se realizó empleando el paquete de extracción DNeasy Tissue kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo para bacterias Gram positivas. El ADN fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (w/v) en buffer TBE 1X (TBE 10X: Tris 108 gr., ácido bórico 55 gr, 20 mL EDTA 0.5 M pH 8.0 20 aforado a un litro) adicionado con 2 µL bromuro de etidio (10mg/ml) utilizando el marcador de peso molecular exACTGene 24kb Max ladder (Fisher Scientific International Inc.). Además, el ADN obtenido fue cuantificado espectrofotométricamente para conocer su concentración utilizando un biofotómetro (BioPhotometer Eppendorf mod 6131).

Las amplificaciones parciales del 16S rADN y del *phaC* fueron realizadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador marca Techne Mod. TC-312. Cada ensayo de amplificación fue realizado con sus respectivos controles positivos, negativos y blanco.

6.1.2. *Amplificación del fragmento 16S ADNr*

Para la identificación molecular de las bacterias, fue amplificada la secuencia parcial del 16S ADNr (de la posición 8 a la 1542) utilizando los iniciadores universales A y B (Giovannoni, 1991). Las secuencias de los iniciadores empleados es la siguiente:

A: 5´- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 3´

B: 5´-AAGGAGGTGATCCANCCRCA-3´

La mezcla de reacción (21.6µL) consistió en: 12.4µL de H_2O libre de nucleasas (Promega), 3.75 µL $MgCl_2$ (25mM), 2.5 µL 5x Buffer Flexi Colorless GoTaq Promega, 1.2 µL de dNTP´s Promega (2.5mM), 0.2µL de cada iniciador a una concentración de 250ng/µL, 1µL de ADN (150 ng/µl) y 0.2 µL de Flexi GoTaq Polimerasa marca Promega. El protocolo de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94° C durante 5 min seguido de 30 ciclos de 90° C 1min, 60°C 1min y 72° C 1 min y un ciclo final de extensión de 10 min a 72°C; dicha reacción fue realizada en un termociclador (Techne Mod. TC-312). Cada ensayo de amplificación fue realizado con sus respectivos controles positivos (*Ralsotonia* sp, ADN de Abulón respectivamente) y como blanco una mezcla de reacción sin ADN.

6.5.3. *Amplificación parcial del phaC*

Para el caso de la amplificación parcial del *phaC*, fueron diseñados iniciadores específicos para bacterias Gram Positivas a partir de secuencias depositadas en Gen Bank, dichos iniciadores fueron nombrados *phaC*GPf1 (5´-GGTTTTGAYGTGTATWTGCTTG-3´) y *phaC*GPr1 (5´-GGCAKSGCRATATGATCACG-3´). La mezcla de reacción (23.8µL) consistió en: 10.6µL de H_2O libre de nucleasas, 3.75 µL $MgCl_2$ (25mM), 2.5µL 5x Buffer

Flexi Colorless GoTaq Promega, 1 µL de dNTP´s Promega (2.5mM), 1µL de cada primer (50ng/µL de cada primer), 1 µL de ADN (150 ng/µL) y 0.2 µL de Flexi GoTaq Polimerasa marca Promega.

Los productos de PCR obtenidos de los genes 16S ADNr y *phaC* fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (w/v), corrida a un voltaje de 100 V durante 30 minutos; como marcador de peso molecular fue utilizado el DNA Molecular Weight Marker VIII (Roche™). Las imágenes de los geles fueron obtenidas con la ayuda de un transiluminador (BioDoc-It™ System). Finalmente, los productos de PCR fueron enviados a MACROGEN Inc., Corea, para su secuenciación.

6.1.3. Análisis Bionformático

Los electroferogramas obtenidos fueron analizados y editados con el Programa Chromas Lite 2.01 con el fin de eliminar ambigüedades dentro de las secuencias; una vez editadas las secuencias, se efectuó una búsqueda por alineamiento básico local BLAST (Altschul *et al.,* 1997) utilizando la base de datos de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) para obtener la posible identidad de las secuencias y obtener secuencias similares. Para el alineamiento y construcción del árbol filogenético se empleo el programa CLC Viewer Versión 5.1. La construcción del árbol filogenético se realizó empleando el método de Neighbor Joining con un análisis bootstrap de 700 replicas.

7. RESULTADOS

7.1. Valoración fisiológica de la producción de PHA

7.1.2. Evaluación preliminar del efecto de la concentración de nitrógeno sobre el crecimiento y la detección microscópica de PHAs

El propósito de este ensayo fue identificar la concentración adecuada de nitrógeno para la producción de PHAs; es decir aquella concentración que pudiera fungir como factor limitante y estimular la producción de PHAs, pero sin afectar bruscamente sobre el crecimiento bacteriano. En la Figura 3 podemos observar que para el caso de la cepa C18 y E13 no hubo diferencias significativas en el número de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) en respuesta a las tres diferentes concentraciones de NH_4Cl empleadas.

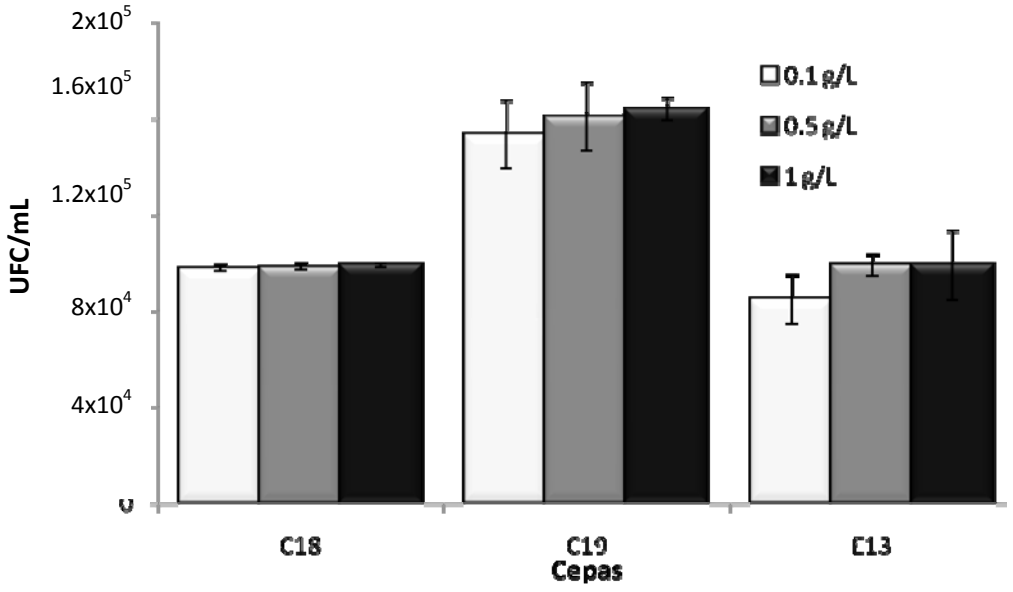

Figura 3. Valores obtenidos de cuenta viable de unidades formadoras de colonias de la cepa C19 cultivada durante 24 h en medio Medio Basal Mineral con glucosa (MBMG) utilizando tres diferentes concentraciones de nitrógeno (NH_4Cl).

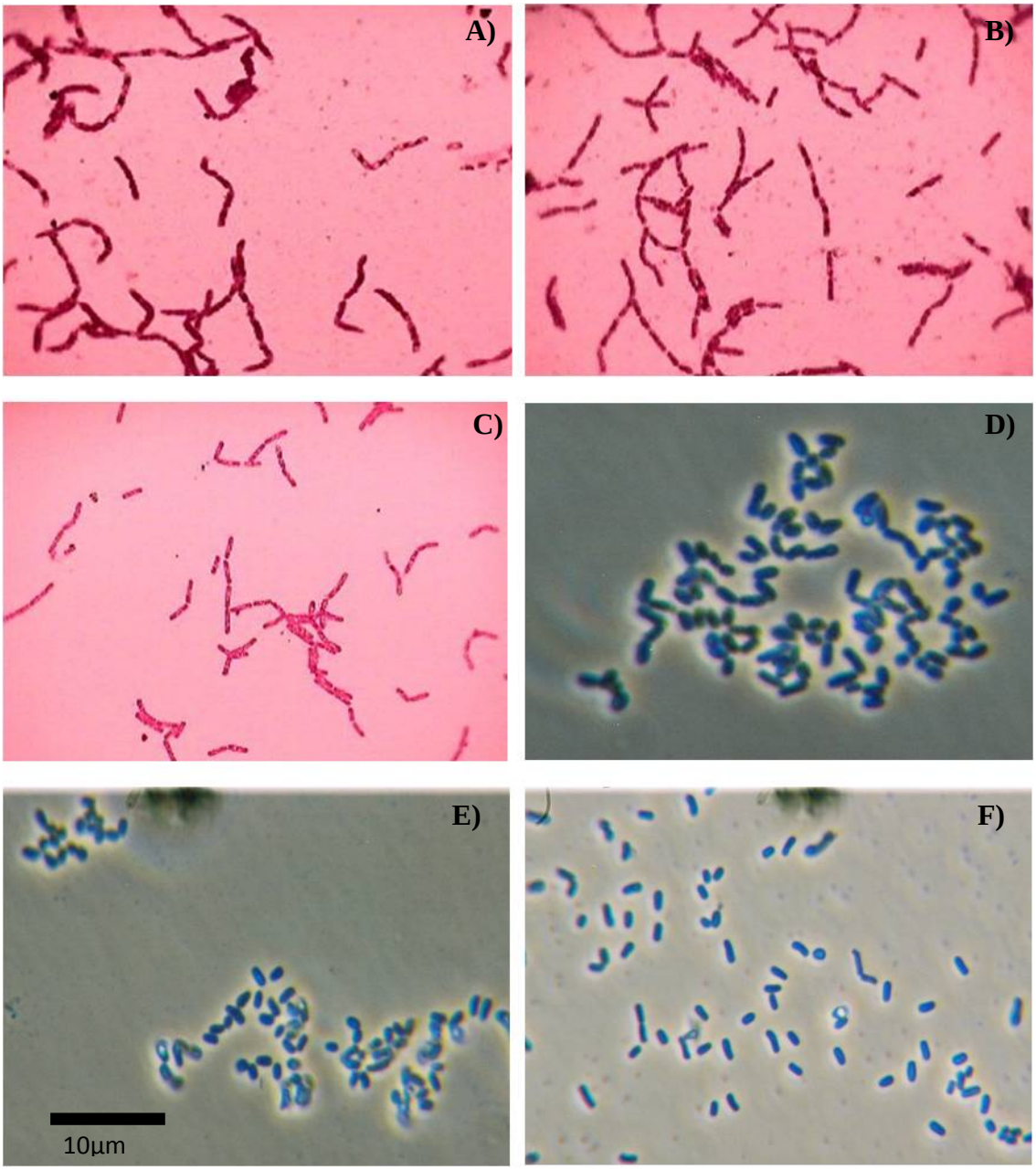

Figura 4. Microscopias realizadas para la detección de PHAs. A), B), C) y D) tinciones con Negro Sudán de células de cepa C19 cultivadas en medio MBMG con concentraciones de 0.1, 0.5 y 1g/L de NH_4Cl. IV-VI imágenes de microscopia de contraste de fases de la Cepa E13 cultivada en medio MBMG.

Así mismo, en la cepa C19 se detectó un decremento en el número total de UFC para el tratamiento con 0.1 g/L de NH_4Cl (1.53 x10^5 UFC); mientras que la concentración 1g/L de NH_4Cl mostró el mayor crecimiento con un número de 1.64 x10^5 UFC/mL. La cepa E13 mostró un comportamiento similar al de la cepa C18 al no mostrar diferencias significativas para los tratamientos de 0.5 y 1 g/L de NH_4Cl, mientras que para la concentración de 0,5 mostró un pequeño decremento al contabilizar 8.46 x10^4 UFC/mL.

Para cada tratamiento y para cada cepa, se realizaron tinciones con Negro Sudán, así como la detección de inclusiones citoplasmáticas refringentes para corroborar la producción de PHAs bajo los diferentes tratamientos (Fig. 4).

Los resultados obtenidos en este experimento nos permitieron establecer que la concentración adecuada a utilizar para la producción de PHAs sería 0.5 g/L tomando en cuenta que para la cepa C18 y E13 no había diferencia en el crecimiento y que en la cepa C19 esta es la concentración intermedia y que le permite un buen crecimiento.

7.1.2. Extracción de PHAs

Los valores obtenidos indican que el método con mayor porcentaje en la recuperación de PHAs fue el método de extracción por solventes (Fig. 5). Bajo este procedimiento, fue posible recuperar cantidades de 1.61, 1.72 y 1.53 g/L de PHA para cada tratamiento, respectivamente. La diferencia para el caso del tratamiento MBMS fue de casi un 30% de recuperación, mientras que para el tratamiento MBMG el porcentaje de recuperación por solventes fue un 40% mayor al presentado por el método de extracción con SDS. Aunque los porcentajes de recuperación obtenidos empleando SDS no fueron extremadamente bajos, con una recuperación en promedio de 1 g/L para cada tratamiento, a nivel industrial, la

pérdida de aproximadamente el 30% del producto total representaría una gran pérdida económica. Con base a estos resultados se determinó que el método de extracción por solventes sería utilizado en los ensayos subsecuentes.

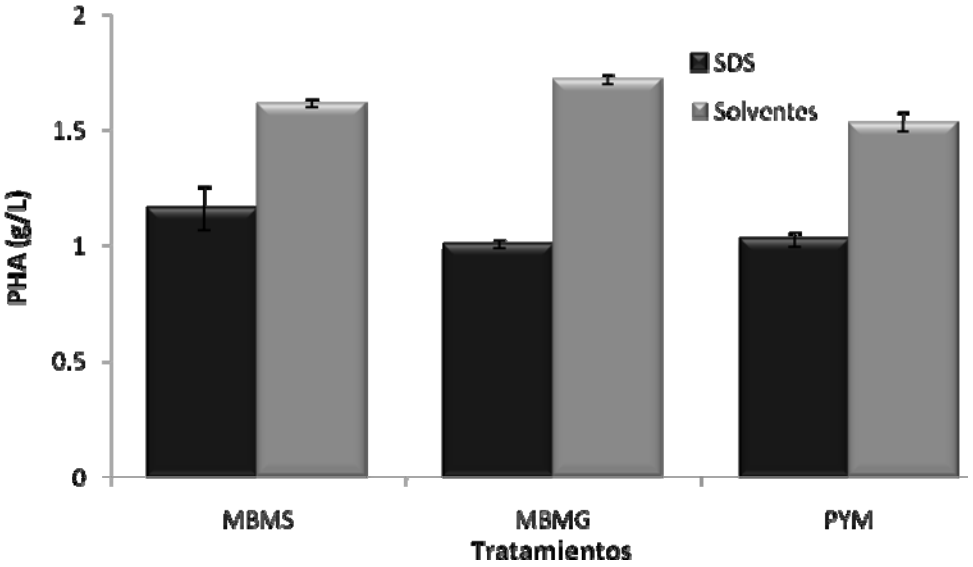

Figura 5. Valores obtenidos de la extracción de PHA realizada para la evaluación preeliminar de dos métodos de extracción: por solventes y el con SDS (sodium dodecyl sulfate) utilizando cultivos de la cepa C19 a 48 h de incubación empleando tres medios de cultivo. MBMS= medio basal marrino con sacarosa, MBSG= medio basal marino on glucosa y PYM= peptona-extracto de levadura marino.

7.1.3. Evaluación de la producción de PHAs bajo diferentes fuentes de carbono

Las cinéticas de crecimiento mostraron diferentes comportamientos para cada una de las cepas. La cepa C18 evidenció un decremento en su crecimiento en los tratamientos empleados con respecto al control (Fig. 6-A). De forma evidente, el control positivo fue el que presentó mayor crecimiento alcanzando unidades de absorbancia superiores a los 2.5 a las 24 h de crecimiento.

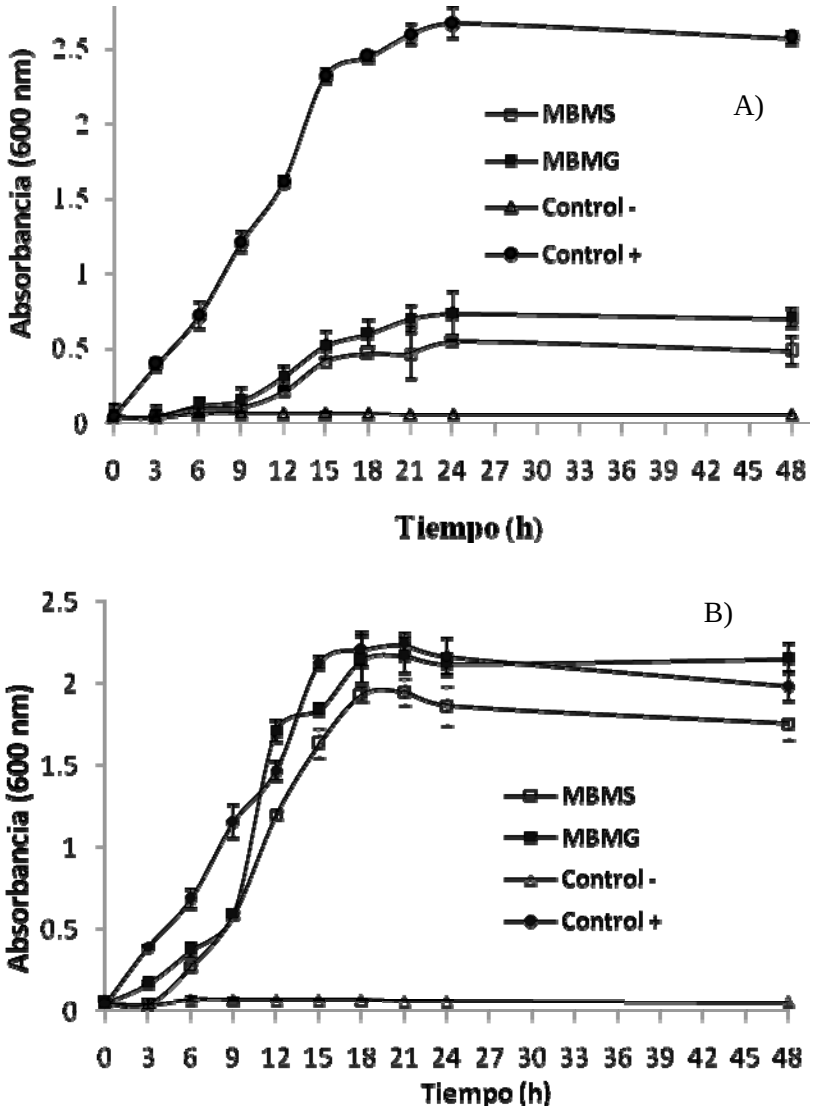

Figura 6. Cinéticas de crecimiento de las cepas C18 (A) y C19 (B) bajo diferentes tratamientos de fuente de carbono, control positivo (PYM) y control negativo (Medio Basal Marino sin fuente de carbono) incubadas durante 48h a 32°C a 115 rpm.

Los dos tratamientos empleados tuvieron un efecto negativo en la cepa C18, mientras que el crecimiento de la cepa C19 solo presentó mínimas diferencias entre los diferentes tratamientos y el control positivo (Fig. 6-II). La cepa E13 tuvo un crecimiento

considerablemente bueno bajo el tratamiento MBMG, mientras que el crecimiento observado para el tratamiento MBMS fue muy pobre (Fig. 7).

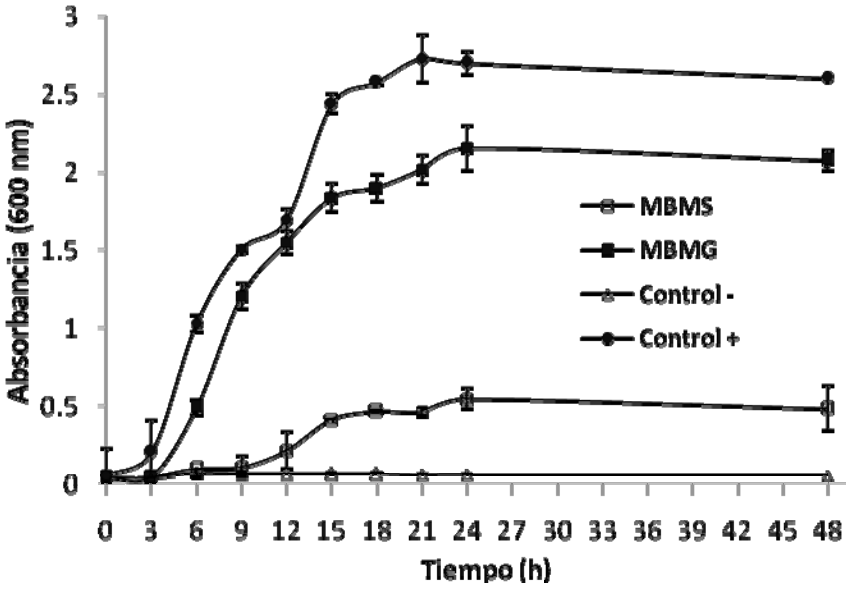

Figura 7. Cinéticas de crecimiento de las cepas E13 bajo diferentes tratamientos de fuente de carbono, control positivo (PYM) y control negativo (Medio Basal Marino sin fuente de carbono) incubadas durante 48 h a 32 ° C a 115 rpm.

Para los tres casos, se observa que el control positivo exhibió mayor crecimiento con respecto a los tratamientos empleados. Así mismo, se puede identificar que la cepa C19 alcanza la fase estacionaria aproximadamente a la 18 h de crecimiento para los tres tratamientos, mientras que las cepas C18 y E13 entran en fase estacionaria aproximadamente a las 24 h de incubación.

Los parámetros celulares de tasa de crecimiento y tiempo de generación fueron calculados a partir de los puntos correspondientes a la fase exponencial de cada tratamiento (Tabla 5) En la cepa C18 el tratamiento fue MBMG el que exhibió la tasa de crecimiento más alta con un valor de 0.218, así como el tiempo de generación más corto.

Tabla 5. Valores obtenidos de los parámetros celulares para cada tratamiento. K= tasa de crecimiento, Tg=tiempo generación, ND = no detectado

Cepa	Tratamiento	K	t_g
C18	MBMG	0.21870925	3.16926323
	MBMS	0.10898774	6.35986352
	Control +	0.10777119	6.43165538
	Control -	ND	ND
C19	MBMG	0.13206093	1.96457429
	MBMS	0.35282309	5.24869241
	Control +	0.17678944	3.92074991
	Control -	ND	ND
E13	MBMG	0.19080928	3.63267022
	MBMS	0.12898941	5.37367527
	Control +	0.33144533	2.09128658
	Control -	ND	ND

El tratamiento MBMS presentó una mayor tasa de crecimiento en la cepa C19 con un valor de 0.352, mientras que el tiempo de generación más corto para todas las cepas bajo los tres diferentes tratamientos fue obtenido por el tratamiento MBMG en la cepa C19 con un valor de 1.96 h. La cepa E13 tuvo una mayor tasa de crecimiento en el control positivo, así como una tasa de generación de 2.09. En general, de las tres cepas estudiadas, C18 mostró los valores más bajos en la tasa de crecimiento y los tiempos de generación más largos.

A las 24 h de incubación la cepa C18 mostró la mayor producción de biomasa (2g/L) en el control positivo representado por el medio PYM con diferencias significativas en comparación a los medios MBMS 0.6 g/L y MBMG 0.8 g/L (Fig. 8). Para el caso de la producción de PHA el control negativo sin fuente de carbono no mostró valores de detección. Entre los medios MBMS (0.36 g/L) y MBMG (0.41 g/L) no se encontraron diferencias significativas, pero si con respecto al control positivo (0.4 g/L), quien mostró menor producción de PHA.

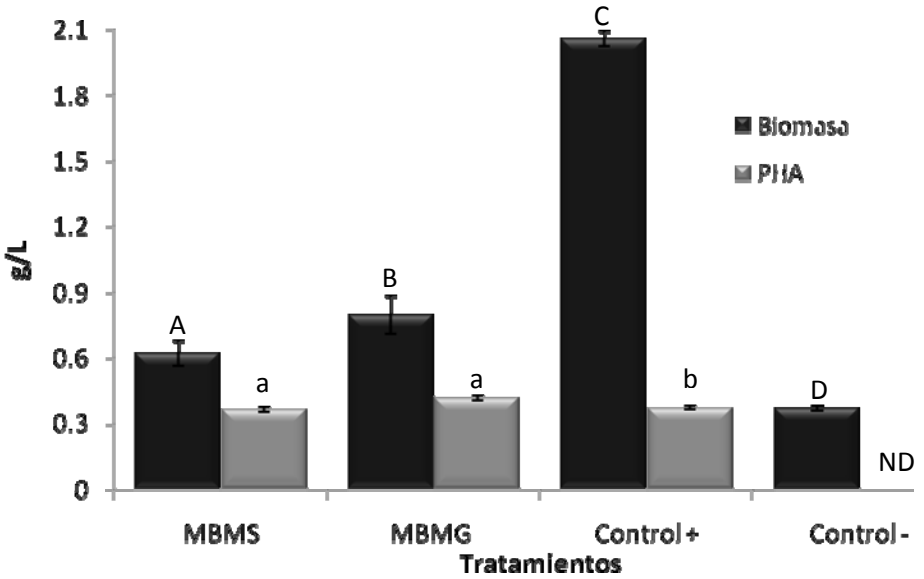

Figura 8. Datos obtenidos de la cepa C18 sometida a 3 diferentes tratamiento, control positivo (PYM) y control negativo (Medio Basal Marino) a 24 h de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar. ND= no detectado. Las diferencias significativas son representadas por letras y fueron calculadas a partir de ANOVA multifactorial y prueba de Tukey post-hoc con una significancia de $P \leq 0.05$.

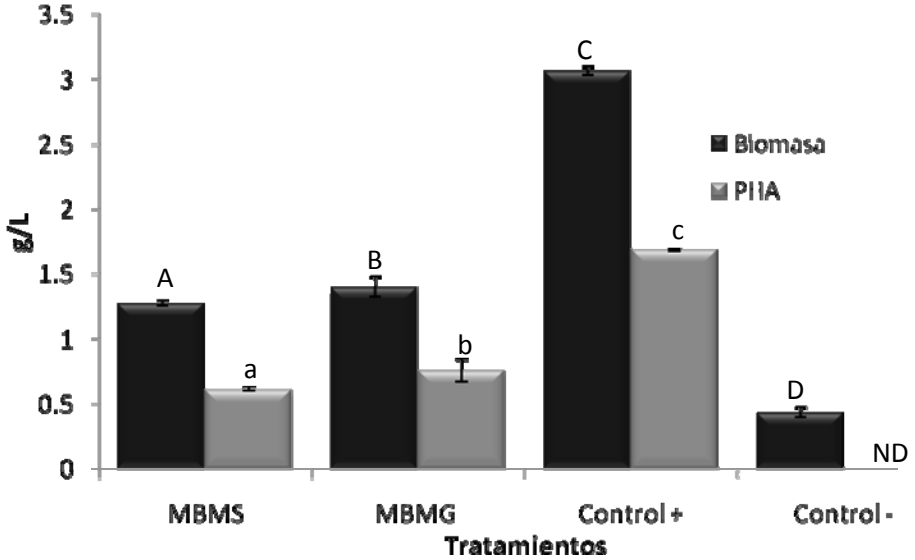

Figura 9. Valores registrados para la cepa C18 sometida a 3 diferentes tratamientos, control positivo (PYM) y control negativo (Medio Basal Marino) a 48 h de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar. ND= no detectado. Las diferencias significativas están representadas por letras y fueron calculadas a partir de ANOVA multifactorial y prueba de Tukey post- hoc con una significancia de $P \leq$

La cepa C18 a las 48 de incubación, mostró la misma tendencia que a las 24 h de incubación en relación a la producción de biomasa (Fig. 9). Nuevamente, para el caso del control negativo sin fuente de carbono la producción de PHA no se detecto. Entre los medios MBMS (0.6 g/L), MBMG (0.76 g/L) y el control positivo PYM (1.6 g/L) se encontraron diferencias significativas.

En contraste, la cepa C19 incubada 24 h mostró diferente comportamiento al presentado por la cepa C18 en relación a la producción de biomasa. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la producción de PHA para los dos tratamientos MBMS (0.76 g/L, MBMG (0.86 g/L) y para el control positivo con 0.7 g/L (Fig. 10).

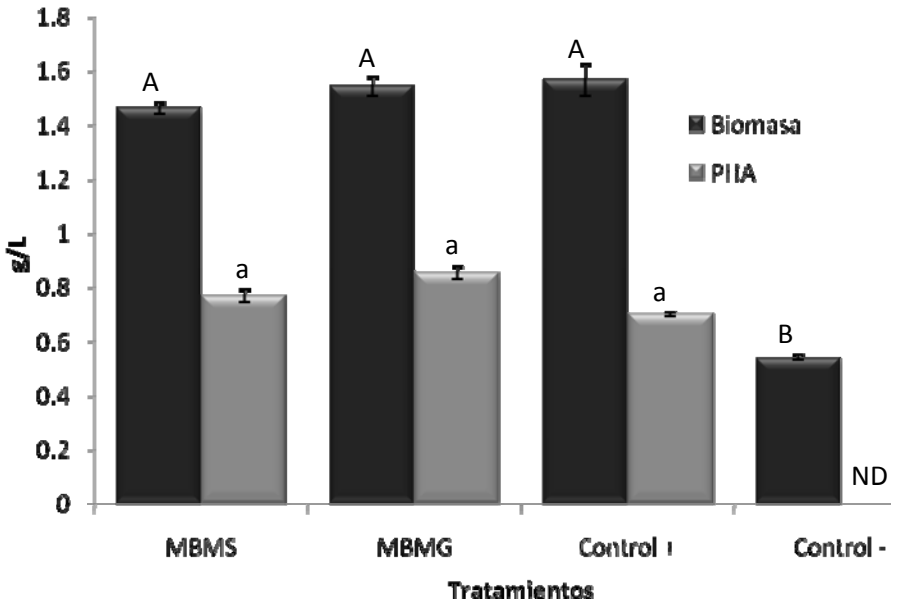

Figura 10. Valores registrados para la cepa C19 sometida a 3 diferentes tratamientos, control positivo (PYM) y control negativo (Medio Basal Marino) a 24 h de incubación. Las barras representan la desviación estándar. ND= no detectado. Las diferencias significativas están representadas por letras y fueron calculadas a partir de ANOVA multifactorial y prueba de Tukey post- hoc con una significancia de $P \leq 0.05$.

En la Figura 11 podemos observar que la cepa C19 a 48 h de incubación no presento diferencia significativa en la cantidad de biomasa producida; sin embargo es posible distinguir que el tratamiento MBMG tuvó una mayor producción de PHA (2.06 g/L), mientras que el tratamiento MBMS no mostró diferencias significativas con respecto del control positivo en la producción de PHA.

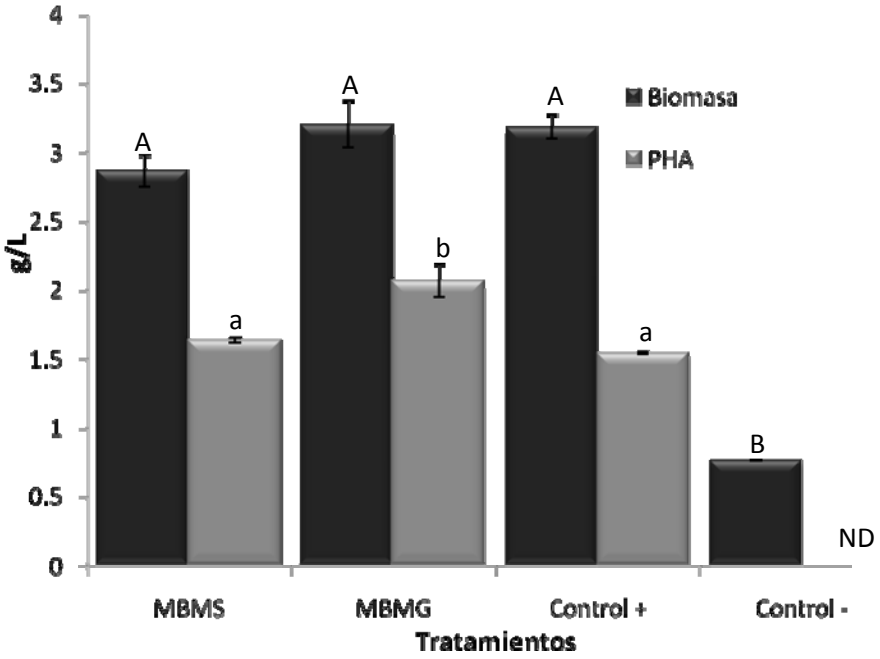

Figura 11. Datos obtenidos para la cepa C19 sometida a 3 diferentes tratamientos, control positivo (PYM) y control negativo (Medio Basal Marino) a 48 h de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar. ND= no detectado. Las diferencias significativas están representadas por letras y fueron calculadas a partir de ANOVA multifactorial y prueba de Tukey post- hoc con una significancia de $P \leq 0.05$.

En la cepa E13 se observaron diferencias significativas en la producción de biomasa y PHA para los diferentes medios de cultivo, siendo el control positivo el de mayor rendimiento, biomasa (1.5 g/L), PHA (0.9).

La comparación en el rendimiento de la producción de biomasa en medio MBMG incubado por 24 h entre las cepas C18, C19 y E13 mostró diferencias numéricas 0.8, 1.5 y 1.4 g/L respectivamente (Fig. 8, 10 y 12).

La cepa C18 al igual que la cepa E13, tuvieron los menores rendimientos en la producción de biomasa y PHA cuando se uso el medio MBMS (Fig 8 y 12), tanto a las 24 como a las 48 h.

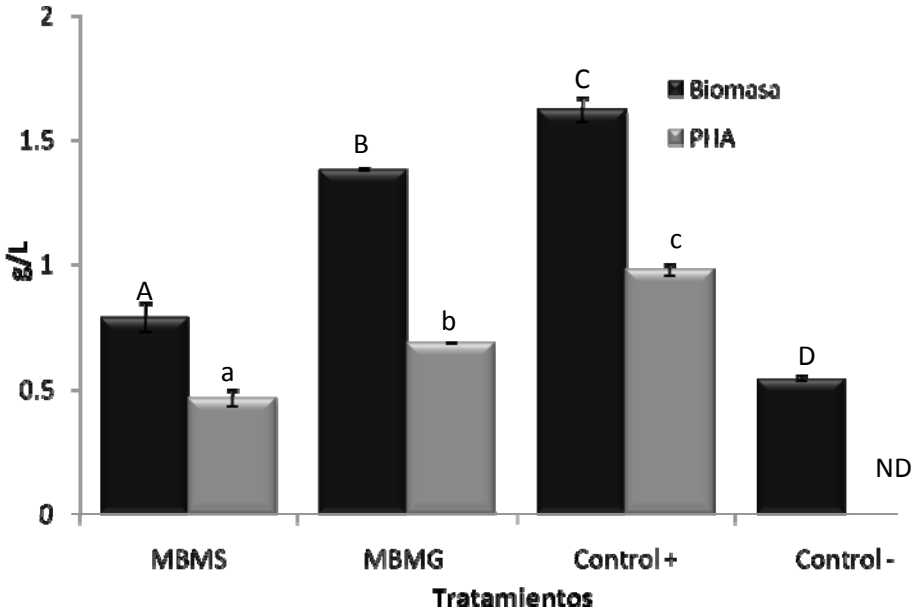

Figura 12. Valores obtenidos para la cepa E13 sometida a 3 diferentes tratamientos, control positivo (PYM) y control negativo (Medio Basal Marino) a 24 h de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar. ND= no detectado. Las diferencias significativas están representadas por letras y fueron calculadas a partir de ANOVA multifactorial y prueba de Tukey post- hoc con una significancia de $P \leq 0.05$.

En la Figura 13 se observa que la diferencia entre el peso seco del tratamiento MBMG y el control positivo no fue tan contrastante en comparación con el tratamiento con sacarosa; sin embargo la cantidad de PHA producido por el MBMG fue considerablemente menor en relación al control positivo con una producción de 0.87 y 1.59 g/L respectivamente.

Estos resultados nos sugieren que tanto la cepa C18 y E13 no requieren que en sus condiciones de cultivo exista limitación de algún nutrimento para que la producción de PHA sea realizada. Además, los datos indican que el empleo de NH_4Cl como fuente de nitrógeno no resulta adecuado en estas cepas bacterianas. Cabe destacar que en el control positivo (PYM) la cepa C19 presentó menor producción de biomasa que las cepas C18 y E13. Sin embargo, la cepa C19 mostró buena adaptación al uso de dos diferentes fuentes de carbono así como al empleo de NH_4Cl como fuente nitrógeno.

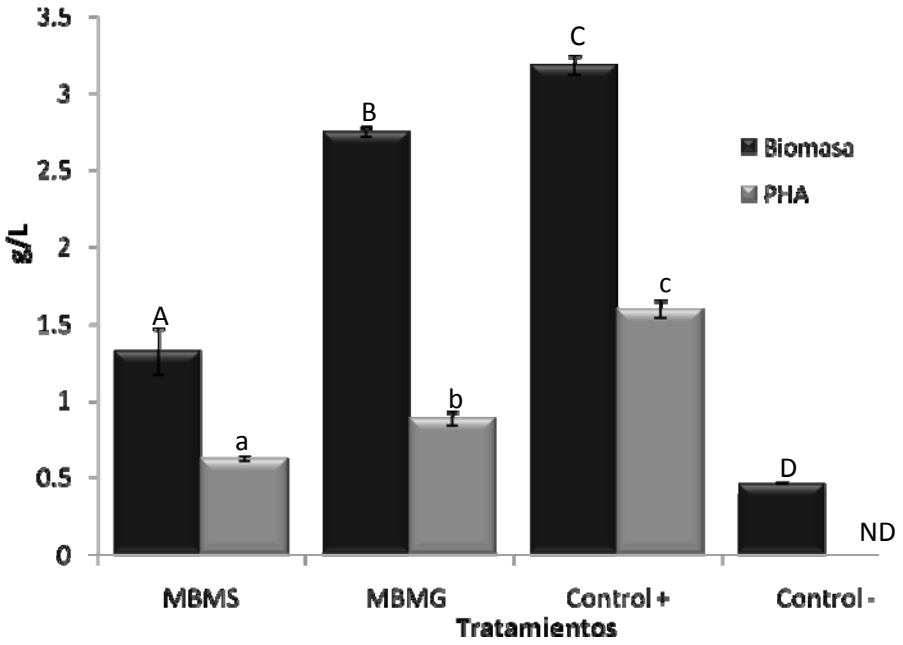

Figura 13. Datos registrados para la cepa E13 sometida a 3 diferentes tratamientos, control positivo (PYM) y control negativo (Medio Basal Marino) a 48 h de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar. ND= no detectado. Las diferencias significativas están representadas por letras y fueron calculadas a partir de ANOVA multifactorial y prueba de Tukey post- hoc con una significancia de $P \leq 0.05$.

En contraste, los datos registrados parecen indicar que la cepa C19 aumenta su producción de PHA en condiciones de limitación de nutrimentos. En la Tabla 6 se presentan los porcentajes obtenidos en la producción de PHA para cada una de las cepas con sus respectivos tratamientos.

Tabla 6. Porcentajes de producción total de PHA y biomasa en peso seco obtenido a las 48 horas de crecimiento por las tres cepas bajo los diferentes tratamientos. ND= no detectado

Cepa	Tratamiento	Biomasa Peso Seco g/L	Porcentaje de producción de PHA
C18	MBMS	1.27	48.81 %
	MBMG	1.4	54.5 %
	Control +	3.06	54.9 %
	Control –	0.44	ND
C19	MBMS	2.86	56.9 %
	MBMG	3.2	62.5 %
	Control +	3.18	48.42
	Control –	0.763	ND
E13	MBMS	1.31	47.3 %
	MBMG	2.74	32.4 %
	Control +	3.18	50%
	Control –	0.45	ND

En base a estos resultados, se decidió evaluar el comportamiento de la producción de PHA en la cepa C19 a lo largo de 72 h de incubación. Los datos obtenidos para el tratamiento en MBMS muestran que en la fase estacionaria es donde se detecta la mayor producción de PHA; a partir de las 24 h se dispara la producción de PHA hasta alcanzar su punto máximo de concentración cerca de las 48, después de este punto, la concentración de de PHA comienza a descender hasta llegar a un nivel donde ya no hay detección del polímero (Fig. 14).

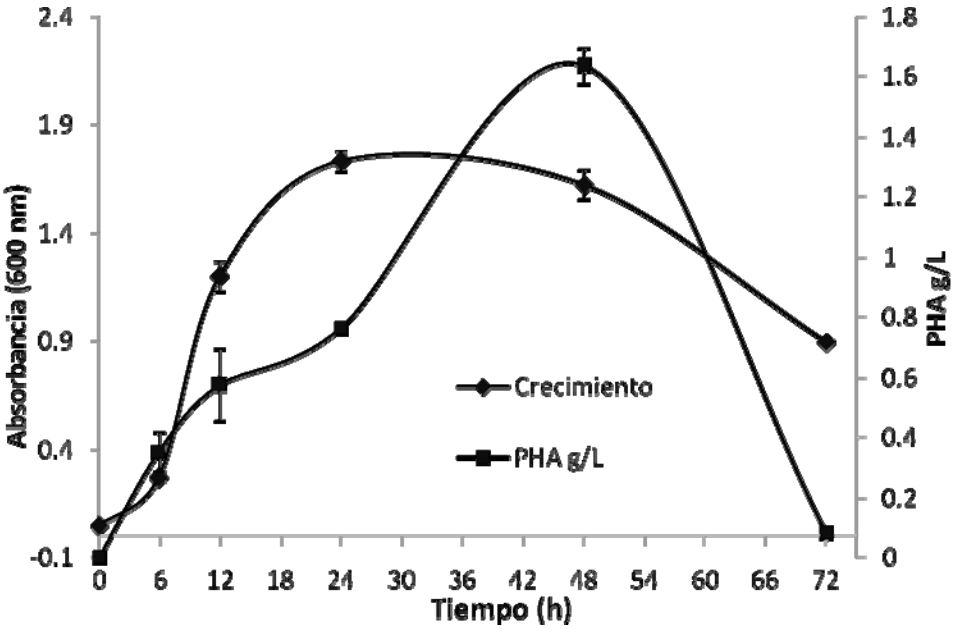

Figura 14. Valores registrados para densidad óptica y PHA producido por la cepa C19 durante 72 h de incubación con el tratamiento MBMS (Medio Mineral Basal con Sacarosa). Las barras corresponden al error estándar.

Bajo el tratamiento MBMG (Fig. 15) la fase de adaptación es más rápida y en consecuencia, a las 6 horas se presenta el primer aumento en la concentración de PHA; este se mantiene parcialmente constante hasta después de las 24 h donde se observa un rápido incremento en la producción de PHA. Es posible detectar que el punto máximo de producción de PHA se localiza casi exactamente a las 48 h y después de este periodo empieza a disminuir la concentración de PHA, pero a diferencia del tratamiento con sacarosa, la degradación de PHA es más lenta y a las 72 h de crecimiento aun es posible detectar su presencia. El tratamiento en el control positivo (Fig. 16) fue muy similar al de los dos tratamientos; su producción se mantiene constante de las 6 a las 24 horas y alcanza su punto óptimo de producción a las 48 h.

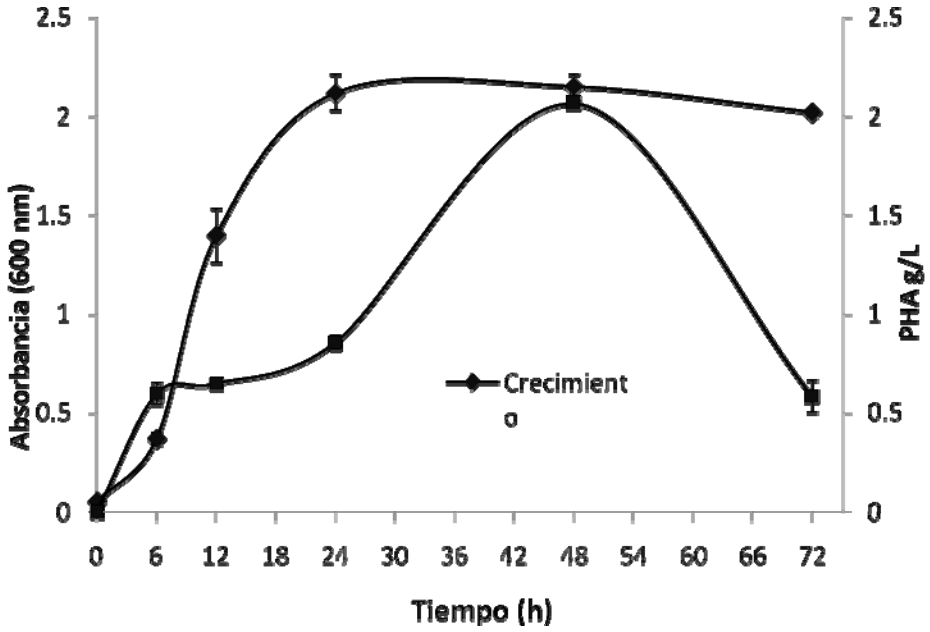

Figura **15.** Valores registrados para densidad óptica y PHA producido por la cepa C19 durante 72 h de incubación con el tratamiento MBMG (Medio Mineral Basal con glucosa). Las barras corresponden al error estándar.

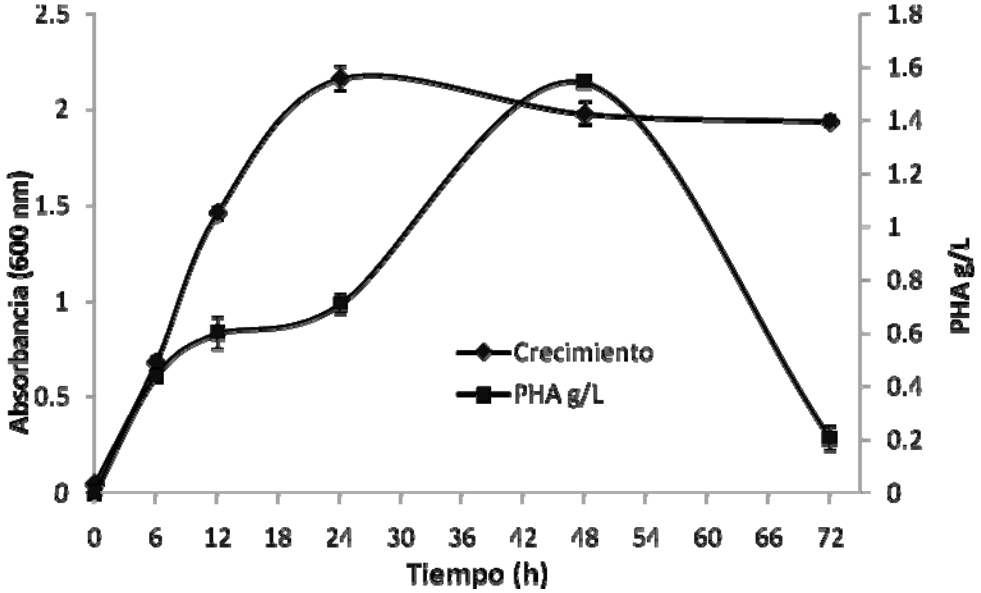

Figura 16. Valores registrados de densidad óptica y PHA producido para el control positivo (PYM) por la cepa C19 durante 72 h de incubación. Las barras corresponden al error estándar.

7.2. Análisis moleculares

7.2.1. Amplificación del 16S ADNr

De la amplificación del fragmento 16S ADNr, se obtuvieron productos de PCR de un tamaño aproximado de 1000 pb (Fig. 17). Una vez secuenciados estos productos de PCR, las secuencias fueron analizadas y depositadas en la base de datos de NCBI (National Center of Biotechnology Information), los números de acceso se enlistan en la Tabla 5.

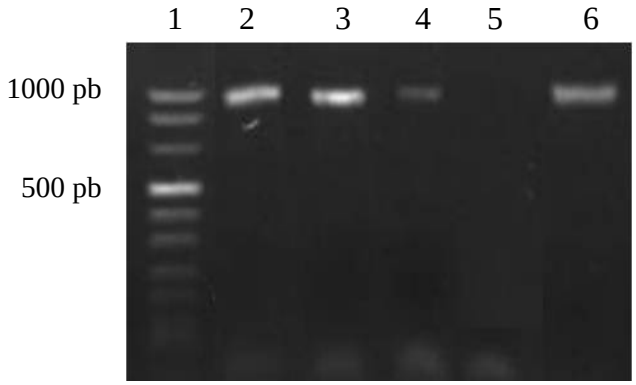

Figura 17. Gel de agarosa al al 0.8% de los productos de PCR obtenidos de la amplificación del 16S ADNr. (1) Marcador de Peso Molecular VIII (Roche). (2) Cepa C18. (3) Cepa C19. (4) Cepa E13. (5) Control negativo (ADN de abulón). (6) Control positivo (*Ralstonia* sp.).

Utilizando la herramienta de Basic Logical Alingment Search Tool (BLAST) disponible en la página de NCBI se compararon las secuencias con mayor similitud para la identificación de las cepas estudiadas (Tabla 7). La cepa C18 y E13 tuvieron un porcentaje de similitud del 100% con secuencias pertenecientes a bacterias del género *Bacillus* pero de dos diferentes especies: *B. cereus* y *B. thuringiensis*. Al obtener los mismos valores de identidad y alineamiento con las mismas cepas, podemos sugerir que la cepa C18 y E13 son la misma especie, pero diferente cepa. Asimismo, la cepa C19 mostró valores de 100% de similitud con bacterias del género *Bacillus* de las especies *B. megaterium*, *B. subtillis* y *B. flexus*.

Tabla 7. Números de acceso del GenBank de las secuencias del 16S ADNr de las cepas estudiadas y porcentajes de similitud de los organismos más cercanos

Cepa	Clave de acceso GenBank	Tamaño de secuencia (pb)	Secuencias más parecidas	Identidad
C18	FJ436018	664	*B. cereus* cepa bh11	100%
			Bacillus sp. cepa EC4	100%
			B. thuringiensis cepa 104XG46	100%
C19	FJ436019	673	*Bacillus megaterium* cepa B4	100%
			Bacillus subtilis	100%
			Bacillus flexus cepa NY-1 16S	100%
E13	FJ436017	728	*B. cereus* cepa bh11	100%
			Bacillus sp. cepa EC4	100%
			B. thuringiensis cepa 104XG46	100%

Del árbol filogenético construido a partir de las secuencias obtenidas (Fig. 18), podemos observar que se forman dos grupos; uno donde se agrupan las cepas C18 y E13 y las bacterias de las especies *B. cereus* y *B. thuringiensis*, y otro donde se encuentra la cepa C19 y las especies de *B. megaterium*, *B. subtilis* y *B. flexus*.

Dado que los resultados revelan que los porcentajes de similitud son del 100% para tres especies diferentes, no podemos determinar la identidad de las cepas hasta nivel de especie, por lo que su identificación permanecerá hasta nivel de género. Una identificación precisa de las cepas deberá incluir otro tipo de análisis tanto moleculares como fenotípicos que nos permitan ser más concluyentes en la identificación.

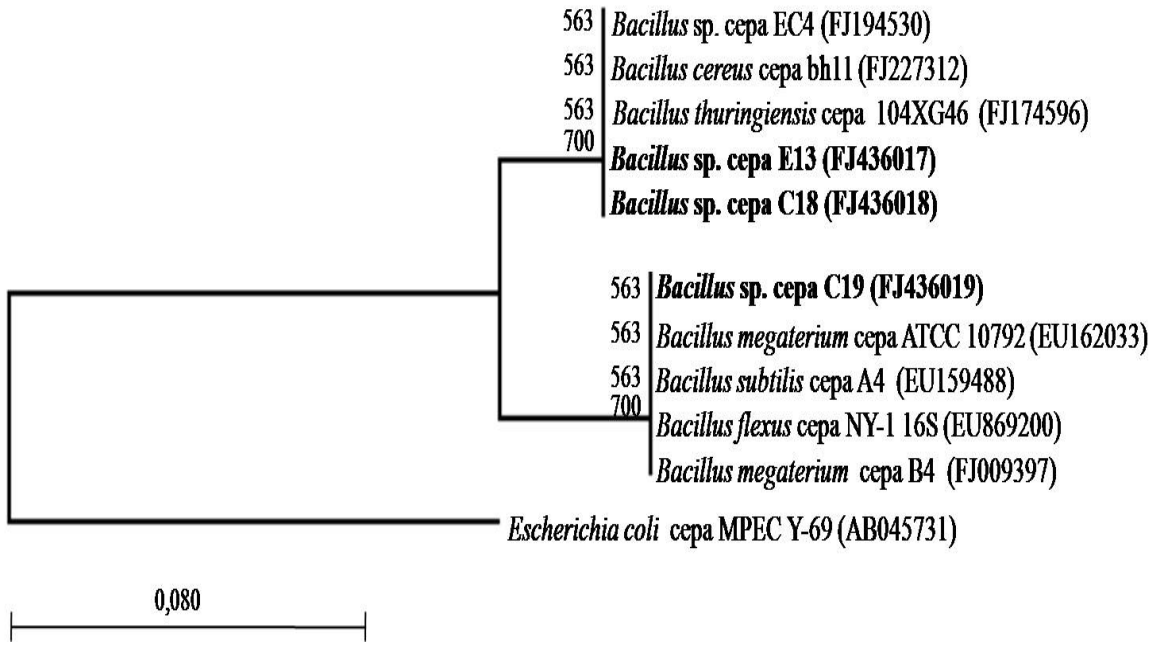

Figura 18. Árbol filogenético de secuencias de 16S ribosomal de las cepas estudiadas (negritas), derivado de un análisis por el método de distancias Neighbor-Joing (NJ) con un análisis bootstrap de 700 replicas. El alineamiento y el árbol fueron generados con el programa CLC sequence viewer versión 5. Los números entre paréntesis indican el número de acceso a la base de datos del Gene Bank. *E. coli* fue utilizada como grupo externo. La barra de escala representa el número de sustituciones.

7.2.2. Amplificación parcial del gen *phaC*

A partir de los iniciadores diseñados para la identificación del gen *phaC* para bacterias Gram positivas, obtuvimos productos de PCR de un tamaño aproximado de 600 pb (Fig. 19). Las secuencias obtenidas de estos amplicones fueron analizadas y depositadas en la base de datos del Genbank, los números de acceso se muestran en la Tabla 8.

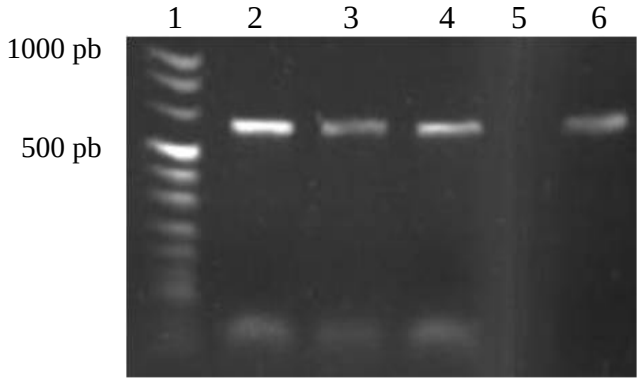

Figura 19. Gel de agarosa al al 0.8% de los productos de PCR obtenidos de la amplificación del gen *phaC* (1) Marcador de Peso Molecular VIII (Roche). (2) Cepa C18. (3) Cepa C19. (4) Cepa E13. (5) Control negativo (ADN de arquea).

El análisis de alineamiento realizado por el programa BLAST mostró que las secuencias obtenidas del gen *phaC* para las cepas C18 y E13 poseen un 98% de similitud con secuencias pertenecientes a *B. thuringiensi* y *Bacillus cereus;* mientras que para la cepa C19 se obtuvieron datos de un 95% de identidad con una secuencia correspondiente a *B. megaterium* (Tabla 8). Los valores de identidad obtenidos tanto de la secuenciación del gen *phaC* como del 16s ADNr muestran poseer altos niveles de identidad para cepas similares.

Tabla 8. Valores de identidad obtenidos del análisis BLAST y número de acceso de las secuencias parciales del gen *phaC* obtenidas en este estudio

Cepa	Clave de acceso GenBank	Tamaño de secuencia	Secuencias más parecidas	Identidad
C18	FJ436016	607	*B. thuringiensis* cepa ATCC 10792 *B. cereus* cepa ATCC 14579 *B. cereus* strain CFR06	98% 98% 98%
C19	FJ436021	609	*B. megaterium* cepa ATCC 11561	95%
E13	FJ436021	603	*B. thuringiensis* cepa ATCC 10792 *B. cereus* cepa ATCC 14579 *B. cereus* strain CFR06	98% 98% 98%

De las relaciones filogenéticas establecidas a partir de la construcción del árbol filogenético, se puede apreciar que, al poseer secuencias idénticas, las cepas C18 y E13 forman un subgrupo (Fig. 20).

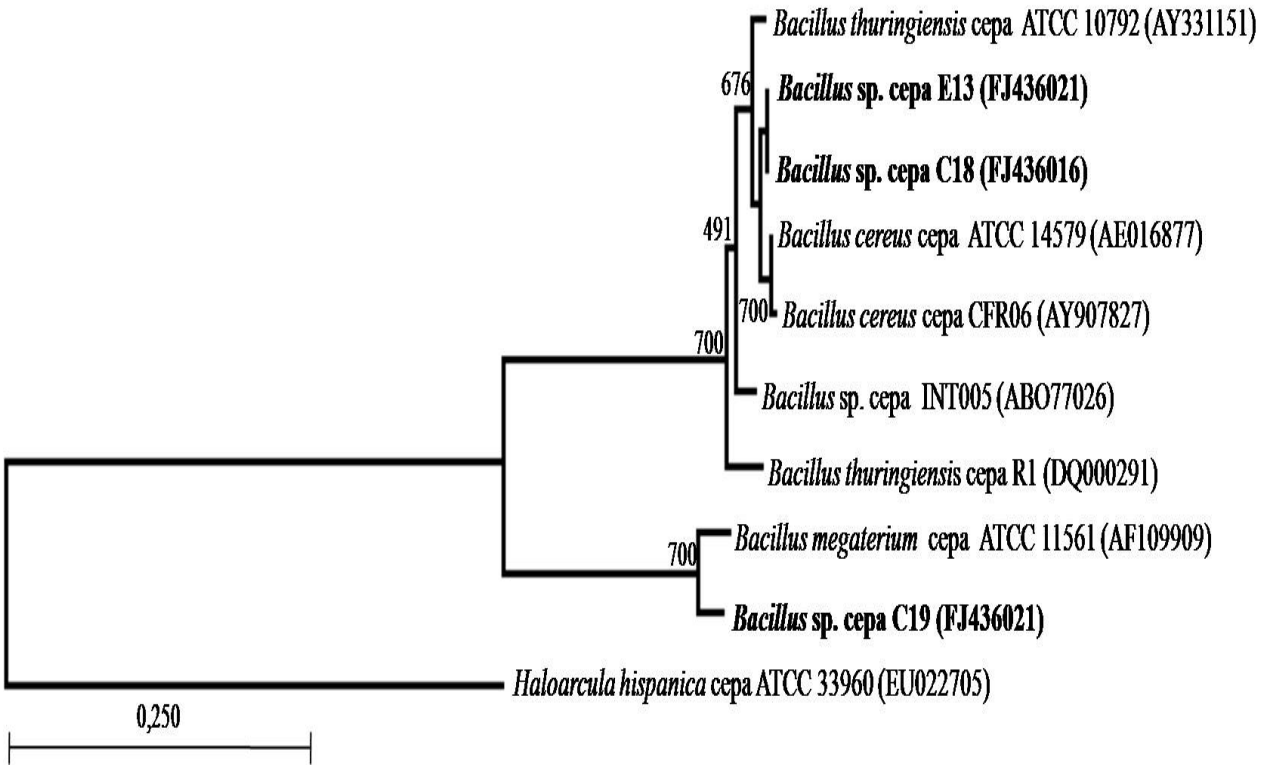

Figura 20. Árbol filogenético correspondiente a secuencias del gen *phaC* derivado de un análisis por el método de distancias Neighbor-Joing (NJ) utilizando un análisis bootstrap de 700 replicas generado por el programa CLC sequence viewer 5.1. Los números entre paréntesis indican el número de acceso a la base de datos del Gene Bank. La barra de escala representa el número de sustituciones. Se utilizó una secuencia del gen *phaC* del haloarqueon *Haloarcula hispanica* como grupo externo.

En el caso de la cepa C19 es interesante observar que para *phaC* solo hubo una secuencia en la base de datos con la cual presento similitud. Sería muy interesante obtener secuencias del gen *phaC* que pertenezcan a las bacterias que presentaron la misma identidad para el gen 16s ADNr para poder realizar un análisis más profundo sobre la filogenia de este gen.

8. DISCUSIÓN

8.1. Evaluación preliminar del efecto de la concentración de nitrógeno sobre el crecimiento

El nitrógeno es un macro nutriente fundamental para todas las formas de vida (Commichau *et al*., 2006); y en el proceso de síntesis bacteriana de PHAs. La concentración y fuente de nitrógeno es uno de los factores que más efecto tiene sobre los rendimientos en el crecimiento celular y en la producción de PHAs (Omar *et al.,* 2001).

La cepa C18 no mostró diferencias significativas en el conteo de UFC para las tres concentraciones de nitrógeno (0.1, 0.5 y 1.0 g/L de NH_4Cl). Este comportamiento mostró ser similar al reportado para *Brachymonas* sp. P12 (Shi e*t al.,* 2007), la cual no fue afectada en su crecimiento al ser sometida a cultivos con tres concentraciones de nitrógeno (0.026,0.1 y 0.26 g/L de. NH_4Cl). A su vez, la cepa E13 presentó un decremento en su crecimiento al ser sometida a una concentración baja de nitrógeno (Fig 3), sin embargo debemos considerar que el error estándar presente en los datos registrados en este caso es estadísticamente significativo, por lo que no podríamos concluir que realmente este siendo afectada por la concentración de nitrógeno. A su vez, la cepa C19 no hubo un efecto significativo por la concentración de nitrógeno usada (0.1, 0.5 y 1.0 g/L de NH_4Cl), sobre el número de UFC cuantificadas. No obstante, el número total de UFC fue superior ($1.5x10^5$) que el presentado por las cepas C18 y E13, lo cual sugiere que C19 emplea eficientemente NH_4Cl como fuente de nitrógeno. El hecho de que la cepa C19 sea capaz de mantener un buen crecimiento utilizando fuentes inorgánicas de nitrógeno le confiere una gran ventaja debido a que podrían utilizarse aguas de desecho que contengan estos compuestos nitrogenados inorgánicos en los procesos de producción de PHAs (Borah *et al*., 2002), lo cual se vería reflejado en una

disminución de los costos, ya que no se necesitaría la adición de fuentes externas de nitrógeno.

Aunque se ha descrito que las bacterias son capaces de asimilar fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno (Merrik y Edwards, 1995), se ha demostrado que existen microorganismos que presentan mayor crecimiento cuando son sometidos a fuentes orgánicas de nitrógeno como son peptona, extracto de carne y extracto de levadura, debido a la presencia de aminoácidos en dichos compuestos (Fisher, 1991).

Estudios realizados en *Bacillus mycoides* cepa RLJB-017 han reportado que el empleo de fuentes orgánicas de nitrógeno aumenta la producción de PHA, mientras que la adición de sales de amonio, como son NH_4NO_3 and NH_4Cl, promueven el crecimiento celular pero la síntesis de PHA es suprimida (Borah *et al.,* 2002). En contraste, Omar *et al.,* (2001) reportan en *B. megaterium* un aumento en la producción de PHA cuando NH_4Cl es utilizado como fuente de nitrógeno. Asimismo, Fisher (1999) menciona que la elección de los compuestos que brindan una óptima tasa de crecimiento en bacterias se encuentra regulada por un sistema global de asimilación dentro de la célula.

No obstante, que el amonio es la fuente preferida de nitrógeno de muchas bacterias, la eficiencia en el crecimiento y producción de PHAs varía dependiendo de la fuente de nitrógeno utilizada (Bormann, 1998). Bajo esta perspectiva, las rutas metabólicas encargadas de la asimilación de compuestos nitrogenados pueden estar divididas en dos clases: las que utilizan nitrógeno extracelular adquirido del medio y las rutas biosintéticas para la producción intracelular de compuestos nitrogenados (Merrick y Edwards, 1995). Sin embargo, las rutas de asimilación varían entre especies bacterianas (Doroshchuk *et al.,* 2006).

En *B. subtilis* se ha estudiado que el amonio promueve la tasa de crecimiento; asimismo la síntesis de moléculas necesarias para la utilización de otras fuentes de nitrógeno es reprimida en el crecimiento celular en presencia de amonio (Fisher, 1999). Además, comparado con crecimientos celulares utilizando otras fuentes de nitrógeno, las células que prefieren amonio contienen los más bajos niveles de glutamina sintasa (GS), enzima crítica en la asimilación del amonio (Detsch y Stülke, 2003).

El proceso de asimilación de amonio involucra la incorporación del ion amonio seguido de las síntesis de glutamina y el reciclamiento del glutamato (Merrick y Edwards, 1995). La glutamina es utilizada tanto para la síntesis de aminoácidos como para ser donadora de nitrógeno de aproximadamente un 15% de las moléculas nitrogenadas de la célula, además de estar estrechamente relacionada con el metabolismo del carbono (Wacker *et al.,* 2003).

8.1.1. Métodos de extracción de PHAs

A pesar de que se han desarrollado numerosos métodos para la extracción de PHAs, la recuperación aun sigue teniendo limitantes, las cuales genera un aumento en el costo de la producción de estos polímeros (Jacquel *et al.,* 2008). Los datos obtenidos en este estudio muestran diferencias significativas en los porcentajes de recuperación (Fig. 5); mientras que con el método de solventes fue posible recuperar 1.72 g/L de PHA; para el caso de la extracción con SDS solo hubo una recuperación de 1.00 g/L. Desde la perspectiva experimental, el método que con solventes brinda la posibilidad de emplear pequeñas cantidades de biomasa para realizar la extracción. A la fecha, los métodos que más han sido utilizados son aquellos donde se emplean solventes (Jiang *et al.,* 2006). Sin embargo, el empleo de solventes a escala industrial resulta económicamente poco viable y muy agresivo con el ambiente (Choi *et al*., 2004).

No obstante que la recuperación de PHAs empleando SDS fue menor, este método posee la ventaja de no destruir la morfología natural de los gránulos de PHAs que son muy útiles para algunas aplicaciones de estos polímeros, como la producción de fibras y films (Kim *et al.*, 2003). Además, cabe destacar que la extracción con SDS incrementa su porcentaje de recuperación mientras mayor sea la masa celular (Kim *et al.,* 2003), por lo que tal vez sería pertinente realizar nuevas pruebas de extracción incrementando los porcentajes de biomasa. Asimismo, el método de extracción con SDS posee la ventaja de no necesitar un tratamiento previo para la lisis celular, que implica un ahorro en los tiempos de recuperación.

La elección del tipo de método de recuperación a utilizar deberá de establecerse en función del uso *a posteriori* que se le quiera dar al polímero extraído. Por ejemplo; para aplicaciones médicas es necesario que el PHA recuperado se encuentre libre de toxinas que son naturalmente producidas por bacterias gran negativas, y en este caso, es conveniente el uso de solventes para la recuperación del polímero (Zinn *et al.,* 2001).

8.1.2. Evaluación de la producción de PHAs a partir de diferentes fuentes de carbono

El efecto de la fuente de carbono observado en las tres cepas (Fig.6 y 7) refleja que para el caso de la cepa C18 el crecimiento es visiblemente afectado, no solo por la fuente de carbono, sino también por la fuente de nitrógeno. Esta idea es respaldada por los datos obtenidos en el control positivo, el cual emplea una fuente orgánica de nitrógeno y presenta un mayor crecimiento celular, en comparación con los demás tratamientos que mostraron menor crecimiento utilizando una fuente inorgánica de carbono.

Es de vital importancia conocer el efecto que pueda tener la fuente y concentración de nitrógeno sobre el crecimiento de las bacterias, ya que existe una regulación por represión catabólica entre el metabolismo del nitrógeno y el del carbono dado (Fisher, 1991).

Un ejemplo de esta regulación es la glucólisis, la cual es inducida por la glucosa; sin embargo, una activación total ocurre solo si hay una buena disposición de aminoácidos (Ludwing y Stúlke, 2001). Algo similar sucede en el ciclo de Krebs, el cual está reprimido sinérgicamente por glucosa y glutamato (Rosenkrantz *et al.* ,1985; Stïlke y Hillen , 2000) Estos mecanismos de regulación podrían explicar el efecto que tuvo la fuente inorgánica de nitrógeno sobre las cepas C18 y E13, las cuales no tuvieron un buen crecimiento a pesar de disponer de una buena cantidad de fuente carbono (glucosa o sacarosa).

Es importante destacar que la regulación del carbono y del nitrógeno no solo está integrada en el control de la síntesis de aminoácidos y en el metabolismo del carbono: el metabolismo central de las bacterias está sujeto a una regulación dual derivada de señales del carbono-nitrógeno (Commichau *et al.,* 2006). Como claro ejemplo tenemos el ciclo de los ácidos tricarboxilicos (TCA), el cual está directamente involucrado en la síntesis de PHAs (Steinbüchel y Füchtenbusch, 1998). En este ciclo, el metabolismo del nitrógeno y del carbono están conectados por la formación de glutamato a partir del oxoglutarato, una de los intermediarios clave en el ciclo de los ácidos tricarboxilicos.

Por otra parte, el crecimiento en la cepa C19 no se vio significativamente afectado. Aunque hubo una disminución en la densidad óptica para los tratamientos MBMS y MBMG, el tiempo de generación fue menor (t_g=1.96) para el tratamiento MBMG con respecto al control positivo, lo que refleja una buena aceptación de este medio por parte de la cepa. Estos datos

obtenidos son muy interesantes y sugieren que el tratamiento MBMG podría utilizarse como medio de cultivo para incrementar la producción de PHA.

En la síntesis de PHA, la fuente de carbono presente en el medio es utilizada en tres diferentes funciones: 1) síntesis de biomasa 2) fuente de energía para la supervivencia celular y 3) materia prima para la polimerización de PHAs (Labuzek y Radecka, 2001). Cuando en el medio se presenta una mezcla de fuentes de carbono, las bacterias utilizan preferentemente aquella fuente de carbono en función del sistema enzimático que posean. Para la mayoría de las bacterias, incluyendo al género *Bacillus*, la fuente de carbono predilecta es la glucosa (Fisher, 1991).

En este sentido, la fuente de carbono y nitrógeno juegan un papel primordial en la producción de PHAs, debido a que son factores que dependiendo de sus concentraciones, activan la producción del polímero. Se ha reportado que las bacterias productoras de PHAs pueden dividirse en dos grupos principales (Lee, 1996., Khana y Srivastava, 2005):

1) Bacterias que requieren la limitación de algún nutrimento esencial como puede ser nitrógeno, fósforo, magnesio o azufre aunado a un exceso en la fuente de carbono

2) Bacterias que no necesitan una limitación en los nutrimentos esenciales para la producción de PHAs.

La estrategia de síntesis depende de la cepa seleccionada así como del tipo de sustrato utilizado (Babel, 2001). Claramente podemos identificar que la cepa C18 y E13 pertenecen al grupo número uno, que requieren de las limitaciones de factores de crecimiento, mientras que la cepa C19 corresponde al grupo número dos que no requieren de limitaciones. Además, es posible identificar que las tres cepas estudiadas producen PHA durante la fase

estacionaria, similar al comportamiento presentado por *R. eutropha* (Taguchi *et al.,* 2001). A su vez, la disminución en la acumulación de PHA que se observa para la cepa C19 después de 48 h de incubación (Fig. 14, 15 y 16), puede atribuirse al consumo como fuente de carbono y energía del PHA acumulado (Braunegg *et al.,* 1998), por lo que la extracción de PHA debe realizarse antes de este periodo.

Las cepa C18 y C19 fueron aisladas de un sitio donde las concentraciones de nutrimentos eran un tanto limitadas, mientras que la cepa E13 fue aislada de un sitio que presentaba relativos niveles de eutrofización (López-Cortés *et al.,* 2008); sin embargo es evidente que poseen capacidades de adaptación muy diferentes que se ven reflejadas en la producción de PHAs. Se ha demostrado que el crecimiento microbiano en los ambientes naturales es limitado y los microorganismos usualmente están expuestos a una carencia de nutrimentos que los hace desarrollar características adaptativas (Harder y Dijkhuizen, 1983), entre las que destacan la producción de polímeros de reserva.

En los procesos de producción de PHAs, el tipo de estrategia desarrollada por los microorganismos es muy importante; Aldor (2003) menciona que una de las principales limitantes de la producción masiva de PHAs (usualmente realizada por *R. eutropha)* son las condiciones especiales requeridas para la síntesis, que regularmente deben ser con un desequilibrio en las concentraciones de los nutrimentos lo que ocasiona que el crecimiento sea muy lento. Nuestros resultados muestran que la cepa C19 a pesar de producir PHAs bajo estas condiciones, su crecimiento no se ve significativamente retardado (Fig 14-16) y en contraste, la producción de PHAs aumenta.

Aunque las cepas C18 y E13 no mostraron una respuesta positiva a los tratamientos evaluados (fuentes de carbono y nitrógeno) sería interesante estudiar la producción de PHAs

utilizando otras fuentes de carbono y limitando otros nutrimentos esenciales como son el fósforo y el magnesio que se ha demostrado contribuyen al aumento de la producción de PHA en otras cepas de *B. cereus* (Halami, 2008; Valappil *et al.,* 2008). Los datos obtenidos para las tres cepas exhiben diferentes estrategias de producción de PHAs que pueden ser explotadas para diferentes regímenes de cultivo. Del mismo modo, los porcentajes de producción presentados por las cepas, C18, C19 y E13 es competitivo con respecto a los reportados por otras cepas de *Bacillus* (Yilmaz *et al.,* 2005).

8.2. Análisis moleculares

8.2.1. Amplificación del 16S ADNr

Los alineamientos realizados con las secuencias obtenidas del 16S ADNr para la cepa C19 mostraron una identidad de 100% con *B. megaterium*, *B. flexus* y *B. subtilis*. Sin embargo, las características fenotípicas observadas y reportadas en la literatura como son: a) tamaño de la célula b) morfología colonial c) producción de PHB (Brenner *et al.,* 2005), nos hacen descartar que se trate de las especies *B. flexus* y *B. subtilis,* por lo que la cepa C19 se sugiere puede ser identificada como *B. megaterium*.

A su vez, las cepas C18 y E13 presentaron porcentajes de identidad del 100% para *B. cereus* y *B. thuringiensis*. Actualmente, la secuenciación del 16S ADNr reporta ser una de las herramientas más útiles para la identificación en procariontes (Gevers *et al.,* 2005) ya que en las especies bacterianas, la conservación de la secuencia del 16S ADNr es de 99%, lo que permite marcar límites entre grupos fenotípicos y entre especies (Medini *et al.,* 2008); sin embargo, se ha reportado que existen excepciones en este concepto que incluyen algunas

especies del género *Bacillus* como son *B. cereus, B. thuringiensis* y *B. anthracis*, las cuales solo difieren en 8 bases (posiciones 1,2,3,4,6 y 12) dentro de su genoma (Sacchi *et al.,* 2002). Fenotípicamente y genotípicamente *B. cereus* y *B. thuringiensis* pueden ser diferenciados por la presencia de la proteína-cristal CRY, cuyos genes se encuentran codificados en un plásmido en *B. thuringiensis*; pero si el plásmido es perdido, *B. thuringiensis* no podría ser distinguido de *B. cereus* (Ash *et al*., 1991). Dadas sus características fenotípicas y genotípicas, algunos autores sugieren que *B. thuringiensis* es una sub especie de *B. cereus* (Logan y Berkeley, 1984; Jensen *et al.,* 2003; Rasko *et al.,* 2005). Aunque se han evaluado estrategias moleculares para la distinción entre estas dos especies, aún existen dificultades para su identificación; actualmente la única estrategia parcialmente efectiva es la detección de la proteína-cristal producida por *B. thuringiensis* (Chen y Tsen, 2002). Para el caso de este trabajo, se recomienda la identificación del cuerpo paraesporal por medio de microscopía de transmisión electrónica (TEM).

8.2.2. Amplificación parcial del gen phaC

Los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *phaC* mostraron efectividad en bacterias Gram positivas. Fue posible obtener productos de PCR de un tamaño aproximado de 600 pares de bases que corresponden a un fragmento del gen *phaC* con un mayor número de adenina-timina.

Las cepas estudiadas habían sido anteriormente reportadas como productoras de PHA basadas en tinciones lipofílicas (López-Cortés *et al., 2008*); sin embargo este tipo de tinciones han reportado no discriminar entre otros cuerpos lipídicos (Shamala, *et al.,* 2003, Sheu *et al., 2000*), por lo que la identificación del gen *phaC* en estas cepas confirma su capacidad de producir PHAs. La identidad de las secuencias obtenidas del gen *phaC*

mostraron congruencia con los datos de las secuencias del 16S ADNr, para la cepa C18 y E13 un porcentaje del 98% de similitud con cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus*. Con respecto a la cepa C19 presentó un 95% de similitud solo para *B. megaterium.*

En el árbol filogenético del gen *phaC* (Fig. 20) podemos observar que las secuencias de este gen para las cepas C18 y E13 son idénticas por lo que forman un grupo; en cambio, la cepa C19 no se agrupa con ellas, evidenciando la diferencia entre sus secuencias a pesar de que las tres cepas pertenecen al género *Bacillus.* Recientemente, Valappil *et a.,* (2008) reportó que secuencias obtenidas del gen *phaC* de *B. cereus cepa* SPV son diferentes a las reportadas para *B. megaterium* por McCool y Cannon (2001) pero muy similares a secuencias reportadas para otras cepas de *B. cereus.* Estos datos contrastan con los encontrados por Shamala *et al.,* (2003) quienes realizaron una selección y aislamiento de cepas de *Bacillus* en suelos utilizando cebadoras diseñados a partir de *B. megaterium,* encontrando que en cepas de *B. sphaericus*, *B. circulans*, *B. brevis* y *B. licheniformis* la secuencia del gen *phaC* es universal para cepas del género *Bacillus.*

Kadouri *et al.,* (2005) sugieren que las relaciones filogenéticas de 16S ADNr y del gen *phaC* son coherentes entre así, además el gen *phaC* aparenta ser altamente conservado y estar ampliamente distribuido en el dominio *Bacteria*, como resultado de que el metabolismo del PHA es un característica esencial de muchas bacterias en el ambiente que les brinda un ventaja ecológica. A su vez, Kalia *et al.* (2007) plantea que en algunos casos, los agrupamientos formados por análisis filogenéticos no son consistentes entre secuencias del 16S ADNr y el gen *phaC*, debido a que la transferencia horizontal de genes es el proceso por el cual la ruta síntesis de PHA es ampliamente distribuida en el dominio *Bacteria.*

En general, el estudio de la secuencias del genoma de bacterias productoras de PHAs proveen fundamentos para la optimización de los procesos de producción y para el desarrollo de estrategias de ingeniería metabólica que sirven para el mejoramiento de las propiedades de los PHAs (Lee, 2006). Es importante considerar que la producción de PHAs es un mecanismo celular complicado y su regulación está estrechamente relacionada con otros procesos metabólicos de la célula (Raberg *et al.,* 2008). Aun nos hace falta conocer *sensu stricto* el comportamiento de este proceso, la regulación del metabolismo de PHAs aun no está descrita en su totalidad y todavía existen huecos en el conocimiento de este proceso que no permiten que la producción a gran escala se lleve de manera más amplia.

En este estudio se evaluó la capacidad de producción de PHAs por tres cepas de *Bacillus* aisladas de ambientes marinos bajo diferentes condiciones. A la fecha, no había reportes de cepas productoras de PHAs del género *Bacillus* de origen marino, por lo que es necesario analizar y complementar los estudios realizados. Actualmente, existe un creciente interés en el estudio de cepas de *Bacillus* productoras de PHAs debido a la capacidad de sintetizar co-polímeros a partir de diferentes sustratos (Valappil *et al.,* 2007a; Valappil *et al.,* 2008). En este sentido es importante mencionar que estas cepas han mostrado características interesantes que pueden ser explotadas para el desarrollo de procesos de producción de PHAs a gran escala.

9. CONCLUSIONES

- Este es el primer reporte de cepas productoras de PHAs del género *Bacillus* de origen marino. Estudios sobre la producción de PHAs con miembros del género *Bacillus* han sido realizados en su totalidad con cepas procedentes de suelos naturales y agrícolas, tal es el caso de cepas de las especies *B. thuringiensis* y *B. cereus.*

- Se observó que la producción de PHA en las cepas C18 y E13 no requiere condiciones limitadas de nitrógeno, además de exhibir una preferencia en el empleo de fuentes orgánicas de nitrógeno.

- La cepa C19 mostró capacidad para producir PHAs utilizando fuentes de nitrógeno inorgánicas, así como diferentes fuentes de carbono con buenos rendimientos de producción. El comportamiento observado en esta cepa indica que la producción de PHAs se ve incrementada bajo concentraciones mínimas de nitrógeno.

- El método de extracción empleando solventes mostró ser más efectivo en la recuperación de PHAs, sin embargo sería pertinente evaluar otros métodos de extracción publicados en la literatura. Se recomienda emplear otros métodos de cuantificación de PHAs distintos a aquel en el que se genera ácido crotónico, ya que sobre estima la producción de PHAs.

- Para las cepas C18 y E13 las secuencias del 16s ADNr no resolvieron la identificación a nivel de especie, debido a la complejidad de establecer diferencias entra las especies de *B. cereus* y *B. thuringiensis*. Será conveniente realizar un estudio formal de taxonomía que en primera instancia, incluya la detección del cristal

parasporal diagnóstico de *B. thuringiensis* lo que permitiría establecer su asignación taxonómica, de no ser así otras aproximaciones como comparación de patrones de bandas que resultan del corte del ADN con ayuda de enzimas de restricción así como hibridación ADN-ADN deberán ser empleadas.

- Con base a la secuenciación de 16S ADNr y las dimensiones celulares, se sugiere que la cepa C19 debe asignarse a la especie *B. megaterium*.
- Se logro la detección de *phaC* en las tres cepas estudiadas C18, C19 y E13. Las secuencias obtenidas presentaron valores de similiutd de 98%, 98% y 95% respectivamente con las reportadas en la literatura para otras cepas del género *Bacillus.*
- Para estudios ulteriores se recomienda que las cosechas de biomasa de las tres cepas estudiadas se realice entre las 44 y 46 h de incubación para evitar que la bacteria inicie un auto consumo de los PHAs sintetizados.

10. RECOMENDACIONES

Investigaciones sobre la producción de PHAs deben continuar debido al creciente interés en su comercialización, por lo que se recomienda realizar estudios paralelos para la caracterización química y física de los polímeros extraídos, así como la valoración de nuevos sustratos. Estos estudios permitirán establecer un mejor manejo de los microorganismos y la posibilidad de optimizar procesos biotecnológicos a gran escala que permitan un aumento en la producción de PHAs.

11. REFERENCIAS

- Anderson AJ & Dawes EA (1990) Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Review* **54**: 450-472.
- Aldor IS & Keaslingy JD (2003) Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Current Opinion in Biotechnology* **14**: 475-483.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S & Collins MD (1991) Phylogenetic heterogeneity of the *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. *Letters of Applied Microbiology* **13**: 202-206.
- Ashby RD & Foglia TA (1998) Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates. *Applied Microbiology Biotechnology* **49**: 431-437.
- Babel W, Ackermann J-U & Breuer U (2001) Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **71**: 125-157.
- Bhatt R, Shah D, Patel KC & Trivedi U (2008) PHA–rubber blends: Synthesis, characterization and biodegradation. *Bioresource Technology* **99**: 4615-4620.
- Borah B, Thakur PS & Nigam JN (2002) The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-hydroxybutyrate. *Journal of Applied Microbiology* **92**: 776-783.

- Bormann EJ, Leiûner M & Beer B (1998) Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by Azotobacter beijerinckii from organic nitrogen substrates. *Applied Microbiology Biotechnology* **49**: 84-88.
- Bradshaw, L.J. (1979). Laboratory Microbiology 3rd Ed. Saunders. USA. 338 p.
- Braunegg G, Lefebvre G & Genser KF (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology* **65**: 127-161.
- Braunegg G, Bona R & Koller M (2004) Sustainable Polymer Production. *Polymer Plastics Technology and Engineering* **43**: 1779-1793.
- Brenner D., Krieg N., Garrity G., Stakey J., Boone D., Vos P., Goodfellow M.,Rainey F. y Schleifer K. 2005[a]. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3: The Gram Positive Bacteria with low G+C. Springer. 2da Edición. New York. 1118-1119.
- Carrasco F, Dionisi D, Martinelli A & Majone M (2006) Thermal Stability of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Polymer Science* **100**: 2111-2121.
- Chen ML & Tsen HY (2002) Discrimination of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *Journal of Applied Microbiology* **92**: 912-919.
- Chien C, Chen C, Choi M, S.Kung & Wei Y (2007) Production of poly-hydroxybutyrate (PHB) by Vibrio spp. isolated from marine environment. *Journal of Biotechnology* **132**: 259–263.
- Choi GG, Kim HW & Rhee YH (2004) Enzymatic and Non-enzymatic Degradation of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Copolyesters Produced by Alcaligenes sp. MT-16. *The Journal of Microbiology* **42**: 346-352.
- Commichau FM, Forchhammer K & Stülke J (2006) Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 167-172.
- Conte E, V.Catara, Greco S*, et al.* (2006) Regulation of polyhydroxyalkanoate synthases (*phaC*1 and *phaC*2) gene expression in Pseudomonas corrugata. *Applied of Microbiology Biotechnology* **72**: 1054-1062.
- Doroshchuk NA, Gelfand MS & Rodionov DA (2006) Regulation of Nitrogen Metabolism in Gram-Positive Bacteria. *Molecular Biology* **40**: 829-836.

- Dunlop, W. F., and A. W. Robards. 1973. Ultrastructural Study of Poly-β-hydroxybutyrate Granules from *Bacillus cereus*. In: Inner Structures of Bacteria. Iterson, W (ed.).Scientific and Academic Editions. USA. 105 p.
- Fisher SH (1991) Control of Carbon and Nitrogen Metabolisn in *Bacillus subtilis*. *Annual Reviews of Microbiology* **45**: 107-103.
- Fisher SH (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! *Molecular Microbiology* **32**: 223-232.
- Gavrilescua M & Chisti Y (2005) Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances* **23**: 471–499.
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG*, et al.* (2005) Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 733-739.
- Giovannoni S (1991) *The Polimerase Chain Reaction. En: Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*. Jhon Wiley & Sons Ltd, New York.
- González-García Y, Nungaray J, Córdova J, González-Reynoso O, M.Koller, Atlic A & Braunegg G (2008) Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates in the polysaccharide-degrading marine bacterium *Saccharophagus degradans* ATCC 43961. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* **35**: 629–633.
- Gross RA & Kalra B (2002) Biodegradable Polymers for the Environment. *Science* **297**: 803-807.
- Gunaratne LMWK & Shanks RA (2005) Melting and thermal history of poly(hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate) using step-scan DSC. *Thermochimica Acta* **430**: 183-190.
- Halami PM (2008) Production of polyhydroxyalkanoate from starch by the native isolate Bacillus cereus CFR06. *World J Microbiol Biotechnol* **24**: 805-812.
- Harder W & Dijkhuizen L (1983) Physiological responses to nutrient limitation. *Annual Reviews of Microbiology* **37**: 1-23.
- Jacquel N, Lob C-W, Wei Y-H, Wu H-S & S.Wang S (2008) Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal* **38**: 15-27.
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J & Mahillon J (2003) The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* **8**: 631-640.

- Jiang X, Ramsay JA & Ramsay BA (2006) Acetone extraction of mcl-PHA from Pseudomonas putida KT2440. *Journal of Microbiological Methods* **67**: 212-219.
- Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y & Castro-Sowinski S (2005) Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology* **31**: 55-67.
- Kalia VC, Lal S & Cheema S (2007) Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: Horizontal gene transfer. *Gene* **389**: 19–26.
- Kessler B & Witholt B (2001) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology* **86**: 97-104.
- Khanna S & Srivastava AK (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* **40**: 607–619.
- Kim YB & Lenz RW (2001) Polyesters from Microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **71**: 51-79.
- Kim M, Cho K-S, Ryu HW, Lee E & Chang YK (2003.) Recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from high cell density culture of Ralstonia eutropha by direct addition of sodium dodecyl sulfate. *Biotechnology Letters* **25**: 55–59.
- Kim DY, Kim HW, Chung MG & Rhee YH (2007) Biosynthesis, Modification, and Biodegradation of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. *The Journal of Microbiology* **45**: 87-97.
- Kominek LA & Halvorson H (1965) Metabolism of Poly 3-Hydroxybutyrate and Acetoin in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **90**: 1251-1259.
- Kyuwa S.H, K, Takasu M & Shimizu K (2001) Temperature-induced expression of PHB genes in *Escherichia coli* and the effect of temperature patterns on the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**: 21-26.
- Labuzek S & Radecka I (2001) Biosynthesis of PHB tercopolymer by Bacillus cereus UW85. *Journal of Applied Microbiology* **90**: 353-357
- Lanz-Landazúri, A. 2006. Bioprospección y Aislamiento de bacterias productoras de PHB de un tapete microbiana. Tesis de Maestria

- Law JH & Slepecky RA (1961) Assay of Poly-β-hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology* **82**: 33-36.
- Law K, Chan P, Lau W*, et al.* (2004) Construction of Recombinant Escherichia coli Strains for Production of Poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **113**: 361–372.
- Lee SY (1995) Bacterial PHASs. *Biochemical Bioengineering* **49**:1-14.
- Lee JC & Han S (1998) Cloning of the Alcaligenes latus polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4807-4903.
- Lee SY (2006) Deciphering bioplastic production. *Nature Biotechnology* **24** 1227-1229.
- Lemoigne M (1926). Produits de d6shydration et de polymerization de l'acid B-oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim Biol.* **8**: 770-782.
- Li R, Zhang H & Qi Q (2007) The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant Escherichia coli. *Bioresource Technology* **98**: 2313-2320.
- Logan NA & Berkeley RC (1984) Identication of *Bacillus strains* using API system *Journal of General Microbiology* **130**: 1871-1882.
- López-Cortés A, Lanz-Landazuri A & García-Maldonado J (2008) Screening and Isolation of PHB-Producing Bacteria in a Polluted Marine Microbial Mat. Microbial Ecology. **56**:112–120.
- Ludwig H & Stülke J (2001) The Bacillus subtilis catabolite control protein CcpA exerts all its regulatory functions by DNA-binding. *FEMS Microbiology Letters* **203**: 125-129.
- Luengo JM, García B, Sandoval A, G.Naharro & Olivera_ ER (2003) Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 251-260.
- Madison LL & Huisman GW (1999) Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **63**: 21-53.

- McCool GJ & Cannon MC (2001) *PhaC* and PhaR Are Required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase Activity in Bacillus megaterium. *Journal of Bacteriology* **183**: 4235–4243.
- Medini D, Serruto D, Parkhill J*, et al.* (2008) Microbiology in the post-genomic era. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 419-430.
- Mergaert J, Webb A, Aderson C, Wouters A & Swings J (1993) Microbial Degradation of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate) in Soils. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3233-3238.
- Merrick MJ & Edwards RA (1995) Nitrogen Control in Bacteria. *Microbial Reviews* **59**: 604–622.
- Nakata HM (1966) Role of Acetate in Sporogenesis of Bacillus cereus. *Journal of Bacteriology* **91**: 784-788.
- Olivera E, Carnicero D, Jodra R*, et al.* (2001) Genetically engineered Pseudomonas: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environmental Microbiology* **3**: 612-618.
- Omar S, Rayes A, Eqaab A & Steinbüchel A (2001) Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. *Biotechnology Letters* **23**: 1119-1123.
- Padermshoke A, Katsumoto Y, Sato H, Ekgasit S, Nodad I & Ozaki Y (2005) Melting behavior of poly(3-hydroxybutyrate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Spectrochimica Acta* **61**: 541-550.
- Patnaik PR (2005) Perspectives in the Modelingand Optimization of PHB Production by Pure and Mixed Cultures. *Critical Reviews in Biotechnology* **25**: 153-171.
- Pham TH, Webb JS & Rehm BHA (2004) The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by Pseudomonas aeruginosa in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. *Microbiology* **150**: 3405-3413.
- Pötter M & Steinbüchel A (2006) Biogenesis and Structure of Polyhydroxyalkanoate Granules. *Microbiology Monographs* **1**: 109-136.
- Prieto M (2007) From Oil to Bioplastics, a Dream Come True? *Journal of Bacteriology* **189**: 289-290.

- Raberg M, Reinecke F, Reichelt R*, et al.* (2008) *Ralstonia eutropha* H16 changes flagellation according to nutrient supply and state of poly(3-hydroxybutyrate) accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* doi:10.1128/AEM.00440-08.
- Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dude B, Bataille P & Ramsay JA (1990) Production of Poly-(P-Hydroxybutyric-Co-3-Hydroxyvaleric) Acids. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 2093-2098
- Rasko DA, Altherr MR, Han CS & Ravel J (2005) Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 303-329.
- Rawte T & Mavinkurve S (2002) Characterization of polyhydroxy alkanoates – Biodegradable plastics from marine bacteria. *Current Science* **83**: 562-564.
- Reddy CSK, Ghai R, Rashmi & Kalia VC (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* **87**:137–146.
- Rehm BHA & Steinbüchel A (1999) Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* **25** 3-19.
- Rehm BHA (2006) Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnology Letters* **28**: 207-213.
- Rosenkrantz MS, Dingman DW & Sonenshein AL (1985) *Bacillus subtilis* citB Gene Is Regulated Synergistically by Glucose and Glutamine. *Journal of Bacteriology* **164**: 155-164.
- Rothermich M, Guerrero R, Lenz R & Goodwin S (2000) Characterization, Seasonal Occurrence, and Diel Fluctuation of Poly(hydroxyalkanoate) in Photosynthetic Microbial Mats. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4279–4291.
- Taguchi S, Maehara A, Takase K, M. Nakahara, Nakamura H & Doi Y (2001) Analysis of mutational efects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system. *Microbiology Letters* **128**: 65-71.
- Tsz-Chun, M, Chan PL, Lawford H, Chua H, Lo WH & Yu PH (2005) Microbial Synthesis and Characterization of Physiochemical Properties of

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) Produced by Bacteria Isolated from Activated Sludge Obtained from the Municipal Wastewater Works in Hong Kong. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **22**: 731-740.

- Sacchi CT, Whitney AM, Mayer LW*, et al.* (2002) Sequencing of 16S rRNA Gene: A Rapid Tool for Identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 1117-1123.
- Shamala TR, Chandrashekar A, Vijayendra SVN & Kshama L (2003) Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing Bacillus spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Applied Microbiology* **94**: 369-374.
- Sheu D, Y. Wang & Lee C (2000) Rapid detection of polyhydroxyalkanoate accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology* **146**: 2019–2025.
- Shi H, Lee C & Ma W (2007) Influence of electron acceptor, carbon, nitrogen, and phosphorus on polyhydroxyalkanoate (PHA) production by *Brachymonas* sp. P12. *World Journal of Microbiol Biotechnology* **23**: 625–632.
- Slock JA & Sthaly DP (1974) Polysaccharide That May Serve as a Carbon and Energy Storage Compound for Sporulation in *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology* **120**: 399-406.
- Steinbüchel A & Füchtenbusch B (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology* **16**: 419-427.
- Steinbüchel A & Hein S (2001) Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **71**: 81-123.
- Steinbüchel A (2001) Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecules Bioscience* **1**: 1-24.
- Stülke J & Hillen W (2000) Regulation of Carbon Catabolism in *Bacillis* species. *Annual Reviews of Microbiology* **54**: 849–880.

- Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M & Shah S (2007) Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants — A review. *Biotechnology Advances* **25** 148–175.
- Trotsenko YA & Belova LL (2000) Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrateco-3-Hydroxyvalerate) and Its Regulation in Bacteria. *Microbiology* **69**: 635-645.
- Tsuge T (2002) Metabolic Improvements and Use of Inexpensive Carbon Sources in Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**: 579-584.
- Valappil SP, Boccaccini AR, Bucke C & Roy I (2007a) Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* **91**: 1-17.
- Valappil SP, Peiris D, Langley GJ, Herniman JM, Boccaccini AR, Bucke C & Roy I (2007b) Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. *Journal of Biotechnology* **127**: 475-487.
- Valappil SP, Rai R, Bucke C & Roy I (2008) Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *Journal of Applied Microbiology* **104** 1624–1635.
- Verlinden RAJ, Hill DJ, Kenward MA, Williams CD & Radecka I (2007) Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 1437–1449.
- Wacker I, Ludwig H, Reif I, Blencke HM, Detsch C & Stülke J (2003) The regulatory link between carbon and nitrogen metabolism in Bacillus subtilis: regulation of the gltAB operon by the catabolite control protein CcpA. *Microbiology* **149**: 3001–3009.
- Wang F & Lee SY (1997) Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivityand High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of Alcaligenes latus under Nitrogen Limitation. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3703-3706.

- Yamane T (1993) Yield of Poly-D(-)3-hydroxybutyrate from varios carbon sources: a theorical study. *Biotechnology Bioengeering* **41**: 167-170.
- Yilmaz M, Soran H & Beyatli Y (2005) Determination of poly-b-hydroxybutyrate (PHB) production by some *Bacillus* spp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **21**: 565-566.
- Yu J (2001) Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. *Journal of Biotechnology* **86**: 105-112.
- Zinn M, Witholt B & Eglia T (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews* **53**: 5-21.