



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DE DESECHOS MARINOS COMO
SISTRATO DE BAJO COSTO PARA
LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA BACTERIANA Y
POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS)**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

Presenta

Juan Pablo Molina Viramontes

La Paz, Baja California Sur, diciembre 2016.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 23 del Mes de Noviembre del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

- "Evaluación de desechos marinos como sustrato de bajo costo para la producción de biomasa bacteriana y polihidroxicanoatos (PHAs)"

Presentada por el alumno:

Juan Pablo Molina Viramontes

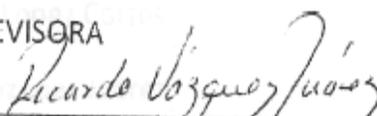
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología.

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.

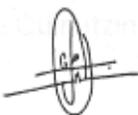


Dr. Alejandro López Cortés
Director de Tesis

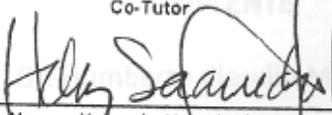
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Co-Tutor



Dr. José Quinatzin García Maldonado
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Alejandro López Cortés

Director de tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Co-tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. José Quinatzin García Maldonado

Co-tutor

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mérida.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Alejandro López Cortés

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. José Quinatzin García Maldonado

JURADO DE EXAMEN

Dr. Alejandro López Cortés

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Dr. José Quinatzin García Maldonado

SUPLENTE

Dr. Humberto Claudio Mejía Ruíz

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres sintetizados y acumulados por diversos microorganismos como reserva de carbono y energía. Estos biopolímeros muestran propiedades similares a plásticos de origen petroquímico con las ventajas de ser biodegradables, biocompatibles y producirse a partir de fuentes de carbono renovables. La limitante de esta tecnología radica en que la producción de PHAs tiene altos costos de producción. Esta investigación exploró el potencial de dos desechos alimenticios marinos como sustrato de bajo costo para la generación de biomasa bacteriana y para la producción de PHAs. Los resultados mostraron que el efluente de una enlatadora de atún y sardina de grupo Pando no fue útil para soportar el crecimiento bacteriano ni para la producción de PHAs debido a su bajo contenido nutricional (0.022 %). No obstante, los caldos de desechos de almeja chocolata (*Megapitaria squalida*), tuvieron un contenido de materia orgánica de 1.2 % por lo que resultaron eficientes para la producción de biomasa bacteriana y con potencial para estimular la producción de PHAs en cultivos de *Vibrio* sp. cepa Y01A1, bacteria productora de PHA aislada de este mismo desecho. La cepa Y01A1 tuvo una velocidad de crecimiento (K) de 0.5318 h^{-1} alcanzando una absorbancia de 1.79 (D.O. = 660 nm) a las 24 horas en un medio enriquecido con glucosa, mientras que *Paracoccus seriniphilus* cepa E71 tuvo una velocidad máxima de crecimiento de 0.4647 h^{-1} y una absorbancia de 1.72 a las 24 horas. En el medio elaborado con desecho de almeja chocolata (medio CAC), la cepa Y01A1 tuvo una velocidad máxima de crecimiento de 0.3019 h^{-1} y alcanzó una absorbancia de 1.93 en 74 horas y de 1.79 en 48 horas en el mismo medio con adición de pulsos de CAC° (medio CAC sin extracto de levadura). La cuantificación espectrofotométrica indirecta del poli-3-hidroxibutirato (PHB) a partir de ácido *trans*-2-butenóico (ácido crotónico) mostró valores de $2.23 (\pm 0.49) \text{ mg mL}^{-1}$ a las 72 horas y $2.9 (\pm 0.5) \text{ mg mL}^{-1}$ a las 144 horas de cosecha sin diferencias estadísticas significativas ($P < 0.1$) en un sistema de producción de dos etapas con glucosa como fuente de carbono y con limitación de nitrógeno. En el medio CAC sin pulsos, los valores de PHB fueron de $2.20 (\pm 1.3) \text{ mg mL}^{-1}$ y de $3.02 (\pm 1.01) \text{ mg mL}^{-1}$ en el cultivo con pulsos sin diferencias estadísticas significativas ($P < 0.1$). Debido a su rápido crecimiento, capacidad de acumular PHAs y capacidad de utilizar un sustrato complejo proveniente de desechos alimenticios marinos, *Vibrio* sp. cepa Y01A1 es un microorganismo prometedor para la producción de PHAs; sin embargo, se requieren mayores estudios y la optimización del proceso.

Palabras clave: bioplástico, polihidroxicanoatos, biomasa, desechos marinos, *Vibrio* sp.

Vo. Bo.

Dr. Alejandro López Cortés

Summary

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters synthesized and accumulated by diverse microorganisms for carbon and energy storage. These biopolymers show properties similar to plastics of petrochemical origin, with the advantages of being biodegradable, biocompatible, and produced from renewable carbon sources. The limitation of this technology is that producing PHA has high production costs. Our research explored the potential of two marine food wastes as low cost substrate for the generation of bacterial biomass and producing PHA. The results show that the tuna and sardine canning effluent from “Grupo Pando” was not useful to support bacterial growth or for the production of PHAs due to its low nutritional content (0.022 %). The chocolata clam (*Megapitaria squalida*) waste broths had an organic content of 1.2 %, was effective for producing bacterial biomass, and showed potential to stimulate production of PHAs in cultures of *Vibrio* sp. strain Y01A1, a PHA-producing bacterium isolated from this same waste. Strain Y01A1 had a growth speed (K) of 0.5318 h^{-1} , reaching an absorbance of 1.79 (O.D. = 660 nm) in 24 h in a medium supplemented with glucose, while *Paracoccus seriniphilus* strain E71 had a maximum growth speed of 0.4647 h^{-1} and an absorbance of 1.72 at 24 h. In the medium made with the chocolata clam waste (medium CAC), strain Y01A1 had a maximum growth rate of 0.3019 h^{-1} and reached an absorbance of 1.93 at 74 h and 1.79 at 48 h in the same medium with CAC° (CAC medium without yeast extract) pulses. The indirect spectrophotometric quantification of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) from trans-2-butenic acid (crotonic acid) showed values of $2.23 (\pm 0.49) \text{ mg mL}^{-1}$ at 72 h and $2.9 (\pm 0.5) \text{ mg mL}^{-1}$ at 144 h after harvest, with no statistically significant differences between treatments ($P < 0.1$) in a two-stage production system with glucose as carbon source and nitrogen limitation. In CAC medium without pulses, PHB values were $2.20 (\pm 1.3) \text{ mg mL}^{-1}$ and $3.02 (\pm 1.01) \text{ mg mL}^{-1}$ in the culture with pulses without statistically significant differences ($P < 0.1$). As a result of its rapid growth, ability to accumulate PHAs and ability to use a complex substrate from marine food waste, *Vibrio* sp. strain Y01A1 is a promising bacteria for the production of PHAs. Future studies and process optimization is still required.

Keywords: bioplastic, polyhydroxyalkanoate, biomass, marine waste, *Vibrio* sp.

Vo. Bo.
Dr. Alejandro López Cortés

Dedicatoria

A mi padre:

*Por tu gran corazón que te impulsa constantemente a ayudar a aquellos con vidas menos afortunadas que las nuestras,
por tu rebeldía con la que me has enseñado la importancia de ser diferente,
por tu integridad para realizar las cosas con ética,
por tu humor que me demuestra que riendo y disfrutando la vida sin temor al juicio de los demás se mantiene cerca a la gente que quieres,
por tu valentía para enfrentar injusticias, salir adelante y resisitir situaciones difíciles,
por tu interés y pasión por la ciencia y la naturaleza el cual me has contagiado,
por la paciencia, el cariño y el apoyo que me has dado durante todos estos años,
por darme todas las facilidades para hacer lo que quise.*

*Esta tesis no se hubiera logrado sin ti.
Infinitas gracias.*



A la maravilla de la vida, al misterio de la existencia, a la belleza de la naturaleza,
al sabor del momento, al aprendizaje constante, a la experiencia inmortal,
a la originalidad del ser, a la pasión incansable, a la amistad sincera,
a la emoción de amar, al trabajo en equipo, a la curiosidad insaciable,
al cambio constante, al tiempo imparable, a la oportunidad de estar aquí.

Por nunca dejar de sorprenderme.

Agradecimientos

La realización de esta tesis fue posible gracias a recursos financieros del proyecto fiscal PPAC otorgados al Dr. Alejandro López Cortés.

Gracias al CONACYT por la beca otorgada (número 392832) que me permitió realizar y culminar mis estudios exitosamente, y por impulsar la ciencia en México.

Al CIBNOR por ser la institución que me acogió para realizar mis estudios de posgrado y contar con la infraestructura necesaria para realizarlos. Al personal de posgrado: Horacio Sandoval, Tania Núñez, Osvelia Ibarra, Leticia González-Rubio y a la Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra, por el profesionalismo, la calidez y el interés que muestran por ayudar.

A mi director de tesis el Dr. Alejandro López Cortés por su pasión por la ciencia y la microbiología, por compartirme sus experiencias y conocimientos de su larga trayectoria como científico y por siempre intentar dejarnos alguna enseñanza, también gracias por la paciencia y el tiempo dedicado.

A mis co-tutores el Dr. Ricardo Vázquez Juárez y el Dr. José Quinátzin García Maldonado por el tiempo y el esfuerzo dedicado y por sus comentarios y críticas constructivas durante la realización de la tesis.

Al M. en C. Roberto Hernández, responsable del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR por su ayuda y amabilidad.

A la Dra. Blanca Estela Romero López y al M. en C. Manuel Moreno Legorreta del laboratorio de Microbiología Ambiental y al M. en C. Angel Carrillo del laboratorio de Ecología Microbiana Molecular quienes amablemente me prestaron equipo necesario para la realización de este trabajo.

Al Biólogo Marino, Hever Latisnere Barragán, responsable técnico del Laboratorio de Proteómica y Genética Toxicológica.

A mis compañeras de laboratorio Carolina Alejandra Martínez y Priscila Gallut Rubio por su interés en la microbiología, por aprender juntos, por estar en los buenos momentos y en los no tan buenos y por el trabajo en equipo.

A mis compañeros y amigos de la maestría.

A Asdrubal Trujillo por haberme motivado a venir al CIBNOR y por su sentido del humor.

A Daniela Maldonado; mi compañera durante este viaje, por confiar en mi, por la amistad y por los grandes momentos que pasamos (los buenos tiempos del esterito). Gracias.

A mis amigos de la maestría con los que compartí muchas risas y momentos agradables: Eva Benavides, Rigel Sansores (Chirris), Marlene Luquin, Mónica Felix, Carolina Jacobson, Ivan Siordia así como al nuevo integrante de la familia Oliver. Muchas historias en tan poco tiempo. Gracias por los ánimos, por escucharme, por los consejos y por las pláticas.

Gracias a Carmelina Molina por la ayuda con la corrección de estilo del documento final.

A Gerardo Viramontes, mi primo doble y hermano de vida, por tu amistad y tu forma de ser tan particular. Por no dejar morir la mística.

A Malú por ser tan buena persona y por su actitud tan positiva.

A mis broders: Chaba, Gianni, Soria, Momox y Yordi; los mejores.

A Fernanda; gracias por el tiempo compartido y la agradable compañía.

A La Paz, B.C.S. y a su gente, por permitirme conocerlos y a su bello hogar.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Abreviaturas.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los plásticos petroquímicos: entajas y desventajas.....	1
1.2. Polihidroxialcanoatos (PHAs): bioplásticos sintetizados por microorganismos.....	2
1.3. Biosíntesis y funciones de los PHAs.....	4
1.4. PHAs como alternativa a los plásticos petroquímicos.....	6
1.5. Problemática: alto costo de producción.....	8
1.6. Estrategias para la producción de PHAs.....	9
1.7. Bacterias de origen marino productoras de PHAs.....	10
1.8. Uso de materiales de desecho como fuente de carbono económica para la producción de PHA.....	11
1.9. Desechos de industrias pesqueras	12
2. ANTECEDENTES	13
2.1. Bacterias productoras de PHAs aisladas del efluente de una enlatadora de alimentos pesqueros.....	13
2.2. Caracterizaciones de desechos marinos.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. HIPÓTESIS	17
5. OBJETIVOS	17
5.1. Objetivo general	17
5.2. Objetivos particulares.....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1. Colecta de muestras	18
6.2. Selección y procesamiento de las fuentes de carbono	18
6.3. Análisis químicos de las muestras	19
6.4. Aislamiento de bacterias productoras de PHA del lixiviado de almeja chocolata (<i>Megapitaria squalida</i>)	22
6.5. Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas a partir de desechos de almeja chocolata.....	24

6.6.	Amplificación y visualización del gen <i>phaC</i> en las cepas seleccionadas	24
6.7.	Pruebas fenotípicas de las cepas seleccionadas.....	25
6.8.	Reactivación de la cepa E71.....	27
6.9.	Producción de biomasa y acumulación de PHA de E71 y Y01A1 en medios químicamente formulados con glucosa como fuente de carbono.....	27
6.10.	Exposición de <i>Paracoccus seriniphilus</i> cepa E71 a medio con efluente de enlatadora de alimentos pesqueros.....	29
6.11.	Exposición de cepas aisladas del lixiviado de desecho de almeja chocolata al caldo de almeja chocolata (CAC).....	30
6.12.	Extracción de PHAs	31
6.13.	Cuantificación de PHAs.....	31
6.14.	Calculo de parámetros de crecimiento poblacional.....	32
6.15.	Análisis estadísticos	32
7.	RESULTADOS	33
7.1.	Caracterización química de los desechos marinos	33
7.1.1.	Efluente de enlatadora de productos pesqueros.....	33
7.1.2.	Caldos de desechos de almeja chocolata (CAC).....	34
7.2.	Selección y aislamiento de cepas de bacterias productoras de PHAs a partir de un lixiviado de desecho de almeja chocolata	36
7.3.	Identificación molecular de la cepa Y01A1.....	38
7.4.	Pruebas fenotípicas complementarias para la identidad de las cepas	39
7.5.	Visualización del gen <i>phaC</i> de la cepa Y01A1.....	40
7.6.	Crecimiento poblacional y producción de PHAs de <i>P. seriniphilus</i> cepa E71 y <i>Vibrio</i> sp. cepa Y01A1 en medio químicamente definido empleando glucosa como fuente de carbono y un sistema de producción de dos etapas con limitación de nitrógeno.....	40
7.7.	Valoración de los medios de cultivo elaborados con desechos marinos para producción de biomasa y PHAs	45
7.7.1.	<i>P. seriniphilus</i> cepa E71 con efluente de enlatadora de grupo Pando.....	45
7.7.2.	Cepa Y01A1 en caldo de almeja chocolata (CAC).....	48
7.8.	Comparación de los medios y cepas utilizadas	54
7.9.	Cuantificación del PHB.....	55
8.	DISCUSIÓN	58
8.1.	Efluente de la enlatadora del grupo Pando.....	58
8.2.	E71 en un sistema de producción de PHA de dos etapas con glucosa como fuente de carbono y E71 expuesta al efluente de grupo Pando.....	58
8.3.	Caldos de desecho de almeja chocolata.....	62
8.4.	Y01A1 en un sistema de producción de PHAs de dos etapas con glucosa como fuente de carbono	62
8.5.	Y01A1 en caldo de desechos de almeja chocolata (CAC).....	64
8.6.	Identidad de la cepa Y01A1	65
8.7.	Cuantificación del poli-3-hidroxibutirato	70

9. CONCLUSIONES	71
10. RECOMENDACIONES	73
11. LITERATURA CITADA	74
12. ANEXOS.....	82

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de los polihidroxialcanoatos (PHA)	3
Figura 2. Ruta de biosíntesis del P(3HB) en <i>Ralstonia eutropha</i>	5
Figura 3. Ruta de biosíntesis y fuentes de carbono para la producción de P(3HB)	6
Figura 4. Tubo de desagüe de la industria procesadora de alimentos pesqueros de grupo Pando de donde se colectó la muestra de efluente	19
Figura 5. Composición química del efluente de la enlatadora de alimentos pesqueros de grupo Pando en porcentaje de peso seco	33
Figura 6. Concentración de los nutrientes del efluente de la enlatadora de alimentos pesqueros de grupo Pando, obtenido mediante análisis espectrofotométricos	34
Figura 7. Composición química del caldo de almeja chocolate de animales completos en porcentaje de peso seco	35
Figura 8. Concentración de los nutrientes de desechos de almeja chocolate bajo diferentes tratamientos obtenidos mediante análisis espectrofotométricos	36
Figura 9. Cinéticas de crecimiento poblacional en medio YEB glucosa 1 % de 4 cepas productoras de PHAs aisladas del lixiviado de almeja chocolate	38
Figura 10. Gel de agarosa al 0.6 % con los productos de PCR del gen <i>phaC</i> de la cepa Y01A1	40
Figura 11. Crecimiento poblacional y consumo de glucosa de <i>Paracoccus seriniphilus</i> cepa E71 en un sistema de cultivo de dos etapas.....	42
Figura 12. Crecimiento poblacional y consumo de glucosa de la cepa Y01A1 en un sistema de cultivo de dos etapas	42
Figura 13. Micrografías de contraste de fases de <i>Paracoccus seriniphilus</i> cepa E71 en un sistema de cultivo de dos etapas con glucosa como fuente de carbono	43
Figura 14. Micrografías de contraste de fases de la cepa Y01A1 a diferentes tiempos de cultivo con sistema de cultivo de dos etapas donde se observa la acumulación de PHAs..	43
Figura 15. Cambio del pH con respecto al tiempo en el sistema de producción de PHA de dos etapas con las cepas E71 y Y01A1	44

Figura 16. Crecimiento poblacional de <i>P. seriniphilus</i> cepa E71 expuesto diferentes concentraciones del efluente de la enlatadora de grupo Pando	46
Figura 17. Gráficas de aproximación al crecimiento poblacional y concentración de nutrientes de los diferentes tratamientos de la cepa E71 con efluente de grupo Pando ...	47
Figura 18. Cambios en los valores de pH durante el cultivo de la cepa E71 en los medios con diferentes concentraciones de efluente de la enlatadora de alimentos pesqueros.....	48
Figura 19. Crecimiento poblacional de la cepa Y01A1 en medio CAC.....	49
Figura 20. Crecimiento poblacional de la cepa Y01A1 en medio CAC con pulsos de CAC°..	50
Figura 21. Cambio del pH durante el cultivo de Y01A1 en el medio CAC con pulsos y sin pulsos	51
Figura 22. Crecimiento poblacional y concentración de nutrientes del medio CAC sin pulsos (A y C) y con pulsos (B y D) inoculado con la cepa Y01A1	52
Figura 23. Consumo total de los nutrientes en el medio CAC sin pulsos y con pulsos de CAC° inoculado con la cepa Y01A1	53
Figura 24. Cuantificación del PHB producido por la cepa Y01A1 en un sistema de producción de dos etapas con glucosa como fuente de carbono, cosechada a las 72 y 144 horas	56
Figura 25. Cuantificación del PHB producido en la cepa Y01A1 en el caldo de almeja chocolate (CAC), con pulsos de CAC° (CP) y sin pulsos (SP) cosechado a las 215 horas	57
Figura 26. Cuantificación del PHB producido en la cepa E71 expuesta a las diferentes diluciones del efluente del grupo Pando (1:1, 1:3 y 1:7) 72 horas después de haber sido añadido el pulso de glucosa.....	57

Lista de tablas

Tabla I. Propiedades térmicas y mecánicas de PHAs comparados con plásticos sintéticos convencionales	8
Tabla II. Composición del medio de cultivo obtenido al acidificar el efluente de la cocción del mejillón	15
Tabla III. Cebadores utilizados para amplificar el gen <i>phaC</i> en bacterias Gram negativas	25
Tabla IV. Caracterización de las cepas aisladas del lixiviado de almeja chocolate	37
Tabla V. Pruebas realizadas a E71 y Y01A1	39
Tabla VI. Consumo de nutrientes del medio CAC sin pulsos inoculado con la cepa Y01A1	54
Tabla VII. Consumo de nutrientes del medio CAC con pulsos de CAC° (20 mL) inoculado con la cepa Y01A1	54
Tabla VIII. Resumen de la valoración de los medios formulados para la producción de biomasa y polihidroxicanoatos (PHAs)	55
Tabla IX. Comparación entre la cepa Y01A1 con otras bacterias marinas del género <i>Vibrio</i>	69

Abreviaturas

°C = grados centígrados

μL = microlitros

μg = microgramos

mg = miligramos

ADN = ácido desoxirribonucleico

ARN = ácido ribonucleico

g = gramos

rpm = revoluciones por minuto

h = horas

HCl = ácido clorhídrico

M = molar

min = minutos

mL = mililitros

C.T.D. = conteo total directo

D.O. = densidad óptica

g = unidad de medición de fuerzas de gravedad

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los plásticos petroquímicos: ventajas y desventajas.

Gracias a sus versátiles cualidades de dureza, ligereza, maleabilidad, durabilidad y resistencia a la degradación, los plásticos derivados del petróleo tienen tal variedad de aplicaciones que se han expandido a prácticamente todas las industria y se han convertido en una comodidad importante para mantener la calidad de vida y el bienestar de los seres humanos. En las últimas décadas, la utilización de plásticos ha aumentado rápidamente, consumiéndose en la actualidad más de 300 millones de toneladas al año (Suriyamongkol *et al.*, 2007) y se han vuelto esenciales para casi todas las industrias reemplazando a la madera, metal y vidrio como materiales para la construcción, empaquetamiento y dispositivos médicos (Andrady *et al.*, 2015). Sin embargo, el éxito de estos polímeros viene de la mano con una problemática asociada a su excesiva producción. La problemática de los plásticos se basa en tres aspectos: (1) la contaminación que generan, (2) su producción a base de fuentes no renovables y (3) su toxicidad. La contaminación se debe principalmente a que una vez producidos, los petro-plásticos son persistentes en el ambiente, abarcando amplias extensiones de área. Como un ejemplo, una bolsa de supermercado común tarda entre 100 y 400 años para biodegradarse (Elain *et al.*, 2016), sin embargo más de un tercio de los plásticos producidos son destinados para materiales desechables (Hopewell *et al.*, 2009) que pueden tener un tiempo de vida útil muy corto, de segundos, minutos u horas, mientras que su degradación puede suceder en décadas, siglos e incluso milenios (Thompson *et al.*, 2009). También se han identificados riesgos a la salud humana los cuales se han atribuido principalmente a la liberación de bisfenol A y ftalatos tanto en alimentos como por el uso de los plásticos en aparatos de uso médico (Halden, 2010). Por otra parte, se ha observado el potencial contaminante y disruptor de procesos naturales de los plásticos en el ambiente (Thompson *et al.*, 2009): fragmentos de plásticos (detritos) que varían en tamaño desde macrodetritos (> 20 mm), mesodetritos (2-2 mm) y microdetritos (< 2 mm) se están acumulando en los océanos, contaminándolos

(Koch, 2009) y afectando a animales marinos como aves, ballenas, lobos marinos y tortugas marinas, llegando a causarles la muerte (Gregory *et al.*, 2009).

Debido a que estos plásticos son sintetizados a partir de petróleo o gas natural, que son recursos limitados, su producción no es sustentable y surge la necesidad de buscar tecnologías ambientalmente amigables. Una alternativa es la utilización de plásticos biodegradables que no sean sintetizados a partir del petróleo (Prieto, 2007).

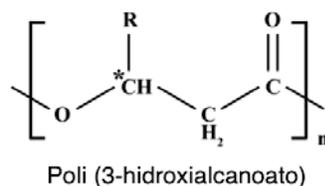
1.2. Polihidroxicanoatos (PHAs): bioplásticos sintetizados por microorganismos.

Los Polihidroxicanoatos (PHAs) son una familia de poliésteres 100 % biodegradables (Khanna y Srivastava, 2005) que son sintetizados por diversos microorganismos y acumulados en forma de inclusiones citoplasmáticas discretas e insolubles como reserva de carbono y energía (Lee, 1996). Las bacterias pueden sintetizar y almacenar PHAs en respuesta al estrés ambiental y al desbalance de nutrientes y pueden alcanzar a hasta el 90 % de su peso seco. Fueron descubiertos por primera vez por Lemaigne en 1926 (Akaraonye *et al.*, 2010) y han atraído mucho interés comercial y científico debido a sus propiedades de biodegradabilidad, biocompatibilidad, diversidad química y a que su producción es a partir de fuentes de carbono renovables (Tan *et al.*, 2014).

Una molécula de PHA está típicamente conformada por polímeros de entre 600 a 35,000 unidades monoméricas de (R)3-hidroxi-ácidos grasos, en donde el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero vecino (Fig. 1) (Khanna y Srivastava, 2005). Cada unidad monomérica posee una cadena lateral cuyo grupo R es usualmente, aunque no siempre, un grupo alquilo saturado (Lu *et al.*, 2009). Dependiendo del número total de átomos de carbonos dentro del monómero se pueden clasificar como PHAs de cadena corta (scl-PHAs; 3-5 átomos de carbono), PHAs de cadena media (mcl-PHAs; 6-14 átomos de carbono) y PHAs de cadena larga (lcl-PHAs; 15 o más átomos de carbono) (Khanna y Srivastava, 2005). La longitud de la cadena de los monómeros influencia la hidrofobicidad, el punto de fusión, la temperatura de transición

al vidrio y el grado de cristalización del monómero (Tabla I) (Crank *et al.*, 2004). El polihidroxi butirato, P(3HB) es el PHA más ampliamente estudiado y caracterizado, un homopolímero de 3-hidroxi butirato que tiene propiedades semejantes al polipropileno (Lee, 1996).

La acumulación de PHA dentro de la bacteria ocurre principalmente cuando el organismo se encuentra en un desbalance de nutrientes caracterizado por un exceso en la fuente de carbono y un déficit de un nutriente limitante, generalmente nitrógeno pero también puede ser fósforo u oxígeno (Anderson y Dawes, 1990). El microorganismo más estudiado para la producción de P(3HB) es *Cupravidus necator* anteriormente nombrado como *Hydrogenomonas eutrophus*, *Alcaligenes eutropha* y *Ralstonia eutropha* (Vandamme y Coenye, 2014), una bacteria Gram negativa perteneciente a la clase de las betaproteobacterias.



Grupo R	No. de Cs	Polimero de PHA
metil	C ₄	Poli (3-hidroxi butirato)
etil	C ₅	Poli (3-hidroxi valerato)
propil	C ₆	Poli (3-hidroxi hexanoato)
butil	C ₇	Poli (3-hidroxi heptanoato)
pentil	C ₈	Poli (3-hidroxi octanoato)
hexil	C ₉	Poli (3-hidroxi nonanoato)
heptil	C ₁₀	Poli (3-hidroxi decanoato)
octil	C ₁₁	Poli (3-hidroxi undecanoato)
nonil	C ₁₂	Poli (3-hidroxi dodecanoato)
decil	C ₁₃	Poli (3-hidroxi tridecanoato)
undecil	C ₁₄	Poli (3-hidroxi tetradecanoato)
dodecil	C ₁₅	Poli (3-hidroxi pentadecanoato)
tridecil	C ₁₆	Poli (3-hidroxi hexadecanoato)

Figura 1. Estructura química de los polihidroxi alcanoatos (PHAs). La nomenclatura y el número de carbonos del compuesto de PHA está determinado por el grupo funcional R alquil. Los asteriscos denotan centros quirales de los bloques de formación del PHA (Tomado y modificado de Tan *et al.*, 2014).

1.3. Biosíntesis y funciones de los PHAs.

Los genes involucrados en la síntesis de PHAs y aquellos relacionados con su metabolismo (síntesis y degradación) se encuentran organizados en operones dentro del genoma bacteriano cuya estructura y organización varía dependiendo del microorganismo (Steinbrüchel y Hein, 2001). 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 subóptima para el crecimiento y reproducción, además de estar conectada con otros procesos metabólicos de la célula (Babel *et al.*, 2001).

La vía metabólica para la síntesis de polihidroxi-butirato P(3HB) consiste en tres reacciones enzimáticas catalizadas por tres enzimas. La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetyl coenzima A (acetyl-CoA) para dar lugar a acetoacetyl-CoA por la enzima β -cetotilasa. La segunda reacción es la reducción del acetoacetyl-CoA a (D)-3-hidroxi-butiril-CoA por la enzima acetoacetyl-CoA deshidrogenasa, dependiente de NADPH. Finalmente, los monómeros de (D)-3-hidroxi-butiril-CoA son polimerizados a poli-3-3-hidroxi-butirato por la enzima PHA sintasa o polimerasa (Fig. 2). Las tres enzimas para la síntesis de PHB están localizadas en el citosol de la célula, donde tiene lugar la acumulación de PHB (Kojima *et al.*, 2004).

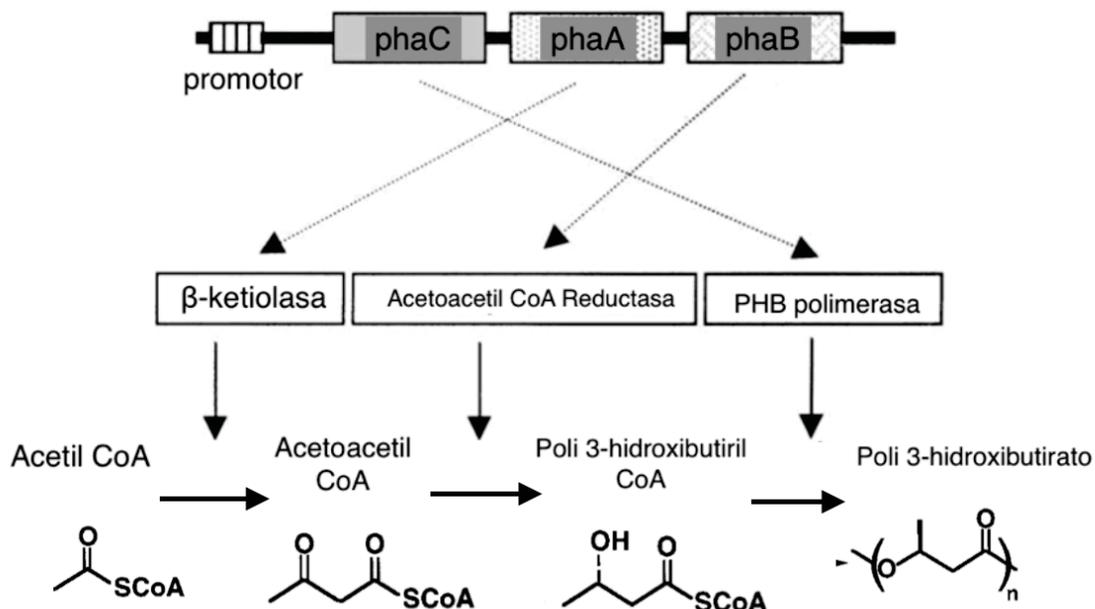


Figura 2. Ruta de biosíntesis del P(3HB) en *Ralstonia eutropha* (Tomado y modificado de Reddy *et al.*, 2003).

La acumulación de PHA permite a las células almacenar el exceso de carbono y equivalentes reductores para tener estos recursos disponibles para cuando sean necesarios para diferentes procesos celulares. Se acumula como cuerpos de inclusión complejos o gránulos que están rodeados de proteínas adheridas que incluyen: PHA sintasa, enzimas de despolimerización, proteínas de regulación y proteínas estructurales llamadas fasinas (Grage *et al.*, 2009). Esta estructura multi-componente ha sido llamada recientemente “carbonosoma” para reflejar su multifuncionalidad (Jendrossek y Pleiffer, 2014).

Los PHAs confieren una ventaja adaptativa para la supervivencia y resistencia al estrés ambiental (Kadouri *et al.*, 2005), además de intervenir en la formación de biopelículas (Pham *et al.*, 2004) y servir como fuente de carbono y energía en el proceso de esporulación de bacterias del género *Bacillus* (Stock y Sthaly, 1974).

La composición del poliéster producido depende del sustrato y de la cepa utilizada (Madison y Huisman, 1999). Las fuentes de carbono que pueden ser utilizadas para producir PHA incluyen sacáridos (e.g. glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa, etc.), n-alcanos (e.g. hexano, octano, dodecano, etc.), ácidos n-alcanóicos, (e.g. ácido acético, ácido propiónico, ácidos butíricos, ácido valérico, ácido láurico, ácido oléico, etc.), n-alcoholes (e.g. metanol, etanol, octanol, glicerol, etc.) y gases (e.g. metano, y dióxido de carbono) (Fig. 3) (Anderson y Dawes, 1990; Verlinden *et al.*, 2007).

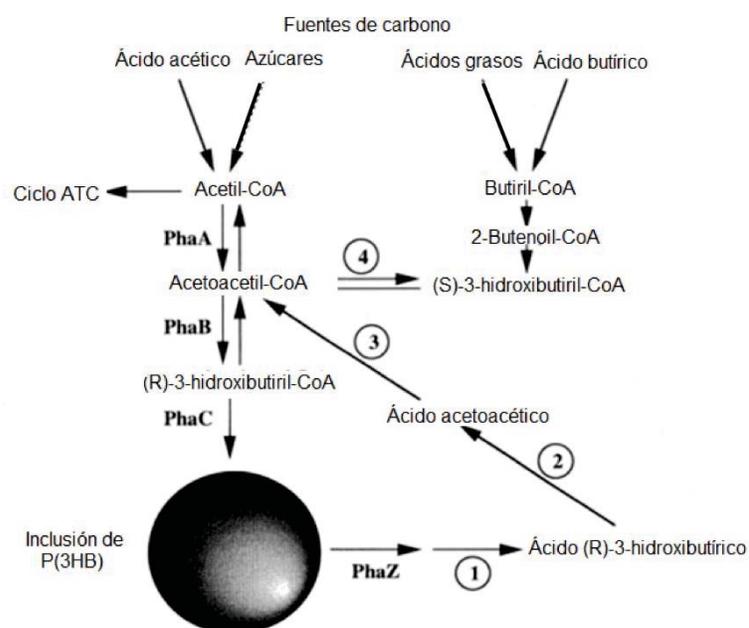


Figura 3. Ruta de biosíntesis y fuentes de carbono para la producción de P(3HB) (Tomado y modificado de Sudesh *et al.*, 2000).

1.4. Polihidroxialcanoatos: una alternativa a los plásticos petroquímicos.

Existe un gran interés por estos compuestos debido a que una vez extraído de las células bacterianas el PHA muestra propiedades termoplásticas y/o elastoméricas similares a plásticos convencionales como el polietileno de baja densidad y el polipropileno (Tabla I). Además son completamente degradados a agua y CO₂ en condiciones aeróbicas y a

metano en condiciones anaeróbicas por microorganismos del suelo, mar, agua dulce y aguas residuales y exhiben propiedades impermeables al oxígeno, agua y aceite (Lee, 1996). Los microorganismos degradadores producen PHA depolimerasa extracelular, lo que convierte los poliésteres en oligómeros hidrosolubles y monómeros que son utilizados como fuente de carbono por el organismo (Reddy *et al.*, 2003). Mergaert *et al.* (1992, 1993, 1994) reportaron que el copolimero P(3HB-co-3HV) era completamente degradado en aguas residuales anaeróbicas, suelo y agua de mar en 6, 75, y 350 semanas respectivamente.

Como valor agregado adicional, cabe mencionar que estos bioplásticos tienen la ventaja de ser biocompatibles (Castilho *et al.*, 2009). La biocompatibilidad está caracterizada por la ausencia de compuestos tóxicos generados durante la degradación del polímero, así como por la forma y la porosidad de la superficie del material. La biocompatibilidad del poli-3-hidroxibutirato P(3HB) no causa sorpresa ya que el 3-hidroxibutirato (3HB) es un constituyente normal de la sangre y se encuentra en la envoltura celular de eucariontes (Wiggam *et al.*, 1997). Por lo tanto, los PHAs son candidatos para materiales en diferentes aplicaciones médicas como suturas, dispositivos de sistemas vasculares, tornillos, injertos y soportes para regeneración de cartílagos y huesos y micro y nano esferas para liberación controlada de drogas (Chen *et al.*, 2005; Zinn *et al.*, 2001). Además, son los únicos materiales termoplásticos bioegradables a prueba de agua. (Gomez *et al.*, 2012)

Las primeras aplicaciones comerciales que se dieron para los PHAs fue con el uso del copolimero P(HB-co-HV) en botellas de shampoo y otros contenedores de cosméticos (Hocking y Marchessault, 1994). Posteriormente también aparecieron en el mercado bolígrafos, tazas y empaquetamientos realizados con PHA (Wu *et al.*, 2009). Considerando las propiedades del material, los polímeros bio-basados podrían potencialmente substituir a un tercio de la producción actual de polímeros (Choi y Lee, 1999).

Tabla I. Propiedades térmicas y mecánicas de PHAs comparados con plásticos sintéticos convencionales.

	Temperatura de fusión T_m (°C)	Temperatura de cristalización T_g (°C)	Fuerza de tensión (MPa)	Extensión hasta el quiebre (%)	Módulo de Young (GPa)
P3HB	180	4	40	5	3.5
P(3HB-co-20 % 3HV)	145	-1	9	50	1.2
P4HB	53	-48	104	150	0.15
mcl-PHAs	61	-35	9	380	0.008
Poliacilato	-	-106	68	50	2.2
Polietileno	100	-78	23	200	1.13
Polipropileno	176	-10	38	400	1.7
Poliestireno	240	100	60	7	3

Tomado de Williams y Martin (2005) y Sudesh *et al.* (2000).

1.5. Problemática: alto costo de producción.

A pesar de las ventajas que tienen los PHAs sobre los plásticos convencionales, su producción comercial se ve limitada por el alto costo del proceso de fermentación bacteriana, que aumenta su costo de 5 a 10 veces respecto al de un plástico derivado de petróleo; de US\$ 1 por Kg en el caso de plásticos convencionales a US\$ 5-10 por Kg en el caso de PHAs (Shrivastav *et al.*, 2010). Además la manufactura de PHAs se realiza hasta ahora en escalas pequeñas y, como consecuencia, carece del beneficio económico de una producción a gran escala (Chanprateep, 2010). La síntesis industrial de PHA debe mejorar su sustentabilidad para alcanzar costos de producción apropiados y disminuir el daño ambiental (Gomez *et al.*, 2012). El reto consiste en reducir los costos del proceso de biosíntesis y de la extracción del polímero para hacer al bioplástico derivado de PHA económicamente competitivo con los plásticos petroquímicos (Elain *et al.*, 2016).

El costo del sustrato (fuente de carbono) puede llegar a representar hasta el 50 % del costo total de producción (Lee y Choi, 1999). Comparado con los precios de los polímeros convencionales, la utilización de sustratos como la glucosa es demasiado costoso e incluso el proceso más eficiente de producción de PHA sería incapaz de competir con polímeros a

base de petróleo, lo que hace necesaria la búsqueda de sustratos de bajo costo. En este sentido, la utilización de desechos industriales como fuente de carbono es una alternativa prometedora para la producción comercial de PHAs (Choi y Lee, 1999).

Los factores más importantes que afectan la economía global de la producción de PHAs son la productividad, el contenido de PHA en la biomasa, el rendimiento del PHA en la fuente de carbono utilizada, el costo del material crudo y los métodos de recuperación (Gomez *et al.*, 2012).

Se ha integrado información de los trabajos realizados por diversos autores para reducir los costos de producción de los PHAs que encontraron que se habían optado por las siguientes estrategias: uso de estrategias de lote alimentado (fed-batch) y de dos etapas de fermentación, desarrollo de procesos de recuperación del polímero más eficientes, uso de tecnologías recombinantes de ADN e ingeniería metabólica, producción de PHAs en plantas transgénicas, procesos de integración con otros productos y el uso de fuentes de carbono baratas como materia prima (Castilho *et al.*, 2009).

1.6. Estrategias para la producción de PHAs.

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 *Ralstonia eutropha*, *Protomonas extorquens* y *Protomonas oleovorans*. En el segundo grupo, las bacterias que 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 cepas mutantes de *Azotobacter vinelandii* y *E. coli* recombinante (Braunegg *et al.*, 1998; Khanna y Srivastava, 2005).

Para maximizar la productividad de los procesos biotecnológicos y obtener la mayor densidad de los productos de interés en el menor tiempo se requieren altas densidades celulares del microorganismo productor del metabolito de interés; en otras palabras, una alta cantidad de biomasa (Riesenberg y Guthke, 1999). Para la producción de PHA, densidades superiores a 100 g L^{-1} de peso seco celular y alrededor de $30\text{-}40 \text{ g L}^{-1}$ de biomasa residual (biomasa activa sin el polímero = biomasa total – PHA) son consideradas como altas densidades celulares (Lenczak y Schmidell, 2013).

En el cultivo en lote de bacterias acumuladoras de PHA, el método de cultivo mayormente empleado bajo limitación de nutrientes es un sistema de dos etapas. Primero las células son crecidas hasta una concentración deseada sin ninguna limitación nutricional, después de lo cual se limita un nutriente esencial para permitir la síntesis efectiva del PHA. Cuando se aplica esta limitación nutricional las células dejan de crecer pero sintetizan y acumulan PHA, la concentración residual celular permanece casi constante y la concentración celular incrementa solo como resultado de la acumulación intracelular de PHA (Lenczak *et al.*, 2011).

1.7. Bacterias de origen marino productoras de PHAs.

Se tienen pocos reportes acerca de bacterias marinas productoras de PHAs. La mayoría de los estudios 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 del río Ebro, en España.

También se han aislado bacterias del género *Vibrio* de sedimentos marinos y encontraron que el 62 % de las cepas aisladas acumulaban PHAs y se probaron diferentes parámetros de cultivo (pH, temperatura, tiempo de incubación, fuente de carbono, concentración de NaCl y tamaño del inóculo) en la cepa BTC26 identificada como *Vibrio azureus* para

optimizar la acumulación de PHA (Subin *et al.*, 2013). También, se han aislado de sedimentos marinos bacterias del género *Vibrio* que acumularon hasta el 41 % de su peso seco celular como PHB (Chien *et al.*, 2007). La bacteria marina Gram negativa *Saccharophagus degradans* sintetiza PHB a partir de polisacáridos complejos (González-García *et al.*, 2008).

1.8. Uso de materiales de desecho como fuente de carbono económica para la producción de PHA.

La utilización de fuentes de carbono crudas, tales como melazas de caña y remolacha, suero de leche, aceite de plantas y otros, pueden reducir considerablemente los costos. No obstante, tomando en consideración que la productividad de PHA es usualmente menor, el desarrollo de procesos eficientes basados en fuentes de carbono baratas como sub-productos de industrias y desechos continúa siendo un reto por alcanzar (Choi y Lee, 1999). Utilizar materiales de desecho como fuente de carbono no solo le confiere un valor agregado al desecho, si no que disminuye el costo de deposición de los desechos (Castilho *et al.*, 2009).

Los sub productos agro-industriales ofrecen una alternativa a los medios de cultivo convencionales caros, como el caldo marino, para la producción de PHA, especialmente al reemplazar la glucosa por efluentes agroindustriales (Elain *et al.*, 2016).

Utilizar recursos de desecho para la producción de PHA es particularmente desafiante ya que los efluentes de desecho suelen ser una mezcla complicada de sustratos de carbono, algunos de los cuales no pueden ser asimilados para la producción de PHA o son inhibitorios para un cultivo microbiano único (Tan *et al.*, 2014).

Algunos de los sub-productos o productos de desecho estudiados como fuente de carbono económica para la producción de PHAs son: melazas de caña de azúcar y betabel, bagazos de caña de azúcar y soya, suero de la industria de la leche, efluentes de almazara, glicerol, desechos de aceites vegetales, cebo y desechos de malta de la producción de

cerveza y aguas de desecho (Castilho *et al.*, 2009; Gómez *et al.*, 2012; Koller, 2010), sin embargo no existen publicaciones que hablen de sub-productos marinos o efluentes de industrias pesqueras como fuente de carbono para la producción de PHAs a pesar de que las aguas de desecho generadas en fábricas de procesamiento de alimentos marinos contienen una alta carga orgánica, principalmente proteínas y grasas (García-Sanda *et al.*, 2003).

1.9. Desechos de industrias pesqueras.

Las industrias enlatadoras de productos pesqueros generan un gran número de diferentes efluentes que normalmente son tratados en una planta compleja. Los problemas ambientales asociados a las industrias enlatadoras de alimentos son las aguas de desecho, las emisiones a la atmósfera, los desechos sólidos, los residuos inertes y los residuos peligrosos. Sin embargo, algunos de estos efluentes pueden ser tratados para recuperar subproductos adicionales y al mismo tiempo reducir el volumen final del efluente. Aceites y grasas del efluente de empacadoras son removidos usualmente en plantas de tratamiento convencional con dispositivos de flotación. Como resultado de esta operación se obtiene un efluente que contiene la mayoría de los aceites, grasas y materia flotante. Los efluentes provenientes de la cocción de los organismos tienen la mayor cantidad de carga orgánica (García-Sanda *et al.*, 2003).

Durante el procesamiento de las especies, la cantidad de materia cruda que se convierte en desecho puede llegar a ser el 50 % del peso total (Aguilar *et al.*, 1988).

2. ANTECEDENTES

2.1. Bacterias productoras de PHAs aisladas del efluente de una enlatadora de alimentos pesqueros.

Se han aislado bacterias heterótrofas productoras de PHAs pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Paracoccus*, y *Micrococcus* de un tapete microbiano asociado al efluente de desecho de una industria enlatadora de alimentos pesqueros en Puerto San Carlos, Baja California Sur, encontrando cepas que acumulaban hasta el 66 % de su peso seco total como PHA (López-Cortés *et al.*, 2008).

La cepa *Paracoccus serinphilus* E71 proveniente del tapete microbiano contaminado con el efluente de la enlatadora de alimentos pesquero en Puerto San Carlos, B.C.S. fue seleccionada para posteriores investigaciones de producción de biomas y PHAs. El primo aislamiento se realizó en medio diaztrófico (contiene en g L⁻¹ de agua destilada: glucosa: 5, manitol: 5, CaCl₂ 2H₂O: 0.1, MgSO₄ 7H₂O: 0.1, Na₂MoO₄ 2H₂O: 0.005, K₂HPO₄: 0.9, KH₂PO₄: 0.1, FeSO₄ 7H₂O: 0.01, CaCO₃: 5, agar: 15) (López-Cortés *et al.*, 2008).

Esta cepa no mostró crecimiento cuando fue incubada en medio basal adicionado únicamente con NaCl y sí cuando fue cultivada con medio basal con NaCl y MgSO₄·7H₂O lo que sugiere que esta cepa requiere Na⁺, Mg²⁺ y SO₄⁻² (López-Cortés *et al.* 2010). Fue aún mayor su crecimiento cuando se cultivo en medio PYM (medio marino levadura-peptona) el cual contiene las sales representativas del agua de mar, lo que sugiere que esta cepa necesita iones del agua de mar como Na⁺, Mg²⁺, K⁺, Ca²⁺ y SO₄⁻², un atributo estable para que las bacterias marinas crezcan y por lo tanto E71 se debe considerar una bacteria marina verdadera (Baumann y Baumann 1981; López-Cortés *et al.*, 2010).

También se diseñaron primers para amplificar el gen *phaC* el cual codifica para la PHA sintasa, enzima involucrada en el último paso de la síntesis del poli-3-hidroxibutirato (P3HB) logrando un amplicón de 526 pares de bases del ADN en la cepa cepa E71, (López-Cortés *et al.*, 2010). La caracterización del gen *phaC* de esta cepa mostró 77 % de

identidad con el gen *phaC* de *P. denitrificans* cepa PD1222 y la secuencia traducida a aminoácidos mostro 86 % de similaridad con la porción N-terminal de los aminoácidos traducidos del gen *phaC* de esta misma cepa, por lo que se concluye que el gen *phaC* de E71 codifica para un poli (3-hidroxicanoato) sintaza clase I, específicamente una poli-beta-hidroxibutirato sintaza. En cuanto a la caracterización del polímero producido por esta bacteria los resultados indicaron que este alcanza su punto de fusión a 167.86 °C (Tm) y su degradación ocurre a 296.52 °C lo que corresponde a un polímero cristalino con buena estabilidad termal y se mostró por reología que se comporta como un fluido no newtoniano. Con estos análisis se concluyó que el PHA producido por E71 corresponde a un polímero termoplástico cristalino tipo PHB (López-Cortés *et al.*, 2010).

La determinación del crecimiento y producción de PHA en la cepa E71 en un sistema de dos etapas fue realizado por Martínez-Gutiérrez en el 2015. Probó diferentes concentraciones de glucosa (0.5 %, 1 % y 2 %) como fuente de carbono para el crecimiento poblacional y la producción de PHA en esta cepa con limitación de nitrógeno y pulso de carbono para estimular la producción de PHB. A partir de sus resultados sugiere utilizar 1 % de glucosa para generar la biomasa y en la segunda etapa cosechar la biomasa y transferirla a un medio limitado de nitrógeno y adicionarle un pulso de glucosa de 1 g en 10 mL de agua (10 % w/v) para incrementar la producción y acumulación de PHA con tiempos de incubación de 72 horas. Utilizando el sistema de dos etapas obtuvo tres veces más acumulación de PHB que sin la utilización de este sistema.

2.2. Caracterizaciones de desechos marinos.

En una caracterización química de efluentes de la cocción del atún, del mejillón y de una planta de carne de pescado se observó que el efluente de la cocción del mejillón tenía mayor contenido de carbohidratos y menor contenido de proteínas que la del atún y la de carne de pescado (Omil., 1996), lo cual es beneficioso para tener una mayor proporción C/N, que puede favorecer la acumulación de PHAs.

El efluente del procesamiento del mejillón ha sido ampliamente estudiado como medio de cultivo y fuente de carbono para el crecimiento de bacterias y levaduras y para la producción de algunos metabolitos secundarios de interés como ácido cítrico, ácido giberélico, niacina y pediocina, glucosa oxidasa, así como producción de biomasa. Los desechos del procesamiento de mejillones son ricos en materia orgánica, particularmente glucógeno. Para obtener un medio con gran cantidad de carbohidratos y poca fracción protéica, el efluente crudo se acidifica a pH 4.5 con HCl de manera las proteínas precipitan y la fracción superior clarificada tiene una mayor concentración de glucógeno (10 g L^{-1}) (Tabla II), este medio se puede concentrar más mediante ultrafiltración pudiendo obtener hasta 100 g L^{-1} de glucógeno. Para concentrar los nutrientes se pueden aplicar métodos de evaporación o ultrafiltración, de esta manera se puede obtener un medio caracterizado por una alta concentración de glucógeno ($70\text{-}100 \text{ g L}^{-1}$) y bajo contenido de nitrógeno ($400\text{-}900 \text{ mg L}^{-1}$) (Murado, 1994).

Tabla II. Composición del medio de cultivo obtenido al acidificar el efluente de la cocción del mejillón.

Compuesto	g L^{-1}
Glucógeno	10
Azúcares reductores	0.15
Proteína	3.50
Taurina	2.50
Nitrógeno Total	1.60
Fósforo total	0.09
NaCl	18
COD (O_2)	25

Tomado de Murado *et al.* (1992).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido su naturaleza recalcitrante, los productos tóxicos que generan, el uso indiscriminado y el mal manejo de sus desechos, los plásticos petroquímicos causan afectaciones ambientales. Además, por ser producidos a partir del petróleo se ven amenazados por la potencial escasez de esta fuente no renovable. Sin embargo, es tal la dependencia a este tipo de materiales para sostener el estilo de vida contemporáneo que la producción de plásticos es cada vez mayor. Para solucionar este problema se necesita encontrar un polímero con propiedades semejantes a los plásticos petroquímicos que pueda degradarse en el ambiente en tiempo cortos sin generar productos tóxicos en su descomposición y que sea producido a partir de fuentes renovables. Los PHAs cumplen estos requisitos y podrían llegar a sustituir a un tercio de los plásticos convencionales además de que tienen otras cualidades que le dan un valor agregado como la biocompatibilidad.

Sin embargo, el éxito de estos materiales se ve obstaculizado por los altos costos de su producción. Un factor determinante en el costo es la fuente de carbono, que llega a representar hasta el 50 % del costo total de producción, por lo que la búsqueda de fuentes de carbono de bajo costo es fundamental. En este sentido, los desechos orgánicos de industrias alimenticias resultan prometedoras debido a que pueden llegar a ser una fuente rica en carbono y que en su deposición causan contaminación, pero que podrían utilizarse para la producción de biomasa y PHAs bajando el costo de su producción y dándole un uso a estos desechos contaminantes. Por otro lado, existe muy poca información sobre la caracterización química de desechos de alimentos marinos, pero se sabe que tienen una gran cantidad de materia orgánica y podrían ser utilizados como fuente de nutrientes de bacterias heterótrofas.

En estas razones y en la información obtenida del comportamiento de bacterias productoras de PHA cultivadas en desechos de origen marino de bajo costo radica la importancia de este trabajo.

4. HIPÓTESIS

Si, el efluente del procesamiento de alimentos marinos de Puerto San Carlos y/o el caldo de desechos de almeja chocolata (*M. squalida*) son ricos en materia orgánica, entonces existirán bacterias heterótrofas capaces de utilizar dicha materia orgánica como sustrato para la producción de biomasa bacteriana y PHAs.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Valorar la capacidad de uso de desechos orgánico provenientes de productos alimenticios de origen marino como sustrato de bajo costo para la producción de biomasa bacteriana y PHAs.

5.2 Objetivos particulares.

1. Evaluar el contenido de proteína, glucosa, glucógeno, lípidos, carbohidratos y nitrógeno total, así como el pH, del efluente de una enlatadora de alimentos pesqueros y de caldos de desecho de almeja chocolata.
2. Aislar bacterias productoras de PHA de desechos de almeja chocolate, identificarlas y detectar la presencia del gen *phaC* en las mismas.
3. Formular medios de cultivo para la producción de biomasa y acumulación de PHA a partir de los desechos de alimentos marinos en *Paracoccus seriniphilus* cepa E71 y en las bacterias aisladas del desecho de almeja chocolata y comparar la eficacia de estos con medios químicamente formulados con glucosa como fuente de carbono en un sistema de cultivo de dos etapas con limitación de nitrógeno.
4. Cuantificar la acumulación de PHA en los diferentes tratamientos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Colecta de muestras.

De la industria enlatadora de atún y sardina Grupo Pando, ubicada en Puerto San Carlos, B.C.S. con geoposición 24° 46' 56.4'' N, 112° 06' 21.2'' W, se colectaron el 8 de enero del 2016 cuatro litros del efluente de una fuga de la tubería a 50 metros hacia el mar en marea baja (Fig. 4). Se usaron botellas de plástico de un galón que fueron llevadas al laboratorio y mantenidas en congelación a -20 °C hasta su posterior análisis.

La segunda fuente de carbono valorada provino de desechos de almeja chocolate (*M. squalida*) que consisten en las vísceras de este animal. Fueron colectadas de comercios locales en la Ciudad de la Paz, B.C.S. ante la inexistencia de industrias medianas o grandes que procesen bivalvos en la región. Las muestras se almacenaron en congelación hasta su uso.

6.2. Selección y procesamiento de las fuentes de carbono.

El efluente de grupo Pando se proceso a través de esterilización mediante autoclave a 121 °C y 15 libras de presión durante 60 minutos.

Para los desechos de almeja chocolate se realizaron tres tratamientos en los que variaron las proporciones de material usado y los tiempos de cocción de los desechos, intentando simular como ocurre en el procesamiento industrial de la cocción del mejillón: a) 250 g de desecho en 1 L de agua hirviendo durante 5 minutos; b) 250 g de desecho en 1 L de agua hirviendo durante 10 minutos, y c) 500 g de desecho en 1 L de agua hirviendo durante 10 minutos. Los residuos sólidos fueron desechados mientras que el caldo (extracto) obtenido se almacenó en congelación a -20 °C hasta su posterior análisis. El análisis químico con combustión y gravimetría se realizó de un caldo de animales completos (excepto concha) cocidos durante 10 minutos.



Figura 4. Tubo de desagüe de la industria procesadora de alimentos pesqueros de grupo Pando de donde se colectó la muestra de efluente.

6.3. Análisis químicos de las muestras.

Los análisis se realizaron mediante dos aproximaciones distintas: con métodos de combustión y gravimetría realizados en el Laboratorio de Análisis Químico Proximal del CIBNOR y mediante métodos espectrofotométricos realizados en el Laboratorio de Bioquímica Fisiológica del CIBNOR.

6.3.1. Análisis químicos proximales.

Se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Químico Proximal del CIBNOR utilizando las siguientes metodologías:

a) Determinación de nitrógeno total y proteína (%): mediante el método de combustión o método de Dumas con analizador LECO® FP-528, que se basa en la liberación del nitrógeno mediante pirolisis a 850 °C en una cámara de combustión, el cual es posteriormente transportado a un detector con la ayuda de helio, y para convertir a proteína se utilizó un factor de conversión de 6.25.

b) Determinación de humedad por diferencia de peso de muestras secadas en horno a 70 °C por 24 horas.

- c) Determinación de extracto etéreo con método Soxtec-Avanti Tecator.
- d) Determinación de fibra cruda con método de hidrólisis sucesiva (ácido/base).
- e) Determinación de cenizas por diferencia de peso. Calcinación a 500 °C/24 horas.
- f) Determinación de extracto libre de nitrógeno (E.L.N.) calculado por diferencia: 100 - (% Proteínas + % Lípidos + % F. Cruda, + % Cenizas).
- g) Determinación de energía bruta determinación por calorímetro.

6.3.2. Análisis espectrofotométricos.

Se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bioquímica Fisiológica, del CIBNOR utilizando las siguientes metodologías.

a) Determinación de proteínas: mediante la técnica del ácido bicinconínico o BCA, que se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el ácido bicinconínico para dar un color morado. El color es proporcional al contenido proteico de la muestra. La muestra se leyó en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 562 nm utilizando una curva estándar de albúmina bovina y solución salina como blanco.

b) Determinación de carbohidratos: se utilizó un método basado en Roe *et al.* (1957). Primero se tomaron 0.2 mL de cada muestra y se mezclaron con 0.2 mL de Ácido TriCloroAcético (TCA) al 20 % con la finalidad de precipitar proteínas que interfieren en la medición de carbohidratos; posteriormente se colocaron 0.1 mL de sobrenadante en un tubo de vidrio, se le agregó 1 mL de solución de antrona 0.1 % diluida en H₂SO₄ al 72 %. Se calentaron a baño maría a 90 °C durante cinco minutos y se enfriaron en baño de hielo. Se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 620 nm.

c) Determinación de glucosa: Para medir la glucosa se utilizó una prueba enzimática colorimétrica (kit de RANDOX método GOD-PAP, No. catalogo AY 891). El método se basa en la oxidación de glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa, provocando la formación de peróxido de hidrógeno, que a su vez reacciona, catalizado por la peroxidasa, con fenos y 4-aminofenazona para formar quinoneimina, un indicador rojo-violeta cuya intensidad es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra. Se toma una alícuota de 20 μ L y se pone en el fondo de una microplaca, se le agregan 200 μ L de solución reactiva, se incubó 20 minutos y se leyó en un espectrofotómetro de microplacas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a una absorbancia de 540 nm.

d) Determinación de glucógeno: El glucógeno se determinó por el método de antrona, establecido por Van Handel (1965) para muestras pequeñas. Para la extracción de glucógeno del sobrenadante de TCA, se tomaron 0.1 mL del sobrenadante de cada muestra, se le añadieron 2 mL de etanol para precipitar el glucógeno. Las muestras se centrifugaron a 1667 g por 10 minutos a 4 °C, en una centrifuga refrigerada (Eppendorf 5810 R, NY-USA) y se eliminó el etanol con pipeta y evaporando en un horno-estufa (VWR-Sheldon Manufacturing 1350FM, OR-USA) a 70 °C una vez hecho lo anterior se resuspendió el glucógeno con 0.1 mL de agua destilada. Posteriormente, a cada tubo de muestra y de la curva tipo, se le agregaron 1 mL de solución de antrona 0.1 % diluida en H₂SO₄ al 72 %. Las preparaciones anteriores se calentaron a 90 °C en baño maría durante cinco minutos. Se enfriaron y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 620 nm.

e) Determinación de lípidos totales: Se utilizó el método de la sulfafosfovainillina según Barnes y Balckstock (1973). Una alícuota de 0.025 mL (25 μ L) de cada muestra se colocó en tubos de vidrio, se les agregó 0.25 mL de ácido sulfúrico concentrado y se incubaron a baño maría a 90 °C, por 10 minutos. Los tubos se enfriaron en baño de hielo, posteriormente se tomaron 20 μ L de cada tubo y se colocaron en el fondo del pozo de una micro placa de 96 pozos, se le agregó solución reactiva para lípidos (fosfovainillina al 0.2 %

en ácido sulfúrico al 80 %), se dejó incubar la placa por 40 minutos a temperatura ambiente y se tomó la lectura de la placa en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 540 nm, al mismo tiempo que las muestras se hacen reaccionar una curva de calibración.

f) Determinación de amonio: Se utilizó el método basado en Koroleff (1969). Se colocó en los pocillos de una microplaca 20 μ L de una solución con fenol (10 g de fenol grado reactivo en 100 mL de etanol al 95 %) y se agregó a cada pocillo 100 μ L de agua desionizada y 150 μ L de cada muestra, posteriormente fueron añadidos a los pocillos 20 μ L de una solución de 0.5 g de nitroprusiato de sodio en 100 mL de agua y finalmente se agregaron 30 μ L de mezcla oxidante al 150 % (10 mL de solución alcalina, 15 g de citrato de sodio y 0.75 g de hidróxido de sodio en 50 mL de agua) mezclado con 2.5 mL de hipoclorito de sodio comercial) a cada pocillo y se dejó incubar a la oscuridad durante una hora. La reacción del amonio, el fenol y el hipoclorito en condiciones de pH alto da un color azul cuya intensidad es proporcional a la concentración de amonio. Se tomó la lectura de la placa en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 655 nm utilizando una curva estándar de cloruro de amonio (NH_4Cl).

6.4. Aislamiento de bacterias productoras de PHA del lixiviado de almeja chocolata (*Megapitaria squalida*).

De un lixiviado de desecho de almeja chocolata almacenado en refrigeración durante 24 horas se realizó el aislamiento de bacterias usando la técnica de diluciones decimales seriadas y extensión en placa en tres tipos de medios de cultivo. Para esto, se tomó 1 mL del lixiviado y se colocó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua de mar artificial $\frac{1}{2}$ X (ASW $\frac{1}{2}$ X) estéril, de esta solución se tomó 1 mL y se transfirió a otro tubo de ensayo con 9 mL de ASW $\frac{1}{2}$ X estéril y esta operación se repitió hasta el octavo tubo. Alícuotas de 0.2 mL de las diluciones 1×10^{-1} hasta la 1×10^{-8} fueron plaquedas por duplicado por la técnica de extensión en placa en los medios agar marino 2216 (Difco®), Pseudomonas Isolation Agar (PIA) (Difco®) con ASW $\frac{1}{2}$ X y YEA glucosa 1 % modificado de Baumann y Baumann (1981)

(contiene en g L⁻¹: NaCl: 11.69, MgSO₄•7H₂O: 12.34, KCl: 0.74, CaCl₂•2H₂O: 1.47, NH₄Cl: 0.5, K₂HPO₄•3H₂O: 0.076, FeSO₄•7H₂O: 0.028, glucosa: 10, extracto de levadura: 0.4, agar: 16 y 50 mL de Tris buffer HCl [pH 7.5]) y se incubaron a 30 °C. A las 24 y 48 horas de cultivo se observaron las colonias formadas, se describieron con ayuda de un estereomicroscopio y también se realizó la descripción celular mediante microscopía de contraste de fases. Aquellos aislados que mostraron inclusiones citoplasmáticas refringentes (ICRs) se tiñeron con Rojo Nilo, un colorante lipofílico que tiñe el PHA, y se usó microscopía de epifluorescencia para confirmar que los ICRs correspondieran a presencia de PHAs. A los aislados positivos se les asignó un nombre y se respaldaron en tubo inclinado del medio donde fueron aislados.

Colonias separadas y discretas fueron resembradas en medios sólidos para comprobar que estuvieran conformados por un solo tipo de morfología colonial y que bajo el microscopio de contraste de fases se mostrara una morfología celular homogénea. En caso de que el cultivo no se mostrara axénico se procedió a realizar diluciones decimales seriadas con ASW ½ X en una microplaca estéril. Para esto se tomó una pequeña asada con un asa estéril de una de las colonias en cuestión con ayuda de un estereomicroscopio y se dispersó en el pocillo de una microplaca que contenía 180 µL de ASW ½ X. Se tomaron 20 µL de este pocillo y se colocaron en el siguiente pocillo con 180 µL de ASW ½ X, se continuó así sucesivamente hasta el octavo pocillo y se tomaron 10 µL de los pocillos 4, 6, 7 y 8 correspondientes a las diluciones 1X10⁻⁴, 1X10⁻⁶, 1X10⁻⁷ y 1X10⁻⁸, que se plaquearon por el método de dispersión en placa en los medios YEA glucosa 1 % y PIA ASW ½ X y se dejaron incubar a 30 °C observando las colonias cada 24 horas. Finalmente cuando se observaba la colonia definida y separada y la morfología celular era homogénea la cepa se consideraban axénica y se respaldaban en tubo inclinado con medio YEA glucosa 1 %.

6.5. Identificación molecular de cepas bacterianas aisladas a partir de desechos de almeja chocolata.

La extracción del ADN de las cepas se realizó con la ayuda del kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Quiagen) a partir de un botón celular de 2 mL de cultivo de cepas axénicas incubadas durante 24 horas a 30 °C y 150 rpm. La concentración de ADN extraído se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® y la integridad se observó mediante electroforesis con gel de agarosa al 0.6 % a 90 volts durante 30 minutos. Se realizaron PCRs para amplificar segmentos del gen 16S ARN ribosomal, que amplifican de las regiones variables V1 a la V9 empleando los primers para bacterias BAC8F (5' AGT GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') y 1492R (5' CGG CTA CTT TGT TAC GAC TT 3') (Teske *et al.*, 2002), y utilizando un termociclador Gene Cycler™ (BIO-RAD). El protocolo de amplificación de PCR inicia con un proceso de desnaturalización inicial de 94 °C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos 94 °C durante 45 segundos, 58 °C durante 45 segundos y 72 °C durante un minuto para terminar con un ciclo final de extensión de 72 °C durante cinco minutos. Los productos de PCR obtenidos fueron purificados y posteriormente cuantificados con NanoDrop® y observados en un gel de agarosa al 0.6 %. Estos productos se mandaron a secuenciar a GeneWiz®, los datos obtenidos fueron editados con el software 4peaks para remover las secuencias de baja calidad y la secuencia parcial de del 16S ARN ribosomal fue comparada con las secuencias de 16S ARN ribosomal disponibles en la base de datos pública de nucleótidos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para conocer la identidad de las cepas.

6.6. Amplificación y visualización del gen *phaC* en las cepas seleccionadas.

Con las cepas seleccionadas se realizó una PCR con los primers PHACGNF y PHACGNR, diseñados para amplificar un fragmento de alrededor de 500 pares de bases del gen *phaC* para bacterias gram negativas. Se utilizaron 12.5 µL de Gotaq mix, 6.5 µL de H₂O milliQ, 2.5 µL del primer forward, 2.5 µL del primer reverse (Tabla III) y 1 µL del ADN muestra. La

cepa 1B de *Halomonas ventosae*, fue tomada de la colección de bacterias del Laboratorio de Geomicrobiología y Biotecnología del CIBNOR, y usada como control positivo de la presencia del gen *phaC*. El protocolo de amplificación de PCR inicia con un proceso de desnaturalización inicial de 94 °C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos 94 °C durante un minuto, 54 °C durante un minuto y 72 °C durante un minuto para terminar con un ciclo final de extensión de 72 °C durante 10 minutos (López-Cortés *et al.*, 2010). Los productos de PCR fueron verificados a través de geles de agarosa a 0.6 %, teñidos con el colorante gel red en una placa de agitación durante 30 minutos y el gel se visualizó con ayuda de un fotodocumentador (Benchtop UV Transilluminator, UVP, BioDoc-it imaging system).

Tabla III. Cebadores utilizados para amplificar el gen *phaC* en bacterias Gram negativas (López-Cortés, *et al.*, 2010).

Nombre del cebador	Secuencia
PHACGNF	5' CCYRGATCAACAAGTTCTAC 3'
PHACGNR	5' TTCCAGAACAGMAGGTCTGAAGG 3'

6.7. Pruebas fenotípicas de las cepas seleccionadas.

Para tener más información de la fisiología de las cepas aisladas se realizaron las siguientes pruebas:

- a) Prueba de desplazamiento: La motilidad por desplazamiento se define como un movimiento rápido multicelular bacteriano en superficies sólidas. Para comprobar está característica, se colocó con cuidado 0.2 mL de una suspensión bacteriana de la cepa deseada cultivada en medio YEB glucosa 1 % a 30 °C y 150 rpm durante 24 horas en el centro de placas con agar marino 2216 con 0.4 % de agar y YEA glucosa 1 % con 0.4 % de agar. Se dejaron incubando a 30 °C y se observaron cada 24 horas.
- b) Utilización de sacarosa: Para conocer si las cepas seleccionadas eran capaces de utilizar la sacarosa como fuente de carbono se transfirieron colonias provenientes

de cajas Petri con medio YEA glucosa 1 % a cajas Petri con medio MBM sacarosa 1 % (contiene en g L^{-1} : NaCl: 11.69, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 12.34, KCl: 0.74, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1.47, NH_4Cl : 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 0.076, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.028, sacarosa: 10, y 50 mL de Tris buffer HCl [pH 7.5]) mediante el método de estría y se dejaron incubar a 30°C durante 24 horas. De las colonias obtenidas en este medio se resembró una de ellas en el mismo medio y se continuó incubando en las mismas condiciones, esta operación se repitió una vez más, con la finalidad de eliminar cualquier remanente de glucosa u otro nutriente proveniente del medio original que pudiera estar afectando el resultado del crecimiento de la bacteria en el medio. Cuando se observaba crecimiento colonial en la tercera resiembra en el medio MBM sacarosa 1 % y cuando se veían células integrales al observarla mediante microscopia de contraste de fases, se consideraba positivo para la utilización de sacarosa.

- c) Utilización de aminoácidos como fuente de carbono: Como una aproximación para saber si la cepa podía utilizar aminoácidos como única fuente de carbono y energía se inoculó una colonia de la cepa en cuestión crecida en YEA glucosa 1 % durante 24 horas en un frasco con 10 mL de medio YEB° (sin carbono) (contiene en g L^{-1} : NaCl: 11.69, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 12.34, KCl: 0.74, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1.47, NH_4Cl : 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 0.076, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.028, extracto de levadura: 5, y 50 mL de Tris buffer HCl [pH 7.5]) y se dejó incubando durante 72 horas a 150 rpm y 30°C . Se midió la D.O. a 660 nm y se hicieron observaciones el microscopio cada 24 horas.
- d) Medio citrato de Simmons: Esta prueba indica la capacidad de la bacteria para utilizar el citrato como única fuente de carbono en un medio con amonio inorgánico como fuente de nitrógeno. Los organismos que degradan el citrato utilizan las sales de amonio y liberan amonio incrementando el pH del medio y cambiando el color de este de verde a azul. Se preparó el medio agar citrato de Simmons (Difco®) como indicado en las instrucciones. Una vez enfriado el medio, se inoculó una cepa de la bacteria deseada por el método de punción y estriado y se incubó a 30°C durante 10 días.

e) Medio Moellers descarboxilasa: Medio que indica la presencia de enzimas descarboxilasas o deshidrolazas de aminoácidos (lisina, arginina y ornitina) mediante un indicador de pH. La composición del medio es la siguiente: en g L⁻¹: peptona: 5, extracto de levadura: 3, dextrosa: 1, L-aminoácido (lisina y arginina): 5, purpura de bromocresol: 0.2.) 10 mL de los medios preparados con lisina y arginina respectivamente se colocaron en tubos de ensayo y se esterilizaron en autoclave a 15 libras y 121°C durante 15 minutos. Una vez enfriado el medio se inoculó con una colonia mediante un asa estéril en los medios, se le agregó una capa de aceite mineral estéril para protegerlos del aire y prevenir falsa alcalinización en la superficie del medio y se dejaron incubando durante 4 días a 37 °C. Si la bacteria fermenta la glucosa, el medio se torna amarillo por el viraje al pH y si el aminoácido es descarboxilado se forman aminas que provocan un retorno al color original por la alcalinización del medio.

6.8. Reactivación de cepa E71.

Para reactivar a *Paracoccus seriniphilus* cepa E71 fue retirada del congelador a -20 °C y se colocó a 4 °C durante dos horas; seguidamente se dejó a temperatura ambiente durante dos horas más y posteriormente alícuotas de 0.2 mL se plaquearon en los medios YEA glucosa 1 % y 2216 con el método de estriado y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. A las 24 horas se realizó la caracterización colonial y celular de la cepa para corroborar su identidad y axenicidad.

6.9. Producción de biomasa y acumulación de PHA de E71 y Y01A1 en medios químicamente formulados con glucosa como fuente de carbono.

Para tener una comparación de la producción de biomasa y PHAs entre las fuentes de carbono costosas (glucosa) y las fuentes de carbono económicas (desechos orgánicos: efluente de enlatadora y caldos de desecho de almeja chocolate) se cultivaron las bacterias seleccionadas en medios químicamente definidos con glucosa como fuente de

carbono y se utilizó la estrategia de dos etapas para la producción de PHA. La primera etapa consistió en la producción de biomasa bacteriana donde se busca obtener la mayor tasa de crecimiento, y la segunda consistió en la inducción a la producción de PHA, en la que, una vez que la población bacteriana ha alcanzado su fase estacionaria, se somete a una limitación de nitrógeno y abundancia de fuente de carbono para estimular la acumulación de PHA.

La generación del inóculo consistió en colocar una colonia de cada cepa (E71 y Y01A1), incubada previamente durante 24 horas en YEA glucosa 1 % a 30°C, en tubos de ensayo con tapón de rosca que contenían 5 mL de YEB glucosa 1 % (contiene en g L⁻¹: NaCl: 11.69, MgSO₄•7H₂O: 12.34, KCl: 0.74, CaCl₂•2H₂O: 1.47, NH₄Cl: 0.5, K₂HPO₄•3H₂O: 0.076, FeSO₄•7H₂O: 0.028, glucosa: 10, extracto de levadura: 0.4 y 50 mL de Tris buffer HCl (pH 7.5)) incubándose a 150 rpm y 30 °C durante 24 horas. Los 5 mL de volumen de cultivo en el tubo se centrifugaron a 3214 g por 20 minutos y el botón celular se resuspendió en 5 mL de YEB glucosa 1 % para inocular matraces Erlenmeyer de boca ancha de 250 mL con 75 mL de YEB glucosa 1 % y se incubaron durante 24 horas a 150 rpm y 30 °C. Pasado este tiempo, se obtenía el máximo de densidad óptica (D.O.) equivalente a biomasa por lo que se procedió a someter el cultivo a una limitación de nitrógeno para estimular la producción de PHA. Para ello la biomasa se cosechó centrifugándola a 3214 g durante 20 minutos, el botón celular se resuspendió en 5 mL de medio MBM° (sin fuente de nitrógeno) (formulación en g L⁻¹: NaCl: 11.69, MgSO₄•7H₂O: 12.34, KCl: 0.74, CaCl₂•2H₂O: 1.47, K₂HPO₄•3H₂O: 0.076, FeSO₄•7H₂O, glucosa: 13, extracto de levadura: 0.4 y 50 mL de Tris buffer HCl [pH 7.5]) y las suspensiones bacterianas se colocaron en matraces Erlenmeyer de boca ancha 250 mL de capacidad con 75 mL de medio MBM° y se incubaron por 24 horas a 150 rpm a 30 °C. Pasadas 24 horas se adicionó 10 mL de una solución de glucosa al 10 % w/v (1 g de glucosa en 10 mL de H₂O_d), esterilizándola mediante filtración con membranas de 0.2 µm de diametro de poro. Cada cuatro horas durante las primeras ocho horas y posteriormente cada 24 horas, se hicieron mediciones de densidad óptica usando un espectrofotómetro HachTM DR/200 a una absorbancia de

660 nm y de conteo total directo (C.T.D.) usando una cámara Petrov-Houssser. Además se tomaron alícuotas cada 4 y 24 horas para la medición de los analitos (amonio y glucosa), centrifugando 1 mL del cultivo en tubos eppendorff de 1.5 mL a 3214 g durante 10 minutos conservando el sobrenadante y descartando el botón. Para el polihidroxibutirato se tomaron 10 mL del cultivo en tubos falcon de 10 mL, se centrifugaron a 3214 6 durante 20 minutos, se desechó el sobrenadante y el botón celular se colocó en un horno de secado a 37 °C durante 72 horas.

6.10. Exposición de *Paracoccus seriniphilus* cepa E71 a medio con efluente de enlatadora de alimentos pesqueros.

Para valorar la capacidad catabólica de *Paracoccus seriniphilus* cepa E71 para emplear al efluente de la enlatadora de alimentos pesqueros de la empresa Pando, se procedió primero a producir la biomasa en medio YEB glucosa 1 % de la misma manera que aparece expuesto en el punto 6.9. en 75 mL de YEB glucosa 1 % y, posteriormente, pasadas 24 horas de incubación la biomasa se cosechó y se resuspendió en 10 mL de los medios 1:1, 1:3 o 1:7 que fueron inoculados en matraces Erlenmeyer conteniendo 150 mL del medio respectivo (1:1, 1:3 o 1:7) y se continuó incubando a 150 rpm y 30 °C. Se midió la D.O. a 660 nm y se tomaron alícuotas para la medición de los analitos (glucosa, carbohidratos, proteína y lípidos).

Los medios utilizados fueron los siguientes: 1:1= 50 % de efluente y 50 % de MBM^{oo} (sin fuente de nitrógeno ni carbono), 1:3= 33.33 % de efluente y 66.66 % de MBM^{oo} (sin fuente de nitrógeno ni carbono) y 1:7= 15 % de efluente y 75 % de MBM^{oo} (sin fuente de nitrógeno ni carbono). El medio MBM^{oo} (sin fuente de N ni C) tiene en g L⁻¹: NaCl: 11.69, MgSO₄•7H₂O: 12.34, KCl: 0.74, CaCl₂•2H₂O: 1.47, K₂HPO₄•3H₂O: 0.076, FeSO₄•7H₂O, y 50 mL de Tris buffer HCl (pH 7.5).

6.11. Exposición de cepas aisladas del lixiviado de desecho de almeja chocolata al caldo de almeja chocolata (CAC).

Para probar el caldo de almeja chocolata el cual ya conocíamos que era rico en materia orgánica, se agregó un inóculo bacteriano de 5 mL a los medios con CAC (composición en g L^{-1} : NaCl: 11.69, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 12.34, KCl: 0.74, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1.47, extracto de levadura: 5, diluido en 1 L de caldo de almeja chocolata) esto con la finalidad de observar el crecimiento en medios con CAC y estimar si en la etapa de producción de biomasa, el medio YEB glucosa 1 % puede ser reemplazado por un medio con CAC y de esta manera reducir los costos generados por el uso de la glucosa en esta etapa. Buscando estimular la producción de PHA, a uno de los triplicados del cultivo bacteriano en medio CAC se le añadieron pulsos de caldo de almeja chocolata sin extracto de levadura denominado CAC° (contiene en g L^{-1} : NaCl: 11.69, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 12.34, KCl: 0.74, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 1.47, diluido en 1 L de caldo de almeja chocolata) ya que el extracto de levadura contiene una fracción de nitrógeno buscando de esta manera aumentar la proporción C/N para estimular la producción de PHA en la bacteria.

Para esto, se generó por sextuplicado un inóculo en 5 mL de medio YEB glucosa 1 % y después de 24 horas a 150 rpm y 30 °C se cosechó la biomasa y se resuspendió en 5 mL de ASW ½ X. Uno de los triplicados se inoculó en matraces Erlenmeyer de 150 mL con 75 mL de medio CAC y se dejó incubar en las mismas condiciones, mientras que el otro triplicado se inoculó en el mismo medio pero cada 24 horas se le añadió un pulso de 20 mL del medio CAC°. Se hicieron mediciones de densidad óptica mediante un espectrofotómetro Hach™ DR/200 spectrophotometer a una absorbancia de 660 nm y de conteo total directo (C.T.D.) mediante una cámara Petrov-Housser y se tomaron alícuotas para la medición de los analitos (glucosa, amonio, lípidos totales, carbohidratos totales, proteína total, glucógeno) y el polihidroxibutirato.

6.12. Extracción de PHAs.

Este procedimiento se efectuó de acuerdo al método propuesto por Law y Slepecky (1961) con algunas modificaciones; 10 mL de cultivo se cosecharon por centrifugación bajo las siguientes condiciones 3214 g por 10 minutos a 25 °C de temperatura, descartando el sobrenadante y exponiendo el botón celular a 10 mL de solución de hipoclorito de sodio (Clorox®) para después incubar durante una hora a 37 °C. Seguidamente, las células lisadas se cosecharon por centrifugación bajo las siguientes condiciones 3214 g por 10 minutos a 20 °C de temperatura y se obtuvo un botón que fue lavado de forma sucesiva con agua Mili Q, acetona, y etanol. En este último paso las muestras fueron transferidas a tubos de vidrio. El exceso de etanol se retiró por centrifugación a 3214 g por 10 minutos a 20 °C.

Una vez que se obtuvo un botón con el polímero y los restos celulares, éstos se disolvieron por extracción con 3 mL de cloroformo previamente hervido a 61.2 °C (punto de ebullición). Después de este tratamiento, los tubos tapados se dejaron incubando a temperatura ambiente durante 24 horas, y el polímero solubilizado en cloroformo se filtró empleando papel WHATMAN 934-AH de fibra de vidrio para retirar los restos celulares. El filtrado resultante se dejó evaporar para retirar la totalidad del cloroformo.

6.13. Cuantificación de PHAs.

El PHA obtenido en la etapa de extracción se convirtió a ácido trans-2-butenóico (ácido crotónico) mediante digestión. Para ello se adicionaron 10 mL de H₂SO₄ a cada tubo, y posteriormente se calentaron a 100 °C durante 10 minutos a baño maría. La solución tratada se dejó enfriar, se mezcló manualmente, y se diluyó con H₂SO₄ (1:100) para posteriormente ser transferida a una cubeta de cuarzo para llevar a cabo las mediciones con la ayuda de un espectrofotómetro (Helios Omega Uv-Vis/Thermo Scientific/USA) a una absorbancia de 235 nm, usando como blanco H₂SO₄. Para extrapolar los valores

obtenidos, se elaboró una curva de calibración empleando β -HB al 98 % (DL- β -hydroxybutyric acid sodium salt SigmaTM) como estándar.

6.14. Cálculo de parámetros de crecimiento poblacional.

La tasa constante de crecimiento (k) y el tiempo de generación (T_{gen}) fueron calculados con las siguientes fórmulas:

$$K = \frac{\log(t_1) - \log(t_0)}{0.301(t)} \quad (1)$$

$$T_{gen} = 1/K \quad (2)$$

6.15. Análisis estadísticos.

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la producción de PHB se realizó un análisis de varianza simple (ANAVA) con un $\alpha = 0.1$. Para establecer diferencias significativas entre los tratamientos se recurrió a una prueba de rangos múltiples de LSD de Fisher con un valor de probabilidad del 90 % y un nivel de confianza de 0.1. Los análisis se realizaron con el software STATGRAPHICS Centurion XV.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización química de los desechos marinos.

7.1.1. Efluente de enlatadora de productos pesqueros.

Las figuras 5 y 6 muestran los resultados del análisis del efluente de la enlatadora de alimentos pesqueros. En la figura 5 se presentan valores en porcentaje, siendo los minerales el mayor componente con 71 %, le siguen con 16 % los carbohidratos, 10 % proteínas y 2 % lípidos y un porcentaje de nitrógeno total de 1 %. La figura 6 muestra la concentración en mg mL^{-1} de los nutrientes orgánicos: proteína, carbohidratos y lípidos notándose concentraciones de materia orgánica muy bajas: 0.21 mg mL^{-1} de proteínas, 0.1 mg mL^{-1} de lípidos y 0.02 mg mL^{-1} de carbohidratos. Estos valores son cercanos a los de ambientes oligotróficos en los océanos: 0.001 mg mL^{-1} de carbono orgánico en las aguas superficiales y $0.0005 \text{ mg mL}^{-1}$ en el océano profundo (Kurath y Morita, 1983).

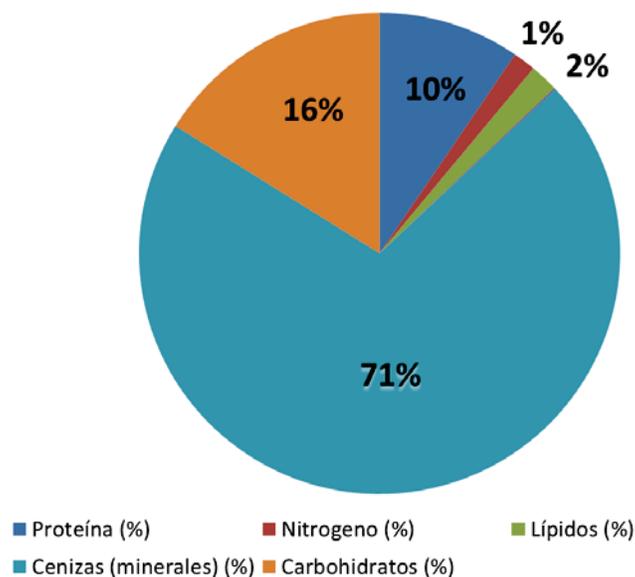


Figura 5. Composición química del efluente de la enlatadora de alimentos pesqueros de grupo Pando (porcentaje de peso seco).

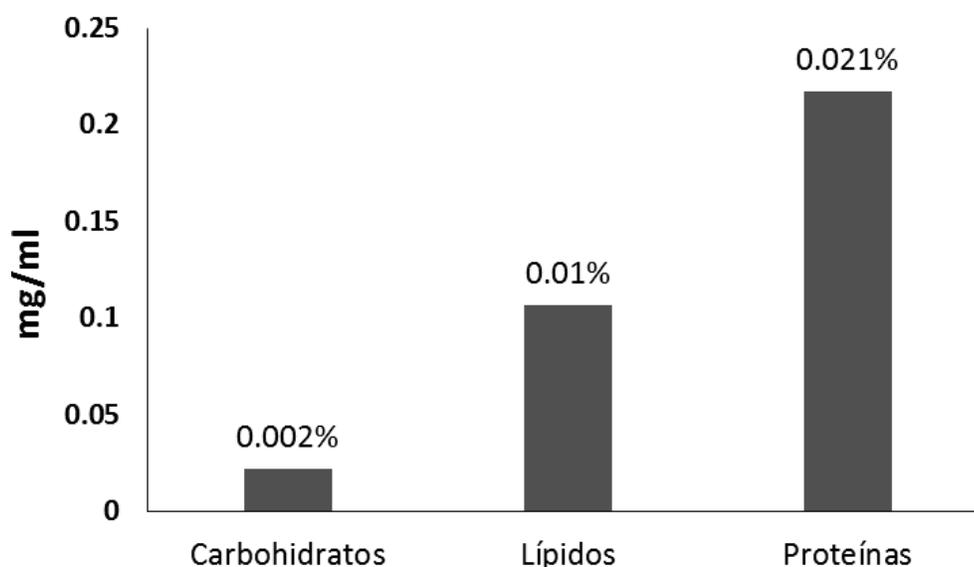


Figura 6. Concentración de los nutrientes del efluente de la enlatadora de alimentos pesqueros de grupo Pando obtenido mediante análisis espectrofotométricos.

7.1.2. Caldos de desechos de almeja chocolata (CAC).

Los análisis de porcentaje de peso seco de la figura 7 provienen de un caldo de almeja chocolata (*M. squalida*) realizado mediante la cocción en agua hirviendo durante 10 minutos de animales completos excepto concha. Los resultados mostraron que las proteínas presentaron un valor de 38.98 %, los minerales 38.32 %, los carbohidratos 22.44 % y los lípidos 0.27 % con un contenido total de nitrógeno de 6.24 % (Fig. 7). En cuanto a la concentración de los nutrientes dadas en mg mL^{-1} , estos resultados provienen de los análisis realizados a partir de desechos de la almeja chocolata obtenidos de restaurantes y puestos locales de La Paz, B.C.S. Se obtuvo mayor cantidad de nutrientes en el caldo a mayor tiempo de cocción y mayor cantidad de desecho usado. En el tratamiento más eficiente (500 g de desecho en 1 litro de agua hirviendo durante 10 minutos), el contenido de proteínas fue de 7.1 mg mL^{-1} , carbohidratos 4.8 mg mL^{-1} representados casi en su totalidad por glucógeno (4.68 mg mL^{-1}) y de lípidos de 0.37 mg mL^{-1} dando un total de

materia orgánica de más de 1.2 %, cifra que representa una cantidad de materia orgánica adecuada para el crecimiento bacteriano si sabemos que muchos de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio emplean concentraciones de fuentes de carbono entre el 0.5 % al 2 % (Fig. 8).

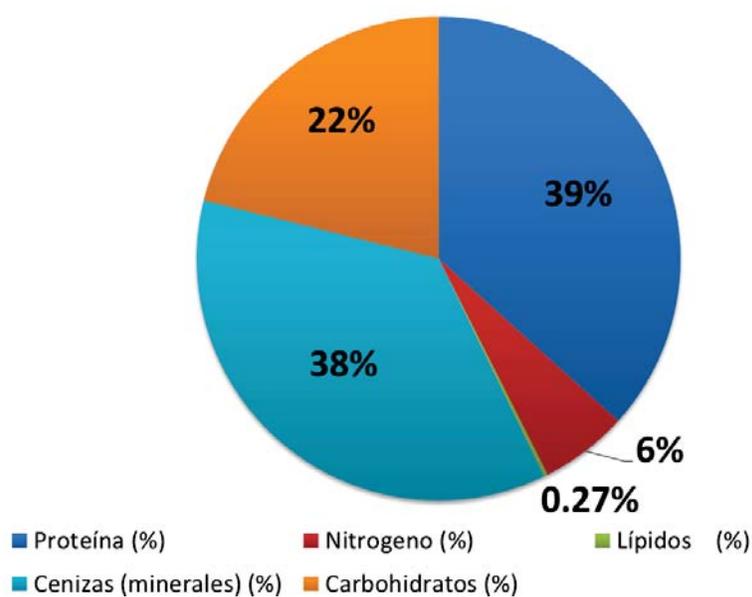


Figura 7. Composición química del caldo de almeja chocolate obtenido de animales completos en porcentaje de peso seco.

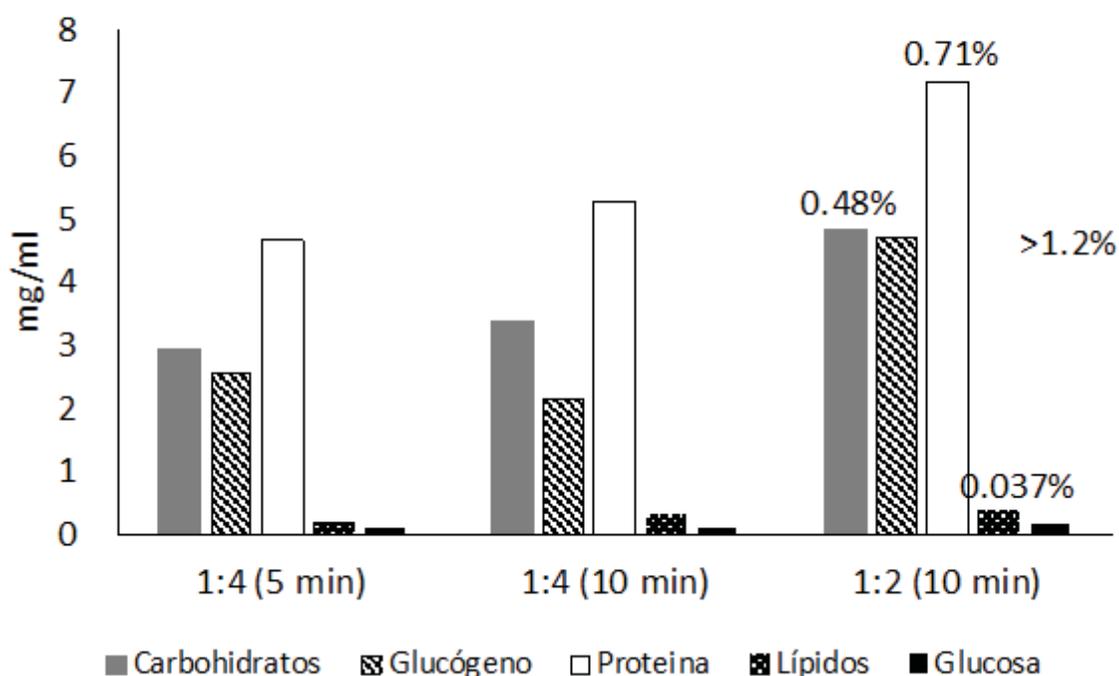


Figura 8. Concentración de los nutrientes de desechos de almeja chocolata bajo diferentes tratamientos obtenidos mediante análisis espectrofotométricos. 1:4 10 min = 250 g de desecho de almeja chocolata en 1 L de agua hervido durante 10 minutos, 1:4 2 min = 250 g de desecho de almeja chocolata en 1 L de agua hervido durante 2 minutos, 1:2 10 min = 500 g de desecho de almeja chocolata en 1 L de agua hervido durante 10 minutos

7.2. Selección y aislamiento de cepas de bacterias productoras de PHAs a partir de un lixiviado de desecho de almeja chocolata.

Se aislaron bacterias productoras de PHAs de un desecho de almeja chocolata con el supuesto de que las bacterias asociadas serían capaces de catabolizar los nutrientes de estos desechos.

Se aislaron siete cepas del lixiviado de desecho de almeja chocolata. A partir de colonias aisladas desarrolladas en medio YEA glucosa 1 % y Pseudomonas Isolation Agar (PIA) (Difco®) con ASW ½ X e incubadas a 30 °C durante 48 horas que mostraron inclusiones citoplasmáticas refringentes (ICR) también visualizadas con Rojo Nilo y microscopio de

fluorescencia. La tabla IV muestra la descripción morfológica parcial de las cepas aisladas que almacenan PHA. En la figura 9 se muestran las curvas de crecimiento poblacional en medio YEB glucosa 1 % y las velocidades máximas de crecimiento y tiempo de generación de cuatro de estas cepas empleando densidad óptica a 660 nm. La cepa Y01A1 fue seleccionada por su característica fenotípica notable de acumular PHA y alcanzar los valores más altos de densidad óptica a las 24 h (D.O. 660 = 1.8) aun presentando menor velocidad de crecimiento; mientras que las cepas Y02A2, P01A2-A y P01A2-B mostraron valores de densidad óptica menores, en el intervalo de 0.5 a 0.8.

Tabla IV. Caracterización de las cepas aisladas del lixiviado de almeja chocolata^a

Cepa	Medio	Descripción celular	Gram	ICR ^b	Rojo Nilo
Y01A1	YEA glu 1 %	Bacilos móviles de 1-1.3 μm de ancho x 1-3 μm de largo	Negativo	+++	+++
Y02A2	YEA glu 1 %	Bacilos móviles rectos o curvos de 1-1.5 μm de ancho x 1-4 μm de largo	Negativo	+++	++
Y01A2	YEA glu 1 %	Bacilos móviles curvos de 1.3 μm de ancho x 1-3-7 μm de largo	Negativo	+++	+++
Y04B1	YEA glu 1 %	Bacilos móviles curvos de 1-1.5 μm de ancho x 2-4 μm de largo	Negativo	+	+
P01A1	PIA ASW ½ X	Coco bacilos móviles de 1.4 μm de ancho x 1.4-2 μm de largo	Negativo	++	+++
P01A2	PIA ASW ½ X	Bacilos móviles de 1-1.5 μm de ancho x 1.5-3 μm de largo	Negativo	+++	+++
Y03A4	YEA glu 1 %	Bacilos móviles pequeños de 0.5-1 μm de ancho x 1-2 μm de largo	Negativo	+	+

^aLas cepas fueron incubadas por 24 horas a 30 °C. ^bICR = Inclusiones citoplasmáticas refringentes, + = presentes, ++ = abundantes, +++ = muy abundantes.

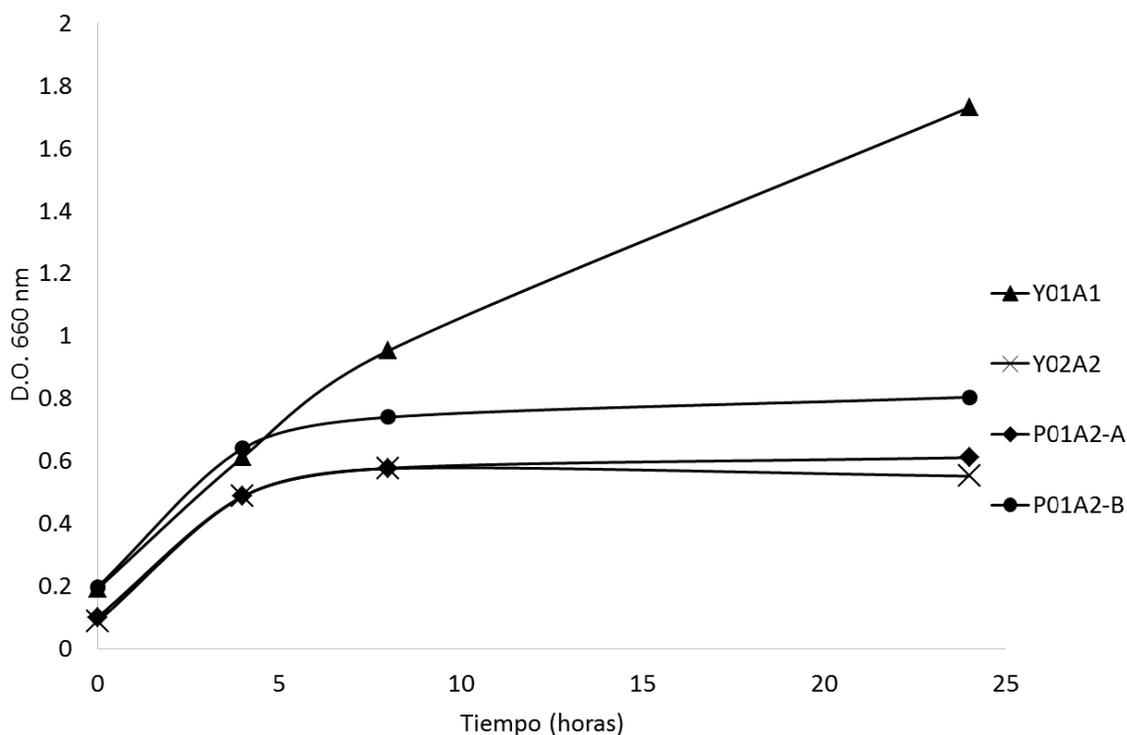


Figura 9. Cinéticas de crecimiento poblacional en medio YEB glucosa 1 % de 4 cepas productoras de PHAs aisladas del lixiviado de almeja chocolata. Condiciones de cultivo 150 rpm y 30 °C. Y01A1: $K = 0.38 \text{ h}^{-1}$, $T_{\text{gen}} = 2.61 \text{ h}$; Y02A2: $K = 0.56 \text{ h}^{-1}$, $T_{\text{gen}} = 1.75 \text{ h}$; P01A2-A: $K = 0.51 \text{ h}^{-1}$, $T_{\text{gen}} = 1.94 \text{ h}$; P01A2-B: $K = 0.39 \text{ h}^{-1}$, $T_{\text{gen}} = 2.44 \text{ h}$. Los cálculos de K y T_{gen} se calcularon con los datos de 0 y 4 horas de cultivo.

7.3. Identificación molecular de la cepa Y01A1.

De las secuencias parciales del gen 16S ARN ribosomal obtenidas se seleccionó únicamente la región que mostró una secuencia con alta señal, sin ruido de fondo y sin ambigüedades, para posteriormente ser comparadas con el gen 16S ARN ribosomal de la base de datos GeneBank utilizando el algoritmo BLAST. La secuencia obtenida tuvo una longitud de 511 nucleótidos, esto debido a que únicamente se utilizó el primer foward debido a la pérdida de la alícuota del primer reverso durante el envío a la empresa de secuenciación GeneWiz. El resultado del BLAST de esta secuencia utilizando la base de datos “nucleotide collection (nr/nt)” mostró una identidad y una cobertura del 100 % con

un puntaje máximo de 944 con varias cepas del genero *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio natriegnes*, *Vibrio owensii*, *Vibrio azureus*, *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrio neocladonicus*). Utilizando la base de datos “16S Ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)” la cepa con mayor puntaje (941) fue *Vibrio alginolyticus* cepa NBRC 15630 con un 99 % de identidad y un 100 % de cobertura, le siguen cepas de *Vibrio natriegnes*, *algynoliticus*, *pharaemolyticus*, *jasicida*, *pelagius*, *campbellii* y *neocladonicus*, con puntajes máximos muy similares. Por lo tanto, esta cepa se depositó en la base de datos de GeneBank bajo el número de acceso KX774275 con el nombre de *Vibrio sp.* cepa Y01A1.

7.4. Pruebas fenóticas complementarias para la identidad de las cepas.

En la tabla V se resumen los resultados de las pruebas realizadas para las cepas E71 y Y01A1 para conocer más acerca de su fisiología e identidad.

Tabla V. Pruebas realizadas a E71 y Y01A1.

Prueba	Y01A1	E71
Desplazamiento (Swarming)	+	-
Sacarosa	+	-
Moellers arginina descarboxilasa	-	ND
Moellers lisina descarboxilasa	-	ND
Medio citrato de Simmons	-	ND
Color de colonia en medio TCBS	Amarillo	ND
Crecimiento con extracto de levadura	+	ND

+ = positivo, - = negativo, ND = No determinado.

7.5. Visualización del gen *phaC* de la cepa Y01A1.

En la figura 10 se observa una banda única con una talla aproximada de 500 pb en los carriles correspondientes a la cepa problema Y01A1 y al control positivo, (ADN de *Halomonas ventoseae* cepa 1B) que se especula corresponde al gen *phaC*.

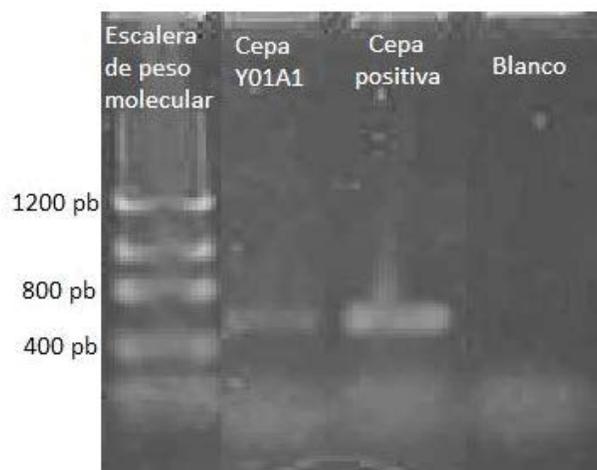


Figura 10. Gel de agarosa al 0.6 % con los productos de PCR del gen *phaC* de la cepa Y01A1. Muestra una banda única con un tamaño aproximado de 500 pares de bases.

7.6. Crecimiento poblacional y producción de PHAs de *P. seriniphilus* cepa E71 y *Vibrio* sp. cepa Y01A1 en medio químicamente definido empleando glucosa como fuente de carbono y un sistema de producción de dos etapas con limitación de nitrógeno.

Se crecieron las bacterias productoras de PHA con glucosa al 1 % para la generación de biomasa y posteriormente se le suministraron las condiciones para estimular la producción de PHAs mediante la limitación de nitrógeno.

En la figura 11 se muestra la densidad óptica y valores de pH de un cultivo de *P. seriniphilus* cepa E71 en medio YEB glucosa 1 % y su transferencia a medio MBM° (sin fuente de N) para promover la producción de PHAs. La glucosa es consumida durante la etapa de crecimiento exponencial así como durante la fase de acumulación de PHA, que comienza a las 24 horas. La glucosa se consume durante las primeras 24 horas y luego

aumenta debido a la transferencia de la biomasa al medio MBM° el cual contiene 1.3 % de glucosa, la glucosa continua consumiéndose incluso después del pulso a las 48 horas, sin embargo no se agota y queda un remanente de 16.8 mg mL^{-1} después de 170 horas de incubación. Los valores de pH en el cultivo variaron, iniciando cerca del neutro (7.12) para posteriormente descender a 5.15 debido al metabolismo ineficiente de la glucosa, que resulta en la producción de ácidos orgánicos.

La figura 12 corresponde al crecimiento poblacional, valores de pH y consumo de glucosa de la cepa Y01A1 bajo las mismas condiciones de cultivo que E71. En la primera etapa el consumo de glucosa por esta bacteria es muy rápido ya que agota la totalidad de ésta en 24 horas. Posteriormente hay un aumento en la glucosa debido a la transferencia al medio MBM° sin embargo el consumo de glucosa en la segunda etapa es menos evidente, pudiéndose deber ésto a los valores bajos en el pH ya que en este caso, aunque el valor inicial del pH es de 7.47, llega a alcanzar un pH de 4.58, fenómeno que tiene correspondencia con la gráfica de densidad óptica donde se observa que después de la cosecha de la biomasa y la transferencia al medio MBM° la población bacteriana no aumenta quedando los valores de D.O. alrededor de 1.5.

En medio YEB glucosa 1 % se promovió la generación de biomasa mientras que en medio MBM° se dieron las condiciones para la acumulación de PHAs representado por inclusiones citoplasmáticas refringentes (ICRs). En las células de *P. seriniphillus* cepa E71 y *Vibrio* sp. cepa Y01A1 se detectó la acumulación tanto en la primera etapa como en la segunda etapa (Fig. 13 y 14), pero fue más evidente en E71.

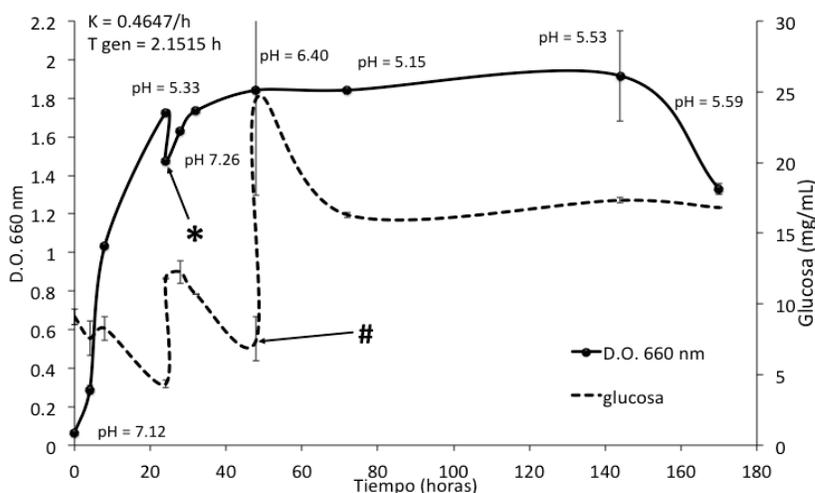


Figura 11. Crecimiento poblacional (línea continua) y consumo de glucosa (línea discontinua) de *P. seriniphilus* cepa E71 en un sistema de cultivo de dos etapas. En la primera etapa se empleó medio YEB glucosa 1 % y en la segunda etapa medio MBM° utilizando glucosa como fuente de carbono. * = Cambio al medio sin nitrógeno (medio MBM°). # = Pulso de glucosa (1 g). Condiciones de cultivo: 150 rpm y 30 °C. Los cálculos de K y T gen se obtuvieron con los datos de 4 y 8 horas de cultivo.

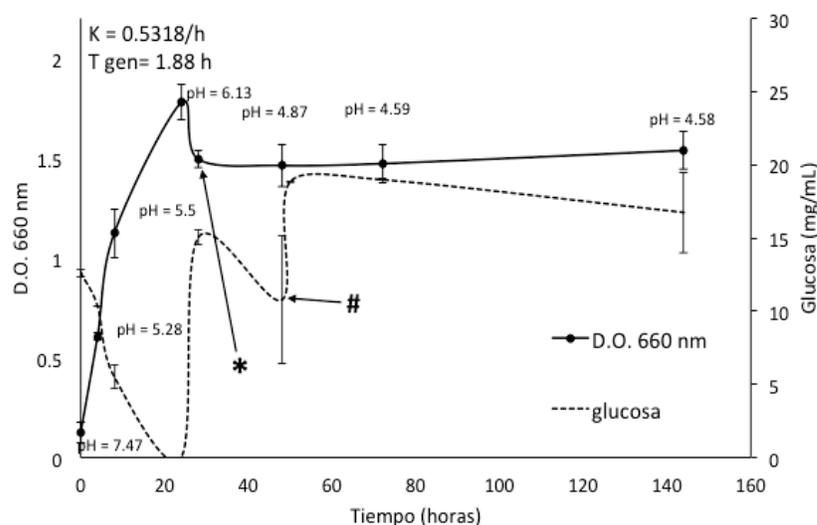


Figura 12. Crecimiento poblacional (línea continua) y consumo de glucosa (línea discontinua) de la cepa Y01A1 en un sistema de cultivo de dos etapas. En la primera etapa se empleó medio YEB glucosa 1 % y en la segunda etapa medio MBM° utilizando glucosa como fuente de carbono. * = Cambio al medio sin nitrógeno (medio MBM°). # = Pulso de glucosa (1 g). Condiciones de cultivo: 150 rpm y 30 °C. Los cálculos de K y T gen se obtuvieron con los datos de 0 y 4 horas de cultivo.

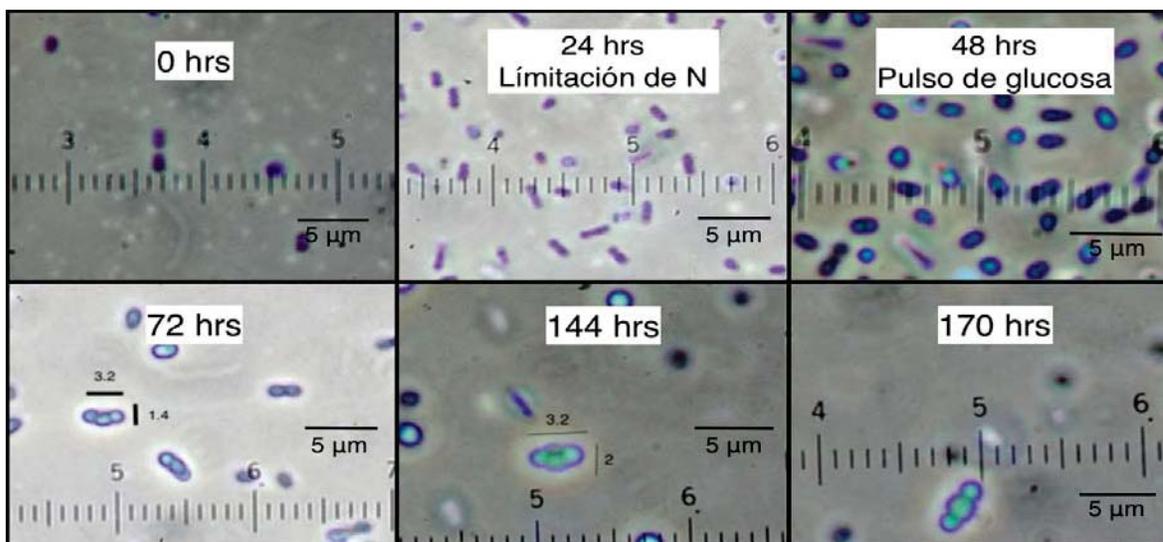


Figura 13. Micrografías de contraste de fases de *P. seriniphilus* cepa E71 a diferentes tiempos de cultivo con el sistema cultivo de dos etapas donde se observa la acumulación creciente de PHA desde las 48 horas.

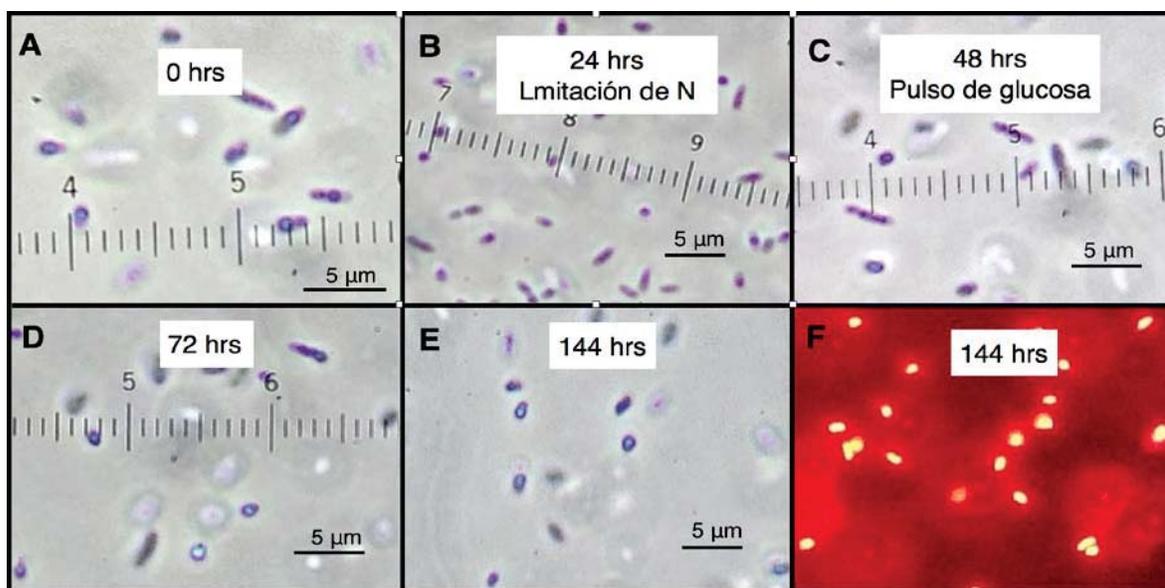


Figura 14. Micrografías de contraste de fases de la cepa Y01A1 a diferentes tiempos de cultivo con el sistema cultivo de dos etapas donde se observa la acumulación de PHAs. A, B, C, D, E = Microscopías de contraste de fases, F = Microscopía de epifluorescencia que muestra la reacción de la tinción lipofílica rojo Nilo a una excitación de 540 nm, los colores brillantes de la micrografía F indican la presencia de PHA.

En la figura 15 se representa el cambio del pH con respecto al tiempo de los medios para producción de biomasa (YEB glucosa 1 %) y PHAs (MBM^o) inoculados con la cepa Y01A1 y E71. Se observa que el decremento en los valores de pH producidos por la cepa Y01A1 es más rápido ya que en cuatro horas alcanza valores de 5.4; sin embargo se observa una tendencia a incrementar el pH en las siguientes 20 horas llegando hasta 6.96. Una vez transferida esta bacteria el medio MBM^o la caída del pH es de nuevo muy acelerada y continua en decremento las subsecuentes 24 horas, de tal manera que al tiempo final (144 horas) el pH del cultivo fue de 4.58. En contraste, el decremento de los valores de pH con la cepa E71 fue menos abrupto, pues llegó a 5.32 en 24 horas en el medio YEB glucosa 1 % mientras que en el medio MBM^o hubo un decremento en el pH, siendo el valor más bajo 5.2 a las 48 horas en este medio y en el tiempo final (170 horas de cultivo) el valor fue de 5.59.

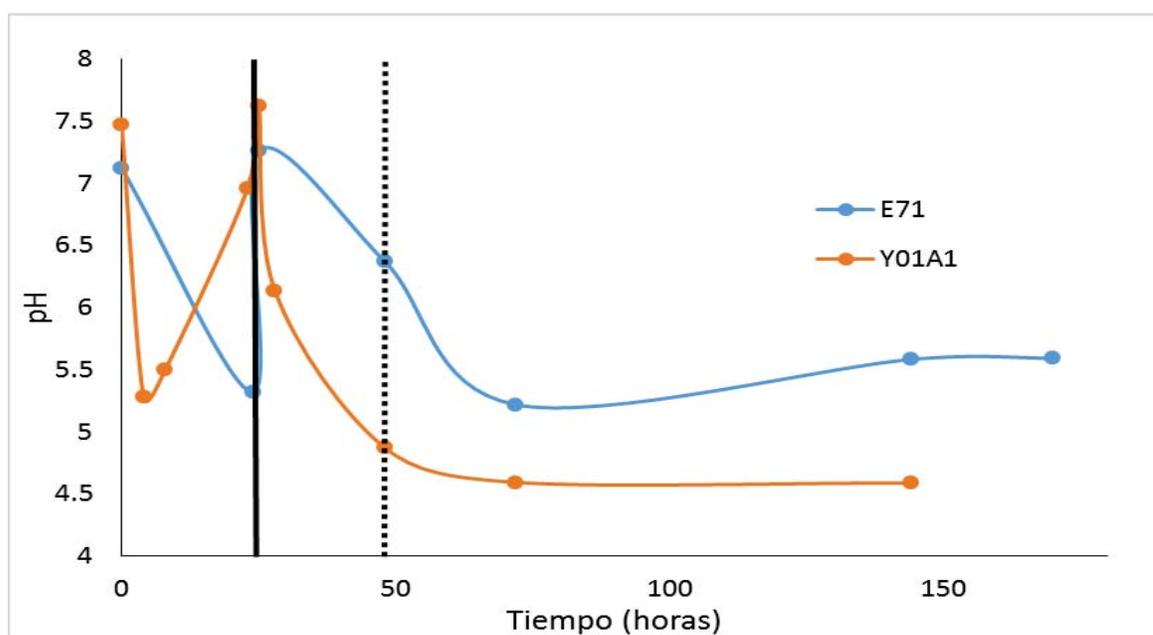


Figura 15. Cambio del pH con respecto al tiempo en los medios para producción de biomasa y PHA con las cepas E71 y Y01A1. La línea vertical continua representa el momento de la transferencia al medio sin nitrógeno (MBM^o) y la línea punteada la adición del pulso de glucosa.

7.7. Valoración de los medios de cultivo elaborados con desechos marinos para producción de biomasa y PHAs.

7.7.1. *P. seriniphilus* cepa E71 con efluente de enlatadora de grupo Pando.

En la figura 16 se muestran valores de densidad óptica que corresponden a la densidad poblacional de la cepa E71 expuesta a medios de cultivo con tres diferentes concentraciones del efluente. Se observa un incremento en la densidad óptica cuando la bacteria es crecida en YEB glucosa 1 % (primeras 24 horas de cultivo). Una vez que se transfiere esta biomasa al medio con el efluente de la enlatadora se observa una disminución en la densidad óptica, presumiblemente por la baja concentración de nutrientes (0.022 %) representada en el efluente (Figs. 5 y 6). Considerando este precepto, se decidió añadir un pulso de glucosa para estimar la viabilidad de la bacteria y conocer si la falta de carbono disponible para la célula era la explicación de los valores bajos de densidad óptica.

Para las diluciones 50 % y 33 %, el pulso consistió en añadir 1 g de glucosa en 10 mL de H₂O_d (10 % w/v), esterilizándola por filtración con membranas de 0.2 µm de tamaño de poro, mientras que para la dilución de 15 % se le agregó 2 g de glucosa en 10 mL de H₂O_d (20 % w/v) a una repetición de esta y a la otra no se le añadió glucosa. Estos pulsos añadidos a las 312 horas demuestran la viabilidad de las células evidenciado por un aumento en la densidad óptica. El hecho de que la réplica de 15 % a la que no se le añadió glucosa no mostrará aumento en la D.O. confirma que la razón de que no hubiera crecimiento poblacional se debía a la falta de una fuente de carbono disponible para las células.

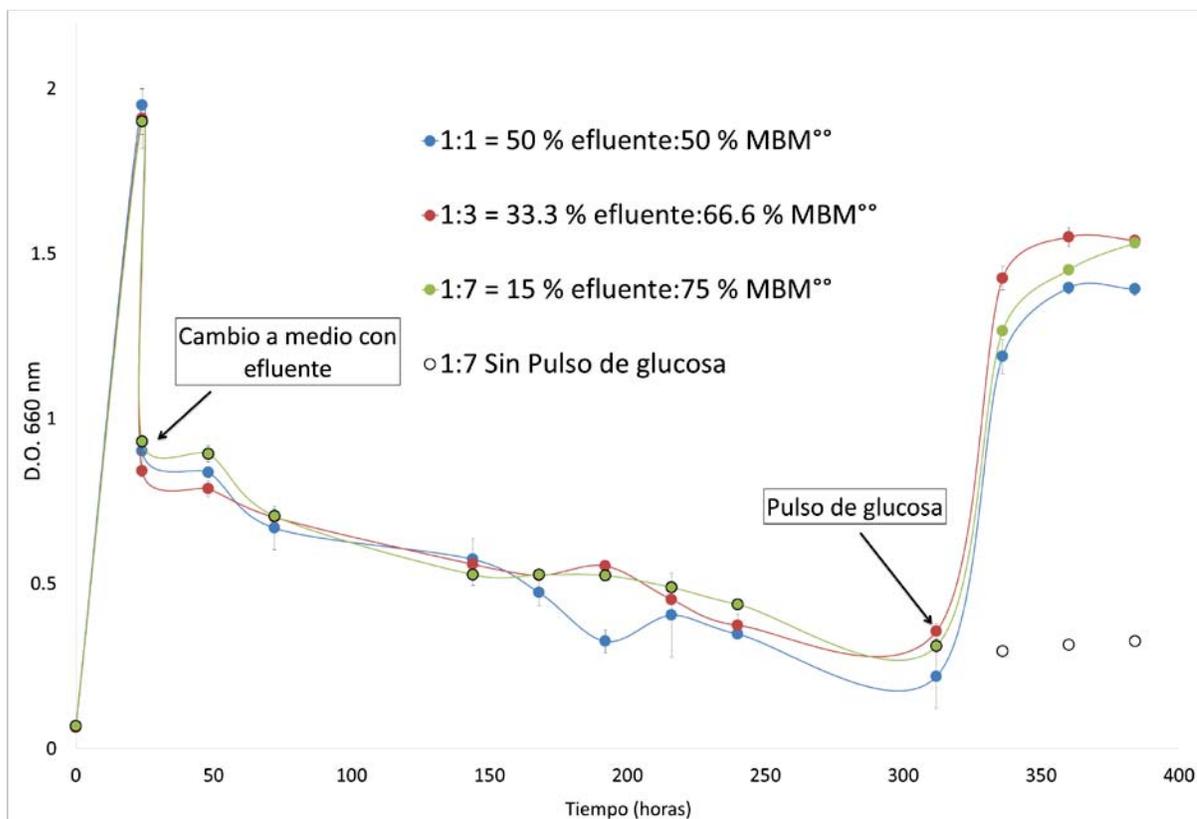


Figura 16. Crecimiento poblacional de *P. seriniphilus* cepa E71 expuesto diferentes concentraciones del efluente de la enlatadora de grupo Pando.

En la figura 17 se muestran los cambios de las concentraciones de los nutrientes (carbohidratos, lípidos y glucosa) de los medios con las diferentes concentraciones del efluente además de los cambios en los valores de pH y las densidades poblacionales a través del tiempo. Los valores de los nutrientes son en todos los casos muy bajos: de 0 a 0.35 mg mL^{-1} , excepto en el tratamiento en que se agregaron 2 g de glucosa, donde se observan valores entre 1.5 a 10 mg mL^{-1} después del pulso. Lo que se observa en todos los casos es que después de agregaron el pulso de glucosa no sólo aumentan los carbohidratos totales si no también los lípidos totales.

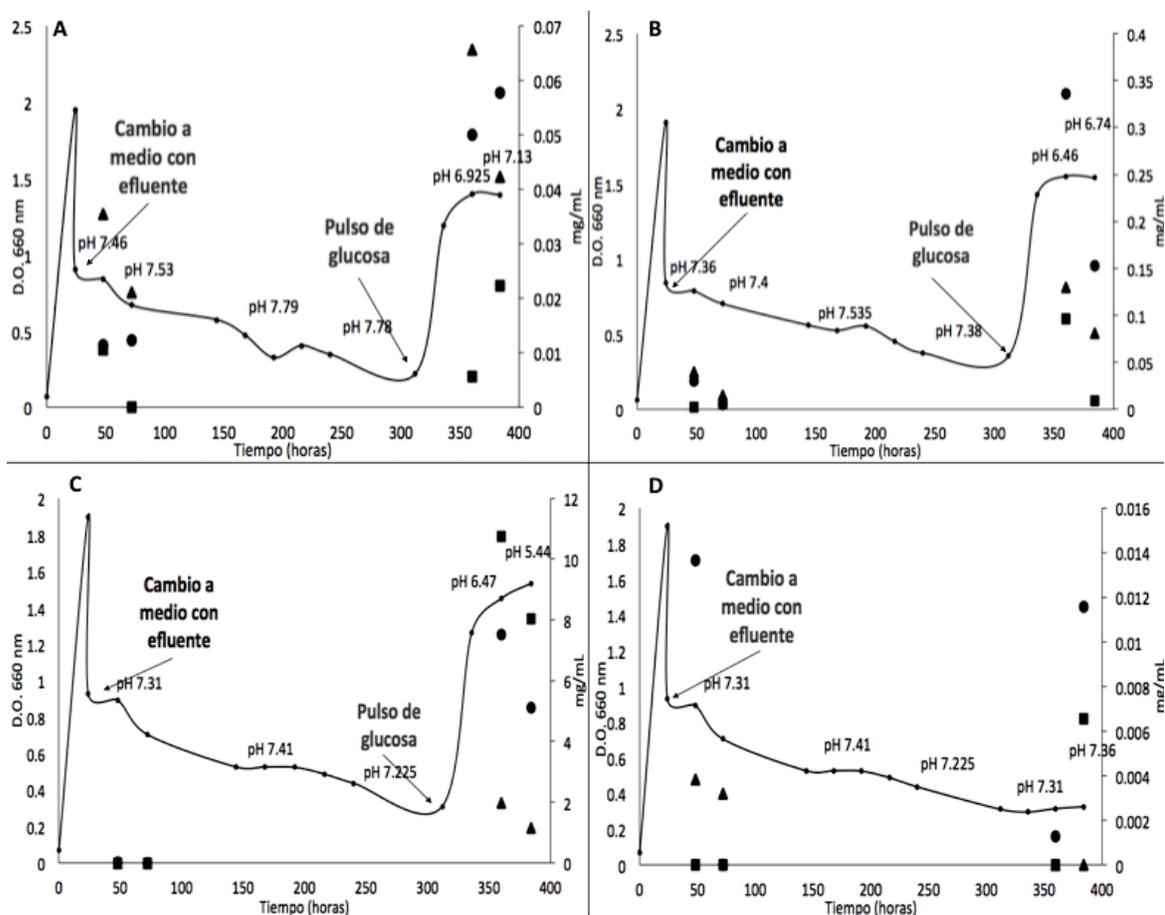


Figura 17. Gráficas de aproximación al crecimiento poblacional y concentración de nutrientes de los diferentes tratamientos de la cepa E71 con efluente de grupo Pando. A) 1:1 con 1 g de pulso, B) 1:3 con 1 g de pulso de glucosa, C) 1:7 con 2 g de pulso de glucosa, D) 1:7 sin pulso de glucosa. Línea negra = densidad óptica, círculo = carbohidratos totales, cuadrado = glucosa, triángulo = lípidos totales.

En cuanto a los cambios de valores de pH visualmente no se aprecian variaciones manteniéndose en valores cercanos al neutro. Una vez agregado el pulso de glucosa se nota una disminución en el valor de pH probablemente debido al consumo del sustrato para posteriormente tender a valores neutros en la dilución de 50 % (1:1) y 33 % (1:3), mientras que para la dilución 15 % (1:7) con 2 g de glucosa añadida la caída del valor de pH fue mayor sin un cambio posterior hacia valores neutros. Para el caso del tratamiento de 15 % sin adición de glucosa el pH permaneció con mínimas modificaciones (Fig. 18).

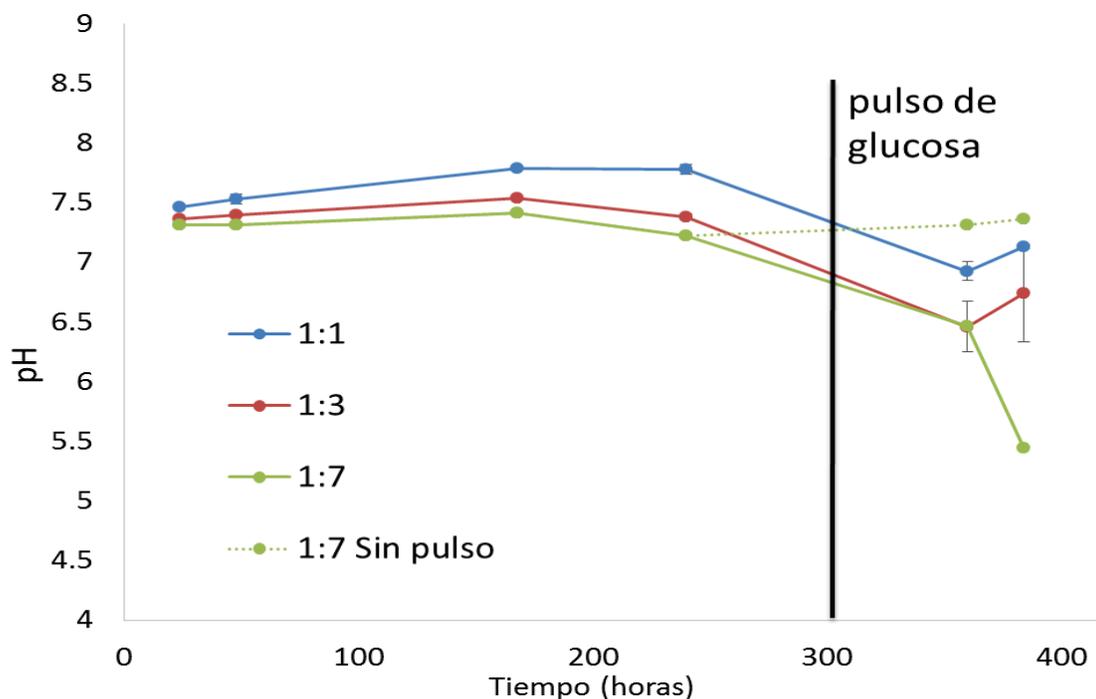


Figura 18. Cambios en los valores de pH durante el cultivo de la cepa E71 en los medios con diferentes concentraciones de efluente de la enlatadora de alimentos pesqueros. La línea negra representa el momento de la adición del pulso de glucosa 1:1 = 50 % efluente (1 g de pulso de glucosa), 1:3 = 33.3 % efluente (1 g de pulso de gluocsa), 1:7 = 15 % efluente (2 g de pulso de glucosa).

7.7.2. Cepa Y01A1 en caldo de almeja chocolata (CAC).

En las figuras 19 y 20 se muestran las curvas de crecimiento poblacional y valores de pH de un cultivo de la cepa Y01A1 en medio CAC sin pulsos (Fig. 19) y con pulsos (Fig. 20). Los pulsos consistieron de 20 mL de medio CAC° y están representados por las flechas de color negro en la figura 20. Se observa en la figura 19 que en el caso del cultivo sin pulsos la biomasa aumenta en las primeras horas, alcanzando la máxima densidad óptica a las 74 horas (1.93). En el caso del cultivo con pulsos (Fig. 20) la máxima densidad óptica (1.79) se alcanza a las 48 horas.

Presumiblemente los pulsos de CAC° diluían el cultivo, este efecto se nota en la caída de los valores de D.O. notoriamente evidenciado en el segundo pulso (Fig. 20) donde tenemos una medición de densidad óptica de 1.79 a las 48 horas de cultivo antes de agregar el pulso y 1.61 a las 52 horas, una vez que se le había agregado el pulso.

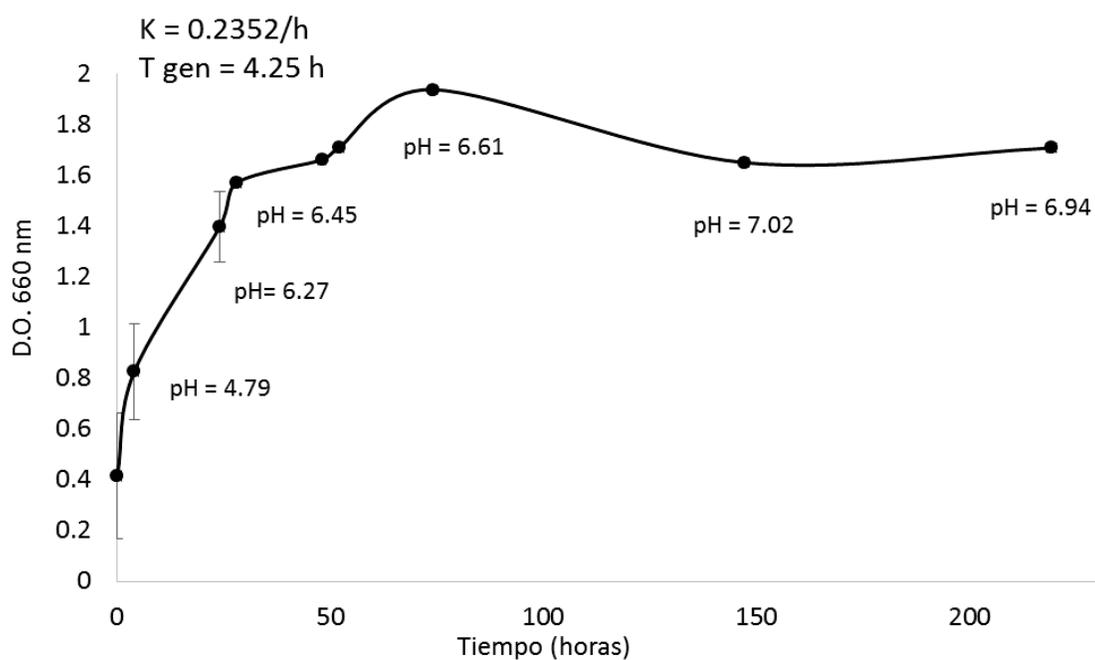


Figura 19. Crecimiento poblacional de la cepa Y01A1 en medio CAC. Condiciones de cultivo: 150 rpm y 30°C. Los cálculos de K y T gen se obtuvieron con los datos de 0 y 4 horas de cultivo.

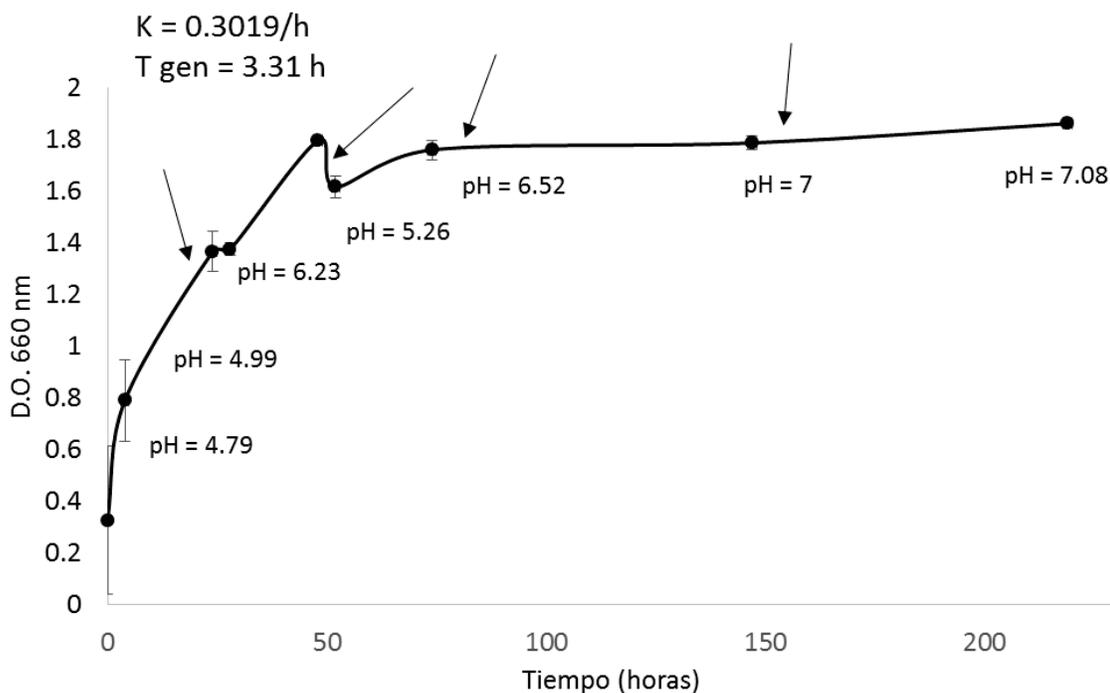


Figura 20. Crecimiento poblacional de la cepa Y01A1 en medio CAC con pulsos de CAC° (20 mL). Las flechas indican el momento de la adición de los pulsos. Condiciones de cultivo: 150 rpm y 30 °C. Los cálculos de K y T gen se obtuvieron con los datos de 0 y 4 horas de cultivo.

En la figura 21 se muestra el cambio de pH durante el cultivo de estos dos medios. Se observa una tendencia a incrementar hacia valores neutros. El medio CAC° tenía un pH ácido de 4.52 y la adición de éste resultó en decremento en los valores de pH, como se observa en el caso del segundo pulso, sin embargo el pH tiende a incrementar alcanzando valores cercanos a pH neutro. El incremento en los valores de pH puede deberse al aumento de la concentración del amonio. También cabe destacar que el pH de los medios fue ácido desde el inicio por lo que se recomienda la utilización de un buffer de pH.

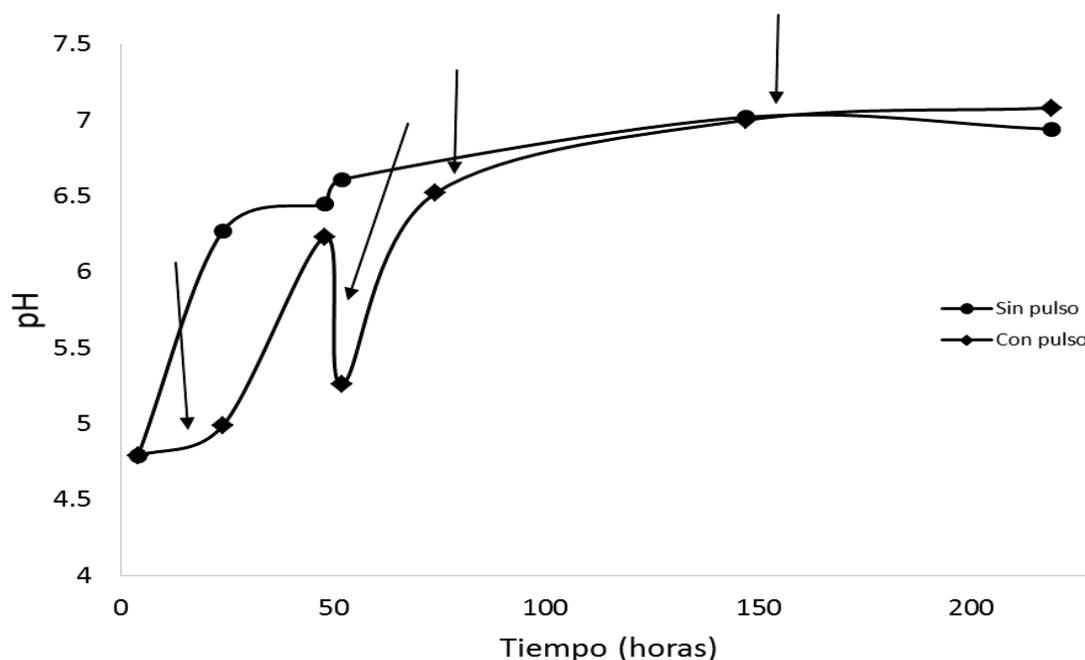


Figura 21. Cambio de pH durante el cultivo de Y01A1 en medio CAC con pulsos y sin pulsos. Las flechas indican la adición del medio CAC°.

En la figura 22 se muestra el cambio en las concentraciones de los nutrientes (carbohidratos, glucógeno, glucosa, lípidos, proteínas, amonio) durante el cultivo en medio CAC inoculado con la cepa Y01A1, sin pulsos (A y C) y el cultivo con pulsos de CAC° (B y D) además de los valores de densidad óptica (línea negra). Hubo consumo de todos los compuestos analizados excepto en el caso de amonio, cuyos valores incrementaron. El decremento en la concentración de los nutrientes ocurrió en las primeras 50 horas en el caso del cultivo sin pulsos correspondiente a la fase de crecimiento exponencial de la bacteria. El cultivo con pulsos mostró un comportamiento similar pero hubo un mayor consumo de proteína en donde el decremento en sus valores se observa hasta las 74 horas, apreciando además que en el segundo pulso indicado por la segunda línea aumentaron los valores al agregar el pulso, información que corresponde con los resultados de la caracterización de los caldos de almeja chocolate que muestran un mayor contenido de proteína con respecto al resto de los nutrientes (Fig. 8).

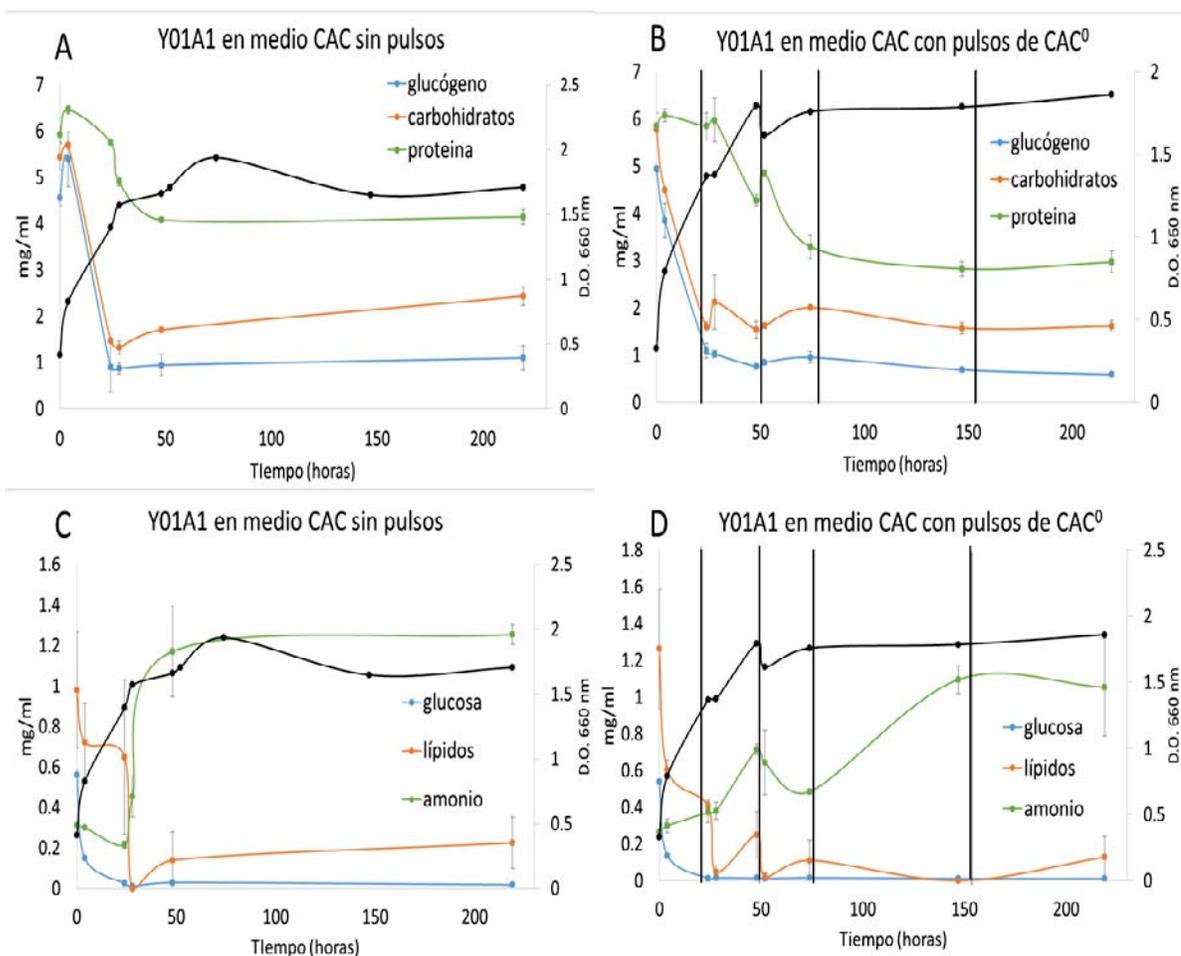


Figura 22. Crecimiento poblacional y concentración de nutrientes del medio CAC sin pulsos (A y C) y con pulsos (B y D) inoculado con la cepa Y01A1. La línea negra representa la densidad óptica a 660 nm. Las líneas verticales negras marcan el momento de la adición del pulso de CAC⁰. Las líneas de colores representa los nutrientes cuyos valores se encuentran en mg mL⁻¹ excepto en el caso de amonio que está en mg L⁻¹.

En la figura 23 se muestra el consumo total de las principales biomoléculas (carbohidratos, proteínas y lípidos) tanto del cultivo sin pulsos como del que se le añadieron los pulsos de CAC⁰. Lo que se nota es que el nutriente más consumido fueron los carbohidratos seguido por proteínas y finalmente lípidos, y que hubo un mayor consumo total de nutrientes en el caso del cultivo con pulsos.

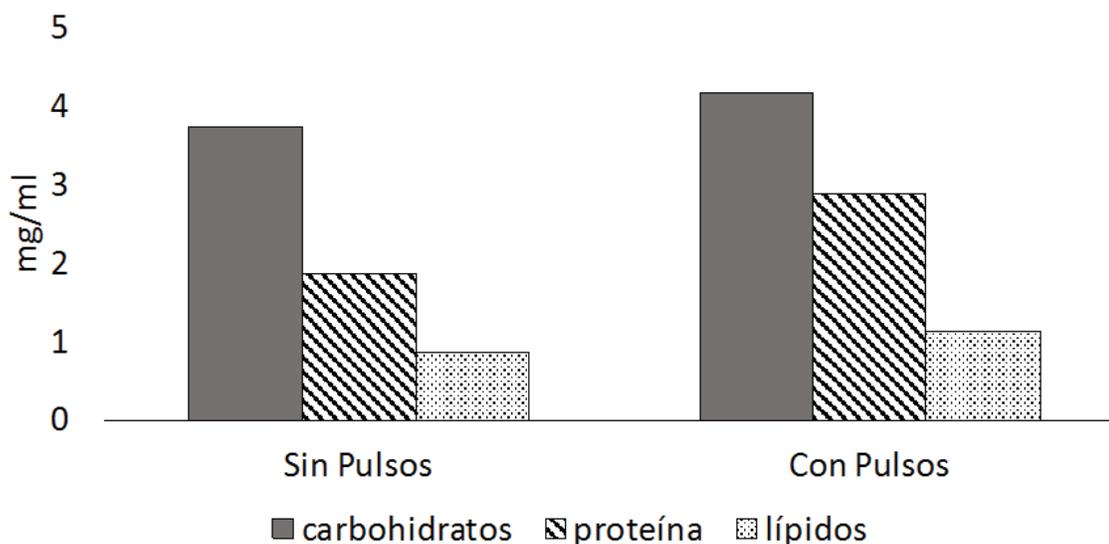


Figura 23. Consumo total de los nutrientes en el medio CAC inoculado con la cepa Y01A1 sin pulsos y con pulsos de CAC°.

Las tablas VI y VII nos dan información más detallada sobre el consumo de los nutrientes. Muestran que aunque las proteínas eran el nutriente más abundante (5.91 mg mL^{-1} en el cultivo sin pulsos y 5.84 mg mL^{-1} en el cultivo con pulsos), éste no fue el que tuvo mayor consumo ya que tan sólo se consumieron 1.83 mg mL^{-1} (31 %) y 2.87 mg mL^{-1} (50 %) respectivamente; en cambio, se consumieron 3.73 mg mL^{-1} (68 %) de carbohidratos del cultivo sin pulsos y 4.24 mg mL^{-1} (73 %) del cultivo con pulsos. De estos carbohidratos consumidos casi todo consistió de glucógeno, 3.60 mg mL^{-1} y 4.18 mg mL^{-1} respectivamente, y, aunque la glucosa fue consumida casi en su totalidad, representaba una fracción muy pequeña de los carbohidratos totales ya que los valores iniciales de esta fueron de tan sólo 0.56 mg mL^{-1} en el cultivo sin pulsos y de 0.53 mg mL^{-1} en el cultivo con pulsos. De manera similar, casi el total de los lípidos fue consumido (86 % en cultivo con pulsos y 89 % en cultivo sin pulsos) pero la cantidad inicial de estos también era baja (0.98 mg mL^{-1} y 1.26 mg mL^{-1} respectivamente).

Tabla VI. Consumo de nutrientes del medio CAC sin pulsos inoculado con la cepa Y01A1.

Nutriente	Valor inicial (total) (mg mL⁻¹)	Valor final (remanente) (mg mL⁻¹)	Consumo (mg mL⁻¹)
Carbohidratos	5.437667189 (100 %)	1.703033926 (32 %)	3.734633263 (68 %)
Proteínas	5.918814509 (100 %)	4.080581865 (69 %)	1.838232644 (31 %)
Lípidos	0.981064272 (100 %)	0.140737672 (14 %)	0.840326601 (86 %)
Glucógeno	4.549211906 (100 %)	0.942521477 (20 %)	3.606690429 (80 %)
Glucosa	0.561324523 (100 %)	0.030595674 (6 %)	0.530728849 (94 %)

Tabla VII. Consumo de nutrientes del medio CAC con pulsos de CAC° (20 ml) inoculado con la cepa Y01A1.

Nutriente	Valor inicial (total) (mg mL⁻¹)	Valor final (remanente) (mg mL⁻¹)	Consumo (mg mL⁻¹)
Carbohidratos	5.77603018 (100 %)	1.530471394 (27 %)	4.245558786 (73 %)
Proteínas	5.841203025 (100 %)	2.965671773 (50 %)	2.875531252 (50 %)
Lípidos	1.260999634 (100 %)	0.140737672 (11 %)	1.120261962 (89 %)
Glucógeno	4.939417311 (100 %)	0.754274956 (15 %)	4.185142356 (85 %)
Glucosa	0.538231228 (100 %)	0.011196409 (2 %)	0.527034819 (98 %)

7.8. Comparación de los medios y cepas utilizadas.

En la tabla VIII se resume la efectividad de los medios utilizados en la producción de biomasa y PHAs. Los medios definidos enriquecidos con glucosa fueron los más efectivos tanto para biomasa como para producción de PHA, aunque cabe destacar que no se logró

buena acumulación de PHAs con este medio en la cepa Y01A1. Los medios con efluente de la enlatadora no fueron efectivos para ninguno de los casos, en cambio el caldo de almeja chocolate (CAC) resulto ser un medio efectivo para la producción de biomasa en la cepa Y01A1.

Tabla VIII. Resumen de la valoración de los medios formulados para la producción de biomasa y polihidroxicanoatos (PHAs).

Organismo	Medio	Biomasa	PHA ¹
<i>P. seriniphilus</i> cepa E71	YEB glucosa 1 %	***	+++
<i>P. seriniphilus</i> cepa E71	MBM° con efluente de enlatadora	↓	•
<i>Vibrio sp.</i> cepa Y01A1	YEB glucosa 1 %	***	++
<i>Vibrio sp.</i> cepa Y01A1	Caldo de almeja chocolate sin pulsos	**	+
<i>Vibrio sp.</i> cepa Y01A1	Caldo de almeja chocolate con pulsos	**	+

Notas: ↓ = descenso de D.O., * = mantenimiento de D.O., ** = Aumento de D.O., *** = Máximo D.O. en 24 horas, • = Ausencia de PHAs, + = Poco PHA, ++ = Abundante PHA, +++ = Citoplasma lleno de PHA, ¹Valoración visual mediante microscopía de contraste de fases.

7.9. Cuantificación del PHB.

En las siguientes figuras se muestran los gráficos de los resultados de la cuantificación de PHB mediante la técnica de conversión a ácido crotónico. La figura 24 muestra la comparación del contenido de PHB entre la cosecha a las 72 y 144 horas de la cepa Y01A1 en un sistema de producción de dos etapas utilizando glucosa como fuente de carbono. La media de la cosecha a las 144 horas es mayor (2.9 mg mL⁻¹) que la cosecha a las 72 horas (2.23 mg mL⁻¹); sin embargo, estadísticamente no hay diferencia entre estos tratamientos.

La figura 25 muestra la cantidad de PHB producido por la cepa Y01A1 cultivada en el caldo de almeja chocolate, con pulsos (CP) y sin pulsos (SP) de CAC°. Aunque la media del cultivo con pulsos es mayor (3.02 mg mL^{-1}) que la del cultivo sin pulsos (2.2 mg mL^{-1}) no existe diferencia estadística entre los tratamientos.

En la figura 26 se observa la cantidad de PHB producido por la cepa E71 expuesta a las diferentes diluciones del efluente de grupo Pando (1:1, 1:3 y 1:7) después de 72 horas de habersele añadido el pulso de glucosa. La media de la dilución 1:1 fue de 3.98 mg mL^{-1} , la de 1:3 5.7 mg mL^{-1} y la de 1:7 8.98 mg mL^{-1} y existe diferencia estadística entre el tratamiento 1:1 y el 1:7. Este comportamiento se podría atribuir a que al tratamiento 1:7 se le añadió el doble de pulso de glucosa.

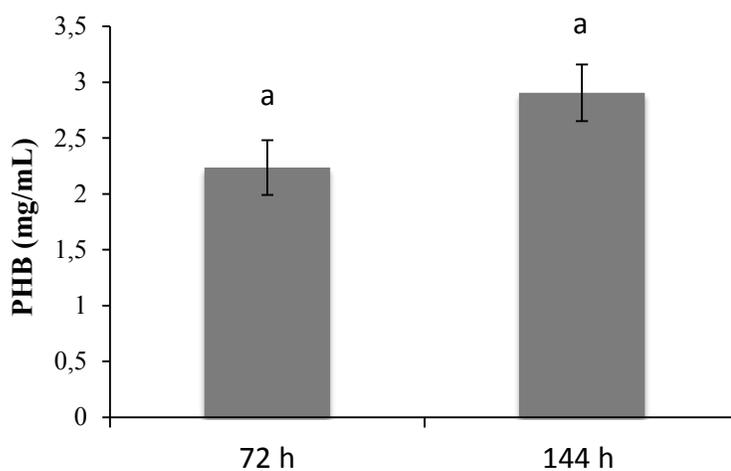


Figura 24. Cuantificación del PHB producido en la cepa Y01A1 en un sistema de producción de dos etapas con glucosa como fuente de carbono, cosechada a las 72 y 144 horas. Condiciones de cultivo 150 rpm y 30 °C.

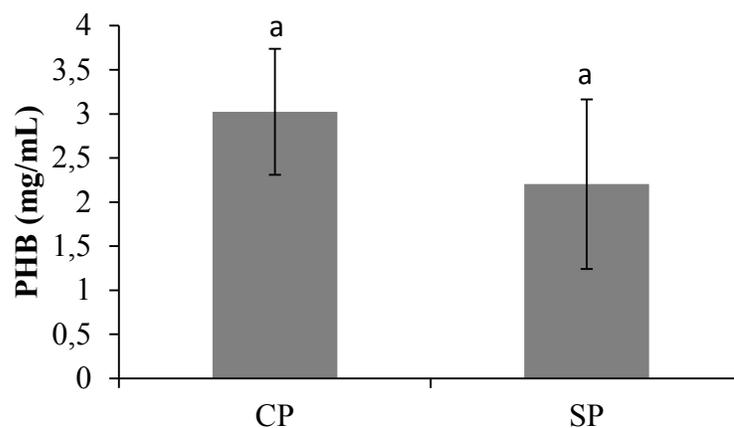


Figura 25. Cuantificación del PHB producido en la cepa en el caldo de almeja chocolate (CAC), con pulsos de CAC° (CP) y sin pulsos (SP) cosechado a las 215 horas. Condiciones de cultivo 150 rpm y 30 °C.

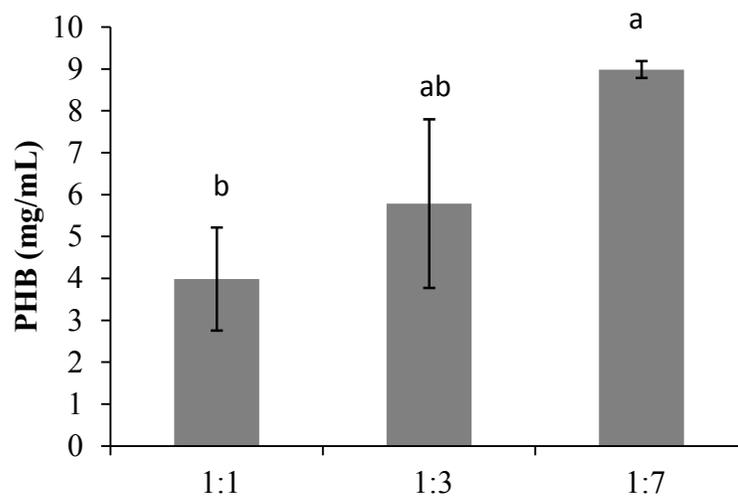


Figura 26. Cuantificación del PHB producido en la cepa E71 expuesta a las diferentes diluciones del efluente del grupo Pando (1:1, 1:3 y 1:7) 72 horas después de haber añadido el pulso de glucosa. Condiciones de cultivo 150 rpm, 30 °C y 389 horas de cultivo.

8. DISCUSIÓN

8.1. Efluente de la enlatadora del grupo Pando.

Los resultados del análisis del efluente de la enlatadora del grupo Pando muestran que el contenido de este desecho es pobre en los principales nutrientes utilizados como fuente de carbono por bacterias heterótrofas (carbohidratos, lípidos y proteínas) (Madigan *et al.*, 2000). Los valores obtenidos (proteínas = 0.21 g L^{-1} , carbohidratos = 0.022 g L^{-1} y lípidos = 0.1 g L^{-1}) (Fig. 6) son menores que los obtenidos por Panpong *et al.* (2014), quienes caracterizaron el efluente de una enlatadora de alimentos pesqueros en la provincia Trang en Thailandia, obteniendo valores de 3.9 g L^{-1} de proteínas, 1.91 g L^{-1} de carbohidratos y 0.13 g L^{-1} de lípidos.

La diferencia del contenido nutricional entre efluentes del mismo tipo de industria nos indica que la composición de este tipo de desechos es compleja y varía dependiendo de factores que no pueden ser controlados por el investigador como: a) cantidad y tipo de organismos capturados y procesados en la planta al momento de la colecta de la muestra y b) tipo de procesamiento que reciben las aguas antes de ser desechadas al ambiente. El efluente de la enlatadora de grupo Pando pasa por un tratamiento primario y uno secundario. En el 2008, cuando se aisló a *P. seriniphilus* cepa E71, este tratamiento secundario no existía, lo cual explica que en dicho estudio se hayan encontrados valores de lípidos mayores (0.29 g L^{-1}) (López-Cortés *et al.*, 2008).

8.2. E71 en un sistema de producción de PHA de dos etapas con glucosa como fuente de carbono y E71 expuesta al efluente de grupo Pando.

El uso de un medio químicamente formulado denominado YEB glucosa 1 % confirma que la generación de la biomasa por E71 ocurre en estas condiciones (Fig. 11) y que la acumulación de PHAs ocurre cuando se expone la biomasa al medio MBM° con limitación de nitrógeno (Fig. 11) (Martínez-Gutierrez, 2015). Dicha biomasa cuando es expuesta al efluente diluido de la enlatadora de alimentos pesqueros de grupo Pando (Fig. 16) tiene

un decremento en sus valores de densidad óptica por lo que el efluente mostró no ser suficiente para sostener el desarrollo de la cepa E71, lo que se explica por las bajas concentraciones de nutrientes (0.022 %) (Figs. 5 y 6). Esta condición de bajo contenido de nutrientes también explica la incapacidad de E71 para acumular PHAs.

El contenido nutricional del efluente de grupo Pando fue pobre en carbono, con valores cercanos a ambientes marinos oligotróficos (0.001 mg mL^{-1} en las aguas superficiales y $0.0005 \text{ mg mL}^{-1}$ en el océano profundo, de carbono orgánico) (Kurath y Morita, 1983), sin embargo *P. seriniphillus* cepa E71 fue aislada originalmente de un ambiente eutrofizado en medios de cultivo ricos en nutrientes (medio AZ y medio PYM) (López-Cortés *et al.*, 2010) por lo que podría ser considerado como un organismo copiotrófico. Las bacterias oligotróficas son aquellas que pueden crecer en un medio con bajas concentraciones de nutrientes 0.2 a 16.8 mg L^{-1} de carbono, (Schut *et al.*, 1997) mientras que las bacterias eutróficas o copiotróficas requieren 2 o más g L^{-1} de carbono (Akagi *et al.*, 1977; Yanagita *et al.*, 1978).

Aunque E71 estuvo sometida a esta condición de déficit de nutrientes durante 12 días, las células mantuvieron su viabilidad ya que al agregar un pulso de glucosa (Figs. 16 y 17) la población bacteriana que se encontraba en fase de muerte, evidenciada por el decremento gradual en la densidad óptica, mostró un incremento rápido en su densidad poblacional por lo que se puede argumentar que la razón de que no hubiera crecimiento celular se debía a que no había una fuente de carbono disponible para las células. Se sabe que muchas bacterias en cese del crecimiento celular debido falta de nutrientes responden rápidamente a la adición de nutrientes frescos; esta rapidez del inicio del proceso de recuperación es similar a lo que se observa en esporas en germinación (Foster y Johnstone, 1990). De manera similar, E71 respondió rápidamente a la adición de glucosa.

La supervivencia al ayuno es definida como la habilidad de resistir largos periodos de tiempo sin sustratos proveedores de energía (Llorens *et al.*, 2010). Muchas bacterias

marinas copiotróficas poseen estrategias de supervivencia al ayuno (Morita, 1982). En bacterias Gram negativas, la respuesta al ayuno dispara un factor sigma alternativo RpoS, que en *E. coli* controla hasta el 10 % de sus genes; estos genes preparan a la célula para la supervivencia en situaciones difíciles (Lacour y Landini; 2004, Weber *et al.*, 2005) ayudándole también para sobrellevar estrés osmótico y estrés de temperatura (Jenkins *et al.*, 1990). Se ha reportado que tanto *E. coli* como cepas de *Bacillus* y *Myxococcus* poseen programas genéticos específicos que han evolucionado para prolongar la supervivencia en etapas de arresto de división celular (Nyström, 1998).

Las bacterias Gram negativas sometidas a limitación de nutrientes pueden entrar en un programa de desarrollo que resulta en células menos activas metabólicamente y más resistentes. Células más pequeñas y esféricas son el resultado de varias divisiones celulares sin incremento de la masa celular (Lange y Hengge-Aronis, 1991). Muchas bacterias marinas disminuyen su tamaño y se desarrollan formas denominada ultramicrocélulas que reducen su tamaño por una combinación de divisiones reducidas y metabolismo endógeno. La división reductiva incrementa la relación superficie/volumen de las células produciendo células esféricas. Este encogimiento es un resultado de la autodigestión y el resultado de la degradación de material celular endógeno (Nystrom, 2001). Cuando se adicionan nutrientes a muestras de agua de mar se observan células más largas, un incremento en el volumen celular y un incremento en la tasa de incorporación del sustrato (Wright, 1978). Las células de la cepa E71 sometidas el efluente de grupo Pando también mostraron este fenómeno: se observaron células pequeñas y redondas en el microscopio de contraste de fases (Anexo C) y aumentaron considerablemente su tamaño después del pulso de glucosa. Además, las células que se encuentran en déficit nutricional utilizan sus materiales de reserva como el glucógeno y el PHB lo que explica que no se observara este compuesto (Kaprelyants *et al.*, 1993).

Al agregarle 1 g de glucosa a estos medios, se obtuvo una concentración equivalente a 10 g L⁻¹ aproximadamente, tomando en cuenta que el volumen total de los medios era de

100 mL después de la toma de alicuotas. La primera medición de glucosa se realizó 48 horas después del pulso dando valores de 0.005 g L^{-1} para la dilución 1:1 y 0.09 g L^{-1} para la dilución 1:3. Aunque estos valores son muy bajos, podría deberse a que la glucosa fue consumida casi en su totalidad; si observamos el caso en que E71 fue cultivada en medio definido con glucosa (Fig. 11) a las 0 horas este medio tenía 9.08 g L^{-1} de glucosa y a las 24 horas 4.33 g L^{-1} lo que equivale a un consumo de 4.75 g L^{-1} de glucosa en 24 horas y 9.5 g L^{-1} en 48 horas; por lo tanto E71 podría consumir casi 10 g L^{-1} de glucosa en 48 horas y podría ser la explicación de los valores tan bajos encontrados después de 48 horas de agregado el pulso de glucosa en los medios con efluente. En el caso que se agregó 2 g de glucosa (20 g L^{-1}), 48 horas después del pulso se tiene un valor de 10.73 g L^{-1} , lo que coincide con un consumo aproximado de 10 g L^{-1} en 48 horas.

En el tratamiento 1:1 y en el 1:7 sin pulso de glucosa se observa un aumento en los valores de glucosa y carbohidratos totales de las 360 a las 384 horas, lo cual podría explicarse por lisis celular y liberación de biomoléculas al medio debido a que el cultivo se encontraba en fase de muerte. Se sabe que las enzimas responsables de la autólisis en *Streptococcus neumonía* son sensibles y producidas en mayor cantidad a valores extremos de pH (Lord y Nye, 1919). En *Mycobacterium tuberculosis* la autólisis fue inducida cuando se creció la bacteria en presencia de oxígeno y exceso de glucosa (Bowman y Redmond, 1956) así como disponibilidad limitada de nitrógeno (Redmond, 1957), una situación similar a la condiciones en las que se encontraba E71 después del pulso de glucosa.

También se observó que en todos los casos, al añadir la glucosa, no sólo aumento la concentración de los carbohidratos totales, sino también de los lípidos totales; ésto debido a que las rutas de síntesis de diversas biomoléculas pueden tener como precursor a la glucosa. Muchas bacterias utilizan glicolisis aeróbica para formar las unidades estructurales necesarias para la síntesis de macromoléculas durante la fase exponencial del crecimiento. Estas bacterias metabolizan la glucosa en presencia de oxígeno vía glicolisis e inhiben el ciclo de los ácidos tricarbóxicos resultando en la secreción de

grandes cantidades de acetato al medio de cultivo. Sólo cuando la glucosa se ha agotado nuevamente el acetato es utilizado vía ciclo de ácidos tricarboxílicos. (Rice y Bayles, 2008).

El pH del agua de mar es ligeramente alcalino, alrededor de 8 (Marion *et al.*, 2011) lo cual puede explicar que los medios que contenían mayor cantidad del efluente de la enlatadora de grupo Pando tuvieron un pH ligeramente mayor. La acidificación de los medios después de la adición de la glucosa (Fig. 18) puede atribuirse a la actividad catabólica ineficiente donde hubo una degradación incompleta del sustrato, formándose ácidos orgánicos, etanol, acetato o lactato (Molenaar, 2009). En el caso en que se agregó 2 g de glucosa, el pH continuó bajando, lo que indica que el sustrato continuaba siendo utilizado.

8.3. Caldos de desecho de almeja chocolata.

El contenido nutricional de los caldos de desechos de almeja chocolata mostraron una similitud con los valores obtenidos de la caracterización de un efluente de cocción de mejillón (Murado *et al.*, 1994), donde casi el total de los carbohidratos se encuentran en forma de glucógeno.

Las determinaciones químicas del contenido de nutrientes para el caso del caldo de almeja chocolata (Figs. 7 y 8) mostró estar enriquecido en biomoléculas que fueron suficientes para la generación de biomasa de la cepa Y01A1, debido a que la suma de las concentraciones de carbohidratos, lípidos y proteínas fue del orden de 1.2 %, valor comparable con la concentración de fuente de carbono empleada en medios de cultivo estándar que garantizan el crecimiento de una bacteria.

8.4. Y01A1 en un sistema de producción de PHAs de dos etapas con glucosa como fuente de carbono.

Durante la etapa de producción de biomasa en el medio YEB glucosa 1 %, la cepa Y01A1 tuvo una velocidad máxima de crecimiento medida de las 0 a las 4 horas de 0.5318 h^{-1} y

un tiempo de generación de 1.88 h (Fig. 12) por lo que la velocidad de crecimiento de esta bacteria fue mayor que el de E71 bajo las mismas condiciones ($K = 0.4647 \text{ h}^{-1}$, $T_{\text{gen}} = 2.1515 \text{ h}$). Una vez transferida la biomasa al medio MBM° la D.O. disminuyó debido a que el medio nuevo tiene menor opacidad que los medios viejos y debido a la pérdida de biomasa durante la cosecha, pero, a diferencia de lo ocurrido con E71, Y01A1 no aumentó su D.O. durante el resto del cultivo, lo que pudiera atribuirse al pH que disminuyó de 7.62 a 6.13 en tan solo tres horas, y 24 horas después de expuesto al medio MBM° el pH fue de 4.87, alcanzando a las 144 horas valores de 4.58 (Fig. 15). En cambio, el valor de pH más bajo alcanzado por E71 fue de 5.15. En las primeras 24 horas Y01A1 consumió la totalidad de la glucosa, en cambio E71 dejó un remanente de $4.33 (\pm 0.26) \text{ mg mL}^{-1}$. A las 24 horas de haberse añadido el pulso de glucosa la cepa E71 consumió 8.25 g de glucosa mientras que la cepa Y01A1 pareciera no haber consumido glucosa en este tiempo ya que los valores después del pulso de glucosa y 24 horas después de éste son muy cercanos, con solapamiento de las desviaciones estándar. Ésto podría explicarse por el pH, ya que al momento del pulso el medio en el que se encontraba E71 tenía un pH de 6.40 mientras que el medio de Y01A1 tenía un pH de 4.87 y se sabe que las enzimas glucolíticas son poco acidotolerantes y se pueden inhibir a pHs menores a 5 (Burne y Marquis, 2000), lo que podría explicar el menor consumo de glucosa y la menor acumulación de PHB en Y01A1.

Se ha reportado que el pH inicial del medio de cultivo afecta significativamente la acumulación de PHAs. En bacterias del género *Vibrio* aisladas de sedimentos marinos se reportó que la menor acumulación de PHB se observó cuando el pH inicial era ácido, con valores de 4, 5 y 6 y la mayor acumulación del polímero se observó cuando el pH inicial fue de 7 disminuyendo gradualmente en los pHs 8, 9 y 10 (Subin *et al.*, 2013). En *Cupriavidus taiwanensis* la menor concentración de PHB y el menor peso seco celular también se produjeron en el tratamiento con pH inicial ácido (pH = 6) y el mayor con el pH neutro (pH = 7) seguido por el de pH alcalino (pH = 8) (Wei *et al.*, 2011); de manera similar, en *Haloflex mediterranei*, se obtuvo menor concentración de PHB en el medio con pH inicial ácido (6.5) que en el neutro (7.2) (Lilio y Rodríguez-Valera, 1990).

8.5. Y01A1 en caldo de desechos de almeja chocolate (CAC).

Los medios de caldo de almeja chocolate tienen valores iniciales de pH menores a 5 pero se observó una tendencia a alcalinizar el medio a través del tiempo alcanzando valores neutros. Este efecto fue notorio cuando se le agregaron pulsos de CAC° que, por ser ácido, disminuía el pH, pero seguidamente había un aumento en estos valores (Fig. 21). El incremento en los valores de pH se puede deber al catabolismo de ácidos orgánicos y aminoácidos debido a los subproductos generados, pero, un incremento en el pH puede ser también una respuesta inducida por bajos valores de pH como la descarboxilación de aminoácidos, como el de lisina a cadaverina mediante la vía CAD en *E. coli* o de arginina a agmatina vía arginina descarboxilasa. En *Clostridium acetobutylicum*, la fermentación de los carbohidratos resulta inicialmente en una acidificación debido a la producción de ácido acético y butírico y la subsecuente acidificación puede ser prevenida por la reducción de ácido butírico a butanol (Dilworth, 1999).

También, la producción de amonio durante el cultivo (Fig. 22) se puede correlacionar con el incremento en los valores de pH que puede ser explicado por lo encontrado en biofilms de placas dentales bacterianas. Se ha observado que estas comunidades bacterianas aumentan el pH del medio principalmente mediante dos vías: hidrólisis de urea mediante enzimas ureasas que produce CO₂ y amonio, y el metabolismo de la arginina mediante el sistema arginina desaminasa (ADS), el cual libera ornitina, amonio y CO₂. Este último mecanismo pudiera haber sido utilizado por Y01A1 en el medio CAC para aumentar el pH ya que sabemos que el componente principal de este medio fueron las proteínas, además esta vía provee a la bacteria de ATP (Burne y Marquis, 2000).

A pesar de que las biomoléculas más abundantes fueron las proteínas en los caldos de desecho de almeja chocolate, los carbohidratos fueron el elemento mayormente consumido (Fig. 23). El consumo preferencial de los carbohidratos sobre las proteínas podría atribuirse a la represión catabólica del carbono (CCR), fenómeno que ocurre cuando la bacteria es crecida en un sustrato con diferentes fuentes de carbono y que es

un mecanismo regulatorio donde la utilización de una fuente secundaria de carbono es inhibida por la presencia de una fuente de carbono preferencial (Görke y Stülke, 2008). Sin embargo, en este caso no se consumió el total de los carbohidratos y hubo un consumo parcial de las proteínas por lo que podría especularse que el consumo de las proteínas se realizó para obtener fuente de aminoácidos, nitrógeno o factores de crecimiento o que el consumo de proteínas estuvo mayormente relacionado al mecanismo de producción de amonio para incrementar el pH del medio. Se requieren hacer experimentos con controles de pH para comprobar esta hipótesis.

8.6. Identidad de la cepa Y01A1.

Al alinear la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para el 16S ARN ribosomal de la cepa Y01A1 con las secuencias depositadas en la base de datos “nucleotide collection (nr/nt)” utilizando el algoritmo BLAST, se obtuvo una cobertura e identidad del 100 % con diferentes cepas del genero *Vibrio* (*Vibrio alginolyticus*, *Vibrio natriegnes*, *Vibrio owensii*, *Vibrio azureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio neocladonicus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio* sp.). Utilizando la base de datos “16S Ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)” se obtienen alineamientos con una identidad de 99 % y cobertura de 100 % con varias cepas del genero *Vibrio* pero con puntajes máximos diferentes. En orden decreciente los resultados son los siguientes: *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio natriegens*, *Vibrio pharaemolyticus*, *Vibrio jasicidia*, *Vibrio pelagius*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio neocaledonicus*, *Vibrio owensii*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio azureus* y *Vibrio inhibens*. Con esta información no es posible designar una identidad de especie a esta cepa, debido a que se tienen puntajes iguales con diferentes especies, además, los análisis de secuencias parciales no deben ser utilizados preferencialmente para conclusiones taxonómicas, al menos de que se haya demostrado que tienen el mismo grado de similitud que los obtenidos con la secuencia completa (Stackebrandt y Goebel, 1994). Pese a ello, se puede concluir que es un organismo marino del genero *Vibrio* ya que coincide con la descripción de este género (Madigan, 2000).

Con el propósito de conocer más sobre la identidad de la cepa Y01A1 se presenta a continuación información de las características biológicas del género *Vibrio* Pacini, 1854; consiste en bacilos pequeños rectos, ligeramente curvados o con forma de coma, de 0.5-0.8 x 1.4-2.6 μm . Formas involucradas suelen aparecer en cultivos viejos (Anexo D). No forman endosporas ni micro quistes. Gram negativos. Motiles por flagelos polares envainados monotricos o multitricos en medio líquido. En medio sólido algunas especies sintetizan numerosos flagelos laterales con longitudes menores al flagelo polar envainado. Anaerobios facultativos capaces tanto de metabolismo respiratorio como fermentativo. El oxígeno molecular es el aceptor universal de electrones. La mayoría no desnitrifican o fijan nitrógeno molecular. Quimioorganotrofos. La mayoría son capaces de crecer en medio mineral con D-glucosa como única fuente de carbono y amonio como única fuente de nitrógeno. Pocas especies requieren factores de crecimiento. El sodio estimula el crecimiento de todas las especies y es un requerimiento absoluto de la mayoría; la concentración mínima para el crecimiento óptimo está entre los 5 a 700 mM (0.029 % - 4.1 %). Todas las especies fermentan D-glucosa produciendo ácido pero raramente gas. Varias especies producen acetoina y acetil metil carbinol. La mayoría fermentan D-fructosa, maltosa y glicerol. Son oxidasa positivos y reducen nitratos a nitritos. Algunos crecen a 4 °C, todos a 20 °C la mayoría a 30 °C y muchos a 35-37 °C. Algunas pocas especies son bioluminiscentes. Primordialmente acuáticas; la distribución de las especies usualmente depende de la concentración de sodio y el contenido nutricional del agua así como de la temperatura. Muy comunes en ambientes marinos y estuarinos y en la superficie y en contenidos intestinales de animales marinos. 12 especies ocurren en especímenes clínicos de humanos 11 de los cuales son aparentemente patógenos para los humanos causando diarrea o infecciones extraintestinales. Las cepas que componen a este género son habitantes comunes del océano abierto, aguas costeras y las branqueas y viseras de peces y mariscos. Una especie es patógena para el humano. Varias especies causan enfermedades a otros vertebrados e invertebrados (Madigan, 2000).

En los países templados los Vibrios se encuentran presentes en el agua de mar durante todo el año, aunque su concentración experimenta un notable incremento en los meses cálidos a causa de las favorables condiciones ecológicas y del plancton aumentando su acumulación por moluscos filtradores y otros animales marinos (West 1989).

Tanto la descripción de Baumann y Baumann (1981) para el género *Beneckea* (*Vibrio*) como la de "Bergey's Manual for Systematic Bacteriology" para el género *Vibrio* (Farmer y Janda, 2005) coinciden con la descripción celular de las cepas aisladas en este estudio. Basándonos en estas investigaciones, las bacterias encontradas en el lixiviado de almeja chocolata corresponderían a *Vibrio natriegens*, *Vibrio nereida*, *Vibrio nigrapulchritud* o *Vibrio orientalis* ya que son las que se reportan como productoras de PHB (Tabla IX). Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que las condiciones de cultivo suministradas en estos trabajos no fueron las adecuadas para la acumulación de PHB en las otras especies de *Vibrio*. Tal es el caso para *Vibrio harveyi*, especie originalmente descrita como PHB negativo y que se observó en un estudio realizado por Sun *et al.*, la acumulación de este polímero en células de *Vibrio harveyi* cepa B392 además de una relación entre el autoinductor de luminiscencia "lux" con la producción de PHB (Sun *et al.*, 1994).

En la tabla IX se comparan los resultados de las pruebas realizadas a la cepa Y01A1 con los datos reportados en "Bergey's Manual for Systematic Bacteriology" (Farmer y Janda, 2005) de vibrios marinos. *V. alginolyticus* coincide con la cepa Y01A1 excepto en la producción de PHB y en el resultado positivo de lisina descarboxilasa, *V. natriegens* únicamente no coincide en cuanto al desplazamiento, mientras que *V. parahaemolyticus* no coincide en el color de la colonia en medio TCBS, producción de PHB ni utilización de sacarosa, *V. harveyi* presenta cierto porcentaje de motilidad por desplazamiento y de utilización de sacarosa pero no reportan presencia de PHB, aunque, como fue mencionado anteriormente, Sun *et al.* (1994) documentan la presencia de éste por microscopia

electrónica y *V. nereis* y *V. orientalis* presentan acumulación de PHB pero no presentan desplazamiento y dan positivo a arginina descarboxilasa.

En la base de datos de GeneBank se encontraron secuencias de nucleótidos correspondientes a poli-3-hidroxicanoatos sintasas (*phaC*) en genomas completos de *V. alginolyticus* (BATK01000002) y *V. harveyi* (CP014038), una proteína asociada a gránulos de PHA en *V. nereis* (LHPJ01000005), y proteínas de la familia de las fasinas en *V. orientalis* (NZ_AFWH01000050). Dando prioridad a la propiedad de desplazamiento y basándonos en el mayor puntaje de identidad obtenido en la base de datos “16S Ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)”, la identidad de nuestra cepa indica ser un *Vibrio alginolyticus*.

V. alginolyticus es un organismo ubicuo del mar y de los estuarios. Su distribución es mundial, por lo general en costas de países templados; se encuentra en organismos marinos tales como peces, almejas, ostiones y corales, entre otros. Es un bacilo corto, pleomórfico, Gram negativo, móvil por flagelos peritricos y polares. (Franco-Monsreal *et al.*, 2010).

Tabla IX. Comparación entre la cepa Y01A1 con otras bacterias marinas del género *Vibrio*.

Prueba	Y01A1	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. natriegens</i>	<i>V. pharaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. nereis</i>	<i>V. orientalis</i>
Desplazamiento (Swarming)	+	100	0	80	33	0	0
Sacarosa	+	100	100	0	83	100	100
Moellers arginina	-	0	0	0	0	80	100
descarboxilasa							
Moellers lisina	-	100	0	100	83	0	25
descarboxilasa							
Medio citrato de Simmons	-	1	ND	3	0	ND	100
Color colonial en medio TCBS	Amarillo	Amarillo	ND	Verde	Amarillo	ND	ND
Crecimiento con extracto de levadura	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PHB	+	-	+	-	-	+	+

8.7. Cuantificación del poli-3-hidroxi-butirato.

La cuantificación del PHB en la cepa Y01A1 muestra valores de $2.23 (\pm 0.49) \text{ mg mL}^{-1}$ a las 72 horas y $2.9 (\pm 0.5) \text{ mg mL}^{-1}$ a las 144 horas bajo el sistema de producción de dos etapas utilizando glucosa como fuente de carbono (Fig. 24), mientras que en el medio CAC se obtuvieron valores de $2.20 (\pm 1.3) \text{ mg mL}^{-1}$ en el cultivo sin pulsos y $3.02 (\pm 1.01) \text{ mg mL}^{-1}$ en el cultivo con pulsos (Fig. 25). Estos resultados parecen favorecer el potencial de los caldos de almeja chocolate para la producción de PHA si no fuera porque no corresponden las observaciones bajo el microscopio de fluorescencia mediante la tinción rojo Nilo (Anexo D). Las células teñidas con rojo Nilo y observadas en el microscopio de fluorescencia crecidas en el medio CAC mostraron incipientes señales de PHA a diferencia de las células crecidas en glucosa que mostraron abundante señal de PHA.

Otros autores han obtenido una producción máxima de PHAs de 0.4 g L^{-1} (Subin *et al.*, 2013) y 0.2 g L^{-1} (Boyandin *et al.*, 2008) en cepas del género *Vibrio* ya habiendo probado varias condiciones de cultivo, por lo que la cepa Y01A1 es un buen candidato para la producción de PHA ya que se obtuvieron mayores valores de PHB sin haber sido optimizada la producción de este polímero en esta cepa.

La producción de PHAs en la cepa E71 después del pulso de glucosa crecida en efluente de grupo Pando fue mayor, con valores que van desde los $3.98 (\pm 1.7)$ hasta $8.98 (\pm 0.6) \text{ mg mL}^{-1}$ (Fig. 26). Comparado con los resultados obtenidos por Martínez-Gutiérrez (2015) con esta misma cepa y bajo el sistema de producción de dos etapas estos valores son bajos, ya que ella obtuvo 92.33 mg mL^{-1} de PHB mediante esta técnica de cuantificación, sin embargo esta técnica tiene sus limitantes y que algunos materiales, especialmente carbohidratos causan interferencia en este ensayo (Slepeky y Law, 1960). Los valores aquí obtenidos son mas cercanos a lo obtenido por López-Cortés *et al.* (2008) quienes obtuvieron 1.2 g L^{-1} en 48 horas en esta cepa. Lo que si se puede concluir es que hubo una mayor producción de PHB por la cepa E71 en la dilución 1:7 a la que se le agregó 2 g.

9. CONCLUSIONES

Este estudio contribuye al conocimiento de la composición química de desechos de material biológico de origen marino, ante los pocos reportes existentes en la literatura. A diferencia de lo esperado, el contenido nutricional del efluente de la enlatadora de grupo Pando fue pobre en materia orgánica lo que no permitió el crecimiento poblacional de la cepa E71. Por otro lado, las caracterizaciones de los caldos de desecho de almeja chocolata mostraron estar enriquecidos en materia orgánica, principalmente proteínas y carbohidratos, estos últimos representados casi en su totalidad por glucógeno.

Debido al bajo contenido nutricional en el efluente de grupo Pando la cepa E71 no mostró crecimiento poblacional ni producción de PHA cuando se usa el efluente como fuente de carbono en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos sobre el efecto del medio de cultivo compuesto por caldo de almeja chocolata (medio CAC) no son suficientes para concluir si este fue eficiente para la producción de PHAs, ya que, aunque la cuantificación de PHB mediante la conversión a ácido trans-2-butenóico (ácido crotónico) mostró valores de acumulación similares en la cepa Y01A1 cultivada tanto en un sistema de producción de dos etapas con glucosa como fuente de carbono, como cultivada en los caldos de desecho de almeja chocolata, las observaciones microscópicas y la tinción lipofílica rojo nilo muestran discrepancias; se observa gran acumulación de PHA en Y01A1 con glucosa como fuente de carbono y muy poca o nula acumulación de PHA en la bacteria cultivada en los medios CAC (Anexo D). Sin embargo, si se puede concluir que el medio basado en CAC es un buen candidato para la producción de biomasa que es la condición previa para la producción de PHAs.

Además, esta investigación contribuye al conocimiento de la diversidad de bacterias asociadas a la almeja chocolata, ya que no se encontraron artículos científicos de calidad que refieran al aislamiento y cultivo de bacterias a partir de almeja chocolata. La asignación taxonómica de la cepa Y01A1, correspondió a una bacteria del género *Vibrio*

con una velocidad de crecimiento alta ($K = 0.5318 \text{ h}^{-1}$) en el medio YEB glucosa 1 %. Aunque no es posible hacer una designación de especie confiable de la cepa Y01A1 con la información obtenida en este estudio, la correspondencia más cercana a la que se llegó es a *Vibrio alginolyticus*, en cuyo caso este trabajo es el primer reporte de producción de PHB en esta especie, no obstante existen secuencias de genomas completos de *V. alginolyticus* donde se detecta la existencia del gen *phaC* en la base de datos del NCBI (NCBI, 2016) (número de acceso: CP013484.1)

La cepa Y01A1 se caracterizó por acumular gran cantidad de PHAs dentro de su citoplasma como fue observado mediante microscopia de contraste de fases, llegando a deformarse la célula por el PHA acumulado cuando se crece en medios sólidos (YEA glucosa 1 %). En medio líquido y en el sistema de producción de dos etapas, la cepa Y01A1 también acumula PHAs pero en menor cantidad; en cambio fue más notoria la acumulación de PHAs en la cepa E71 bajo las mismas condiciones y de igual manera la cuantificación de PHB fue mayor en la cepa E71 expuesta al efluente de grupo Pando después de añadido el pulso de glucosa que en la cepa Y01A1 en el sistema de dos etapas de cultivo con glucosa como fuente de carbono. Este fenómeno podría ser atribuible al rápido descenso del pH que realiza la cepa Y01A1 en el medio.

La contribución principal de este estudio radica en usar el caldo de almeja chocolate como fuente de nutrientes para la generación de biomasa de la cepa Y01A1, para posteriormente transferirla a medio basal marino con glucosa al 1 % sin fuente de nitrógeno para la producción de PHA.

10. RECOMENDACIONES

Para estudios ulteriores se recomienda realizar la caracterización química del desecho que se utilizará como sustrato antes de utilizarlo con la bacteria.

Se recomienda optimizar el proceso de producción de PHAs en el sistema de producción de dos etapas y utilizar glucosa como fuente de carbono en la cepa Y01A1 poniendo atención al pH.

Se recomienda utilizar el caldo de desecho de almeja chocolate con buffer de pH Tris-HCl, 1M (pH 7.5) para la producción de biomasa bacteriana y posteriormente transferirla a un medio que contenga glucosa al 1 % y sin fuente de nitrógeno para la producción de PHAs para así reducir los costos de la glucosa en la etapa de producción de biomasa.

Se recomienda precipitar las proteínas del medio CAC para tener un medio con mayor radio C:N y favorecer la producción de PHA en la bacteria.

11. LITERATURA CITADA

- Aguilar, A.L.C., G.L. San'tAnna. 1988. Liquid effluents of the canning industries of Rio de Janeiro state - treatment alternatives. *Environ. Technol. Lett.* 9:421–428.
- Akagi, Y., T. N. Simidu. 1977. Isolation and distribution of oligotrophic marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 23:981-987.
- Akaraonye, E., T. Keshavarz, I. Roy. 2010. Production of polyhydroxyalkanoates: the future Green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85:732-743.
- Anderson, A.J., E.A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450–472.
- Andrady, A. L., M. Bomgardner, D. Southerton, M.C. Fossi, A. Holström. 2015. Plastics in a sustainable society - Background paper. The Swedish foundation for strategic environmental research. Estocolmo, Suecia. 36p.
- Babel, W., J.U. Ackermann, U. Breuer. 2001. Physiology, regulations and limits of the synthesis of Poly(3HB). *Adv. Biochem. Eng. Biot.* 71:125-157.
- Barnes, H. J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: Detailed investigation of the sulphophosphanilun method for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12:103-118.
- Baumann, P., L. Baumann. 1981. The marine Gram-negative eubacteria: Genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, and *Alcaligenes*. The prokaryotes. Springer-Verlag. Berlin. pp. 1302-1331.
- Berlanga, M. M.T. Montero, J. Fernández-Borrell, R. Guerrero. 2006. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. *Int. Microbiol.* 9:95-102.
- Bowman, B., W.B. Redmond. 1956. The effects of glucose and of oxygen on autolysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *An. Rev. Tuberc.* 73:907-16.
- Boyandin, A., G.S. Kalacheva, S. Medvedeva, E. Rodicheva, T.G. Volova. 2008. Luminous bacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *Macromol. Symp.* 269:17-22.
- Braunegg G., G. Lefebvre, K.F. Genser. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65:127-161.
- Burne, R., R.E. Marquis. 2000. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. 2000. *FEMS Microbiol. Lett.* 193. 1-6.

- Castilho, L. R., D.A. Mitchell, D.M.G. Freire. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource. Technol.* 100:5996–6009.
- Chanprateep, S. 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Bios. Bioen.* 110:621-632.
- Chen, G.Q., Q. Wu, Y. Wang, Z. Zheng. 2005. Application of microbial polyesters–polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Key. Eng. Mater.* 288–289:437–440.
- Chien, C.C., M.H. Choi, S.S. Kung, Y.H. Wei. 2007. Production of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *J. Biotechnol.* 132:259-263.
- Choi, J., S.Y. Lee. 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:13–21.
- Crank, M., M. Patel, F. Marscheider-Weidemann, J. Schleich, B. Hüsing, G. Angerer. 2004. Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe (PRO-BIP). Final Report Prepared for the European Commission's Institute for Prospective Technological Studies (IPTS). Final Report. 256p.
- Davis, D.H., M. Doudoroff, R.Y. Stanier, M. Mandel. 1969. Proposal to reject the genus *Hydrogenomonas*: taxonomic implications. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 19:375-390.
- Dilworth, M.J., A.R. Glenn. 1999. Problems of adverse pH and bacterial strategies to combat it. *Novartis Foundation Symposium 221. Baterial Responses to pH.* John Wiley & Sons. pp. 274.
- Donovan P.K., A.R. Frederick, A.P. Wood. 2006. The Genus *Paracoccus*. Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K. Schleifer, E. Stackebrandt (eds.) *The Prokaryotes Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses.* Editorial Springer. Primera edición. Nueva York. pp 232-294.
- Elain, A., A. Le Grand, Y.M. Corre, M. Le Fellic, N. Hachet, V. Le Tilly, S. Bruzard. 2016. Valorisation of local agro-industrial processing waters as growth media for polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Ind. Crop. Prod.* 80:1–5.
- Farmer, J.J., J.M. Janda. 2005. Order XI. Vibrionales. Garrity, G.M. (ed.). *Bergey's manual of systematyc bacteriology.* Vol 2. Part B. The Gammaproteobacteria. Editorial Springer. Segunda edición. Nueva York, USA. pp 491-555.
- Foster, S.J., K. Johnstone. 1990. The trigger mechanism of bacterial spore germination. En: Smith, I. R.A. Slepecky, P. Setlow (eds.). *Regulation of Prokaryotic Development.* Washington, DC: American Society for Microbiology. pp. 89-109.

- Franco-Monsreal, J. A.L. Zarza-Garcia, N. Villa-Ruano, L.G. Ramón-Canul, O.T. Galván-Valencia, M.L. Meza-Jiménez, L. Mota-Magaña. 2010. Especies patógenas del género *Vibrio* en alimentos marinos de establecimientos de Isla del Carmen, Campeche, México. *Ciencia y Mar*. 41:31-44
- Garcia-Sanda, E., F. Omil, J.M. Lema. 2003. Clean production in fish canning industries: recovery and reuse of selected wastes. *Clean. Technol. Envir.* 5:289–294.
- Gomez, J.G.C., B.S. Méndez, P.I. Nikel, M.J. Pettinari, M.A. Prieto, L.F. Silva. 2012. Making green polymers even greener: towards sustainable production of polyhydroxyalkanoates from agroindustrial by-products. En: Marian Petre (ed.) *Advances in Applied Biotechnology*. Editorial InTech. Croacia. pp 41-61.
- Görke, B., J. Stülke. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:613-24.
- Grage, K., A.C. Jahns, N. Parlane, R. Palanisamy, I.A. Rasiah, J.A. Atwood. 2009. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*. 10:660-669.
- Gregory, M.R. 2009. Environmental implications of plastic debris in marine settings—entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philos. T. Roy. Soc. B*. 20:13–25.
- Halden, R. U. 2010. Plastics and health risks. *Annu. Rev. Publ. Health*. 31:79–94.
- Hocking, P., R. Marchessault. 1994. Chemistry and technology of Biodegradable Polymers. G.J.L. Griffin (eds) Blackie Academic. New York, pp. 48-96.
- Hopewell, J., R. Dvorak, E. Kosior. 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philos. T. Roy. Soc. B*. 21:15–26.
- Ienczak, J., W. Schmidell, G. M. Aragao. 2013. High-cell-density culture strategies for polyhydroxyalkanoate production: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40:275-286.
- Jendrossek, D., D. Pfeiffer. 2014. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environ. Microbiol.* 16:2357-2373.
- Jenkins, D., S. Chaisson, A. Martin. 1990. starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172:2779-2781.
- Kadouri D., E. Jurkevitch, Y. Ikon, S. Castro-Sowinski. 2005. Ecological and agricultural significance of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Crit. Rev. Microbiol.* 31:55-67.

- Kaprelyants, A.S., J.C. Gottschal, D.B. Kell. 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 104:271–286.
- Khanna, S., A.K. Srivastava. 2005. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process. Biochem.* 40:607-619.
- Koch, H.M., A.M. Calafat. 2009. Human body burden of chemicals used in plastic manufacture. *Philos. T, Roy. Soc. B.* 20:63–78
- Kojima, T., T. Nishiyama, A. Maehara, S. Ueda, H. Nakano, T. Yamane. 2004. Expression profiles of polyhydroxyalkanoate synthesis-related genes in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biosci. Bioeng.* 97:45-53.
- Koller, M., A. Atlić, M. Dias, A. Reiterer, G. Braunegg. 2010. Microbial PHA production from waste raw materials. Chen, G.Q. (ed.). *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. Editorial Springer. Berlin, Heidelberg. pp 85–119.
- Koroleff, F. 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *Coun. Explor. Sea C. Hydrography Committee Ref. L. C:9*
- Kurath, G. R.Y. Morita. 1983. Starvation-survival physiological studies of a marine *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microb.* 45:1206–1211.
- Lacour S., P. Landini. 2004. SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. *J. Bacteriol.* 186:7186–7195.
- Lange, R., R. Hengge-Aronis. 1991. Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells is controlled by the novel sigma factor σ S (*rpoS*). *J. Bacteriol.* 173:4474-4481.
- Law, J., R. Slepecky. 1961. Assay of Poly- β -hydroxybutyrate. *J Bacteriol.* 82:33-36.
- Lee, S.Y, J. Choi. 1999. Effect of fermentation performance on the economics of poly-(3-hydroxybutyrate) production by *Alcaligenes latus*. *Polym. Degrad. Stabil.* 59:387–393.
- Lee, S.Y. 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends. Biotechnol.* 14:431–438.
- Lenczak, J.L., L.K. Quines, A.A. de Melo, M. Brandellero, C.R. Mendes, W. Schmidell, G.M.F. Aragao. 2011. High cell density strategy for Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupravidus necator*. *Braz. J. Chem. Eng.* 28:585-596.
- Lilio, J.G., F. Rodriguez-Valera. 1990. Effects of Culture Conditions on Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Production by *Haloferax mediterranei*. *App. Environ. Microb.* 56:2517-2521.

- Llorens, J.M.N., A. Tormo, E. Martínez-García. 2010. Stationary phase in gram-negative bacteria. *Microb. Revs.* 34:476-495.
- López-Cortés, A., A. Lanz-Landázuri, J.Q. García-Maldonado. 2008. Screening and Isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. *Microb. Ecol.* 56:112–120.
- López-Cortés, A., O. Rodríguez-Fernández, H. Latisnere-Barragán, H.C. Mejía-Ruíz, G. González-Gutiérrez, C. Lomelí-Ortega. 2010. Characterization of polyhydroxyalkanoate and the *phaC* gene of *Paracoccus seriniphilus* E71 strain isolated from a polluted marine microbial mat. *World J. Microb. Biot.* 26:109–118.
- Lord, F., Nye R. 1919. The relation of the *Pneumococcus* to hydrogen ion concentration, acid death-point, and dissolution of the organism. *J. Exp. Med.* 30:389–399.
- Lu, J. R.C. Tappel, C.T. Nomura. 2009. Mini-review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). *Polym. Rev.* 49:226–248.
- Madigan, M. T., J.M Martinko, J. Parker. 2000. Brock biology of microorganisms. Prentice Hall/Pearson Education. Novena edición. Upper Saddle River, NJ. 991p.
- Madison, L.L., G.W. Huisman. 1999. Metabolic Engineering of poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 63:21-53.
- Marion, G.M., F.J. Millero, M.F. Camões, P. Spitzer, R. Feistel, C.T.A. Chen. 2011. pH of seawater. *Mar. Chem.* 126:89-96.
- Martínez-Gutierrez, A.C. 2015. Valoración del uso de diferentes concentraciones de glucosa para la producción de biomasa y polihidroxialcanoatos por *Paracoccus seriniphilus* cepa E71. Tesis (licenciatura biología marina). La Paz, Baja California Sur. Universidad autónoma de Baja California Sur. 98p.
- Mergaert, J., A. Webb, C. Anderson, A. Wouters, J. Swings. 1993. Microbialdegradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3233–3238.
- Mergaert, J., C. Anderson, A. Wouters, J. Swings, K. Kerster. 1992. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 103:317–322.
- Mergaert, J., C. Anderson, A. Wouters, J. Swings. 1994. Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrateco-3-hydroxyvalerate) in compost. *J. Environ. Polymer Degrad.* 2:177-183.
- Molenaar D., R. van Berlo, D. de Ridder, B. Teusink. 2009. Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Mol. Sys. Biol.* 5:1-10.

Morita, R.Y. 1982. Starvation survival of heterotrophs in the marine environment. *Adv. Microb. Ecol.* 6:171-198.

Murado, M.A., M.P. Gonzalez, L. Pastrana. 1994. Mussel processing wastes as a fermentation substrate. Martin, A.M. (ed.). *Fisheries Processing-Biotechnological applications*. Springer-Science+business media, B.V. Primera edición. Salisbury, Wiltshire. pp 311-340.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Último acceso el 21 de noviembre del 2016.

Nystrom, T. 1998. To be or not to be: the ultimate decision of the growth-arrested bacterial cell. *Microb. Revs.* 21:283-290.

Nystrom, T. 2001 Not quite dead enough: On bacterial life, culturability, senescence, and death. *Archiv. Microbiol.* 176:159-164.

Omil, F., R. Mendéz, J. Lema. 1996. Anaerobic treatment of seafood processing waste waters in an industrial anaerobic pilot plant. *Water SA.* 22:173-180

Panpong, K., G. Srisuwana, S. O-Thong, P. Kongjan. 2014. Anaerobic co-digestion of canned seafood wastewater with glycerol waste for enhanced biogas production. *Ener. Proced.* 52:328-336.

Pham, T.H., J.S. Webb, B.H.A. Reem. 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

Prieto, M. 2007. From Oil to Bioplastics, a Dream Come True? *J. Bacteriol.* 189:289-290.

Reddy, C.S., R. Ghai, C. Rashmi, V.C. Kalia. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour. Technol.* 87:137-146.

Redmond, W.B. 1957. Studies on autolysis of mycobacteria. II. Autolysis of various pathogenic and nonpathogenic strains grown in a medium deficient in nitrogen. *J. Bacteriol.* 73:279-83.

Rice, K.C., K.W. Bayles. 2008. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72:85-109.

Riesenberg, D., R. Guthke. 1999. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:422-30.

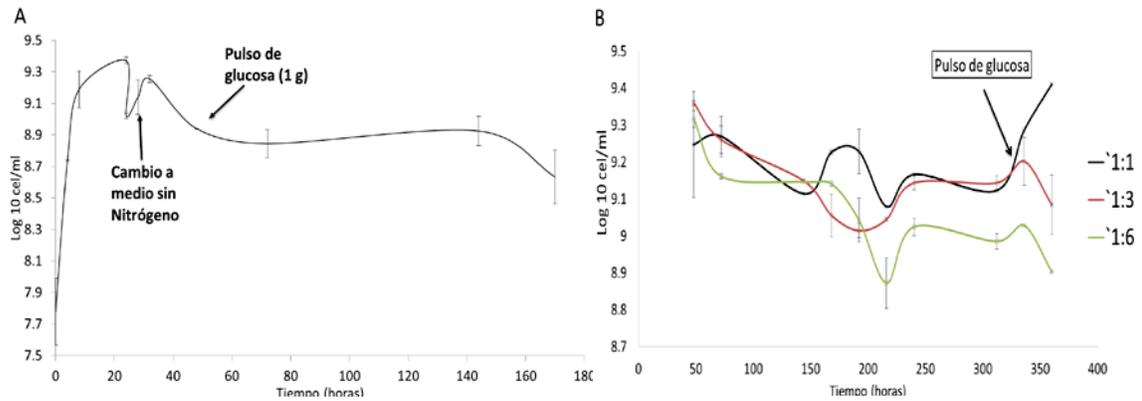
Rothermich, M., R. Guerrero, R. Lenz, S. Goodwin. 2000. Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial Mats. *Appl. Environ. Microb.* 66:4279-4291.

- Schut, F., A. Rudolf, J. Prins, C. Gottscha. 1997. Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquat. Microb. Ecol.* 12:177-202.
- Shrivastav, A., S.K. Mishra, B. Shethia, I. Pancha, D.Jain, S. Mishra. 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct. *Int. J. Biol. Macromol.* 47:283–287.
- Slepecky, R. A., Law J. H. 1960. A rapid spectrophotometric assay of α - β -unsaturated acids and B-hydroxy acids. *Anal. Chem.* 32:1697-1699.
- Stackebrandt, E., B. M. Goebel. 1994. Taxonomic Note: A place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 44:846-849.
- Steinbrüche, A., S. Hein. 2001. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate in microorganisms. *Adv. Biochem. Eng. Biot.* 71:81-123
- Stock, J.A., D.P. Sthaly. 1974. Polysaccharide that may serve as Carbon and energy storage compound for sporulation in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 120:399-406.
- Subin, R.S., M.V. Siju, G.B. Sarita. 2013. Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates accumulating *Vibrio* sp. strain BTTC26 from marine sediments and its production kinetics. *J. Sci. Ind. Res.* 72:228-235.
- Sudesh, K., H. Abe, Y. Doi. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym.* 25:1503- 1555.
- Sun, W., J.G. Cao, K. Teng, E.A. Meighen. 1994. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate in the luminescent bacterium, *Vibrio harveyi*, and regulation by the lux autoinducer, N-(3-hydroxybutanoyl) homoserine lactone. *J. Biol. Chem.* 1994. 269:20785-20790.
- Suriyamongkol, P., R. Westlake, S. Narine, M. Maloney, S. Shah. 2007. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. *Biotechnol. Adv.* 25:148-175.
- Tan, G.Y, C.L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I. Razaad, J.Y. Wang. 2014. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers.* 6:706–754.
- Teske, A., K. Hinrichs, V. Edgcomb, A. de Vera Gomez, D. Kysela, S. P. Sylva, M. L. Sogin, H. W. Jannasch. 2002. Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: Evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1994-2007.

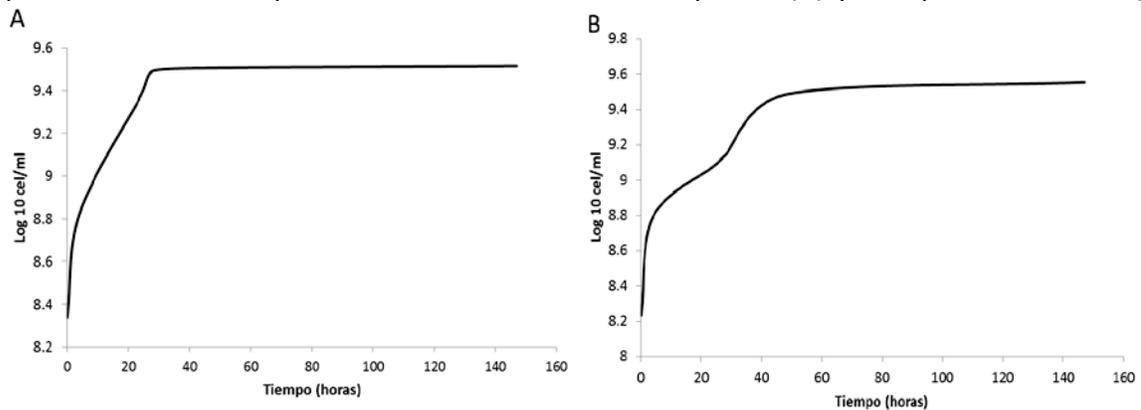
- Thompson, R.C., S.H. Swan, C.J. Moore, F.S. Vom Saal. 2009. Our plastic age. *Philos. T. Roy Soc. B.* 19:73–76
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal. Biochem.* 11:256-265.
- Van Wuyckhuysse, B.C., H.E. Perinpanayagam, D. Bevacqua, R.F. Raubertas, R.J. Billings, W.H. Bowen, L-A Tabak. 1995. Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. *J. Dent. Res.* 74:686-690.
- Vandamme, P., T. Coenye. 2004. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2285-2289.
- Verlinden, R.A.J., D.J. Hill. M.A. Kenward, C.D. Williams, I. Radecka. 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Appl. Microbiol.* 102:1437–1449.
- Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V.F. Wendisch, R. Hengge. 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* 187:1591–1603.
- Wei, Y., C. Wei-Chuan, C. Huang, H. Wu, Y. Sun, C. Lo, O. Janarthanan. 2011. Screening and Evaluation of Polyhydroxybutyrate-Producing Strains from Indigenous Isolate *Cupriavidus taiwanensis* Strains. *Int. J. Mol. Sci.* 12:252-265.
- West, P.A. 1989. The human pathogenic vibrios. A public health update with environmental perspectives. *Epidem. Infec.* 103:1-34.
- Wiggam, M.I., M.J. O’Kane, R. Harper, A.B. Atkinson, D.R. Hadden, E.R. Trimble. 1997. Treatment of diabetic ketoacidosis using normalization of blood 3- hydroxy-butyrate concentration as the endpoint of emergency management. *Diab. Care.* 20:1347–1352.
- Williams, S.F., D.P. Martin. 2005. Applications of polyhydroxyalkanoates (PHA) in medicine and pharmacy. *Biopolymers Online.* 4.
- Wright, R.T. 1978. Measurement and significance of specific activity in the heterotrophic bacteria of natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:297-305.
- Wu, Q. Y. Wang, G.G.Q. Chen. 2009. Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. 2009. *Artif. Cell. Blood. Subs.* 37:1-12.
- Yanagita, T., T. Ichikawa, T. Tsuji, Y. Kamata, K. Ito, M. Sasaki. 1978. Two trophic groups of bacteria, oligotrophs and eutrophs: their distribution in fresh and sea water areas in the central northern Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 24:59-88.
- Zinn, M., B. Witholt, T. Egli. 2001. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 53:5–21.

12. ANEXOS

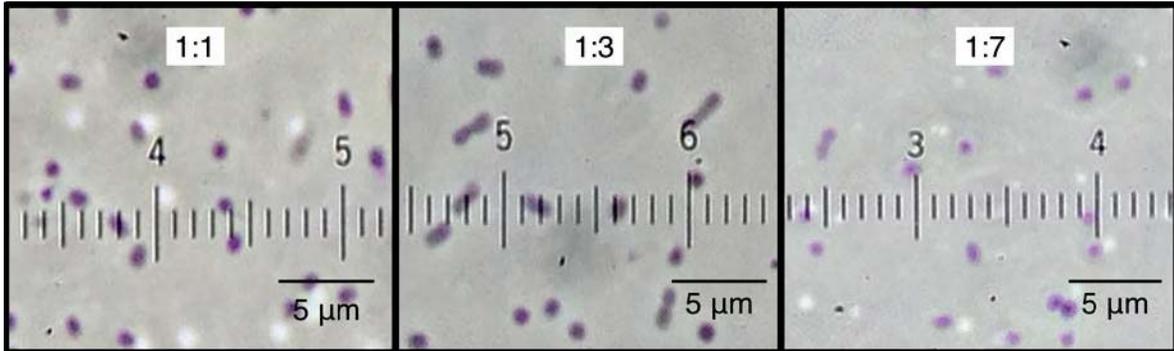
Anexo A. Conteo total directo (C.T.D.) mediante cámara Petrov-Housser del crecimiento poblacional de *Paracoccus seriniphilus* cepa E71 en el sistema de producción de dos etapas con glucosa y limitación de nitrógeno (A) y expuesta a las diferentes diluciones del efluente de grupo Pando (B).



Anexo B. Conteo total directo (C.T.D.) mediante cámara Petrov-Housser del crecimiento poblacional de la cepa Y01A1 en el medio CAC sin pulsos (A) y con pulsos de CAC° (B).



Anexo C. Micrografías de contraste de fases que muestran a la cepa E71 expuesta a las diferentes concentraciones del efluente de grupo pando.



Anexo D. (A) Micrografía de contraste de fases que muestra formas involucionadas de la cepa Y01A1 con granulos de PHA en su interior, cultivada en medio YEA glucosa 1 % e incubada a 30 °C durante 48 horas. (B) Micrografía de epifluorescencia que muestra de la tinción rojo nilo en la cepa Y01A1 cultivada en el sistema de producción de dos etapas con glucosa como fuente de carbono y con limitación de nitrógeno. Condiciones de cultivo 30 °C y 150 rpm. (C) Micrografía de epifluorescencia que muestra de la tinción rojo nilo en la cepa Y01A1 cultivada en medio CAC durante 150 horas. Condiciones de cultivo 30 °C y 150 rpm.

