



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

AISLAMIENTO Y ANÁLISIS INDEPENDIENTE DE
CULTIVO DE COMUNIDADES PRODUCTORAS DE
POLIHIDROXIALCANOATOS Y DEGRADADORAS DE
n-HEXADECANO EN TAPETES MICROBIANOS DE
GUERRERO NEGRO, MÉXICO

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

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

P r e s e n t a

Carolina Alejandra Martínez Gutiérrez

La Paz, Baja California Sur, enero de 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 09 horas del día 03 del Mes de enero del 2017, 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:

" AISLAMIENTO Y ANÁLISIS INDEPENDIENTE DE CULTIVO DE COMUNIDADES PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS Y DEGRADADORAS DE *n*-HEXADECANO EN TAPETES MICROBIANOS DE GUERRERO NEGRO, MÉXICO"

Presentada por el alumno:

Carolina Alejandra Martínez Gutiérrez

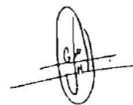
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biotecnología**

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

LA COMISIÓN REVISORA



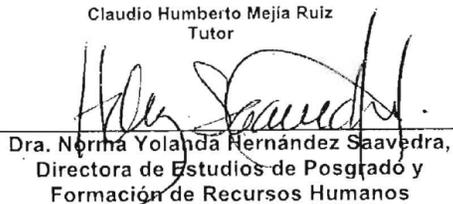
Alejandro López Cortés
Co-director



José Quinatzin García Maldonado
Co-director



Claudio Humberto Mejía Ruiz
Tutor



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

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Alejandro López Cortés
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-director

Dr. José Quinatzin García Maldonado
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Mérida.
Co-director

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Tutor

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Alejandro López Cortés
Dr. José Quinatzin García Maldonado
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Alejandro López Cortés
Dr. José Quinatzin García Maldonado
Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz

SUPLENTE

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros lipídicos sintetizados intracelularmente por bacterias y arqueas. Una vez extraídos de las células, los PHAs muestran propiedades similares a las de los plásticos convencionales, por lo que han adquirido un interés principalmente biotecnológico. Sin embargo, los PHAs tienen significado evolutivo y ecológico al incrementar la sobrevivencia y la tolerancia al estrés del organismo productor en ambientes cambiantes y/o competitivos donde las fuentes de carbono y de energía son limitadas. No obstante, el conocimiento de la producción de PHAs en ambientes naturales es escaso, por lo que el objetivo de este estudio fue caracterizar la diversidad de bacterias heterótrofas aerobias con el potencial metabólico de producir PHAs, y de utilizar *n*-hexadecano para sintetizar PHAs, en dos tapetes microbianos hipersalinos de Guerrero Negro, México, empleando aproximaciones dependientes e independientes de cultivo. Se logró el aislamiento de seis cepas bacterianas que fueron identificadas a través de secuencias parciales del gen 16S rRNA como *Halomonas* sp., *Paracoccus* sp., *Planomicrobium* sp., y *Staphylococcus* sp. Adicionalmente, se detectó la presencia de inclusiones de PHAs a través de microscopía y tinciones lipofílicas, y la secuenciación parcial del gen *phaC* que codifica para la enzima polimerasa, clave en la síntesis de PHAs, en cuatro de las cepas aisladas. El análisis filogenético de secuencias putativas de aminoácidos inferidas de librerías de clones de los genes *phaC* y *phaC1* ambientales mostraron una alta diversidad de PhaC Clase I de bacterias de la clase α -Proteobacteria, la mayoría provenientes de bacterias no cultivadas, mientras que las secuencias putativas de aminoácidos del gen *phaC1* revelaron que todos los clones estuvieron cercanamente relacionados con la PhaC clase II de *Pseudomonas putida*, sugiriendo la presencia de este grupo en los tapetes, resultado que es soportado por la detección del gen *phaC2* en ambos sitios a través de PCR cuantitativo. Adicionalmente, se aisló un consorcio bacteriano capaz de producir PHAs utilizando *n*-hexadecano como sustrato, y se detectaron copias del gen *alkB*, que codifica para una enzima involucrada en la oxidación de alcanos, en ambos sitios. Los resultados de este trabajo sugieren que los tapetes microbianos hipersalinos son importantes reservorios de bacterias productoras de PHAs a partir de hidrocarburos y otros sustratos.

Palabras clave: *phaC*, tapetes microbianos hipersalinos, bacterias hidrocarbonoclasticas, polihidroxicanoatos.

Vo. Bo.

Dr. Alejandro López Cortés

Co-director

Dr. José Quinatzin García Maldonado

Co-director

Summary

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are inner-lipidic polymers synthesized by bacteria and archaea. Once extracted from cells, PHAs shows material properties that are similar to those found in conventional plastics, reason why they have acquired a biotechnological interest. Nevertheless, PHAs have ecological and evolutionary significance because they enhance the survival and stress tolerance of producing-microorganism in changing and/or competitive environments, where carbon and energy sources are limited. However, the knowledge about the PHA production in natural environments is scarce. This study aimed the characterization of aerobic-heterotrophic bacteria with the metabolic potential of PHA production, and *n*-hexadecane degradation to synthesize PHA, in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Mexico, using culture-dependent and independent approaches. Six bacterial strains were isolated and identified by partial 16S rRNA sequences as *Halomonas* sp., *Paracoccus* sp., *Planomicrobium* sp., and *Staphylococcus* sp. Additionally, PHA inclusions were detected using microscopy and lipophilic stains, and the partial *phaC* gene sequencing, which codifies to the PHA polymerase, key enzyme in PHA production, was achieved in four of the isolated strains. Phylogenetic analysis of putative amino acid sequences inferred from environmental *phaC* and *phaC1* clone libraries showed a high diversity of PhaC class I of bacteria inside the α -Proteobacteria class, most of them coming from uncultured bacteria. Meanwhile, all the putative amino acid sequences of *phaC1* gene were close related to PhaC class II of *Pseudomonas putida*, result supported by the detection of *phaC2* gene through quantitative PCR. Furthermore, a bacterial consortia able to produce PHA using *n*-hexadecane as substrate was isolated, and *alkB* gene, which codifies to an enzyme involved in alkane's oxidation, was detected in both sites. The results obtained in this work suggest that hypersaline microbial mats are a great reservoir of PHA-producing bacteria, from hydrocarbons and other substrates.

Keywords: *phaC*, hypersaline microbial mats, hydrocarbonoclastic bacteria, polyhydroxyalkanoates.

Vo. Bo.

Dr. Alejandro López Cortés

Co-director

Dr. José Quinatzin García Maldonado

Co-director

Dedicatoria

Dedico este trabajo al Dr. Alejandro López Cortés por guiarme a lo largo de mi formación académica de los últimos años, por sus consejos, empeño, y dedicación. Gracias por mostrarme que los microorganismos y sus funciones en la naturaleza son algo maravilloso y digno de ser estudiado.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme la beca de manutención con número el 590799, así como al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y por facilitarme sus instalaciones.

También a la Empresa Exportadora de Sal S.A. de C.V. ubicada en Guerrero Negro, B.C.S., México por darnos acceso a sus instalaciones con el fin de obtener muestras de tapete microbiano, y sobre todo por resguardar esos sitios tan especiales.

Este trabajo y el aprendizaje implícito hubieran sido imposibles sin el apoyo y trabajo de muchas personas, a continuación mencionaré a la mayoría de ellas.

Mis directores de tesis, el Dr. Alejandro López Cortés por permitirme desarrollar mis ideas, y por dar más de lo exigido en mi formación ¡gracias, gracias, gracias!, y el Dr. José Quinatzin García Maldonado, por apoyarme en todo momento a pesar de la distancia.

También mi asesor, el Dr. Humberto Mejía Ruiz por sus sugerencias para mejorar el trabajo experimental y posteriormente el documento de tesis, y el Dr. Ricardo Vázquez Juárez por sus ideas para mejorar mi trabajo.

Un agradecimiento al Dr. Luis Fernando García Carreño por invitarme a colaborar en la escritura de la reseña The Vital Question, y también por sus consejos y empeño en mi formación.

Quiero agradecer de manera especial a la Dra. María Leopoldina Aguirre, Investigadora en CINVESTAV-Mérida por permitirme realizar la estancia de investigación donde llevé a cabo una parte de los experimentos de este trabajo. Gracias al Dr. Norberto Ulises García y al Dr. Emanuel Hernández Nuñez por su ayuda en la realización de mis experimentos, ¡gracias Doctores! También a mis amigos Fernanda, Sonia, Magda, Alejandra, y Paco por su apoyo durante mi estancia en Mérida.

También al Ph. D. Jesús Muñoz, jefe del grupo Ecología y Supervivencia de Microorganismos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por proporcionarme la cepa KT2440, la cual fue indispensable en la realización de mis experimentos.

Quiero agradecer ampliamente al Biólogo Marino Hever Latisnere Barragán, técnico responsable del Laboratorio de Geomicrobiología y Biotecnología de CIBNOR, por su apoyo técnico, por soportarme a todas horas, y sobre todo por su amistad y pláticas acerca de bacterias.

Al M.C. Manuel Legorreta, técnico responsable del Laboratorio de Microbiología Ambiental y a la Dra. Blanca Romero López, así como al M.C. Ángel Carrillo, técnico responsable del Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular, por brindarme apoyo técnico a lo largo de mi maestría.

Muchísimas gracias a todos los profesores que me compartieron su conocimiento durante las clases de maestría, ¡aprendí mucho!

Gracias a todos mis amigos: José Luis, en serio, sin ti jamás lo hubiera logrado, Heidi ¡me inspiras, amiga!, Andrea por amar a los diazótrofos, a mi amigo Julio quien también ama a las bacterias, a Priscila y Pablo por su compañerismo en el laboratorio, Mariela, Angélica, Jonathan, y a mis compañeros de maestría.

También a mi familia, sobre todo a mis padres: a mi papá por enseñarme que el trabajo es algo maravilloso y por poner a mi disposición libros desde temprana edad, y a mi mamá por todo su amor y apoyo.

Finalmente, quiero agradecer a todas las personas que trabajan por el desarrollo de la Ciencia en México, y más aún a todas aquellas personas que aman la ciencia y que están en ello por su pasión por el conocimiento.

¡Gracias!

Contenido

Resumen.....	i
Summary.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras.....	x
Lista de Tablas.....	xi
Nomenclatura y unidades.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Los tapetes microbianos estratificados.....	1
1.1.1 Los tapetes microbianos hipersalinos de Guerrero Negro, México.....	2
1.2 Los polihidroxicanoatos (PHAs).....	3
1.2.1 Clasificación de los polihidroxicanoatos y enzimas involucradas en su síntesis.....	3
1.2.2 Vías metabólicas para la síntesis de polihidroxicanoatos.....	5
1.2.3 Funciones de los polihidroxicanoatos en la naturaleza.....	6
1.2.4 Los polihidroxicanoatos en tapetes microbianos.....	7
1.3 Producción de polihidroxicanoatos a partir de hidrocarburos como fuente de carbono.....	9
1.3.1 Relación metabólica entre hidrocarburos y polihidroxicanoatos.....	9
1.3.2 Diagénesis de hidrocarburos en tapetes microbianos.....	10
2. ANTECEDENTES.....	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	12
4. HIPÓTESIS.....	13
5. OBJETIVO GENERAL.....	13
4.1 Objetivos específicos.....	13
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
6.1 Descripción del área de estudio.....	14
6.2 Obtención de muestras.....	14
6.3 Objetivo 1: Obtención de un cepario de organismos productores de polihidroxicanoatos.....	15

6.3.1	Primoaislamiento.....	15
6.3.2	Tinción Negro Sudan.....	15
6.3.3	Tinción Rojo Nilo.....	16
6.3.4	Asignación taxonómica mediante secuencias parciales del gen 16S ARNr.....	16
6.3.4.1	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
6.3.4.2	Análisis de secuencias parciales del gen 16S ARNr.....	17
6.3.5	Amplificación del gen <i>phaC</i> de las cepas aisladas.....	17
6.3.5.1	Análisis de secuencias parciales del gen <i>phaC</i>	17
6.4	Objetivo 2: Diversidad de bacterias potencialmente productoras polihidroxicanoatos en tapetes microbianos de Guerrero Negro.....	18
6.4.1	Diseño de oligonucleótidos para la detección del gen <i>phaC1</i> de bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	18
6.4.1.1	Análisis de identidad de las secuencias parciales del gen <i>phaC1</i> de <i>Pseudomonas putida</i>	19
6.4.2	Extracción de ADN ambiental de los tapetes microbianos analizados.....	19
6.4.3	Amplificación del gen <i>phaC</i> a partir de ADN ambiental.....	19
6.4.4	PCR anidado del gen <i>phaC1</i> a partir de ADN ambiental.....	20
6.4.4.1	Ronda 1.....	20
6.4.4.2	Purificación de productos de PCR a partir de gel de agarosa.....	20
6.4.4.3	Ronda 2.....	20
6.4.5	Separación de productos de PCR por clonación.....	21
6.4.5.1	Reacción de ligación de productos de PCR de los genes <i>phaC</i> y <i>phaC1</i>	21
6.4.5.2	Reacción de transformación.....	21
6.4.5.3	Extracción de ADN plasmídico de clones.....	22
6.4.5.4	PCR del vector pJET 1.2 con el inserto de interés.....	22
6.4.5.5	Análisis de secuencias de clones.....	23
6.4.6	Análisis filogenético de secuencias parciales de los genes <i>phaC</i> y <i>phaC1</i>	23
6.5	Objetivo 3: Estimar el número de copias del gen <i>phaC</i> en ADN ambiental de tapetes microbianos.....	23
6.5.1	qPCR del gen <i>phaC2</i> de <i>Pseudomonas putida</i> empleando ADN ambiental....	23
6.6	Objetivo 4. Evaluar la capacidad de degradar hidrocarburos para producir PHA por bacterias heterótrofas aerobias.....	24
6.6.1	qPCR del gen <i>alkB</i> empleando ADN ambiental.....	24
6.6.2	Enriquecimiento de bacterias degradadoras de <i>n</i> -hexadecano y productoras de polihidroxicanoatos.....	25

6.6.3 Cinética de crecimiento poblacional de consorcio 2 empleando <i>n</i> -hexadecano como fuente de carbono.....	25
6.6.3.1 Elaboración de curva estándar para cuantificación de <i>h</i> -hexadecano.....	26
6.6.3.2 Cinética de consumo de <i>n</i> -hexadecano por consorcio 2.....	26
6.6.3.3 Detección de inclusiones citoplasmáticas sugestivas a polihidroxicanoatos por microscopía.....	27
6.6.3.4 Extracción de ADN genómico.....	27
6.6.3.5 Cuantificación del gen <i>alkB</i> en cinética de crecimiento del consorcio 2.....	27
6.7 Análisis estadístico de datos de cinética de crecimiento, degradación de HC, y qPCR.....	28
7. RESULTADOS.....	29
7.1 Caracterización fenotípica de cepas aisladas capaces de producir polihidroxicanoatos.....	29
7.1.1 Asignación taxonómica por medio de secuencias parciales del gen 16S ARNr.....	30
7.1.2 Detección y análisis de la identidad de secuencias parciales del gen <i>phaC</i>	30
7.2 Análisis de la diversidad de bacterias con el potencial de producir polihidroxicanoatos en los tapetes microbianos analizados.....	33
7.2.1 Análisis de secuencias de productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos diseñados para la detección del gen <i>phaC1</i>	33
7.2.2 Análisis filogenético de secuencias parciales de los genes <i>phaC</i> y <i>phaC1</i> recuperadas a partir de ADN ambiental.....	33
7.3 Estimación del número de copias del gen <i>phaC</i> en DNA ambiental de los tapetes microbianos estudiados.....	36
7.4 Evaluación de la presencia de bacterias con el potencial de degradar hidrocarburos lineales y producir polihidroxicanoatos en tapetes microbianos.....	36
7.4.1 Cuantificación del gen <i>alkB</i> en muestras naturales de tapetes microbianos.....	36
7.4.2 Aislamiento y crecimiento poblacional de un consorcio degradador de <i>n</i> -hexadecano y productor de polihidroxicanoatos.....	37
7.4.2.1 Cinética de consumo de <i>n</i> -hexadecano.....	38
7.4.2.2 Estimación del número de copias del gen <i>alkB</i> a través de cinética	

de crecimiento.....	39
7.4.2.3 Detección de inclusiones citoplasmáticas sugestivas a polihidroxicanoatos.....	41
8. DISCUSIÓN.....	41
8.1 Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas productoras de polihidroxicanoatos recuperadas de tapetes microbianos hipersalinos.....	41
8.1.1 Asignación taxonómica a través de secuencias parciales del gen 16S ARNr.....	42
8.1.2 Caracterización genotípica de cepas productoras de polihidroxicanoatos a través de la detección del gen <i>phaC</i>	44
8.1.3 Posible papel ecológico de cepas productoras de polihidroxicanoatos en los tapetes microbianos.....	46
8.2 Diversidad de bacterias con el potencial de producir polihidroxicanoatos en los tapetes microbianos estudiados.....	46
8.2.1 Análisis filogenético de secuencias parciales de PHA sintasas recuperadas de los tapetes microbianos estudiados.....	47
8.3 Detección del gen <i>phaC</i> en ADN ambiental de los tapetes microbianos estudiados.....	50
8.4 Detección y recuperación de bacterias con la capacidad de utilizar hidrocarburos lineales y producir polihidroxicanoatos.....	52
8.4.1 Detección del gen <i>alkB</i> en ADN ambiental de tapetes microbianos.....	52
8.4.2 Enriquecimiento de bacterias degradadoras de <i>n</i> -hexadecano con la capacidad de producir polihidroxicanoatos.....	53
8.4.3 Cinética de crecimiento poblacional del consorcio 2 utilizando <i>n</i> -hexadecano como fuente de carbono.....	53
8.4.4 Detección de polihidroxicanoatos en el consorcio 2 al crecer con <i>n</i> -hexadecano.....	55
9. CONCLUSIONES.....	56
10. LITERATURA CITADA.....	57
11. ANEXOS.....	65

Lista de figuras

Figura 1. Estructura de los gránulos de PHA <i>in vivo</i> . Tomado y modificado de Laycock <i>et al.</i> (2014).....	4
Figura 2. Vía metabólica de producción y degradación de polihidroxitirato. Tomado y modificado de Sudesh <i>et al.</i> (2000).....	5
Figura 3. Vía metabólica para la producción de polihidroxicanoatos de cadena media empleando diferentes sustratos. Tomado y modificado de Do Young <i>et al.</i> (2007)....	6
Figura 4. Diagrama que muestra algunas de las funciones de los polihidroxicanoatos en la naturaleza (Tomado y modificado de Prieto <i>et al.</i> , 2014).....	7
Figura 5. Esquema de los efectos tóxicos de los hidrocarburos sobre la membrana celular bacteriana. Tomado y modificado de Heipieper y Martínez (2010).....	9
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa (1.2%) de productos de PCR del gen <i>phaC</i> de cepas Gram negativas aisladas de ESSA A1 y ESSA A4.....	31
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos de PCR del gen <i>phaC</i> de cepas Gram positivas aisladas de ESSA A1 y ESSA A4.....	32
Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud, basado en la comparación de secuencias de aminoácidos inferidas de secuencias parciales de los genes <i>phaC</i> que codifican para PHA sintasas clase I y gen <i>phaC1</i> codificante para PHA sintasas clase II, recuperadas de tapetes microbianos hipersalinos de ESSA A1 y ESSA A4.....	35
Figura 9. Aproximación al crecimiento poblacional a través de densidad óptica a 660 nm de consorcio 2 utilizando <i>n</i> -hexadecano como fuente de carbono.....	38
Figura 10. Cinética de consumo de <i>n</i> -hexadecano por el consorcio 2.....	39
Figura 11. Número de copias del gen <i>alkB</i> en tres diferentes tiempos de la cinética de crecimiento del consorcio 2.....	40
Figura 12. Micrografía de epifluorescencia (800 x) que muestra células del consorcio 2 teñidas con Rojo Nilo a una edad de 0 horas, creciendo en <i>n</i> -hexadecano como fuente de carbono.....	41

Lista de Tablas

Tabla I. Parámetros fisicoquímicos de la columna de agua de los sitios estudiados.....	14
Tabla II. Características fenotípicas relacionadas con la producción de PHA de las cepas aisladas de las áreas de estudio.....	29
Tabla III. Asignación taxonómica de cepas productoras de polihidroxicanoatos aisladas de las áreas de estudio.....	30

Nomenclatura y unidades

ESSA: Exportadora de Sal, S.A. de C.V.

ESSA A1: Área 1 de concentración de la empresa Exportadora de Sal, S.A. de C.V.

ESSA A4: Área 4 de concentración de la empresa Exportadora de Sal, S.A. de C.V.

PHAs: polihidroxialcanoatos

PHB: polihidroxiбутирато

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNr: ácido ribonucleico ribosomal

16S RNAr: molécula conformacional de la subunidad menor del ribosoma procariota

%GC: porcentaje molar de las bases nitrogenadas guanina y citosina dentro de un fragmento de ácido nucleico

pH: potencial hidrógeno

min: minutos

cm: centímetros

nm: nanómetros

°C: grados Celcius

h: horas

µm: micrómetro, milésima parte de un milímetro

g: gramos

ng: nanogramos

µg: microgramos

L: litros

mL: mililitros

µL: microlitro, milésima parte de un mililitro

M: molar

µM: micromolar

Abs: absorbancia

rpm: revoluciones por minuto

scl-PHA: polihidroxialcanoatos de cadena corta

mcl-PHA: polihidroxialcanoatos de cadena media

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Colección Alemana de Microorganismos

kDa: kilodaltons

PPC: Pasteur Culture Collection, Colección de Cultivos Pasteur

3HHx: 3-hidroxihexanoato

3HO: 3-hidroxi octanoato

3HDD: 3-hidroxi dodecanoato

(R)-3HA: monómero de hidroxiaácido en configuración R

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

SDS: dodecilsulfato sódico

UV: luz ultravioleta

uv-vis: rango del espectro electromagnético que incluye desde la luz ultravioleta hasta la luz visible

ASW: artificial sea water, agua de mar artificial

YEA: yeast extract broth, caldo de extracto de levadura

MBM: medio basal marino

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

EITr: elementos traza

ICRs: inclusiones citoplasmáticas refringentes

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

pb: pares de bases nucleotídicas

NCBI: national center for biotechnology information, centro nacional para la información biotecnológica

BLAST: basic local alignment search tool, herramienta básica de búsqueda de alineamiento local

MV: máxima verosimilitud

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los tapetes microbianos estratificados

Los tapetes microbianos son comunidades de microorganismos asociadas a minerales y matrices poliméricas. Varían en complejidad desde ecosistemas simples, biopelículas compuestas casi en su totalidad por mono-especies, hasta multi-capas compuestos de poblaciones diversas de procariotas y eucariotas unicelulares, como diatomeas y algas unicelulares, y que se distribuyen en ensambles o gremios (Franks y Stolz, 2009).

Los tapetes microbianos se desarrollan a través del tiempo como resultado del crecimiento y actividad microbianos, y del secuestro y unión de sedimento en la matriz orgánica, principalmente compuesta de exopolisacáridos (Braissant *et al.*, 2009; Margulis *et al.*, 1980). Los parámetros ambientales importantes para el desarrollo de estos ecosistemas incluyen el tamaño del grano del sustrato, la capilaridad del agua, la penetración de la luz, tasas de sedimentación y erosión, y la presión por pastoreo (Van Gemerden, 1993).

Los tapetes microbianos se encuentran asociados a la interface sedimento/agua, donde interactúan con el sedimento, atrapando partículas y clásticos, y en algunos casos pueden promover procesos de precipitación y litificación. Los tapetes microbianos pueden desarrollarse en un amplio rango de hábitats incluyendo aquellos extremos en pH, por ejemplo, cuevas ácidas ricas en sulfuros, lagos ricos en hierro, manantiales de altas temperaturas incluyendo ventilas hidrotermales, pantanos salados, estanques, lagunas hipersalinas, y montañas submarinas que emanan soluciones ricas en minerales para satisfacer la demanda de comunidades quimiolitotróficas (Franks y Stolz, 2009).

Estas estructuras son consideradas ecosistemas completos autosustentables a escala de milímetros (Des Marais, 2003), y se caracterizan por presentar gradientes químicos verticales, fluctuaciones cíclicas estacionales de inundación y desecación, además de fluctuaciones diarias de temperatura, luz, pH, oxígeno, y concentración de sulfuro y de nutrientes (Villanueva *et al.*, 2007).

El éxito ecológico de los tapetes microbianos es un reflejo de la versatilidad metabólica y de la adaptabilidad fisiológica encontrada en los microorganismos principalmente de los Dominios Bacteria y Archaea, y han sido modelos para la ecología microbiana y estudios extensivos en los campos de la evolución y la astrobiología debido a que son los análogos modernos de vida antigua y posiblemente ecosistemas extraterrestres (Franks y Stolz, 2009).

1.1.1 Los tapetes microbianos hipersalinos de Guerrero Negro, México

Uno de los ejemplos más destacables de tapetes microbianos hipersalinos en el planeta Tierra se encuentra en las lagunas evaporíticas de la empresa Exportadora de Sal, Guerrero Negro, Baja California Sur, México, adyacente a la Laguna Ojo de Liebre en la Costa del Océano Pacífico, y desde donde el agua fluye a través de una serie de estanques evaporíticos con un incremento en la salinidad hasta que se alcanza la saturación e inicia la precipitación de halita. Algunos de estos estanques poseen tapetes microbianos con grosor de 10 cm, los cuales han sido ampliamente estudiados (Spear *et al.*, 2003).

Estos tapetes microbianos se caracterizan por mostrar variaciones fisicoquímicas pronunciadas en espacio y tiempo: el oxígeno es detectado en los primeros 2 mm durante el día, a una concentración por encima de 700 μM , mientras que durante la noche se vuelve completamente anóxico. Las capas inferiores permanentemente anóxicas se caracterizan por tener concentraciones micromolares de sulfuro que incrementan con la profundidad (Kunin *et al.*, 2008).

Los tapetes microbianos de Guerrero Negro, dominados por bacterias, han sido reportados como una de las comunidades microbianas más ricas y diversas en el mundo, y comprenden al menos 42 filas bacterianas, incluyendo a 15 filas candidatas (Kunin *et al.*, 2008; Ley *et al.*, 2006).

1.2 Los polihidroxicanoatos (PHAs)

los polihidroxicanoatos (PHAs) son macromoléculas lipídicas estructuralmente simples sintetizadas por bacterias Gram negativas y Gram positivas, y se acumulan en gránulos discretos en el citoplasma a niveles que llegan a representar hasta el 90% del peso seco celular. Se cree que poseen un papel como sumidero de carbono y equivalentes reducidos cuando la disponibilidad nutricional no se encuentra balanceada, generalmente por un exceso de carbono y la limitación de un nutriente esencial como el nitrógeno (Madison y Huisman, 1999).

Se sabe que casi todos los microorganismos de los Dominios Bacteria y Archaea son capaces de acumular al menos un tipo de compuesto lipídico por lo tanto, es probable que esta capacidad metabólica sea ventajosa en la sobrevivencia en hábitats naturales, y que su síntesis provea una ventaja durante la evolución (Wältermann *et al.*, 2005).

Al ser extraídos de las células, los PHAs muestran propiedades similares a los de los plásticos convencionales como el polipropileno, por lo que han adquirido importancia principalmente desde el punto de vista biotecnológico debido a que su origen bacteriano los convierte en materiales naturales que pueden ser degradados en la naturaleza, además de que su producción está basada en la utilización de fuentes renovables (Madison y Huisman, 1999).

1.2.1 Clasificación de los polihidroxicanoatos y enzimas involucradas en la biosíntesis

Los PHAs pueden ser categorizados en dos grupos basándose en el número de carbonos que componen a los monómeros dentro del polímero; los de cadena corta (scl-PHA) poseen monómeros que contienen de 3-5 carbonos, y los de cadena media (mcl-PHA), consisten en monómeros que poseen de 6-14 carbonos (Akaraonye *et al.*, 2010).

Dentro de la célula viva, la superficie de los gránulos de PHA (Fig. 1) es una región rodeada por proteínas involucradas en la biosíntesis, PHA sintasa codificada por el gen *phaC*, y en la movilización o/y degradación, PHA depolimerasa intracelular, codificada por el gen *phaZ*.

Además de estas, existen proteínas denominadas fasinas que se cree están involucradas en la formación y estabilización de las inclusiones de PHAs (Sudesh *et al.*, 2000).

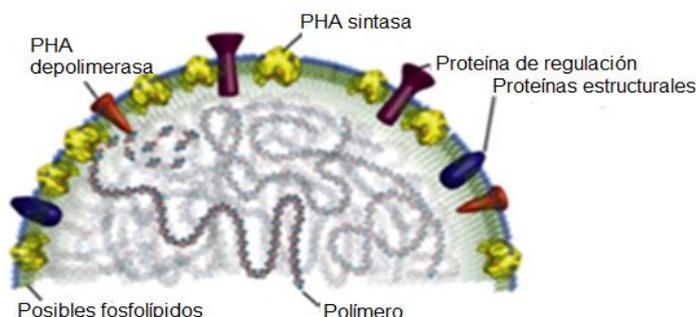


Figura 1. Estructura de los gránulos de PHA *in vivo*. Tomado y modificado de Laycock *et al.* (2014).

La enzima PHA sintasa está involucrada en la polimerización, y ha sido identificada como la enzima clave que determina el tipo de PHA sintetizado por el microorganismo. Existen cuatro tipos de PHA sintasa que pueden distinguirse de acuerdo a la especificidad de sustrato y a la estructura primaria. El primer tipo de PHA sintasa está representado por la enzima de *Ralstonia eutropha* DSM 541, e incluye a todas aquellas enzimas que son activas con monómeros de cadena corta (scl-PHA) sin embargo, recientemente se ha mostrado que la PHA sintasa de *R. eutropha* DSM 541 es capaz de incorporar pequeñas cantidades de 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxi octanoato (3HO), y 3-hidroxidodecanoato (3HDD) (Dennis *et al.*, 1998). El segundo tipo de PHA sintasas polimerizan monómeros largos de (*R*)-3HA conteniendo de 6-14 átomos de carbono. Este tipo está representado por dos PHA sintasa de *Pseudomonas* sp. 61-3 (Matsusaki *et al.*, 1998), mientras que el tercer tipo consiste en dos subunidades designadas como subunidad C (aproximadamente 40 kDa) y subunidad E (aproximadamente 40 kD), y ha sido identificada en *Chromatium vinosum* D (Liebergesell y Steinbüchel, 1992), *Thiocystis violacea* 2311 (Liebergesell y Steinbüchel, 1993), *Thiocapsa pfennigii* 911 (Liebersegel *et al.*, 1993), y *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Hein *et al.*, 1998) siendo el sustrato monómeros de cadena corta en la mayoría de los casos (Sudesh *et al.*, 2000). La cuarta clase de PHA sitasas es prevalente en organismos del género *Bacillus* y están compuestas por una subunidad catalítica PhaC (aproximadamente 40 kDa) y una

segunda subunidad PhaR (aproximadamente 20 kDa), y es generalmente considerado que este tipo de enzimas utilizan monómeros de cadena corta (Tsuge *et al.*, 2015).

1.2.2 Vías metabólicas para la síntesis de polihidroxicanoatos

Una de las especies bacterianas productoras de PHA más estudiadas es *R. eutropha*. La vía metabólica de síntesis en este organismo para producir polihidroxibutirato (PHB) consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para dar lugar a acetoacetil-CoA, reacción catalizada por la enzima β -cetotiolasa (PhaA). El producto sufre una reducción por una reductasa dependiente de NADPH (PhaB), lo cual da lugar al isómero en configuración R 3-hidroxibutiril-CoA, el cual es polimerizado por la PHA sintasa (PhaC) para dar lugar al polímero final (Fig. 2) (Sudesh *et al.*, 2000).

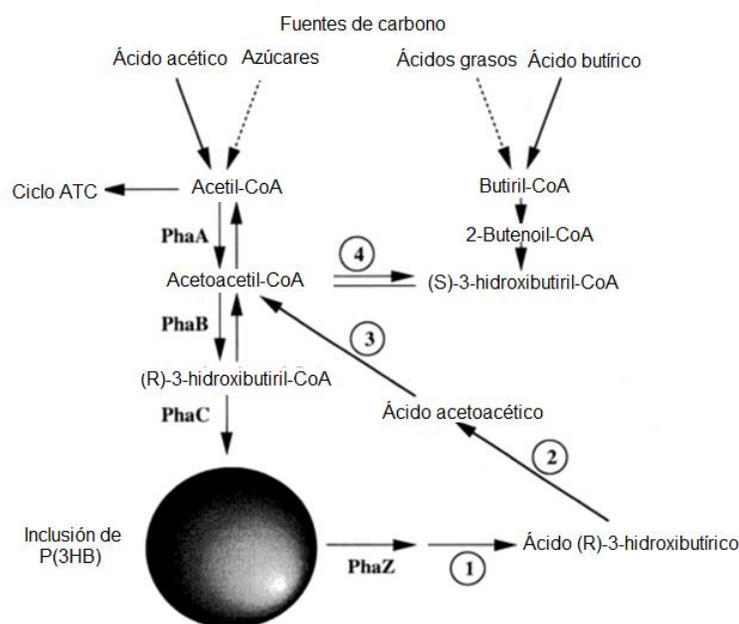


Figura 2. Vía metabólica de producción y degradación de polihidroxibutirato. Tomado y modificado de Sudesh *et al.* (2000).

Existe otro tipo de vía metabólica para la producción de PHA, que es generalmente encontrada en organismos del género *Pseudomonas*, pertenecientes al grupo I basado en homología del ARNr (Fig. 3), el cual puede sintetizar PHA de cadena media a partir de varios alcanos, alcoholes o alcanos, y ácidos orgánicos, principalmente. Las bacterias de este

grupo derivan sustratos 3-hidroxiacil-CoA de C6-C14 a partir de intermediarios de la degradación de ácidos grasos (β -oxidación) (Sudesh *et al.*, 2000).

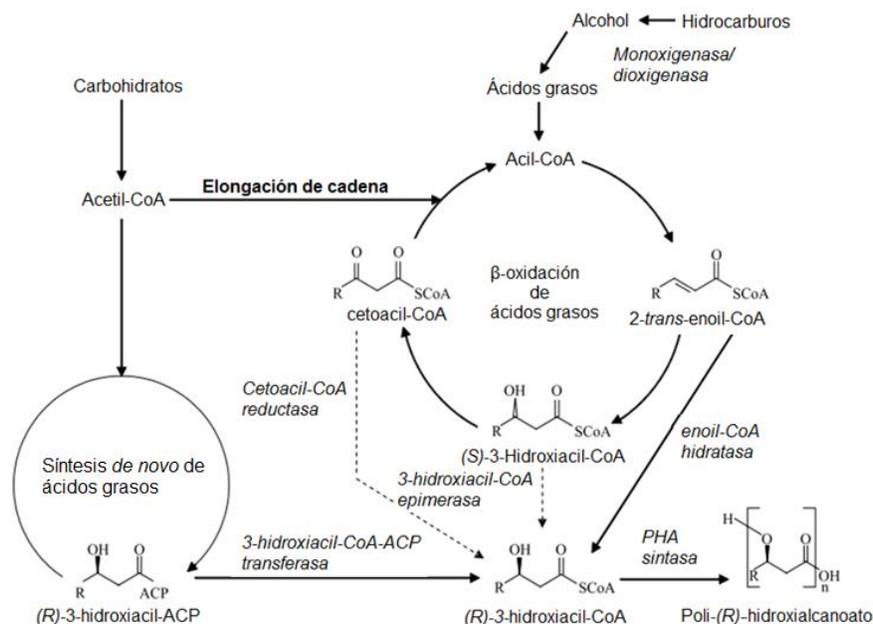


Figura 3. Vía metabólica para la producción de polihidroxiacanoatos de cadena media empleando diferentes sustratos. Tomado y modificado de Do Young *et al.* (2007).

1.2.3 Funciones de los polihidroxiacanoatos en la naturaleza

Actualmente, es sabido que la acumulación intracelular de PHAs mejora la sobrevivencia de algunas bacterias bajo condiciones de estrés en ambientes de agua y suelo, a través de las diversas funciones asociadas a los PHA (Fig. 4) (Prieto *et al.*, 2014) es decir, los PHAs proporcionan una ventaja ecológica a las bacterias que son capaces de producirlos. Bajo ciertas condiciones, bacterias de vida libre con PHAs pueden sobrevivir por más tiempo que aquellas que carecen de PHAs o poseen un bajo contenido, posiblemente porque se encuentran protegidas de condiciones adversas, o porque pueden utilizar material de reserva por más tiempo y más eficientemente (Castro-Sowinski *et al.*, 2010).

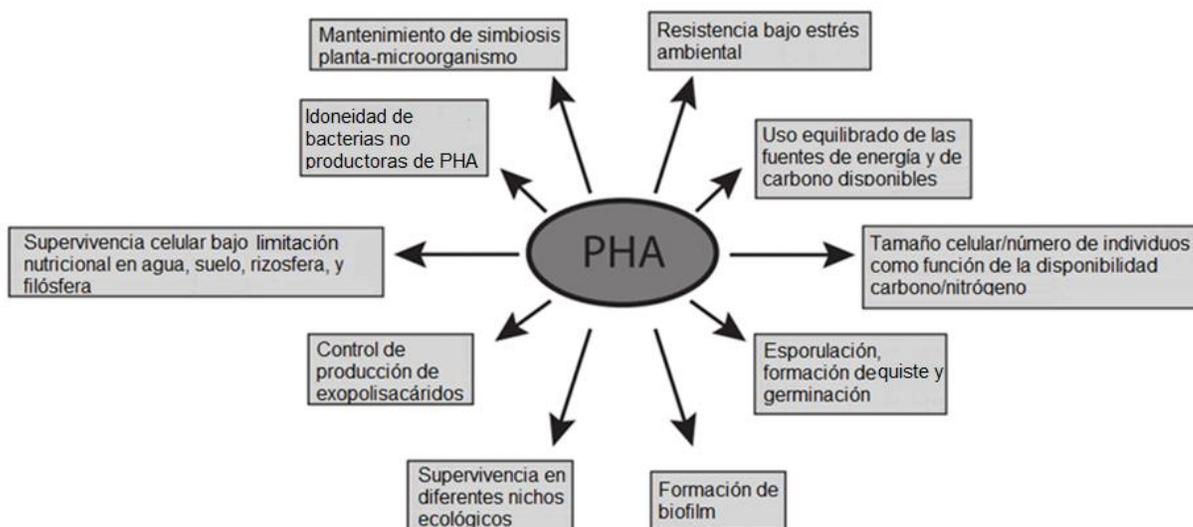


Figura 4. Diagrama que muestra algunas de las funciones de los polihidroxicanoatos en la naturaleza. Tomado y modificado de Prieto *et al.* (2014).

Además, datos de varios estudios sugieren que los PHAs participan en la respuesta al estrés, como aquel provocado por radiación UV protegiendo al DNA, e incrementa la resistencia a shock osmótico, térmico, entre otros. Además, se ha mostrado que los PHAs mantienen la actividad de enzimas como la nitrogenasa y procesos como la aerotaxis, dos actividades fisiológicas que consumen altas cantidades de energía, la figura 4 muestra otros ejemplos (Castro-Sowinski *et al.*, 2010; Ruiz *et al.*, 2004).

1.2.4 Los polihidroxicanoatos en tapetes microbianos

Se ha sugerido que la producción de PHAs en los tapetes microbianos es relevante debido a que en este tipo de ambientes los microorganismos deben sobrellevar estrés moderado químico y físico, y frecuentemente deben adaptarse a condiciones cambiantes (Castro-Sowinski *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2007).

Las bacterias heterótrofas residentes de la zona fótica de los tapetes microbianos poseen la capacidad metabólica para degradar los fotosintatos excretados por los productores primarios, así como compuestos poliméricos del carbono resultantes de su muerte. Además,

las fluctuaciones diarias características de estos ambientes promueven que los organismos heterótrofos acumulen PHAs usando como precursor el exceso de carbono generado y excretado por los organismos fotosintéticos, lo que refleja cambios en los niveles de PHAs dependiendo de la hora del día. La dinámica de producción de los polihidroxicanoatos se encuentra cercanamente relacionada al ciclo de carbono en estas comunidades (Castro-Sowinski *et al.*, 2010; Villanueva *et al.*, 2010).

En la actualidad, cepas productoras de PHAs con potencial aplicación industrial han sido aisladas de tapetes microbianos, lo que posiciona a estos ambientes como una fuente de estos microorganismos (López-Cortés *et al.*, 2008).

1.3 Producción de polihidroxicanoatos a partir de hidrocarburos como fuente de carbono

El petróleo es una mezcla extremadamente compleja de hidrocarburos (Atlas, 1981). De los cientos de componentes individuales, algunas clases pueden ser reconocidas basándose en la estructura determinada por cromatografía de sílica gel; la fracción alifática o saturada, la fracción aromática, y finalmente la fracción asfáltica o polar. Los hidrocarburos dentro de la fracción saturada incluyen *n*-alcanos, alcanos ramificados, y cicloalcanos (naftanos). De estos, los *n*-alcanos son considerados generalmente los componentes más susceptibles a la degradación (Atlas, 1981).

Los sitios contaminados con petróleo son ambientes sujetos a estrés debido a la toxicidad de sus componentes y al estrés oxidativo generado por estos compuestos, afectando incluso a la microbiota del sitio, principalmente a nivel de envolturas celulares (Fig. 5). Para su degradación se han empleado métodos convencionales que involucran la remoción, alteración, o aislamiento del contaminante, sin embargo, estas tecnologías llegan a tener un alto costo. Una alternativa es la bioremediación, una herramienta para transformar estos compuestos en sustancias menos tóxicas o carentes de toxicidad con menor gasto de químicos, energía y tiempo (Haritash y Kaushik, 2009; Heipieper y Martínez, 2010)

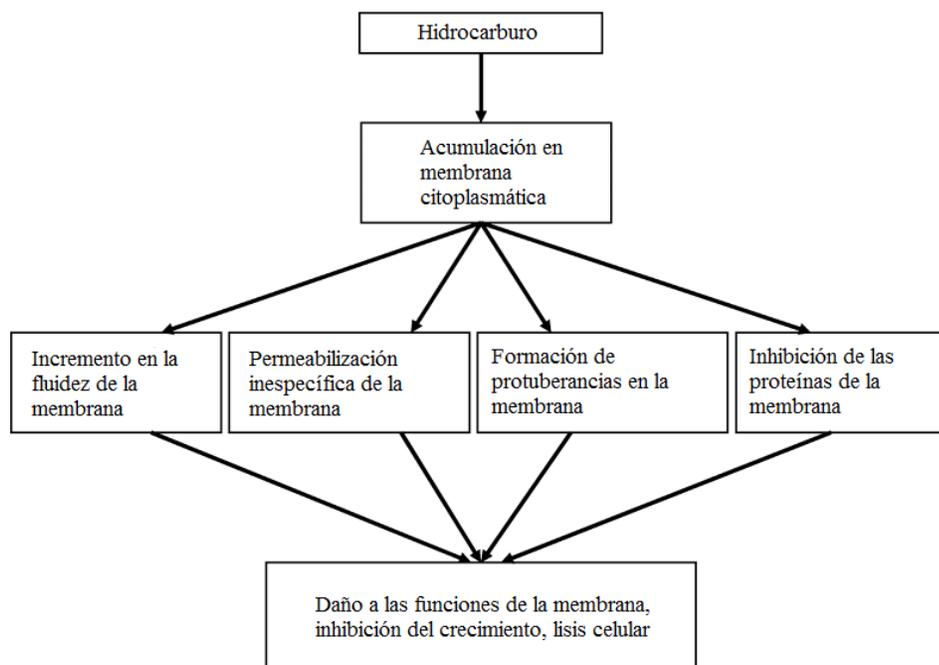


Figura 5. Esquema de los efectos tóxicos de los hidrocarburos sobre la membrana celular bacteriana. Tomado y modificado de Heipieper y Martínez (2010).

Las estrategias de biorremediación diseñadas para remover contaminantes son el empleo de organismos capaces de adaptarse al estrés que predomina en estos ambientes, por lo que la presencia de mecanismos intrínsecos como la habilidad de acumular PHAs es una característica deseable debido a que así los organismos pueden sobrellevar el estrés. Los PHAs pueden ser producidos a partir de diferentes fuentes de carbono, incluyendo algunos hidrocarburos como benceno, tolueno, y xileno, por lo que el compuesto contaminante puede ser usado para la síntesis de PHA (López *et al.*, 2015).

1.3.1 Relación metabólica entre hidrocarburos y polihidroxicarboxilatos

La vía metabólica entre hidrocarburos y polihidroxicarboxilatos se encuentra en la β -oxidación (Fig. 3), ya que la oxidación terminal de los hidrocarburos, mediada por monooxigenasas del tipo alkB (codificadas por el gen *alkB*) asociadas a la membrana celular, genera ácidos grasos que son metabolizados a través de la β -oxidación, donde se obtienen

intermediarios que son precursores metabólicos directos de PHAs, principalmente de cadena media (Sabirova, 2010; Wentzel *et al.*, 2007).

1.3.2 Diagénesis de hidrocarburos en tapetes microbianos

El registro microfósil indica que las comunidades de tapetes microbianos dominadas por cianobacterias fueron los ecosistemas más dominantes a lo largo de la historia de la Tierra. El registro geoquímico orgánico deriva de la productividad primaria de este grupo de fotótofos oxigénicos y con ello la subsecuente red de procesos microbianos secundarios y terminales. El estudio de estos tapetes laminados provee información acerca de procesos de diagénesis y preservación de esta materia orgánica (Green y Jahnke, 2010).

A excepción de las porfirinas, la mayoría de los biomarcadores, moléculas específicas de una especie u otro grupo taxonómico, derivan de lípidos provenientes de la formación e integridad de membranas citoplasmáticas microbianas, por lo que los lípidos polares complejos y las moléculas anfipáticas pueden servir como biomarcadores (Green y Jahnke, 2010).

Las membranas lipídicas se componen generalmente de una fracción polar que consiste en glicerol unida vía grupo hidroxilo *sn*-1 o *sn*-2 a una amplia variedad de compuestos con una cabeza polar. El resto de la molécula se compone por la parte hidrofóbica, que consiste en cadenas de acilos grasos (bacterias) o isoprenilos (arqueas) unidos al grupo hidroxilo a través de enlaces éster y éter, respectivamente (Green y Jahnke, 2010).

Después de la muerte celular, las lipasas empiezan inmediatamente la degradación enzimática de lípidos polares. La cabeza polar y la fracción acilo se rompen, y los ácidos grasos son liberados al ambiente donde sirven como sustratos para el crecimiento de microorganismos heterótrofos. El enlace éter es de alguna manera más estable y los isopronilgliceroles presentes en arqueas son más resistentes a la degradación microbiana (Green y Jahnke, 2010).

Las macromoléculas resistentes a procesos de degradación y sedimentación forman macromoléculas poliméricas altamente resistentes llamadas querógeno, y una pequeña

fracción de este carbono sedimentario corresponde a hidrocarburos libres (Green y Jahnke, 2010).

2. ANTECEDENTES

Estudios recientes de metatranscriptómica de tapetes microbianos termofílicos del Parque Yellowstone (EUA) sugieren que bacterias fotótrofas anoxigénicas filamentosos del tipo Chloroflexi producen y utilizan glucógeno, PHAs, y ceras de ésteres, un tipo de lípido de almacenamiento, en diferentes tiempos del ciclo dial. Este trabajo se enfocó en bacterias del filum Chloroflexi, *Chloflexus* sp. y *Roseiflexus* sp., y proponen que los PHAs, las ceras de ésteres, y los pigmentos fotosintéticos son sintetizados durante la noche empleando carbono almacenado como glucógeno, mientras que durante el día, el PHA y las ceras de ésteres son degradados y usados como fuentes de carbono y energía para llevar a cabo un metabolismo fotomixotrófico, y el glucógeno es acumulado (Klatt *et al.*, 2013; López *et al.*, 2015).

Otro análisis de transcritos de la comunidad total de un tapete microbiano encontrado en el estuario Elkhorn Slough (EUA) permitió la reconstrucción de una vía metabólica del metabolismo anóxico de fotosintetatos, polímeros resultantes de la fotosíntesis, entre la cianobacteria constructora de tapete *Microcoleus* spp. y un linaje no cultivado de *Chloroflexi*. En análisis sugirió que durante la noche, *Microcoleus* spp. fermenta a ácidos orgánicos, CO₂ e H₂, los fotosintatos producidos durante el día como resultado del proceso fotosintético, mientras que Chloroflexi utiliza dichos compuestos para almacenar carbono como polihidroxialcanoatos (Burow *et al.*, 2013).

Un estudio de la composición biológica de un tapete microbiano mesohalino del Golfo Árabe a través del uso de microscopía y biomarcadores mostró que la capa superior, dominada por Cianobacterias, tuvo altas concentraciones de *n*-heptadecano, y una predominancia del alqueno *n*-eicoseno en todas las capas. Además, se encontró un incremento en la abundancia y concentración de *n*-alcanos con la profundidad, lo que sugiere la formación de hidrocarburos en las primeras etapas de la diagénesis (Slowakiewicz y Pancost, 2014).

Además del proceso de diagénesis de hidrocarburos a partir del aumento en complejidad de moléculas resistentes a la degradación, otra posible fuente de hidrocarburos en tapetes microbianos podrían ser las Cianobacterias, debido a que han sido reconocidas como potencial fuente de hidrocarburos de cadena larga, y han sido estudiadas en el contexto de la identificación del origen de los hidrocarburos encontrados en depósitos tanto sedimentarios como de petróleo (Coates *et al.*, 2014).

Otros autores han estudiado, mediante estrategias dependientes e independientes de cultivo, la diversidad bacteriana de un tapete microbiano béntico desarrollado en un sitio altamente contaminado con petróleo en Wadi, Gaza, y los cambios de la composición microbiana al exponer al tapete a compuestos modelo del petróleo, concluyendo que los tapetes microbianos del sitio son ricos en microorganismos con un alto potencial de biodegradación (Raeid *et al.*, 2002).

3. JUSTIFICACIÓN

La inesperada diversidad microbiana recientemente descubierta en tapetes microbianos laminados de Guerrero Negro, la mayoría desconocida, supone un potencial en términos de biotecnología, ya que pudiera significar una posibilidad de encontrar nuevos microorganismos con propiedades favorables para la producción de polihidroxicanoatos.

El posible papel de los PHAs en el ciclo del carbono de los tapetes microbianos y en la sobrevivencia bajo condiciones de estrés ambiental, sugiere la búsqueda de los potenciales participantes en este metabolismo en los tapetes microbianos de Guerrero Negro.

4. HIPÓTESIS

- a. Los tapetes microbianos laminados de Guerrero Negro han sido descritos como ecosistemas altamente diversos y productivos, que se encuentran sujetos a estrés ambiental, por lo que esperaríamos encontrar organismos productores y con el potencial genómico de producir polihidroxicanoatos.
- b. Sí, en bacterias heterótrofas aerobias existe una conexión metabólica entre la capacidad de degradar hidrocarburos y síntesis de PHA, entonces esperaríamos encontrar microorganismos que presenten ambos metabolismos en enriquecimientos de tapete microbiano retados con *n*-hexadecano.

5. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la diversidad de bacterias heterótrofas aerobias cultivables, y no cultivables del Dominio Bacteria potenciales productores de polihidroxicanoatos, y degradadores de *n*-hexadecano en tapetes microbianos de dos áreas de concentración de ESSA en Guerrero Negro, con diferente salinidad.

5.1 Objetivos específicos

1. Obtención de un cepario de bacterias heterótrofas aerobias capaces de producir polihidroxicanoatos.
2. Contribuir al conocimiento de la diversidad de bacterias potenciales productoras de polihidroxicanoatos de los tapetes microbianos analizados empleando el gen *phaC* como marcador molecular.
3. Estimar el número de copias del gen *phaC* a ADN ambiental de los tapetes microbianos estudiados.
4. Evaluar la presencia de bacterias heterótrofas aerobias degradadoras de hidrocarburos lineales y productoras de PHA en los tapetes microbianos analizados.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción del área de estudio

El objeto de estudio fueron los tapetes microbianos laminados que se localizan en el bentos del área 1 (ESSA A1) y área 4 (ESSA A4) de la empresa Exportadora de Sal S.A. de C.V. (ESSA) ubicada en Guerrero Negro, Baja California Sur, México (Tabla I).

La salina Exportadora de Sal en Guerrero Negro cubre un área de 300 km², donde el agua es bombeada de la laguna moderadamente hipersalina Ojo de Liebre a través de una serie de estanques interconectados que poseen un gradiente químico de salinidad, donde se desarrollan tapetes microbianos caracterizados por presentar estratificación macroscópica y que se componen de microorganismos embebidos en polímeros extracelulares y materiales mineralizados (Dillon *et al.*, 2013; Ley *et al.*, 2006).

6.2 Obtención de muestras

Para el análisis de ácidos nucleicos se tomaron núcleos de tapete microbiano de 1 cm de profundidad y 3 mm de diámetro y se embebieron en Life Guard Soil Preservation Solution (Mo Bio Laboratories, EUA), mientras que para los aislamientos bacterianos se extrajeron piezas de tapete microbiano con ayuda de una espátula y se secaron a temperatura ambiente. Adicionalmente se midieron parámetros fisicoquímicos de pH, temperatura, y salinidad de la columna de agua (Tabla I).

Tabla I. Características fisicoquímicas de la columna de agua de los sitios estudiados.

Sitio	Geoposición	Salinidad (ppt)	pH	Temperatura (°C)
ESSA A1	27°36.01'N 113°53.46'O	63	7.9	28.3
ESSA A4	27°41.41'N 113°55.19'O	85	7.6	20.8

6.3 Objetivo 1. Obtención de un cepario de organismos productores de polihidroxicanoatos.

6.3.1 Primoaislamiento

El aislamiento de bacterias heterótrofas aerobias se llevó a cabo homogenizando 0.1 g de tapete microbiano en 900 μL de 1/2X de agua de mar sintética (1/2X ASW) compuesta de (gL^{-1}): NaCl 11.675, KCl 0.75, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.35, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.45, Tris-HCl buffer 1.0 M pH 7.5 (modificado de Baumann y Baumann, 1981). Se tomaron 100 μL de la suspensión celular para llevar a cabo diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-9} . Un inóculo de cada dilución fue plaqueado por duplicado en cuatro diferentes medios de cultivo: (1) agar marino 2216 (Difco®), (2) *Pseudomonas* agar F (Difco®) disuelto en 1/2X SSW con glicerol al 1% como fuente de carbono, (3) YEA glucosa 1% compuesto de (gL^{-1}): NH_4Cl 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.076, extracto de levadura 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.028, glucosa 10, y agar 14, disuelto en 1/2X SSW y (4) YEA acetato 1% compuesto de (gL^{-1}): NH_4Cl 0.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.076, extracto de levadura 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.028, acetato 10, y agar 14, disuelto en 1/2X SSW.

Los cultivos se incubaron a 30°C y se monitorearon cada 24 horas (hasta las 72 horas) para valorar el crecimiento de colonias, donde se procedió a la caracterización celular para seleccionar cepas con inclusiones citoplasmáticas refringentes (ICRs) detectadas a través de microscopio de contraste de fases (1000x) y tinciones lipofílicas Negro Sudan y Rojo Nilo. Las cepas seleccionadas se respaldaron en tubo inclinado con el medio de cultivo de aislamiento. Se realizó tinción Gram en los cultivos con 72 horas de edad.

6.3.2 Tinción Negro Sudan

Las muestras se fijaron al calor en un portaobjetos y se cubrieron con solución Negro Sudan al 0.3% durante 10 minutos, se drenó y se secó con papel filtro Whatman ® No. 1, clarificando con gotas de xileno para después secar nuevamente y contrastar por 20 segundos con safranina acuosa. La muestra se observó en campo claro (Microscopio Nikon 80i, Eclipse, Japón).

6.3.3 Tinción Rojo Nilo

El pellet de células se expuso a 10 µL de solución de Rojo Nilo en acetona (1:1), la mezcla se dejó reposar durante 10 minutos, y se permitió el secado de la acetona a temperatura ambiente. Las células teñidas se resuspendieron en ASW 1X y se observaron en epifluorescencia a 480 nm (Microscopio Nikon 80i, Eclipse, Japón).

6.3.4 Asignación taxonómica mediante secuencias parciales del gen 16S ARNr

Los cultivos puros se sometieron a extracción de ADN genómico usando el kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, EUA), siguiendo el protocolo para bacterias Gram negativas. La concentración y pureza del ADN extraído se determinó con un NanoDrop™ Lite (Thermo Fisher Scientific, EUA), donde se obtuvo la absorbancia de ácidos nucleicos (Abs_{260}) y el cociente de la absorbancia de ácidos nucleicos y proteínas (Abs_{260}/Abs_{280}), mientras que la integridad del ADN se verificó en un gel de agarosa al 1% y se tiñó con una solución de NaCl con Gel Red (0.015%).

6.3.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación del gen 16S rRNA se llevó a cabo un PCR usando los oligonucleótidos BAC8F: 5'AGTGTTTGATCCTGGCTCAG'3 y BAC1492R: 5'CGGCTACTTTGTTACGACTT 3' (Teske *et al.*, 2002). Cada reacción de PCR contenía los siguientes constituyentes: 6.5 µL de agua grado biología molecular de Sigma®, 2.5 µL de solución de cada primer [10 µM], 12.5 µL de GoTaq Master Mix (Promega M7122, Madiscon, WI, EUA) y 1 µL de ADN template. Se utilizó un termociclador Gene Cyclor™ de Biorad (EUA), el protocolo térmico puede ser consultado en el apartado de anexos (anexo A). Los productos de PCR obtenidos fueron visualizados en gel de agarosa y teñidos con solución de NaCl con Gel Red (0.015%) para verificar su tamaño, y se precipitaron con acetato de amonio ($C_2H_3O_2NH_4$) y etanol absoluto (C_2H_6O) para ser enviados a secuenciar en ambas direcciones a la empresa Genewiz (EUA).

6.3.4.2 Análisis de secuencias parciales del gen 16S ARNr

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa ChromasPro versión 1.5 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>), donde se utilizaron los fenogramas para verificar la calidad de las secuencias, y con base en ello editarlas, para posteriormente hacer uso del algoritmo BLAST en la base de datos de nucleótidos de NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

6.3.5 Amplificación del gen *phaC* de las cepas aisladas

El gen *phaC* fue amplificado mediante PCR usando dos parejas de oligonucleótidos; una de ellas para bacterias Gram negativas (PHACGNF: 5' CCYRGATCAACAAGTTCTAC 3' y PHACGNR: 5' TTCCAGAACAGMAGGTCGAAGG 3') (López-Cortés *et al.*, 2010) y otra para bacterias Gram positivas: (PHACGPF1: 5' GGTTTTGAYGTGTATWTGCTTG 3' y PHACGPR1: 5' GGC AKSGCRATATGATCACG 3'). En ambos casos cada reacción de PCR contenía los siguientes constituyentes: 6.5 µL de agua grado biología molecular de Sigma®, 2.5 µL de solución de cada primer [10 µM], 12.5 µL de GoTaq Master Mix (Promega M7122, Madiscon, WI, USA) y 1 µL de ADN template. Se usó un termociclador Gene Cycler™ de Biorad (EUA). Los protocolos de amplificación pueden ser consultados en el apartado de anexos (anexo B y C, respectivamente). Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1% y teñidos con una solución de NaCl con Gel Red (0.015%), y se precipitaron con C₂H₃O₂NH₄ y etanol para ser enviados a secuenciar en ambas direcciones a la empresa Genewiz (EUA).

6.3.5.1 Análisis de secuencias parciales del gen *phaC*

Se usó el programa ChromasPro versión 1.5 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>) para editar las secuencias con base en la calidad mostrada en los fenogramas. Además, se buscaron los marcos de lectura abiertos de cada secuencia para posteriormente traducir a aminoácidos. Las secuencias de proteínas se sometieron al algoritmo BLAST en la base de datos de nucleótidos de NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

6.4 Objetivo 2. Diversidad de bacterias potencialmente productoras polihidroxicanoatos en tapetes microbianos de Guerrero Negro

6.4.1 Diseño de oligonucleótidos para la detección del gen *phaC1* de bacterias del género *Pseudomonas*

Se realizó un alineamiento múltiple usando secuencias de la base de datos de NCBI del *phaC1* de diferentes especies y cepas del género *Pseudomonas*, ubicando zonas conservadas para el diseño de oligonucleótidos degenerados por su alta variabilidad. Los oligonucleótidos generados se valoraron de forma teórica (%GC menor a 60% y temperatura de alineamiento menor a 65°C). Se obtuvieron 3 parejas de oligonucleótidos: pareja 1: phaC1F1 3' TGGARCTGATCCAGTAC 5' y phaC1R1 3' CGGGTTGAGRATGCTCTG 5', pareja 2: phaC1F2 3' SATCAACCTGATGACCGA 5' y phaC1R2 3' TGGTGTTCGTTGTTCCAG 5', y pareja 3: phaC1F2: 3' SATCAACCTGATGACCGA 5' y phaC1R3 5' AGCAGGTAGTTGTTGAC 3'. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa IDT technologies (EUA). Su ubicación dentro del *phaC1* de *Pseudomonas* puede ser consultada en los anexos (anexo D).

Adicionalmente, los oligonucleótidos fueron evaluados experimentalmente usando ADN de *Pseudomonas putida* cepa KT2440. Para determinar la temperatura óptima de alineamiento se utilizó PCR de gradiente de temperatura, y de concentración de MgCl₂. La mezcla de reacción contenía cantidades variables de MgCl₂ [25 mM] para obtener concentraciones finales de 1.5, 2, y 2.5 mM, 2.5 µL de solución de cada primer [10 µM], 12.5 µL de GoTaq Master Mix (Promega M7122, Madiscon, WI, USA), 1 µL de ADN template, y la cantidad de agua grado biología molecular de Sigma® suficiente para alcanzar un volumen final de 25 µL. El equipo usado fue un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler de Applied Biosystems (USA). El protocolo térmico empleado puede ser consultado en el apartado de anexos (anexo E).

Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa al 1% mediante su tinción con una solución de NaCl y Gel Red (0.015%), se precipitaron con C₂H₃O₂NH₄ y etanol, y fueron enviados a secuenciar en ambas direcciones a la empresa Genewiz (EUA).

6.4.1.1 Análisis de identidad de las secuencias parciales del gen *phaC1* de *Pseudomonas putida*

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa ChromasPro versión 1.5 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>), donde se llevó a cabo la edición de calidad basada en los fenogramas, para posteriormente hacer uso del algoritmo BLAST en la base de datos de nucleótidos de NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

6.4.2 Extracción de ADN ambiental de los tapetes microbianos analizados

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir de 0.1 g de muestra de la parte superficial de los tapetes microbianos, empleando el Kit comercial Power Biofilm DNA Isolation Kit 24000-50 (Mo BioLaboratories, Carlsbad CA, EUA), y siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído se determinaron en un NanoDrop™ Lite Thermo Fisher Scientific (EUA), donde se detectó la absorbancia de ácidos nucleicos (Abs₂₆₀) y el cociente de la absorbancia de ácidos nucleicos y proteínas (Abs₂₆₀/Abs₂₈₀), mientras que la integridad del ADN se visualizó en un gel de agarosa al 1% a través de su tinción con una solución de NaCl con Gel Red al 0.015%.

6.4.3 Amplificación del gen *phaC* a partir de ADN ambiental

El ADN extraído fue sometido a PCR empleando oligonucleótidos específicos para la detección del *phaC* de bacterias Gram negativas, PHACGNF: 5' CCYRGATCAACAAGTTCTAC 3' y PHACGNR: 5' TTCCAGAACAGMAGGTCGAAGG 3' (López-Cortés *et al.*, 2010). La mezcla de reacción consistió en 6.5 µL de agua grado biología molecular Sigma®, 2.5 µL de solución de cada primer [10 µM], 12.5 µL de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA) y 1 µL de ADN template. El equipo utilizado fue un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler de Applied Biosystems (EUA), el protocolo térmico puede ser consultado en el apartado de apéndices (anexo B).

6.4.4 PCR anidado del gen *phaC1* a partir de DNA ambiental

6.4.4.1 Ronda 1

Para eficientizar la reacción de amplificación del gen *phaC1*, se llevó a cabo una PCR anidada. En la primera ronda se empleó la pareja de oligonucleótidos: phaC1F2 3' SATCAACCTGATGACCGA 5' y phaC1R1 3' CGGGTTGAGRATGCTCTG 5' (anexo D) con el objetivo de obtener un producto de 1090 pb. Cada mezcla de reacción se compuso de 6.5 µL de agua grado biología molecular (Sigma®), 2.5 µL de solución de cada primer [10 µM], 12.5 µL de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA) y 1 µL de ADN template. El protocolo térmico usado puede consultarse en la sección de anexos (anexo F). El equipo usado fue un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler de Applied Biosystems (EUA). Los productos de PCR fueron teñidos con una solución de NaCl y Gel Red al 0.015% y visualizados en gel de agarosa al 1%.

6.4.4.2 Purificación de productos de PCR a partir de gel de agarosa

La primera ronda de PCR generó productos de distinto tamaño, por lo que fue necesario aislar la banda de interés (de acuerdo al tamaño esperado y basándose en la migración del control positivo) y purificarla a partir de agarosa al 1%. Para ello se utilizó el kit MPbio GeneClean® Turbo Kit, y se siguió el protocolo del fabricante. El ADN purificado fue cuantificado y visualizado en gel de agarosa para confirmar la presencia de una banda única.

6.4.4.3 Ronda 2

Los productos de PCR previamente purificados fueron empleados como template de una segunda ronda que resultó en un producto de 600 pb. Los oligonucleótidos empleados fueron: phaC1F1 3' TGGARCTGATCCAGTAC 5' y phaC1R2 3' TGGTGTCGTTGTTCCAG 5' (Anexo G). Los componentes de cada mezcla de reacción fueron 6.5 µL de agua grado biología molecular de Sigma®, 2.5 µL de solución de cada primer [10 µM], 12.5 µL de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA) y 1 µL de ADN template. El protocolo térmico usado puede ser consultado en anexos (anexo G). Se usó un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler de Applied Biosystems. Los productos

de PCR fueron teñidos con solución de NaCl y Gel Red al 0.015% y visualizados en gel de agarosa al 1%.

6.4.5 Separación de productos de PCR por clonación.

6.4.5.1 Reacción de ligación de productos de PCR de los genes *phaC* y *phaC1*

Se usó el kit CloneJET PCR cloning kit (Thermo Scientific, EUA) con el vector pJET1.2/blunt. La mezcla de clonación contenía lo siguiente: 10 μL de buffer de reacción 2x, 1 μL de productos de PCR ($25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), 6 μL de agua libre de nucleasas, y 1 μL de la enzima blunting DNA. La mezcla se incubó a 70°C por 5 minutos, se enfrió en hielo y se agregaron el resto de los constituyentes: 1 μL del vector pJET1.2 ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) y 1 μL de DNA ligasa T4. La mezcla de ligación se incubó a 22°C durante 5 minutos y se almacenó a -20°C .

Para determinar si la ligación se llevó a cabo exitosamente se llevó a cabo PCR usando los siguientes constituyentes: 9.98 μL de agua grado biología molecular, 12.5 μL de Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA), 0.26 μL de cada primer del vector, y 2 μL de reacción de ligación. El protocolo térmico puede ser consultado en el apartado de anexos (anexo H).

6.4.5.2 Reacción de transformación

Se añadieron 4 μL de reacción de ligación a un vial con células químicamente competentes. La mezcla se incubó en hielo por 15 minutos, se colocó a 42°C por 30 segundos en baño María, para después transferirla a hielo. Se adicionaron 700 μL de medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) a temperatura ambiente. Seguidamente, los tubos se incubaron horizontalmente a 200 rpm y 37°C durante una hora. La suspensión celular se utilizó para inocular cajas con LB y ampicilina ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) con dos volúmenes: 100 y 50 μL , y se incubó a 37°C durante toda la noche.

Tras 16 horas de incubación, se seleccionaron colonias discretas al azar para posterior secuenciación.

6.4.5.3 Extracción de ADN plasmídico de clones

Los clones seleccionados fueron inoculados individualmente en tubos con 5 mL de medio de cultivo LB suplementado con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, y se incubaron durante 16 horas a 37°C y 150 rpm. La biomasa fue cosechada a $21000 g$ durante un minuto, y el botón celular se resuspendió en $200 \mu\text{L}$ de solución I (Tris 50 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM). Se agregaron $200 \mu\text{L}$ de solución II (hidróxido de sodio 200 mM con 1% de SDS) y $200 \mu\text{L}$ de solución III (Acetato de potasio al 3 M pH 5.5). Se centrifugó a $21000 g/10 \text{ min}/4^\circ\text{C}$ y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, al cual se adicionaron $700 \mu\text{L}$ de etanol puro frío, se centrifugó a $21000 g/20 \text{ min}/4^\circ\text{C}$, y se realizó un lavado final con etanol al 70% para finalmente resuspender el botón de ADN en agua grado biología molecular (Sigma ®).

El ADN plasmídico fue teñido directamente con Gel Red y visualizado el gel de agarosa al 1%.

6.4.5.4 PCR del vector pJET 1.2 con el inserto de interés

El ADN plasmídico de cada clon fue sometido a PCR empleando oligonucleótidos que flanquean la zona de inserción del fragmento de interés, la secuencia es la siguiente: pJET forward: 5' CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3' y pJET reverse: 5' AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG 3'. La mezcla de reacción consistió en $9.5 \mu\text{L}$ de agua grado biología molecular (Sigma ®), $12.5 \mu\text{L}$ de Go Taq Master Mix (Promega, EUA), $1 \mu\text{L}$ de solución de cada primer [$10 \mu\text{M}$], y $1 \mu\text{L}$ de DNA diluído 1:20. El protocolo térmico puede ser consultado en el apartado de anexos (anexo H). El equipo usado fue un termociclador Veriti 96 well Thermal Cycler de Applied Biosystems (EUA). Los productos de PCR fueron teñidos directamente con Gel Red y visualizados en gel de agarosa al 1%

Los productos de PCR que mostraron el tamaño esperado fueron precipitados con $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{NH}_4$ y etanol, y fueron enviados a secuenciar en una dirección a la empresa Genewiz (EUA).

6.4.5.5 Análisis de secuencias de clones

Se utilizó el programa ChromasPro versión 1.5 (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>) para la edición de secuencias que consistió en identificar y cortar los nucleótidos correspondientes al vector, y ambigüedades. También se buscaron marcos de lectura abiertos y las secuencias nucleotídicas se tradujeron a aminoácidos para posteriormente ser sometidas al algoritmo BLAST en la base de datos de proteínas de NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Las secuencias que no tuvieron coincidencias con secuencias de la base de datos fueron descartadas en el análisis filogenético.

6.4.6 Análisis filogenético de secuencias parciales en los genes *phaC* y *phaC1*

Las secuencias de aminoácidos inferidas a partir de nucleótidos de los genes *phaC* y *phaC1*, así como secuencias de aminoácidos de las cuatro clases de PHA sintasas de organismos productores de PHA previamente reportados en la base de datos NCBI, fueron alineadas con el algoritmo Clustal Omega (Sievers *et al.*, 2011) en el programa SeaView versión 4.6.2 (Galtier y Gautier, 1996; Gouy y Gascuel, 2010).

El alineamiento fue exportado al programa MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013), donde se hizo la búsqueda del modelo evolutivo que mejor explicara los datos, y se realizó un análisis filogenético usando el método de Máxima Verosimilitud (MV) con 1000 re-muestras.

6.5 Objetivo 3. Estimar el número de copias del gen *phaC* en ADN ambiental de tapetes microbianos

6.5.1 qPCR del gen *phaC2* de *Pseudomonas putida* empleando ADN ambiental

Los oligonucleótidos utilizados son específicos para el *phaC2* de la especie *P. putida* y flanquean un fragmento de 120 pb. La secuencia es la siguiente. F: 5'-ATGAGCAGACCATCG-3' y R: 5'-GTTTACCCAGTAGTTCC-3' (Wang y Nomura, 2010).

El DNA problema previamente extraído de ESSA A1 y ESSA A4 fue cuantificado mediante QUBIT 3.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA) y diluido hasta alcanzar una concentración de $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Se realizó una curva estándar empleando DNA de *P. putida* cepa KT2440 diluido desde 12.2 hasta $0.061 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Los componentes de cada reacción fueron los siguientes: $4.25 \mu\text{L}$ de agua grado biología molecular, $6.25 \mu\text{L}$ de SYBR® Green master mix (QIAGEN, Alemania), $0.5 \mu\text{L}$ de solución de cada primer [10 mM], y $1 \mu\text{L}$ de DNA. El protocolo térmico puede ser consultado en el apartado de anexos (anexo I). Se corrió una curva de disociación que consistió en 95°C por 1 minuto, con un aumento en la temperatura de $55\text{-}95^\circ\text{C}$ con aumentos de 0.5°C por ciclo. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Rotor-gene Q (QIAGEN, Alemania).

6.6 Objetivo 4. Evaluar la presencia de bacterias heterótrofas aerobias degradadoras de hidrocarburos lineales y productoras de polihidroxicanoatos

6.6.1 qPCR del gen *alkB* empleando ADN ambiental

El gen *alk*, que codifica para una monooxigenasa involucrada en la degradación de alcanos lineales, fue amplificado a partir de muestras naturales. Los oligonucleótidos utilizados flanquean un fragmento de 118 pb. La secuencia es la siguiente. F: 5'-AAC TAC MTC GAR CAY TAC GG-30 y R: 5'-TGA MGA TGT GGT YRC TGT TCC-30 (Powell *et al.*, 2006).

El ADN previamente extraído de los tapetes microbianos se diluyó hasta alcanzar una concentración de $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Se realizó una curva estándar empleando un ADN de plásmido con el fragmento del gen de interés con concentraciones desde $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ hasta $0.0001 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Los componentes de cada reacción fueron los siguientes: $4.25 \mu\text{L}$ de agua grado biología molecular, $6.25 \mu\text{L}$ de SYBR® Green master mix (QIAGEN, Alemania), $0.5 \mu\text{L}$ de solución de cada primer [10 mM], y $1 \mu\text{L}$ de DNA. El protocolo térmico puede ser consultado en el apartado de anexos (anexo J). Posterior a la corrida de qPCR, se buscó la presencia de dímeros a través de una curva de disociación que consistió en 95°C por 1 minuto, con

aumento en la temperatura de 45-95°C e incrementos de 1°C por ciclo. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo Rotor-gene (QIAGEN, Alemania).

6.6.2 Enriquecimiento de bacterias degradadoras de *n*-hexadecano y productoras de polihidroxicanoatos

Aproximadamente 0.1 g de tapete microbiano de los primeros 2 mm provenientes de los sitios ESSA A1 y ESSA A4 fueron inoculados en matraces de 250 mL con 25 mL de medio de cultivo MBM+16C+ElTr (modificado de Baumann y Baumann, 1981) el cual consistió en (g L⁻¹): NaCl 11.68, KCl 0.74, MgSO₂·7H₂O 12.34, CaCl₂·2H₂O 1.44, Tris HCl buffer (1.0 M, pH 7.5) 50 mL, NH₄Cl 0.5, K₂HPO₄·3H₂O 76 mg, FeSO₄·7H₂O 28 mg, y 1 mL de solución de elementos traza, y 14.8 g l⁻¹ de *n*-hexadecano como fuente de carbono. Se incubó a 30°C y 150 rpm.

Después de una semana de incubación, se tomaron 2 mL de cultivo y se inocularon en 8 mL de medio de cultivo MBM+16C+ElTr fresco, incubando a 30°C y 150 rpm. Tras 74 horas de cultivo se observó turbidez sugestiva de crecimiento microbiano y se tomaron 50 µL de cultivo para inocular cajas Petri con medio MBM+16C+ElTr sólido con el objetivo de llevar a cabo el aislamiento.

Los criterios de selección de organismos fueron la presencia de inclusiones citoplasmáticas refringentes sugestivas a PHA y la tinción lipofílica rojo nilo, así como detección del *phaC* (protocolo de amplificación previamente descrito).

6.6.3 Cinética de crecimiento poblacional del consorcio 2 empleando *n*-hexadecano como fuente de carbono

Los cultivos del consorcio elegido se desarrollaron en matraces de 500 mL de capacidad con 180 mL de medio de cultivo MBM+16C (g L⁻¹): NaCl 11.68, KCl 0.74, MgSO₂·7H₂O 12.34, CaCl₂·2H₂O 1.44, Tris HCl buffer (1.0 M, pH 7.5) 50 mL, NH₄Cl 0.5, K₂HPO₄·3H₂O 76 mg, FeSO₄·7H₂O 28 mg, y 14.8 g l⁻¹ de hexadecano (modificado de Baumann y Baumann, 1981), y volumen de inóculo de 5.5% (v/v) con edad de 48 horas, el cual fue generado bajo las

mismas condiciones. El experimento se llevó a cabo por triplicado empleando condiciones de cultivo de 150 rpm y 34°C.

El crecimiento poblacional fue monitoreado midiendo la densidad óptica a 660 nm en un espectrofotómetro uv-vis SHIMADZU UV-1800 (Kyoto, Japón), desde las cero horas hasta las 48 horas, realizando mediciones cada ocho horas.

6.6.3.1 Elaboración de curva estándar para cuantificación de *n*-hexadecano

Se elaboró una curva estándar de *n*-hexadecano por triplicado, con concentraciones de 0.2, 0.33, 0.6, 0.86, 1 y 1.6 g L⁻¹, empleando *n*-hexano como diluyente. Las muestras fueron corridas en un sistema de cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A (Alemania), equipado con una columna capilar HP-5 (5% fenil-metilpolisiloxano) (longitud 30 m, diámetro 0.320 mm, grosor de película 0.25 µm) y un detector de ionización de llama (FID), usando una temperatura de 300°C y nitrógeno como gas acarreador.

El programa de corrida consistió en una rampa de temperatura iniciando a 60°C y terminando en 280°C, el volumen de inyección fue de 1.6 µL con un tiempo de corrida de 14.5 minutos.

Se graficó la concentración de *n*-hexadecano conocida contra el área del pico correspondiente, y se aplicó regresión lineal simple para después despejar Y de la ecuación de la curva (anexo K).

6.6.3.2 Cinética de consumo de *n*-hexadecano por consorcio 2

Se llevó a cabo una cinética de crecimiento en tubos de 20 mL, reproduciendo las condiciones de cultivo de la cinética de crecimiento en matraz con el objetivo de tener muestras sacrificables.

Seguidamente, el *n*-hexadecano se separó de los cultivos mediante extracción líquido-líquido con diclorometano (1:1) en los tiempos establecidos en la cinética de crecimiento. La fase

orgánica de cada muestra fue diluida 1:10 con *n*-hexano. Las condiciones de corrida en el cromatógrafo de gases fueron las usadas en la curva estándar.

6.6.3.3 Detección de inclusiones citoplasmáticas sugestivas a polihidroxicanoatos por microscopía

Las células fueron teñidas con Rojo Nilo y observadas en un microscopio de epifluorescencia Leica DM2500 (Alemania) a las 0, 24, y 48 horas de incubación.

6.6.3.4 Extracción de DNA genómico

Se extrajo DNA genómico a las 0, 24 y 48 horas de cultivo con el kit DNeasy Blood and Tissue, QIAGEN (Alemania), usando el protocolo para bacterias Gram negativas. El ADN se tiñó directamente con Gel Red y se visualizó en gel de agarosa al 1%. La cuantificación se realizó a través del equipo Qubit 3.0 (Thermo Scientific, EUA).

6.6.3.5 Cuantificación del gen *alkB* en cinética de crecimiento del consorcio 2

La detección del gen *alkB* se llevó a cabo con los oligonucleótidos reportados por Powell *et al.* (2006), el protocolo térmico puede ser consultado en el apartado de anexos (anexo J). La curva estándar fue elaborada empleado como positivo ADN plasmídico cuyo inserto fue el fragmento de interés, y se diluyó hasta alcanzar concentraciones de 10 ng μL^{-1} hasta 0.0001 ng μL^{-1} .

El DNA extraído a partir de biomasa del consorcio 2 fue diluido hasta obtener una concentración de 3 ng μL^{-1} . La mezcla de reacción consistió en 4.25 μL de agua grado biología molecular, 6.25 μL de SYBR® Green master mix (QIAGEN, Alemania), 0.5 μL de solución de cada primer [10 mM], y 1 μL de DNA extraído a las 0, 24, y 48 horas de incubación. Se corrió una curva de disociación que consistió en 95°C por 1 minuto, con incremento gradual en la temperatura de 45-95°C con aumentos de 1°C por ciclo. El equipo usado fue un Rotor-gene Q (QIAGEN, Alemania).

6.7 Análisis estadístico de datos de cinética de crecimiento, degradación de HC, y qPCR

Los datos que resultaron de los experimentos de qPCR, y cinéticas de crecimiento y degradación de *n*-hexadecano por el consorcio 2 fueron analizados en el programa R Studio versión 1.0.136 (Rstudio team, 2015, <https://www.r-project.org/>), donde se sometieron a las pruebas *a priori* Shapiro-Wilk para determinar si los datos presentaban una distribución normal, y Fligner para probar homogeneidad de varianzas. Seguidamente se aplicó un análisis de varianza para ver el efecto de la variable independiente, y de ser necesaria una prueba *a posteriori* Tukey con el objetivo de establecer grupos homogéneos.

Las gráficas presentadas fueron generadas en el programa Sigmaplot versión 10.0 (Systat Software, San José, CA, EUA).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización fenotípica de cepas aisladas capaces de producir polihidroxicanoatos

Los medios de cultivo agar marino 2216®, YEA suplementado con glucosa o acetato como fuentes de carbono, y *Pseudomonas* agar F con glicerol como sustrato, permitieron la recuperación de 55 morfotipos coloniales discretos que fueron evaluados para detectar la producción de PHAs. Seis de las cepas caracterizadas fueron positivas para dos o tres de las técnicas de microscopía empleadas dentro de las primeras 72 horas de cultivo (Tabla II); todas las cepas valoradas resultaron positivas para la presencia de ICRs sugestivas a PHA y para la tinción Negro Sudán, mientras que únicamente aquellas cepas negativas a la tinción de Gram fueron positivas a la tinción Rojo Nilo.

Tabla II. Características fenotípicas relacionadas con la producción de PHAs de las cepas aisladas de las áreas de estudio.

Clave de cepa	Sitio	Medio de cultivo	Tinción Gram	ICRs ¹	NS ²	RN ³
ESSAA1Ac_1B	ESSA A1	YEA acetato1%	-	+	+	+
ESSAA1Glu_2A	ESSA A1	YEA glucosa1%	-	+	+	+
ESSAA1Glu_3B	ESSA A1	YEA glucosa1%	-	+	+	+
ESSAA1Glu_4C	ESSA A1	YEA glucosa1%	-	+	+	+
ESSAA4Ac_5B	ESSA A4	YEA acetato1%	+	+	+	-
ESSAA1PFA_6A	ESSA A1	<i>Pseudomonas</i> agar ⁴	+	+	+	-

¹ICRs= inclusiones citoplasmáticas refringentes, ²NS= tinción Negro Sudán, ³RN= tinción Rojo Nilo, ⁴empleo de glicerol como sustrato

7.1.1 Asignación taxonómica por medio de secuencias parciales del gen 16S ARNr

La asignación taxonómica basada en secuencias parciales del gen 16S ARNr (Tabla III) mostró que las cepas aisladas con el fenotipo para la producción de PHA fueron ubicadas taxonómicamente dentro de cuatro géneros: *Halomonas*, *Paracoccus*, *Planomicrobium*, y *Staphylococcus*. Los números de acceso en la base de datos GenBank pueden consultarse en la Tabla III.

Las secuencias del gen 16S ARNr no permitieron una asignación a nivel especie debido a que todas ellas tuvieron un valor de similitud mayor o igual a 98% con varias de las secuencias reportadas en la base de datos. La cepa ESSAA1Ac_1B tuvo un valor de con 14 secuencias, las ESAA1Glu_2A y ESSAA1Glu_3B con cuatro secuencias, la cepa ESSAA4Ac con siete secuencias, y las cepas ESSAA4Ac_5B y ESSAA1PAF_6A con más de 10 secuencias.

Tabla III. Asignación taxonómica de cepas productoras de polihidroxicanoatos aisladas de las áreas de estudio.

Clave de cepa	Presuntiva identidad taxonómica	Longitud de secuencia (pb)	Porcentaje de similitud (%)	Número de acceso en GenBank
ESSAA1Ac_1B	<i>Halomonas</i> sp.	1344	99	MF804953
ESSAA1Glu_2A	<i>Paracoccus</i> sp.	1211	100	MF804955
ESSAA1Glu_3B	<i>Halomonas</i> sp.	1373	99	MF804954
ESSAA1Glu_4C	<i>Halomonas</i> sp.	1401	100	MF804952
ESSAA4Ac_5B	<i>Planomicrobium</i> sp.	1366	99	MF804956
ESSAA1PFA_6A	<i>Staphylococcus</i> sp.	1400	100	MF804957

7.1.2 Detección y análisis de la identidad de secuencias parciales del gen *phaC*

Además del empleo de microscopía para evaluar si las cepas aisladas tenían la capacidad de producir PHAs, se utilizó una aproximación genotípica que consistió en la detección del *phaC* usando oligonucleótidos específicos para bacterias Gram negativas (Fig. 6) y Gram positivas (Fig. 7).

La figura 6 muestra que fue posible amplificar un fragmento de aproximadamente 500 pb, cuyo tamaño fue el esperado, en todas las cepas Gram negativas aisladas. No obstante, los oligonucleótidos usados promovieron la amplificación de una posible inespecificidad con un tamaño cercano a las dos mil pares de bases al usar ADN de la cepa *Halomonas* sp. ESSAA1Glu_3B.

La secuenciación de los productos de PCR fue exitosa únicamente para las cepas ESSAA1Glu_2A y ESSAA1Glu_4C. El amplicón de la cepa ESSAA1Glu_2A tuvo un tamaño de 528 pb, y la comparación de la secuencia nucleotídica con la base de datos de NCBI dio como resultado un porcentaje de identidad de 83% con un fragmento del genoma completo de *Paracoccus contaminans* cepa RKI (CP020612), y de 82% con *phaC* de *Paracoccus denitrificans* cepa ATCC 17741. Adicionalmente se encontró un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) codificante para 176 residuos de aminoácidos, cuya comparación con la base de datos mostró un valor de identidad de 98% con la secuencia de aminoácidos de la PHA sintasa de *Paracoccus chinensis* (SDK97885). La relación filogenética de la secuencia parcial de aminoácidos de la enzima PHA sintasa de la cepa ESSAA1Glu_2A con la de otros miembros del género *Paracoccus* puede ser consultada en la figura 8.

El amplicón de la cepa ESSAA1Glu_4C correspondió a una secuencia de 530 pb, y su búsqueda en la base de datos dio como resultado un porcentaje de identidad de 91% con un fragmento del genoma completo de *Halomonas aestuarii* cepa Hb3 (CP018139). La búsqueda de marcos de lectura abiertos permitió obtener una secuencia de 176 residuos de aminoácidos, y su búsqueda en la base de datos mostró un porcentaje de identidad de 95% con la secuencia de la PHA sintasa de *Halomonas daqiaonensis* (SEM12342). La relación filogenética de la secuencia parcial de aminoácidos de la PHA sintasa de la cepa ESSAA1Glu_4C con la de otros miembros del género *Halomonas* puede ser consultada en la figura 8.

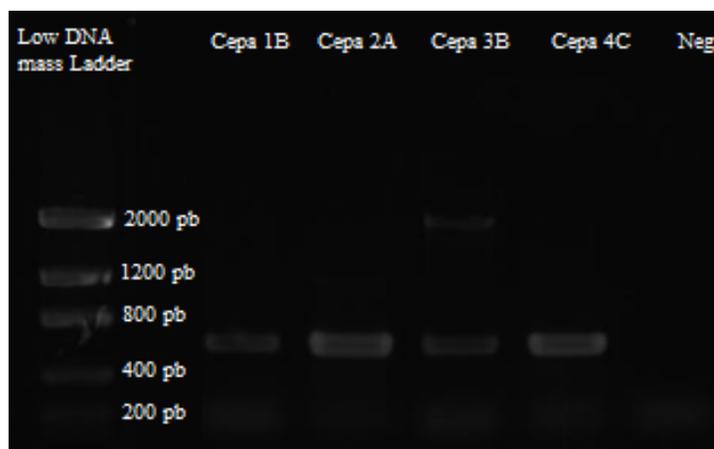


Figura 6. Gel de agarosa (1.2%) que muestra los productos de PCR del gen *phaC* de cepas Gram negativas aisladas de ESSA A1. Cepa 1B: *Halomonas* sp. cepa ESSAA1Ac_1B; cepa 2A: *Paracoccus* sp. cepa ESSAA1Glu_2A; cepa 3B: *Halomonas* sp. cepa ESSAA1Glu_3B; cepa 4C: *Halomonas* sp cepa ESSAA1Ac_4C; Neg: negativo.

La electroforesis de los productos de PCR generados con DNA de las cepas Gram positivas aisladas (Fig. 7) muestra que se detectó un producto del tamaño esperado (400 pb aproximadamente) en la cepa *Planomicrobium* sp. ESSAA4ac_5B, sin embargo, su concentración fue insuficiente para secuenciación. No fue posible detectar el gen en la cepa *Staphylococcus* sp. ESSAA1PAF_6A con los oligonucleótidos utilizados. En ambos casos se obtuvieron posibles dímeros de oligonucleótidos .

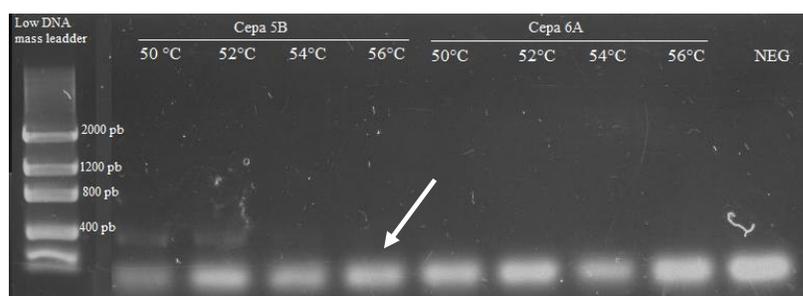


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de productos de PCR del gen *phaC* de cepas Gram positivas aisladas de ESSA A1 y ESSA A4. PCR de gradiente de temperatura de alineamiento. Cepa 5B: *Planomicrobium* sp. cepa ESSAA4ac_5B; 6A: *Staphylococcus* sp. cepa ESSAA1PAF_6A; NEG: negativo.

7.2 Análisis de la diversidad de bacterias con el potencial de producir polihidroxicanoatos en los tapetes microbianos analizados

7.2.1 Análisis de secuencias de productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos diseñados para la detección del gen *phaC1*

El BLAST en la base de datos de nucleótidos de NCBI de la secuencia de los productos de PCR generados con los oligonucleótidos diseñados en este trabajo mostró que dichas secuencias correspondieron al *phaC1* y *phaC2* de *P. putida* cepa KT2440 (anexo M), sugiriendo que estos oligonucleótidos son específicos del gen de interés.

7.2.2 Análisis filogenético de secuencias parciales de los genes *phaC* y *phaC1* recuperados a partir de DNA ambiental

Con el objetivo de aproximarse a la composición de la comunidad bacteriana con el potencial genómico de sintetizar PHA de cadena corta y cadena media en los tapetes microbianos estudiados, se realizaron análisis de clonación de productos de PCR de los genes *phaC* y *phaC1*, a partir de ADN ambiental, y se obtuvieron 26 y 32 secuencias de calidad, respectivamente.

Las secuencias nucleotídicas fueron utilizadas para inferir la secuencia de aminoácidos de la PHA sintasa clase I (*phaC*) y clase II (*phaC1*). La comparación de las secuencias parciales de PHA sintasas clase I con la base de datos NCBI, mostró que la mayoría de las secuencias tuvieron un valor de identidad entre 51 y 96%, encontrando que únicamente cuatro secuencias tuvieron un valor superior a 97%. Los porcentajes de identidad obtenidos para cada clon pueden ser consultados en el anexo O.

En contraste, todas las secuencias parciales de PHA sintasas clase II tuvieron un porcentaje de identidad de 99% con la PHA sintasa clase II de *P. putida* (WP_070384427), no obstante, el alineamiento de las secuencias de aminoácidos mostró que no todas las secuencias fueron idénticas; las secuencias nucleotídicas tuvieron sustituciones no-sinónimos que se reflejaron en cambios a nivel de aminoácidos. Un análisis detallado de los cambios entre secuencias es presentado en el anexo N.

Se realizó un tamizado de las 58 secuencias obtenidas, eliminando aquellas repetidas o que dificultaran el alineamiento, y se generó un árbol filogenético a través del método de máxima verosimilitud. El modelo evolutivo que mejor explicó los cambios entre las secuencias analizadas fue LG con una distribución Gamma.

La topología del árbol (Fig. 8) muestra que no se encontró un patrón de agrupamiento en función del área de estudio, sin embargo, las secuencias recuperadas fueron particulares de cada sitio. Las secuencias de los clones se agruparon en dos ramas principales, una de ellas agrupó a las secuencias correspondientes PHA sintasas clase II, y a un grupo donde se concatenaron el clon 23 y la PHA sintasa de *Rubrimonas cliftonensis*.

Con base en los valores de identidad entre las secuencias de la PHA sintasa clase II y la de *P. putida*, así como en la distancia encontrada en las ramas, es posible inferir la presencia de 13 variantes de secuencias de aminoácidos del *phaC1* de *P. putida* recuperadas con la estrategia de clonación de los tapetes microbianos estudiados.

Las secuencias de aminoácidos de las PHA sintasas clase I se agruparon en una segunda rama principal, y en general presentaron una mayor diversidad filogenética; las secuencias recuperadas a partir de ADN ambiental se agruparon en cinco clusters claramente diferenciados, en contraste a la rama única conformada por las secuencias de la PHA sintasa clase II. En la mayoría de los casos no fue posible aproximarse a la identidad de las secuencias de la PHA sintasa clase I debido a los bajos valores de similitud y a la distancia de las ramas encontrada entre estas y las secuencias con mayor porcentaje de identidad obtenidas de la base de datos.

Las secuencias generadas a partir de ADN ambiental fueron depositadas en la base de datos NCBI con números de acceso del MF939171 al MF939204.

7.3 Estimación del número de copias del gen *phaC* en DNA ambiental de los tapetes microbianos estudiados

El objetivo 3 de este trabajo consistió en estimar el número de copias del *phaC* en ADN ambiental de los tapetes microbianos encontrados en las áreas de estudio. Únicamente fue posible detectar el *phaC2* específico del género *Pseudomonas* usando oligonucleótidos reportados en la literatura, debido a las inespecificidad de los oligonucleótidos diseñados en este trabajo. La curva estándar generada tuvo una pendiente de -3.06, una eficiencia de 1.12, un intercepto en Y de 16.52, y un R² de 0.99.

Se detectaron 2.1×10^8 y 5.4×10^8 copias del gen *phaC2* g⁻¹ de tapete en ESSA A1 y ESSA A4, respectivamente. Sin embargo el análisis estadístico descartó la presencia de diferencias significativas $F_{(1,2)} = 1.528$, $p = 0.342$ entre ambos sitios.

7.4 Evaluación de la presencia de bacterias con el potencial de degradar hidrocarburos lineales y producir polihidroxicanoatos en tapetes microbianos

7.4.1 Cuantificación del gen *alkB* en muestras naturales de tapetes microbianos

La estimación del número de copias del gen *alkB* en muestras ambientales fue llevada a cabo a través de la elaboración de una curva estándar donde el positivo fue ADN plasmídico con el fragmento de interés. El valor de la pendiente fue de -3.35, la eficiencia de reacción de 0.99, el intercepto en y de 47.83, mientras que el valor de R² fue de 0.99.

En ambos sitios se detectaron 5×10^7 copias del gen *alkB* g⁻¹ de tapete, lo que sugiere la presencia de organismos potencialmente capaces de degradar hidrocarburos lineales en estos sitios. El análisis estadístico indica que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de copias del gen entre ambos tapetes ($F_{(1,2)} = 0.04$, $p = 0.861$).

7.4.2 Aislamiento y cinética de crecimiento poblacional de consorcio degradador de *n*-hexadecano y productor de polihidroxialcanoatos

Con el objetivo de recuperar bacterias heterótrofas aerobias con la capacidad de emplear *n*-hexadecano como sustrato para la síntesis de PHA, se llevó a cabo un enriquecimiento donde fragmentos de tapetes microbianos de ESSA A1 y ESSA A4 fueron expuestos directamente a un medio de cultivo con el hidrocarburo.

El enriquecimiento permitió el aislamiento de cuatro consorcios a partir del tapete microbiano de ESSA A4 (1, 2, 3, y 1b), y se eligió al consorcio 2 para experimentos posteriores con base en los valores de densidad óptica alcanzados en la cinética de crecimiento preliminar, la observación de inclusiones sugestivas a PHA, y la detección del gen *alkB*.

El análisis estadístico de la cinética de crecimiento poblacional (Fig. 9), mostró diferencias estadísticamente significativas en los valores de absorbancia por efecto del tiempo ($F_{(1, 19)} = 76.92, p < 0.05$), sugiriendo que el consorcio 2 fue capaz de crecer en *n*-hexadecano. La prueba *a posteriori* permitió detectar tres grupos homogéneos, cada uno correspondiente a una fase del crecimiento: la fase lag ocurrió durante las primeras 8 horas de incubación, mientras que la exponencial concluyó a las 24 horas, donde se alcanzó un valor promedio de absorbancia de 1.591. La fase estacionaria se observó desde las 24 hasta las 48 horas de incubación, donde concluyó el experimento.

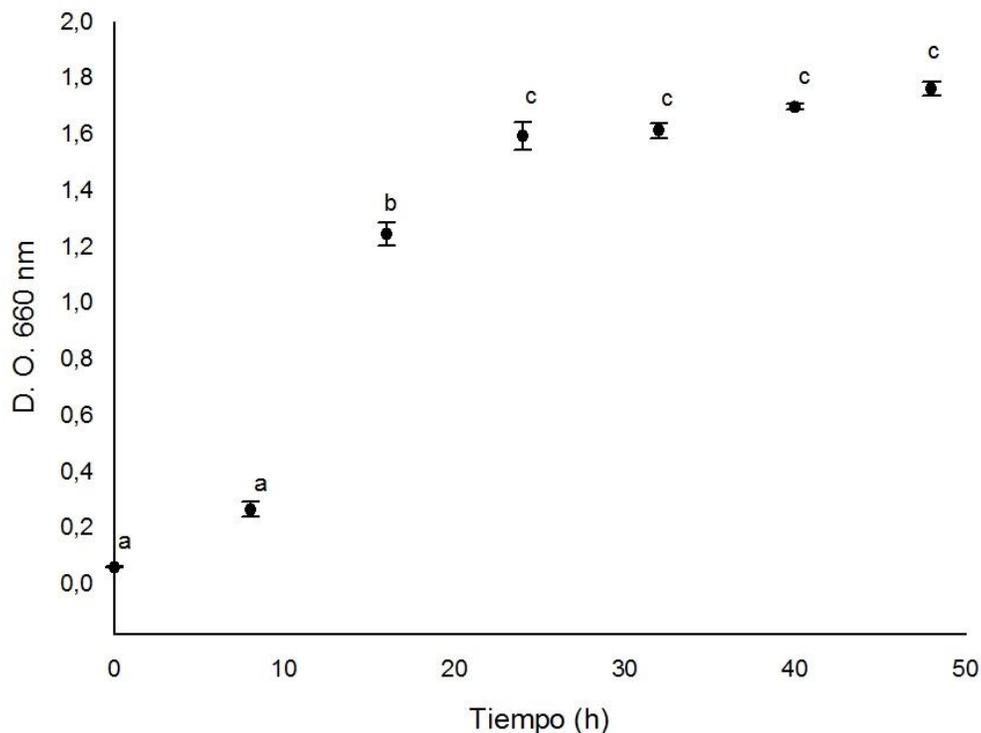


Figura 9. Aproximación al crecimiento poblacional a través de densidad óptica a 660 nm de consorcio 2 utilizando *n*-hexadecano como fuente de carbono. Las letras distintas muestran la presencia de diferencias significativas y las barras el error estándar.

7.4.2.1 Cinética de consumo de *n*-hexadecano

A pesar de que la cinética de crecimiento poblacional sugirió que el consorcio 2 fue capaz de utilizar *n*-hexadecano para generar biomasa, la concentración del sustrato (Fig. 10) no mostró diferencias significativas a través del tiempo ($F_{(1,82)} = 3.505$, $p = 0.0648$). Se encontró que el consumo de hidrocarburo total fue de 1.66 g L^{-1} , un valor relativamente bajo con respecto al total suministrado en el tiempo cero, por lo que se encuentra dentro del error estándar reflejando la ausencia de diferencias significativas.

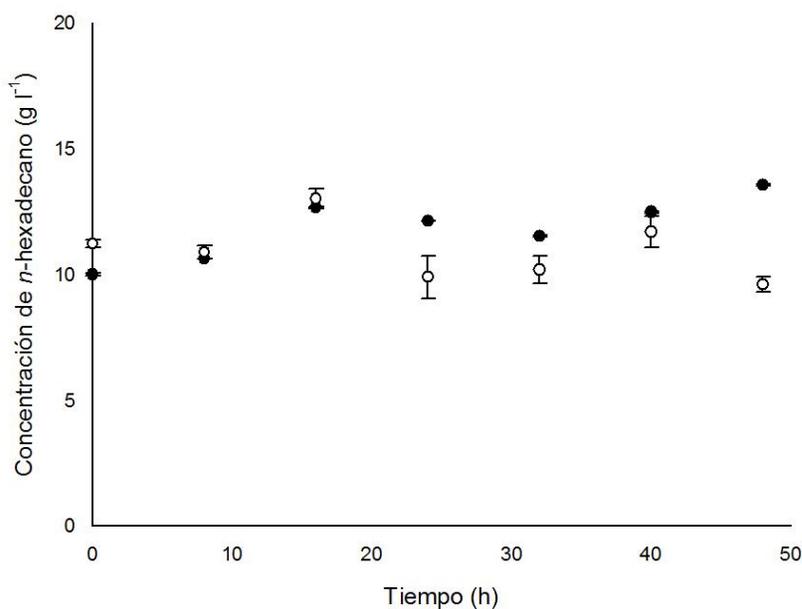


Figura 10. Cinética de consumo de *n*-hexadecano por el consorcio 2 (círculos negros), y blanco abiótico (círculos blancos). Las barras muestran el error estándar, y las letras diferentes la presencia de diferencias estadísticamente significativas.

7.4.2.2 Estimación del número de copias del gen *alkB* a través de cinética de crecimiento

La cuantificación del número de copias del gen *alkB* en biomasa del consorcio 2 expuesta a *n*-hexadecano (Fig. 11) muestra diferencias estadísticamente significativas por efecto del tiempo ($F_{(2,3)} = 285.6$ $p < 0.05$). Se observó que el número de copias al final de la fase logarítmica (24 h) fue un orden de magnitud mayor que el encontrado al tiempo cero, sin embargo, se registró un descenso cuando la población se encontraba en fase estacionario (48 h), cuyo valor no fue significativamente distinto al encontrado en el tiempo cero.

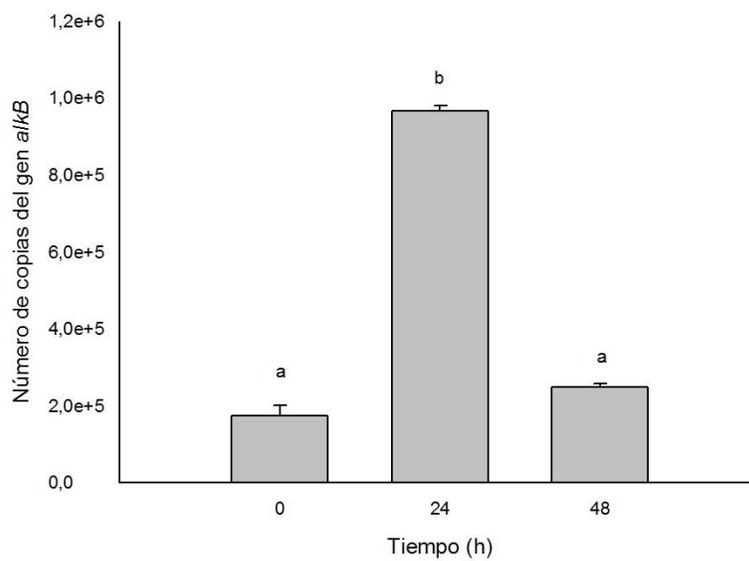


Figura 11. Número de copias del gen *alkB* en tres diferentes tiempos de la cinética de crecimiento del consorcio 2. Las letras distintas muestran la presencia de diferencias estadísticamente significativas y las barras el error estándar.

7.4.2.3 Detección de inclusiones citoplasmáticas sugestivas a polihidroxicanoatos

Las micrografías de células teñidas con el reactivo lipofílico Rojo Nilo muestran que a las cero horas (Fig. 12) no se detectaron células positivas para la producción de PHA. En contraste, a las 24 y 48 h de cultivo la presencia de inclusiones citoplasmáticas sugestivas a PHA fue más evidente (Figs.12B y C, respectivamente). Empero, las inclusiones no fueron visibles en todas las células de los campos observados.

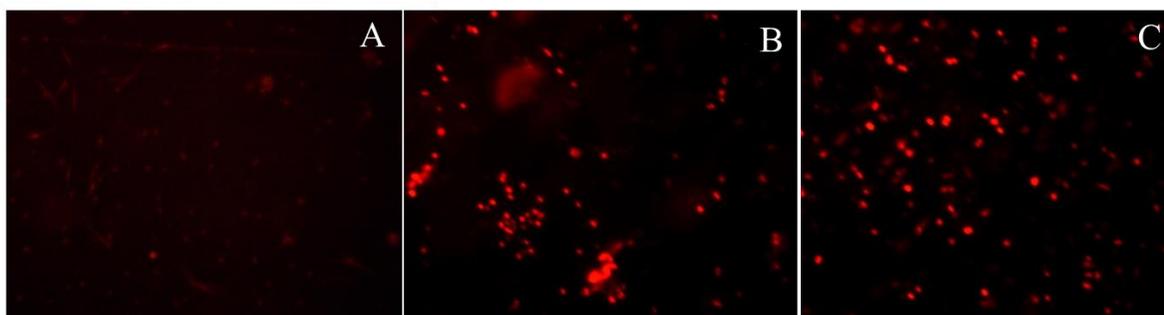


Figura 12. Micrografías de epifluorescencia (800 x) que muestra células del consorcio 2 teñidas con Rojo Nilo a una edad de A) 0, B) 24, y C) 48 horas, creciendo en *n*-hexadecano como fuente de carbono.

8. DISCUSIÓN

8.1 Aislamiento y caracterización fenotípica de cepas productoras de polihidroxicanoatos recuperadas de tapetes microbianos hipersalinos

En este trabajo, se aislaron y caracterizaron cepas heterótrofas aerobias con la capacidad de producir polihidroxicanoatos. Se empleó un enfoque fenotípico que consistió en la detección de inclusiones citoplasmáticas refringentes sugestivas a PHA, y las tinciones lipofílicas Negro Sudan y Rojo Nilo (Tabla II). Se encontró que todas las cepas aisladas mostraron inclusiones citoplasmáticas refringentes y fueron positivas a la tinción Negro Sudan. Además, se detectó una posible relación entre la afinidad al cristal violeta determinada por la tinción de Gram, y la tinción con Rojo Nilo, debido a que solo las cepas negativas a la tinción Gram fueron positivas a Rojo Nilo. Este resultado es consistente con lo reportado en la literatura, donde se menciona que el método no es aplicable a bacterias Gram positivas (Koller *et al.*, 2011).

Fue necesario llevar a cabo más de una técnica de microscopía para la detección de PHAs debido a que cada una de ellas puede resultar en falsos positivos: en el caso de la detección de ICRs a través de microscopía de contraste de fases, los gránulos de PHA pueden ser confundidos con esporas, ya que ambas son refringentes (Hitchins *et al.*, 1968). Una posible estrategia para la diferenciación entre gránulos de PHA y esporas a través de microscopía de

contraste de fases, podría ser que estas últimas son únicas en el citoplasma, mientras que por lo general las células productoras de PHA generan más de una inclusión. Otro criterio podría ser el tamaño y la forma; las esporas de los géneros *Bacillus* y *Clostridium* no alcanzan dimensiones mayores a 1 μm , y las inclusiones de PHA pueden tener tamaños variables, además de que la spora es generada ordenadamente en el citoplasma, y las inclusiones de PHA se distribuyen aleatoriamente en el interior celular (Walker *et al.*, 1970).

Las tinciones lipofílicas Negro Sudan y Rojo Nilo poseen la desventaja de que pueden detectar compuestos lipídicos como ceras o triglicéridos (Sheu *et al.*, 2015), por lo que sería necesario llevar a cabo análisis químicos, como infrarojo, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, termogravimetría, o rayos X, para aproximarse a la naturaleza del material intracelular producido por las cepas aisladas (Sudesh y Abe, 2010).

A pesar de que las aproximaciones fenotípicas son una buena herramienta para la bioprospección de bacterias productoras de PHAs, se ha manifestado que la síntesis del polímero es dependiente de la disponibilidad de fuentes de carbono apropiadas y tiempos de cultivo largos (Sheu *et al.*, 2015), por lo que sería recomendable emplear métodos genotípicos de detección de cepas con el potencial de producir PHAs para minimizar falsos negativos, un ejemplo es PCR de colonias y los métodos de hibridación con sondas específicas de los genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de PHAs (Romo *et al.*, 2007).

8.1.1 Asignación taxonómica a través de secuencias parciales del gen 16S ARNr

La Tabla III muestra que las secuencias parciales del gen 16S ARNr fueron insuficientes para obtener una asignación taxonómica a nivel especie, debido a que al comparar las secuencias problema con las de la base de datos el valor de similitud fue mayor al 98% con más de una secuencia.

Anteriormente se ha manifestado que una identificación efectiva a través de secuencias del gen 16S ARNr no es necesariamente un criterio suficiente para garantizar la identidad a nivel especie, y aunque este criterio puede ser usado rutinariamente para distinguir y establecer relaciones entre géneros y especies establecidas, especies que divergieron recientemente

pueden ser irreconocibles (Fox *et al.*, 1992), además de que un nivel de corte para delinear especies no cobra sentido biológico debido a que la especiación es un proceso dinámico que da lugar a que taxas hermanas se separen por espacios variables dentro de las secuencias (Thompson *et al.*, 2015).

En apoyo al criterio filogenético del gen 16S ARNr, las cepas podrían caracterizarse a través de otras aproximaciones: algunos de ellas serían la caracterización fenotípica como morfología y fisiología, marcadores quimitaxonómicos donde se encuentra la identificación de ácidos grasos de la membrana celular y de los componentes de la pared celular, y a partir de ADN determinando el %mol G+C, tamaño del genoma, e hibridación ADN:ADN (Thompson *et al.*, 2015).

La detección de la producción de PHA podría ser un criterio taxonómico adicional. La producción de PHAs ha sido una característica empleada para discernir entre especies del género *Halomonas* (Mata *et al.*, 2002), aunque esta capacidad metabólica no ha sido reconocida por otros autores; la descripción del género en Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria menciona que los miembros del género no producen gránulos intracelulares (Russell, 2005). Por otra parte, la descripción del género *Paracoccus* presentada en la obra The Prokaryotes hace mención de que muchas, si no todas las especies del género son capaces de producir polihidroxibutirato, un tipo de PHA, bajo condiciones de crecimiento con suficiencia de carbono (Kelly *et al.*, 2006).

No obstante, el género *Planomicrobium* no ha sido previamente reportado como productor de PHAs, por lo que es necesario un estudio más detallado sobre la producción del polímero en este género. El potencial del género *Staphylococcus* como productor de PHA no ha sido previamente estudiado, sin embargo, fue encontrado en una bioexploración de bacterias productoras de PHAs de dos tapetes microbianos costeros (López-Cortés *et al.*, 2008).

8.1.2 Caracterización genotípica de cepas productoras de polihidroxicanoatos a través de la detección del gen *phaC*

En apoyo a la caracterización mediante criterios fenotípicos, se utilizaron oligonucleótidos específicos del *phaC* de bacterias Gram negativas y Gram positivas para detectar este gen en las cepas aisladas.

La figura 6 muestra que se logró amplificar un fragmento de aproximadamente 500 pb en las cepas Gram negativas aisladas, y el tamaño del fragmento obtenido fue el esperado (López-Cortés *et al.*, 2010). No obstante, se obtuvo una banda inespecífica al utilizar DNA de la cepa *Halomonas* ESSAA1Glu_3B, esto podría deberse a que los oligonucleótidos utilizados contenían degeneraciones dentro de la secuencia, y se sabe que cuando la degeneración es alta puede promoverse la amplificación de productos no relacionadas (Linhart y Shamir, 2005).

Adicionalmente, se secuenciaron exitosamente los productos de PCR de las cepas *Paracoccus* sp. ESSAA1Glu_2A y *Halomonas* sp. ESSAA1Glu_4C. La secuencia de aminoácidos de la cepa ESSAA1Glu_2A, inferida a partir de nucleótidos, tuvo un valor de identidad de 98% con la PHA sintasa de *Paracoccus chinensis*. Un resultado similar fue encontrado al comparar filogenéticamente la secuencia de la cepa ESSAA1Glu_2A con otras del miembro *Paracoccus* reconocidos previamente por su capacidad de producción de PHAs (Latisnere-Barragán y López-Cortés, 2012; López-Cortés *et al.*, 2010; Maehara *et al.*, 1998) (Fig 8); la cepa ESSAA1Glu_2A y la PHA sintasa de *Paracoccus chinensis* formaron una rama independiente, dentro de un clúster formado por otros miembros del género *Paracoccus*.

La secuencia de aminoácidos inferida a partir de la secuencia parcial del *phaC* de la cepa ESSAA1Glu_4C tuvo un valor de 95% con la PHA sintasa de *Halomonas daqiaonensis*. Además, la comparación de relación la filogenética entre ambas secuencias permitió su agrupamiento en un clúster independiente dentro del árbol filogenético (Fig. 8).

Con base en lo anterior, existe mayor evidencia de que las cepas ESSAA1Glu_2A y ESSAA1Glu_4C pueden ubicarse taxonómicamente dentro de los géneros *Paracoccus* y *Halomonas*, respectivamente (Tabla III), además de que sugiere que estas cepas poseen tanto el genotipo como el fenotipo de la producción de PHAs. Este es el primer trabajo donde se reportan secuencias parciales de PHA sintasas de cepas aisladas de los tapetes microbianos hipersalinos de Guerrero Negro, México.

Los oligonucleótidos específicos para la amplificación del *phaC* de bacterias Gram positivas (Fig. 7) únicamente permitió la obtención de un amplicón con baja concentración al utilizar ADN de la cepa *Planomicrobium* sp. ESSAA4ac_5B. A pesar de llevar a cabo un gradiente de temperatura de alineamiento con el objetivo de optimizar la reacción de amplificación con la cepa *Staphylococcus* sp. ESSAA1PAF_6A no se obtuvo un producto visible. Este resultado podría asociarse a la presencia de dímeros de oligonucleótidos (Fig. 7), debido a que su generación durante el proceso de PCR es uno de los factores primarios que disminuyen el rendimiento del producto final porque decrementa la concentración de moléculas disponibles para la hibridación con el ADN, o promueven la formación de productos no específicos (Das *et al.*, 1999).

8.1.2 Posible papel ecológico de cepas aisladas en los tapetes microbianos estudiados

Los resultados de este trabajo muestran que el género más abundante en los aislamientos fue *Halomonas* (Tablas II y III). Este resultado fue similar al encontrado previamente en estudios sobre la diversidad y actividad de bacterias productoras y degradadoras de PHA (Berlanga *et al.*, 2006), y su cercana asociación con Cianobacterias en un estero y en un tapete microbiano hipersalinos (Villanueva *et al.*, 2010), caracterizados por biomarcadores lipídicos, la detección y clasificación de PHA del ambiente, análisis bioquímico de los aislados, y ensayos de interacción, encontrando que la mayoría de los aislados, al igual que nuestro estudio, pertenecían al género *Halomonas* sp., quienes fueron co-aislados de Cianobacterias filamentosas sugiriendo una asociación específica o un proceso de simbiosis, lo que posiblemente se asocie a una dinámica de producción de PHAs por parte de *Halomonas*, empleando sustratos excretados por Cianobacterias filamentosas.

En contraste, los géneros de bacterias productoras de PHA *Paracoccus* y *Planomicrobium*, caracterizadas en nuestro estudio, no fueron encontrados en tapetes del trabajo de Berlanga *et al.* (2006) y Villanueva *et al.* (2007).

8.2 Diversidad de bacterias con el potencial de producir polihidroxicanoatos en los tapetes microbianos estudiados

Uno de los objetivos del presente trabajo fue contribuir con la diversidad de bacterias con el potencial de producir polihidroxicanoatos en tapetes microbianos hipersalinos, a través de estrategias cultivo dependientes e independientes. Una parte de la estrategia cultivo independiente se basó en la recuperación de secuencias nucleotídicas parciales de los genes *phaC* y *phaC1* a partir de ADN ambiental de los sitios estudiados.

Las secuencias parciales de aminoácidos de la PHA sintasa clase II codificada por el *phaC1*, inferidas a partir de nucleótidos, mostró que todas las secuencias recuperadas de ambos tapetes microbianos tuvieron un valor de identidad de 99% con la PHA sintasa clase II de *P. putida*, por lo que la diversidad de organismos con el potencial genómico para producir PHA de cadena media fue baja, sin embargo se encontró que las secuencias nucleotídicas tuvieron sustituciones no-sinónimas que se reflejaron en cambios aminoacídicos con distintas propiedades fisicoquímicas (anexo N). Estudios sobre diferentes familias de proteínas han mostrado que las mutaciones, inserciones y deleciones pueden producir cambios en la estructura terciaria de las proteínas (Chothia y Lesk, 1986), por lo que las sustituciones a nivel aminoácidos encontradas podrían derivar en cambios en la estructura de la enzima PHA sintasa clase II en los tapetes microbianos.

Resultados preliminares de la composición microbiana de la capa superficial de los tapetes microbianos de ESSA A1 y ESSA A4 basada en secuencias parciales del gen 16S ARNr generadas en la plataforma Illumina (López-Cortés y García Maldonado, datos no publicados), muestran que el género *Pseudomonas* tuvo una abundancia relativa del 1% y 0.005%, respectivamente, lo que podría situar al género en la categoría de biosfera rara (Lynch y Neufeld, 2015). La baja abundancia del género sugiere que la producción de PHAs de cadena media no representa una fracción considerable del total del polímero producido en

la capa superficial de los tapetes microbianos, además de que se ha sugerido que los PHAs de cadena media en ambientes naturales son menos abundantes que los de cadena corta (De Young *et al.*, 2007).

En contraste, las secuencias parciales de la PHA sintasa clase I mostraron una mayor diversidad, y el 81% de las secuencias correspondieron a PHA sintasas no caracterizadas previamente (anexo O), posiblemente porque provenientes de bacterias no cultivables. Las diferencias en diversidad pueden estar relacionarse a que la capacidad de producción de PHAs de cadena media está primariamente asociada a algunas cepas del género *Pseudomonas* del grupo I (con base en homología del ARNr), mientras que los PHAs de cadena corta pueden ser sintetizados por un amplio rango de bacterias (De Young *et al.*, 2007).

8.2.1 Análisis filogenético de secuencias parciales de PHA sintasas recuperadas de los tapetes microbianos estudiados

A pesar de que anteriormente se ha detectado la presencia *in situ* de polihidroxicanoatos, y se ha llevado a cabo el aislamiento de bacterias heterótrofas con la capacidad de producir el polímero en tapetes microbianos (Rothermich *et al.*, 2000; Villanueva *et al.*, 2009), los datos presentados en este trabajo son el primer reporte de una aproximación cultivo independiente sobre la diversidad de bacterias productoras de PHAs en tapetes microbianos hipersalinos.

Con el objetivo de explorar la composición de la comunidad bacteriana con el potencial genético de producir PHAs, se elaboró un árbol filogenético a través del método de máxima verosimilitud (Fig. 8), usando secuencias de aminoácidos inferidas a través de secuencias de los genes *phaC* y *phaC1* generadas en este trabajo, y secuencias de los cuatro tipos de PHA sintasas, obtenidas de la base de datos (I-IV).

El patrón de agrupamiento en función del tipo de PHA sintasa encontrado en este trabajo coincide con lo reportado por Kadouri *et al.* (2005), quienes analizaron un set de 67 secuencias protéicas de PHA sintasas de Proteobacterias, bacterias Gram positivas y Cianobacterias, a través de método de distancia de Neighbor-Joining.

Adicionalmente, se observó que las secuencias de la base de datos se clusterizaron dependiendo del filum, para Cyanobacteria y Firmicutes, y de la clase en representantes de α -Proteobacteria, β -Proteobacteria, y γ -Proteobacteria. El agrupamiento encontrado ha sido obtenido, pero a nivel especie por otros autores, explicando la existencia de clústers genotípicos que corresponden a la designación tradicional de especies. Sin embargo, este agrupamiento no fue mostrado por las especies *Rubrimonas cliptonensis*, *Rhodococcus opacus*, y *Granulosicoccus antarcticus*. Lo anterior posiblemente está asociado a un proceso de transferencia horizontal de genes entre miembros de distintos taxa (Kadouri *et al.*, 2005)

Todas las secuencias obtenidas en este trabajo se agruparon dentro del segundo clúster principal que incluyó secuencias de organismos previamente reconocidos como productores de PHAs, en cuyos genomas se encuentran los genes que codifican para PHA sintasas clase I o II. Los clones generados con oligonucleótidos específicos para el *phaC1* del género *Pseudomonas* y la PHA sintasa de *P. putida* se agruparon dentro de un mismo clúster, y excluyeron a *Pseudomonas aeuroginosa*, sugiriendo que las secuencias recuperadas corresponden a variantes de la especie *P. putida*. El resultado anterior permite inferir que existen bacterias con el potencial genómico para producir PHAs de cadena media en los tapetes microbianos estudiados, pero la diversidad fue baja. Un resultado similar, pero a través de estrategias dependientes de cultivo, fue encontrado en muestras de tapete microbiano del Delta del Ebro en España, de donde se logró el aislamiento de una cepa del género *Pseudomonas* con el fenotipo de producción de PHA y la detección de derivados de polihidroxihexanoato, un PHA de cadena media, a través de espectrometría de masas, sugiriendo que el género se encuentra activo en este sitio (Villanueva *et al.*, 2010).

En contraste, los oligonucleótidos específicos para bacterias Gram negativas permitieron recuperar una mayor diversidad de secuencias que se distribuyeron irregularmente a través del árbol filogenético (Fig. 8). La distancia filogenética encontrada podría asociarse a un proceso de transferencia horizontal de genes, debido a que estudios previos han presentado evidencia de la adquisición de genes relacionados con la biosíntesis de PHAs a través de este proceso en diferentes especies de bacterias. La fijación de genes transferidos horizontalmente sugiere que estos confieren una ventaja selectiva en los organismos portadores (Kalia *et al.*,

2007; López *et al.*, 2015). La producción de PHAs en los tapetes microbianos podría ser relevante desde el punto de vista evolutivo, ya que pueden mejorar la supervivencia de los organismos productores en situaciones de estrés físico y químico, y se ha sugerido que la habilidad de almacenar carbono en forma de PHAs contribuye a la supervivencia bajo condiciones fluctuantes en suelo y rizosfera (Castro-Sowinski *et al.*, 2010).

Con base en los valores de identidad y en la distancia encontrada entre las ramas de las secuencias obtenidas en este trabajo y en los relativos más cercanos encontrados en la base de datos, es posible inferir que existe homología (Pearson, 2013), sin embargo, las secuencias de este trabajo tuvieron bajos valores de indentidad con respecto a PHA sintasas previamente reportadas, posiblemente porque corresponden a organismos no caracterizados o no cultivados. Un resultado similar fue encontrado en muestras de agua marina pelágica de una Trinchera Japonesa, donde se encontraron 15 secuencias putativas de PhaC no caracterizadas, derivadas de bacterias no cultivadas, a través de la técnica de amplificación de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) (Foong *et al.*, 2014).

Las secuencias recuperadas por medio de los oligonucleótidos específicos para bacterias Gram negativas estuvieron alejadas filogenéticamente de organismos modelo para la producción de PHAs (Fig. 8), tales como *Cupriavidus necator*, *Azotobacter vinelandii*, y *Paraccocus denitrificans*, sugiriendo que los taxa detectados podrían tener nuevas PHA sintasas. Este resultado confirma que los tapetes microbianos hipersalinos son una fuente potencial novedosa de microorganismos productores de polihidroxicanoatos (Berlanga *et al.*, 2006; López-Cortés *et al.*, 2008).

El método independiente de cultivo no permitió la detección de secuencias correspondientes a las cepas productoras de PHA aisladas y caracterizadas en este trabajo (Tablas II y III). Esto podría asociarse a que los microorganismos recuperados mediante cultivo poseen una baja abundancia en los tapetes microbianos estudiados. Resultados preliminares de la composición microbiana de la capa superficial de los tapetes microbianos de ESSA A1 basada en secuencias parciales del gen 16S ARNr generadas en la plataforma Illumina (López-Cortés y García Maldonado, datos no publicados) muestran que el género

Halomonas, del cual se recuperaron tres cepas, y el género *Paracoccus*, del cual se recuperó una cepa, tuvieron una abundancia relativa del 0.2% con respecto al total del Dominio Bacteria, mientras que *Staphylococcus*, género del que se recuperó una cepa, tuvo una abundancia del 0.3%. El mismo resultado, pero de ESSA A4, muestra que *Planomicrobium* que correspondió a una cepa, no se detectó.

Es posible que las estrategias de cultivo utilizadas hayan promovido el enriquecimiento de estos géneros, ya que se ha propuesto que las técnicas de cultivo tradicionales pueden ser útiles para el enriquecimiento y recuperación de microorganismos con una baja abundancia (Lynch y Neufeld, 2015). Por esta razón es importante el empleo de técnicas dependientes e independientes de cultivo para estudiar la producción de polihidroxicanoatos en ambientes naturales.

A pesar de que la mayoría de las secuencias de PHA sintetas tipo I estuvieron alejadas de los relativos más cercanos de la base de datos, se encontró que estos últimos se ubicaron dentro del filo Proteobacteria y se reportaron como organismos heterótrofos. Este resultado podría sugerir que además de los fotótrofos (Burow *et al.*, 2013) los organismos heterótrofos de los tapetes microbianos estudiados podrían ser posibles contribuyentes importantes en la producción de PHA en el tapete, como una estrategia adaptativa de tolerancia al estrés y evolutiva de sobrevivencia.

8.3 Detección del gen *phaC* en ADN ambiental de los tapetes microbianos analizados

Con el objetivo de estimar las abundancias de bacterias con el potencial genómico de producir polihidroxicanoatos de cadena media en los tapetes microbianos de ESSA A1 y ESSA A4, se llevó a cabo PCR en tiempo real usando como template ADN ambiental. Los resultados muestran que el *phaC1* específico del género *Pseudomonas* fue detectado en ambos sitios, pero no se obtuvieron diferencias significativas entre ambas muestras, lo que sugiere que la abundancia del gen es similar en ambos sitios.

Estudios previos a través del aislamiento de bacterias productoras de PHAs a partir de tapetes microbianos, indican la presencia de cepas del género *Pseudomonas* en un tapete microbiano

de un estuario del delta del Ebro, España y la detección *in situ* de de ácido 3-hidroxiocetánico mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés) sin embargo, los monómeros de cadena corta 3-hidroxiacetato y 3-hidroxiacetato fueron más abundantes (Villanueva *et al.*, 2010).

En contraste, Rothermich *et al.* (2000), quienes analizaron la dinámica de producción de PHAs mediante HPLC en la capa verde, dominada en masa por Cianobacterias, y en la capa rosa, compuesta principalmente por bacterias fotótrofas anoxigénicas, de un tapete microbiano estratificado del mismo sitio, detectaron únicamente la presencia de los monómeros 3-hidroxiacetato y 3-hidroxiacetato. La aparente baja concentración o ausencia de PHAs de cadena media en tapetes microbianos podría estar asociada a la baja abundancia de organismos productores, y a la disponibilidad de sustratos para su síntesis directa, tales como ácidos orgánicos e hidrocarburos (Do Young *et al.*, 2007).

Por lo anterior, el uso de herramientas moleculares como PCR en tiempo real pueden ser útiles para la detección de organismos que poseen una baja abundancia en comunidades microbianas debido a la sensibilidad de la técnica comparada con la capacidad de detección de PCR punto final. No obstante, se deben contemplar consideraciones como el uso de oligonucleótidos altamente específicos y evitar que estos formen homo-dímeros y hetero-dímeros. Además, al ser una técnica altamente sensible, procesos *a priori* como la extracción de ADN pueden tener un impacto en el resultado final, por lo que la comparación de resultados entre estudios diferentes debe ser llevada a cabo con reservas (Smith y Osborn, 2009).

La técnica de PCR tiempo real ha sido usada anteriormente en la detección de genes funcionales en muestras ambientales. Ejemplos son la aproximación a la abundancia del gen tipo *AmoA*, que codifica para una enzima involucrada en la nitrificación en miembros del filo Crenarchaeota, en muestras de agua de mar (Mincer *et al.*, 2007), y la detección del gen *mcrA* de organismos metanógenos del Dominio Archaea en tapetes microbianos hipersalinos de Guerrero Negro (García-Maldonado *et al.*, 2014). Sin embargo, no existen antecedentes en la detección del *phaC* a través de PCR en tiempo real en ambientes naturales, por lo que este

es el primer reporte de detección del *phaC* del género *Pseudomonas* en tapetes microbianos hipersalinos.

8.4 Detección y recuperación de bacterias con la capacidad de utilizar hidrocarburos lineales y producir polihidroxicanoatos

8.4.1 Detección del gen *alkB* en ADN ambiental de tapetes microbianos

Con el objetivo de estimar las abundancias de bacterias con el potencial genómico de llevar a cabo el primer paso de oxidación de hidrocarburos lineales vía monooxigenasas, se cuantificó el número de copias del gen *alkB* en ADN ambiental de los tapetes microbianos estudiados. Los resultados mostraron que fue posible detectar el gen en ambos sitios, pero no se encontraron diferencias significativas tras la comparación estadística. Este resultado podría deberse que ninguno de los sitios analizados presenta un enriquecimiento de bacterias hidrocarbonoclasticas con respecto al otro.

A pesar de que no existió una aparente fuente externa de hidrocarburos en los tapetes microbianos analizados, la presencia del gen *alkB* en muestras de ADN ambiental, que podría asociarse a bacterias con el potencial de degradar hidrocarburos, pudiera ser resultado de la disponibilidad de hidrocarburos resultado de un proceso de diagénesis, donde moléculas lipídicas de membranas celulares de bacterias muertas, y que son resistentes a la degradación microbiana, sufren un proceso de acomplejamiento para formar hidrocarburos libres (Green y Jahnke, 2010). Otra posible fuente podrían ser las Cianobacterias, ya que se ha reconocido que estos microorganismos son capaces de producir hidrocarburos de cadena larga vía deformilación de aldehídos grasos y descarboxilación de ácidos grasos (Coates *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren con los de Powell *et al.* (2006), quienes, empleando los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, encontraron un valor mayor (un orden de magnitud) de número de copias del gen *alkB* en muestras control de suelo de la Antártida contaminado con hidrocarburos, lo que podría asociarse a un enriquecimiento de bacterias con la capacidad de degradar hidrocarburos. No obstante, las diferencias entre

ambos trabajos pueden estar asociadas a procesos *a priori* como la extracción de ADN (Smith y Osborn, 2009).

8.4.2 Enriquecimiento de bacterias degradadoras de *n*-hexadecano con la capacidad de producir PHAs

En apoyo a la detección del gen *alkB* en muestras de DNA ambiental, se realizó un enriquecimiento con *n*-hexadecano como única fuente de carbono para promover el crecimiento de bacterias heterótrofas aerobias con un metabolismo hidrocarbonoclástico y con la capacidad de producir PHAs, a partir de tapetes microbianos.

Se logró el aislamiento de cuatro consorcios bacterianos hidrocarbonoclásticos con el fenotipo de producción de PHAs. Otros autores han llevado a cabo el aislamiento de bacterias heterótrofas aerobias de tapetes microbianos contaminados con petróleo, y han logrado la recuperación de cepas con la habilidad metabólica de utilizar alcanos y constituyentes del petróleo (Abed *et al.*, 2007), y se ha sugerido que estos sistemas son capaces de degradar varios compuestos orgánicos incluyendo petróleo (Hernández-Raquet *et al.*, 2006). No obstante, este es el primer reporte del aislamiento de consorcios bacterianos capaces de degradar *n*-hexadecano, un compuesto modelo del petróleo, y de sintetizar PHAs, a partir de tapetes microbianos hipersalinos de Guerrero Negro, México.

8.4.3 Cinética de crecimiento poblacional del consorcio 2 utilizando *n*-hexadecano como fuente de carbono

La cinética de crecimiento del consorcio 2 aislado de ESSA A4, tuvo diferencias estadísticamente significativas en los valores de absorbancia a través del tiempo (Fig. 9), indicando que fue capaz de crecer utilizando hexadecano como fuente de carbono. Se identificó una fase lag relativamente corta (8 horas), lo que sugiere que la biomasa utilizada como inóculo se encontraba cercana a la fase exponencial al momento de ser transferida (Ingraham *et al.*, 1983).

La fase exponencial fue identificada entre las ocho y 24 horas de cultivo, y se observó un paro abrupto en el crecimiento. Se ha establecido que dicho comportamiento se debe al

agotamiento de un nutriente limitante, que en este caso pudo ser el nitrógeno (Bren *et al.*, 2013). Seguidamente, se encontró la fase estacionaria, que duró hasta la finalización del experimento (48 horas).

La gráfica correspondiente al consumo del *n*-hexadecano (Fig. 10) no mostró relación con la cinética de crecimiento, y se obtuvo una degradación de 1.66 g, un valor bajo al compararlo con la cantidad total utilizada. Por lo anterior, el análisis estadístico descartó diferencias significativas en la degradación a través del tiempo, lo que contrasta con la cinética de crecimiento (Fig. 9), donde se encontró que el consorcio fue capaz de crecer en el hidrocarburo. Es posible que el agotamiento del nitrógeno, en lugar que el del sustrato, limitaron el crecimiento (Bren *et al.*, 2013). No obstante, es necesario realizar la cuantificación de la fuente de nitrógeno para evaluar lo anterior.

Se ha establecido que la condición necesaria para la producción de polihidroxialcanoatos es la limitación de un nutriente esencial como el nitrógeno (Anderson y Dawes, 1990), por lo que una posible estrategia de cultivo sería dos fases de crecimiento; la primera donde se promueva la producción de biomasa y la segunda con limitación nutricional que promueva la síntesis del polímero, ya que se ha encontrado que una única etapa de producción con limitación de nitrógeno no siempre resulta en una alta acumulación de PHAs (Akaraonye *et al.*, 2010; Kojima *et al.*, 2004).

En otro punto, se encontraron diferencias significativas al comparar las medias del número de copias del gen *alkB* en el consorcio 2 a las 0, 24 y 48 horas de cultivo (Fig. 11). Debido a que se utilizó ADN, el número de copias puede ser un reflejo de la abundancia de organismos degradadores de hexadecano a lo largo de la cinética, sugiriendo que hubo cambios en la composición del consorcio y que los organismos degradadores de *n*-hexadecano fueron más abundantes a las 24 horas de cultivo o final de la fase exponencial (Fig. 9), teniendo una disminución al final de la cinética. No obstante, los valores de absorbancia se mantuvieron de las 24 a las 48 horas de cultivo, lo que posiblemente se asocie a que aumentó la abundancia de otro tipo de organismo. Este comportamiento ha sido encontrado en otros trabajos, donde

la composición bacteriana tiene cambios a lo largo de la cinética de degradación de hidrocarburos lineales (Militon *et al.*, 2010).

8.4.3 Detección polihidroxicanoatos en el consorcio 2 al crecer con *n*-hexadecano

Las micrografías de células teñidas con el reactivo lipofílico rojo nilo, utilizado para la detección de compuestos lipídicos como los polihidroxicanoatos (Fig. 12), muestran que al inicio de la cinética de crecimiento no se detectó señal del polímero, sino hasta las 24 y 48 horas de incubación, siendo aparentemente más abundantes en este último tiempo. Es importante notar que las estructuras fluorescentes no fueron detectadas en todos los morfotipos del consorcio, lo que posiblemente se deba a que no todos ellos son capaces de producir PHAs o las condiciones de cultivo no promovieron su síntesis (Chen, 2010).

9. CONCLUSIONES

- Las estrategias dependientes e independientes de cultivo utilizadas en este trabajo permitieron reconocer que los tapetes microbianos de Guerrero Negro albergan una gran diversidad de bacterias potencialmente productoras de PHA.
- Este trabajo aporta evidencias fenotípicas y genotípicas de que posiblemente las bacterias heterótrofas participan en la producción de PHA en los tapetes microbianos de Guerrero Negro, México.
- La estrategia independiente de cultivo permitió reconocer una amplia diversidad de PHA sintetas no descritas, sugiriendo que los tapetes microbianos hipersalinos de Guerrero Negro, México pueden ser una buena fuente para el aislamiento o recuperación de nuevos organismos productores de PHAs.
- Los resultados obtenidos a partir de las aproximaciones dependientes e independientes de cultivo, sugieren que en los tapetes microbianos de Guerrero Negro existen bacterias con la capacidad de utilizar *n*-hexadecano como sustrato para la producción de polihidroxicanoatos, siendo este el primer reporte de bacterias con esta capacidad para ambientes hipersalinos.

10. LITERATURA CITADA

- Abed, R. M., B. Zein, A. Al-Thukair, D. de Beer. 2007. Phylogenetic diversity and activity of aerobic heterotrophic bacteria from a hypersaline oil-polluted microbial mat. *Syst. Appl. Microbiol.* 30(4):319-330.
- Abed, R. M., N. M. Safi, J. Koster, D. de Beer, Y. El-Nahhal, J. Rullkotter, F. Garcia-Pichel. 2002. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4):1674-1683.
- Akaraonye, E., T. Keshavarz, I. Roy. 2010. Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 85(6):732-743.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410.
- Anderson, A. J., E. A. 1990. Dawes. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54(4):450-472.
- Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45(1):180-209.
- Baumann, P., L. Baumann. 1981. The marine gram-negative eubacteria: Genera *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas*, and *Alcaligenes*. En: Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel (ed.) *The Prokaryotes. A handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria.* Springer-Verlag. Berlin. 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(2):95-102.
- Braissant, O., A. W. Decho, K. M. Przekop, K. L. Gallagher, C. Glunk, C. Dupraz, P. T. Visscher. 2008. Characteristics and turnover of exopolymeric substances in a hypersaline microbial mat. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67(2):293-307.
- Bren, A., Y. Hart, E. Dekel, D. Koster, U. Alon. 2013. The last generation of bacterial growth in limiting nutrient. *BMC Syst. Biol.* 7(1):1-9.
- Burow, L. C., D. Woebken, I. P. Marshall, E. A. Lindquist, B. M. Bebout, L. Prufert-Bebout, T. M. Hoehler, S. G. Tringe, J. Pett-Ridge, P. K. Weber, A. M. Spormann, S. W. Singer. 2013. Anoxic carbon flux in photosynthetic microbial mats as revealed by metatranscriptomics. *ISME J.* 7(4):817-829.

- Castro-Sowinski, S., S. Burdman, O. Matan, Y. Okon. 2010. Natural functions of bacterial polyhydroxyalkanoates. En: Guo-Qiang, C. (ed.) *Plastics from bacteria*. Springer. Berlin. pp. 39-61.
- Chen, G. 2010. Plastics completely synthesized by bacteria: Polyhydroxyalkanoates. En: Guo-Qiang, C. (ed.) *Plastics from bacteria*. Springer. Berlin. pp. 17-37.
- Chothia, C., A. M. Lesk. 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J.* 5(4):823-826.
- Coates, R. C., S. Podell, A. Korobeynikov, A. Lapidus, P. Pevzner, D. H. Sherman, E. E. Allen, L. Gerwick, W. H. Gerwick. 2014. Characterization of cyanobacterial hydrocarbon composition and distribution of biosynthetic pathways. *PloS One.* 9(1):1-12.
- Das, S., S. C. Mohapatra, J. T. Hsu. 1999. Studies on primer-dimer formation in polymerase chain reaction (PCR). *Biotechnol. Tech.* 13(10):643-646.
- Des Marais, D. J. Biogeochemistry of hypersaline microbial mats illustrates the dynamics of modern microbial ecosystems and the early evolution of the biosphere. 2003. *Biol. Bull.* 204(2):160-167.
- Dennis, D., M. McCoy, A. Stangl, H. Valentin, Z. Wu. 1998. Formation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *J. Biotechnol.* 64:177-186.
- Dillon, J. G., M. Carlin, A. Gutierrez, V. Nguyen, N. McLain. 2013. Patterns of microbial diversity along a salinity gradient in the guerrero negro solar saltern, Baja CA Sur, Mexico. *Front. Microbiol.* 20(4):1-13.
- Foong, C. P., N. Lau, S. Deguchi, T. Toyofuku, T. D. Taylor, K. Sudesh, M. Matsui. 2014. Whole genome amplification approach reveals novel polyhydroxyalkanoate synthases (PhaCs) from Japan Trench and nankai trough seawater. *BMC Microbiology.* 14(1):1-11.
- Fox, G. E., J. D. Wisotzkey, J. R. P. Jurtshuk. 1992. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 42(1):166-170.
- Franks, J., J. F. Stolz. 2009. Flat laminated microbial mat communities. *Earth-Sci. Rev.* 96(3):163-172.
- Galtier, N., M. Gouy, C. Gautier. 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Bioinformatics.* 12(6):543-548.

- García-Maldonado, J. Q., B. M. Bebout, R. C. Everroad, A. López-Cortés. 2015. Evidence of novel phylogenetic lineages of methanogenic archaea from hypersaline microbial mats. *Microb. Ecol.* 69(1):106-117.
- Gouy, M., S. Guindon, O. Gascuel. 2009. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27(2):221-224.
- Green, S. J., L. L. Jahnke. 2010. Molecular investigations and experimental manipulations of microbial mats: A view to paleomicrobial ecosystems. En: Seckbach, J., A. Oren. (ed.) *Microbial Mats: Modern and Ancient Microorganisms in Stratified Systems*. Springer. Berlin. pp. 183-206.
- Haritash, A., C. Kaushik. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard Mater.* 169(1):1-15.
- Hein, S., H. Tran, A. Steinbüchel. 1998. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two-component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that of anoxygenic purple sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.* 170(3):162-170.
- Heipieper, H., P. Martinez. 2010. Toxicity of hydrocarbons to microorganisms. En: Timmis, K. N., T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo. (ed.) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer. Berlin. pp. 1563-1573.
- Hernandez-Raquet, G., H. Budzinski, P. Caumette, P. Dabert, K. Le Ménach, G. Muyzer, R. Duran. 2006. Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the etang de berre (France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 58(3):550-562.
- Hitchins, A. D., A. J. Kahn, R. A. Slepecky. 1968. Interference contrast and phase contrast microscopy of sporulation and germination of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 96(5):1811-1817.
- Ingraham, J. L., O. Maaløe, F. C. Neidhardt. 1983. *Growth of the bacterial cell*. Sinauer Associates. EUA. 448p.
- Kalia, V. C., S. Lal, S. Cheema. 2007. Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: Horizontal gene transfer. *Gene.* 389(1):19-26.
- Kelly, D. P., F. A. Rainey, A. P. Wood. 2006. The genus *Paracoccus*. In: *The prokaryotes*. En: Dworkin, M., S. Falkow, E. Rosenberg, K.G. Schleifer, E. Stackebrandt (Ed.) *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. Springer. Berlin. pp. 232-249.

- Kim, H. W., M. G. Chung, Y. H. Rhee. 2007. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *J. Microbiol.* 45(2):87-97.
- Klatt, C. G., Z. Liu, M. Ludwig, M. Kuhl, S. I. Jensen, D. A. Bryant, D. M. Ward. 2013. Temporal metatranscriptomic patterning in phototrophic Chloroflexi inhabiting a microbial mat in a geothermal spring. *ISME J.* 7(9):1775-1789.
- 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. Bioengin.* 97(1):45-53.
- Koller, M., I. Gasser, F. Schmid, G. Berg. 2011. Linking ecology with economy: Insights into polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Engin. Life Scien.* 11(3):222-237.
- Kunin, V., J. Raes, J. K. Harris, J. R. Spear, J. J. Walker, N. Ivanova, C. von Mering, B. M. Bebout, N. R. Pace, P. Bork, P. Hugenholtz. 2008. Millimeter-scale genetic gradients and community-level molecular convergence in a hypersaline microbial mat. *Mol. Syst. Biol.* 4(198):1-6.
- Latisnere-Barragan, H., A. López-Cortés. 2012. Isolation of phaC gene from marine bacteria *Paracoccus homiensis* strain E33 by magnetic beads subtractive hybridization. *Ann. Microbiol.* 62(4):1691-1695.
- Laycock, B., P. Halley, S. Pratt, A. Werker, P. Lant. 2014. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progr. Polym. Scien.* 39(2):397-442.
- Ley, R. E., J. K. Harris, J. Wilcox, J. R. Spear, S. R. Miller, B. M. Bebout, J. A. Maresca, D. A. Bryant, M. L. Sogin, N. R. Pace. 2006. Unexpected diversity and complexity of the guerrero negro hypersaline microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5):3685-3695.
- Liebergesell, M., F. Mayer, A. Steinbüchel. 1993. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40(2):292-300.
- Liebergesell, M., A. Steinbüchel. 1993. Cloning and molecular analysis of the poly (3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38(4):493-501.
- Liebergesell, M., A. Steinbüchel. 1992. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. *The FEBS J.* 209(1):135-150.
- Linhart, C., R. Shamir. 2005. The degenerate primer design problem: Theory and applications. *J. Comput. Biol.* 12(4):431-456.

- López, N. I., M. J. Pettinari, P. I. Nickel, B. S. Méndez. 2015. Polyhydroxyalkanoates: Much more than biodegradable plastics. *Adv. Appl. Microbiol.* 93:73-106.
- 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(1):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. Microbiol. Biotechnol.* 26(1):109-118.
- Lynch, M. D., J. D. Neufeld. 2015. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nature Rev. Microbiol.* 13(4):1-13.
- Madison, L. L., G. W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(1):21-53.
- Maehara, A., K. Ikai, S. Ueda, T. Yamane. 1998. Gene dosage effects on polyhydroxyalkanoates synthesis from *n*-alcohols in *Paracoccus denitrificans*. *Biotechnol. Bioeng.* 60(1):61-69.
- Margulis, L., E. S. Barghoorn, D. Ashendorf, S. Banerjee, D. Chase, S. Francis, S. Giovannoni, J. Stolz. 1980. The microbial community in the layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico: Does it have Precambrian analogues? *Precambrian Res.* 11(2):93-123.
- Mata, J. A., J. Martínez-Cánovas, E. Quesada, V. Béjar. 2002. A detailed phenotypic characterisation of the type strains of *Halomonas* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 25(3):360-375.
- Matsusaki, H., S. Manji, K. Taguchi, M. Kato, T. Fukui, Y. Doi. 1998. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.* 180(24):6459-6467.
- Militon, C., D. Boucher, C. Vachelard, G. Perchet, V. Barra, J. Troquet, E. Peyretailade, P. Peyret. 2010. Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74(3):669-681.
- Mincer, T. J., M. J. Church, L. T. Taylor, C. Preston, D. M. Karl, E. F. DeLong. 2007. Quantitative distribution of presumptive archaeal and bacterial nitrifiers in Monterey bay and the north pacific subtropical gyre. *Environ. Microbiol.* 9(5):1162-1175.

Mirowsław, S., R. D. Pancost, L. Thomas, M. E. Tucker, S. M. Didi-Ooi, F. Whitaker. 2014. Holocene intertidal microbial mats of qatar and their implications for petroleum source rock formation in carbonate-siliciclastic-evaporite systems. IPTC: International petroleum technology conference: 1-10.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [citado 2017 Agosto 13]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Pearson, W. R. 2013. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 1(10): 1286-1292.

Powell, S. M., S. H. Ferguson, J. P. Bowman, I. Snape. 2006. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in antarctic soil during bioremediation. *Microb. Ecol.* 52(3):523-532.

Prieto, A., I. F. Escapa, V. Martínez, N. Dinjaski, C. Herencias, F. Peña, N. Tarazona, O. Revelles. 2016. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environ. Microbiol.* 18(2):341-357.

Revelo-Romo, D. M., M. V. Grosso, N. C. Moreno-Solano, D. Montoya-Castaño. 2007. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electr. J. Biotechnol.* 10(3):348-357.

Rothermich, M. M., R. Guerrero, R. W. Lenz, S. Goodwin. 2000. Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(10):4279-4291.

Ruiz, J. A., N. I. López, B. S. Méndez. *rpoS* gene expression in carbon-starved cultures of the polyhydroxyalkanoate-accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr. Microbiol.* 48(6):396-400.

Sabirova, J. 2010. Polyhydroxyalkanoates produced by hydrocarbon-degrading bacteria. En: Timmis, K. N., T. J. McGenity, J. R. van der Meer, V. de Lorenzo. (ed.) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer. Berlin. pp. 2981-2994.

Sheu, D., Y. Wang, C. Lee. 2000. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiol.* 146(8):2019-2025.

Sievers, F., A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Soding, J. D. Thompson, D. G. Higgins. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7(539):1-6.

- RStudio Team. 2015. RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Smith, C. J., A. M. Osborn. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67(1):6-20.
- Spear, J. R., R. E. Ley, A. B. Berger, N. R. Pace. 2003. Complexity in natural microbial ecosystems: The Guerrero Negro experience. *Biol. Bull.* 204(2):168-173.
- Sudesh, K., H. Abe, Y. Doi. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* 25(10):1503-1555.
- Sudesh, K., H. Abe. 2010. Practical guide to microbial polyhydroxyalkanoates. ISmithers. Reino Unido. 158p.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30(12):2725-2729.
- Teske, A., K. U. 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(4):1994-2007.
- Thompson, C. C., G. R. Amaral, M. Campeão, R. A. Edwards, M. F. Polz, B. E. Dutilh, D. W. Ussery, T. Sawabe, J. Swings, F. L. Thompson. 2015. Microbial taxonomy in the post-genomic era: Rebuilding from scratch? *Arch. Microbiol.* 197(3):359-370.
- Tsuge, T., M. Hyakutake, and K. Mizuno. 2015. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99:6231-6240.
- Van Gemerden, H. 1993. Microbial mats: A joint venture. *Mar. Geol.* 113:3-25.
- Villanueva, L., A. Navarrete, J. Urmeneta, R. Geyer, D. C. White, R. Guerrero. 2007. Monitoring diel variations of physiological status and bacterial diversity in an estuarine microbial mat: An integrated biomarker analysis. *Microb. Ecol.* 54(3):523-531.
- Vreeland, R. H. 2005. Halomonas. En: Whitman, W.B. (ed.) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Edición digital. EUA. pp. 1-20.
- Walter, P. D. 1970. Cytology of spore formation and germination. En: Woutera, V.I. (ed.) *Van Nostrand Reinhold Company*. Nueva York. pp. 303-327.

Waltermann, M., A. Steinbüchel. 2005. Neutral lipid bodies in prokaryotes: Recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *J. Bacteriol.* 187(11):3607-3619.

Wang, Q., C. T. Nomura. 2010. Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *J. Biosci. Bioen.* 110(6):653-659.

Wentzel, A., T. E. Ellingsen, H. Kotlar, S. B. Zotchev, M. Throne-Holst. 2007. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76(6):1209-1221.

11. ANEXOS

Anexo A. Protocolo térmico de los oligonucleótidos BAC8F y BAC1492R empleados para la amplificación del gen 16S ARNr del Dominio Bacteria.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	5	94	1
Desnaturalización	1	94	30
Alineamiento	1	58	
Extensión	1	72	
Extensión final	10	72	1

Anexo B. Protocolo térmico de los oligonucleótidos PHACGNF y PHACGNR empleados para la amplificación del gen *phaC* de bacterias Gram negativas.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	5	94	1
Desnaturalización	1	94	30
Alineamiento	1	54	
Extensión	1	72	
Extensión final	10	72	1

Anexo C. Protocolo térmico de los oligonucleótidos PHACGPF y PHACGPR empleados para la amplificación del gen *phaC* de bacterias Gram positivas.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	5	94	1
Desnaturalización	1	94	30
Alineamiento	1	50	
Extensión	1	72	
Extensión final	10	72	1



Anexo D. Mapa que muestra la posición y dirección de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *phaC1* de miembros del género *Pseudomonas*.

Anexo E. Protocolo térmico para la optimización y validación de los oligonucleótidos empleados para la amplificación del gen *phaC1* de bacterias del género *Pseudomonas*.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	5	94	1
Desnaturalización	1	94	30
Alineamiento	1	56, 58, 60, 62	
Extensión	1	72	
Extensión final	10	72	1

Anexo F. Protocolo térmico de los oligonucleótidos PHAC1F2 y PHAC1R1 empleados para la amplificación del gen *phaC1* de bacterias del género *Pseudomonas*. PCR anidado, ronda 1.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	5	94	1
Desnaturalización	1	94	30
Alineamiento	1	50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64	
Extensión	1	72	
Extensión final	10	72	1

Anexo G. Protocolo térmico de los oligonucleótidos PHAC1F1 y PHAC1R2 empleados para la amplificación del gen *phaC1* de bacterias del género *Pseudomonas*. PCR anidado, ronda 2.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	5	94	1
Desnaturalización	30 segundos	94	30
Alineamiento	30 segundos	50, 52, 54, 56	
Extensión	30 segundos	72	
Extensión final	7	72	1

Anexo H. Protocolo térmico de los oligonucleótidos del vector pJET 1.2.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	5	95	1
Desnaturalización	1	94	30
Alineamiento	1	60	
Extensión	1	72	

Anexo I. Protocolo térmico de los oligonucleótidos específicos del gen *phaC2* (Wang y Nomura, 2010).

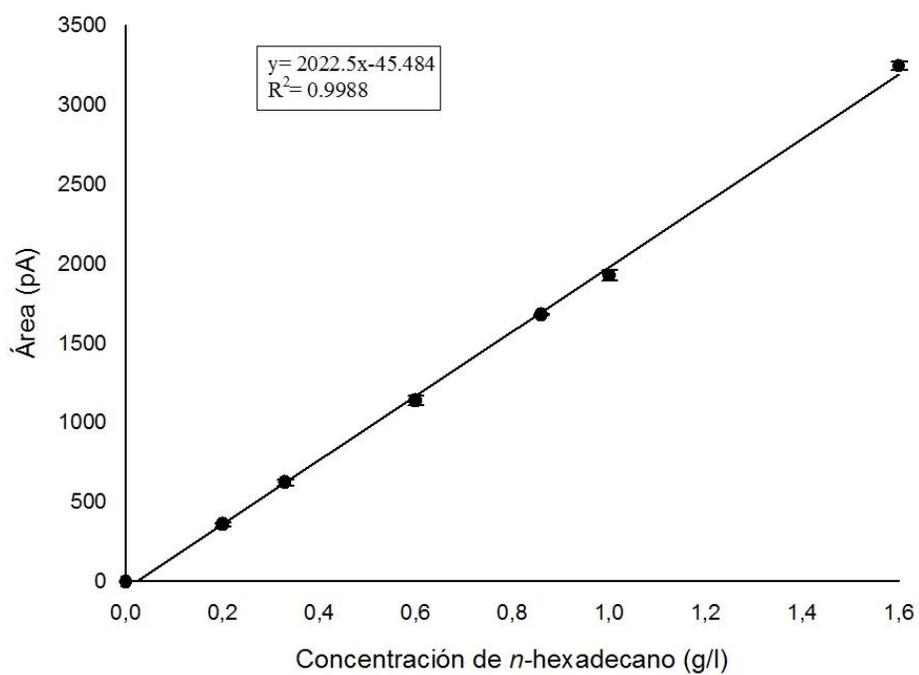
Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	2	94	1
Desnaturalización	40 segundos	94	40
Alineamiento	40 segundos	53	
Extensión*	40 segundos	72	
Extensión	8	72	

*Paso de adquisición

Anexo J. Protocolo térmico de los oligonucleótidos específicos del gen *alkB* (Powell *et al.*, 2006).

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	10	95	1
Desnaturalización	20 segundos	84	40
Alineamiento	20 segundos	50	
Extensión*	30 segundos	72	
Extensión*	15 segundos	77	

*Paso de adquisición.



Anexo K. Curva estándar de *n*-hexadecano. Las barras representan el error estándar.

Anexo M. Identidad del amplicón obtenido con los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *phaC1* de *Pseudomonas*.

Pareja evaluada	Identidad de secuencia	Longitud de secuencia (pb)	Porcentaje de similitud (%)
phaC1F1 y phaC1R1	<i>phaC2</i> de <i>P. putida</i> KT2440	738	100
phaC1F2 y phaC1R2	<i>phaC1</i> de <i>P. putida</i> KT2440	826	100

Anexo N. Cambios aminoacídicos resultado de sustituciones no-sinónimas a nivel de nucleótidos de secuencias del gen *phaC1* del género *Pseudomonas*, recuperadas de tapetes microbianos de ESSA A1 y ESSA A4. S=serina, L=leucina, Q=glutamina, R=arginina, F=fenilalanina, I=isoleucina, T=treonina, A=alanina, V=valina, K=lisina, E=ácido glutámico, G=glicina, H=histidina, P=prolina, W=triptófano.

Número de sustitución	Posición¹	Cambio aminoacídico²
1	45	S->L
2	46	Q->R
3	50	F->S
4	83	I->T
5	84	T->I
6	103	A->V
7	115	K->E
8	144	E->G
9	146	A->T
10	148	R->H
11	173	L->P
12	175	W->R
13	237	L->P
14	193	I->T

¹Posición de sustitución dentro del alineamiento de secuencias de aminoácidos, ²los cuadros grises indican cambios aminoacídicos a nivel de grupo con base en sus propiedades fisicoquímicas.

Anexo O. Identidad aproximada de secuencias de aminoácidos inferidas a partir de secuencias de nucleótidos de los genes *phaC* y *phaC1*, recuperadas de tapetes microbianos de ESSA A1 y ESSA A4.

Número de clona	Sitio	Identidad más cercana/Número de acceso en GenBank	Porcentaje de identidad (%)
1	ESSA A1	PHA sintasa clase I, <i>Woodsholea marítima</i> / WP_019961734.1	82
4	ESSA A1	PHA sintasa clase I, <i>Marivita hallyeonensis</i> / WP_072776758.1	94
2	ESSA A1	PHA sintasa, <i>Marinobacter</i> sp. DSM 26671/ SFE82661.1	97
5	ESSA A1	PHA sintasa, <i>Marinobacter</i> sp. DSM 26671/ SFE82661.1	99
7	ESSA A1	PHA sintasa clase I, <i>Tistlia consotensis</i> / WP_085122734.1	80
8	ESSA A1	PHA sintasa clase I, <i>Oceanicaulis</i> sp. HL-87/ WP_081891145.1	82
11	ESSA A1	PHA sintasa clase I, <i>Marivita hallyeonensis</i> DPG-28 / WP_072776758.1	96
13	ESSA A1	PHA sintasa clase I, <i>Rubrimonas cliftonensis</i> / WP_093247837.1	68
14	ESSA A1	PHA sintasa clase I, <i>Granulosicoccus antarcticus</i> / WP_088921818.1	69

16	ESSA A1	PHA sintasa, <i>Hyphomonas</i> sp. BRH_c22/ KJS39743.1	77
17	ESSA A1	PHA sintasa clase I, <i>Granulosicoccus antarcticus</i> / WP_088921818.1	68
18	ESSA A1	PHA sintasa clase I, bacteria de la familia Rhodobacteraceae/ WP_084860574.1	91
21	ESSA A1	PHA sintasa, <i>Gemmobacter</i> <i>aquatilis</i> , SEN82362.1	80
23	ESSA A1	PHA sintasa, <i>Rubrimonas</i> <i>cliftonensis</i> / SEB00608.1	85
56	ESSA A1	PHA sintasa clase I, <i>Cobetia</i> <i>amphilecti</i> , WP_064503336.1	98
71	ESSA A4	PHA sintasa clase I, <i>Citreimonas</i> <i>salinaria</i> , WP_089885123.1	87
79	ESSA A4	PHA sintasa clase I, <i>Skermanella</i> <i>sibiüresistens</i> / WP_084164931.1	74
98	ESSA A4	PHA sintasa clase I, <i>Acidisphaera</i> <i>rubrifaciens</i> , WP_084623775.1	69
107	ESSA A4	PHA sintasa clase I, <i>Henriciella</i> <i>marina</i> / WP_018147140.1	73
123	ESSA A4	PHA sintasa, bacteria no cultivada/ALB01203.1	67

131	ESSA A4	PHA sintasa clase I, <i>Azospirillum</i> <i>oryzae</i> , WP_085084697.1	80
-----	---------	--	----
