

**UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Informe Escrito Final

**Bioprospección de bacterias obtenidas de suelo y su aplicación potencial en la
producción de polihidroxicanoatos (PHAs)**

**Proyecto de graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biología con Énfasis en Manejo de Recursos Naturales**

Verónica Araya Chaves

Campus Omar Dengo, Heredia 2019

Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Manejo de Recursos Naturales

Grado Académico, nombre Presidente del Tribunal

Grado Académico, nombre Director de la Escuela de Ciencias Biológicas

Grado Académico, nombre Tutor(a)

Grado Académico, nombre Asesor(a)

Grado Académico, nombre Invitado(a) especial

Resumen

Los plásticos sintéticos ocasionan una grave problemática ambiental debido a que son muy resistentes y su degradación es muy lenta, por lo que se acumulan y persisten en el ambiente. Esto ocasiona la contaminación de cuerpos de agua y suelo y a su vez generan un impacto en los ecosistemas, viéndose afectados animales como peces, tortugas, aves y mamíferos acuáticos. Como alternativa, surgen los bioplásticos como los polihidroxialcanoatos (PHA) los cuales son más amigables con el ambiente. Estos son biopolímeros producidos por bacterias los cuales se acumulan en forma de gránulos en el citoplasma como reservorio de energía en condiciones estresantes. La síntesis y degradación de los PHAs es totalmente compatible con el ciclo del carbono y son llamados “polímeros doblemente verdes”, por su origen de fuentes renovables y al ser biodegradables. Lo que se pretende con el presente estudio es la búsqueda de cepas bacterianas que tengan la capacidad de producir este tipo de bioplásticos, para llevar a cabo el desarrollo de la fase preliminar en la producción de PHAs a nivel industrial. Se realizaron muestreos en suelos agrícolas para el aislamiento de bacterias con capacidad de producir PHAs. Por medio de la técnica de aislamiento y siembra en placa se lograron aislar y purificar 31 cepas bacterianas. Mediante microscopía de fluorescencia y cuantificación de PHAs se obtuvo que nueve de estos aislamientos tienen la capacidad de producir PHAs. A través de la identificación molecular utilizando el marcador genético 16S se logró identificar a nivel de género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Citrobacter* y *Serratia*. Estos presentan diferencias estadísticamente significativas en la producción de PHAs. Dentro del género *Bacillus* se presentan variaciones en cuanto al rendimiento y producción de PHAs, siendo la cepa PC3 la mayor acumuladora, inclusive por encima del control *Cupriavidus necator*. Por lo que la cepa PC3 produce PHA a niveles considerables, no obstante es importante el desarrollo de curvas de crecimiento y monitoreo de pH y oxígeno para optimizar la producción de PHAs tanto en esta cepa como en los demás aislamientos bacterianos relacionados filogenéticamente con el género *Bacillus* y *Pseudomonas*.

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar a mi tutor M.Sc Abad Rodríguez, académico e investigador de la UNA, por todo el apoyo brindado desde el inicio hasta el final de este largo proceso, por su dedicación tanto en los trámites administrativos como en la parte práctica, por su disponibilidad a ayudar, así fuera embarriarse en la cancha en busca de suelos agrícolas, así como las trabajadas full de domingos. Por sus palabras emotivas cuando las cosas no salían bien y por transmitirme el sentimiento de lucha y seguir adelante. Su gran apoyo fue clave para la culminación de esta investigación.

Agradecer a Ph.D Sergio Madrigal por permitirme realizar parte de este proyecto en las instalaciones del CENIBiot y a todo el equipo de Bioprocesos de este centro que estuvieron pendientes y anuentes a ayudarme con el proceso de inducción en la producción de PHB y las mediciones por microscopía de fluorescencia. Gracias Iray, Jessica, José y Lucho por sus consejos, por los días que tuvieron que extender su jornada laboral para poder terminar los análisis. Agradezco también a Roberto Bolaños (Bobby) y a Emmanuel Araya por ayudarme con la identificación molecular de las cepas bacterianas.

También agradecer a Vanny Mora investigadora del CITA, por sus sabios consejos en las metodologías del proyecto y por estar dispuesta a ayudar con cualquier situación o duda que se presentaba en el transcurso del proyecto.

A cada uno de los profesores de la UNA que aportaron su granito de arena con los análisis de esta investigación. A M.Sc. Ivan Sandoval por su disposición de trasladarnos a San Carlos para obtener las muestras de suelo. A M.Sc. Rodolfo Umaña por ayudarme con los análisis filogenéticos, a M.Sc. Oscar Ramírez y Dr. Meyer Guevara por su colaboración con los análisis estadísticos, a Lic. Nancy Villalobos y M.Sc. Carola Scholz por permitirnos trabajar en sus laboratorios inclusive en días no laborales. A M.Sc. Silvia Valverde por dejarnos realizar algunas pruebas del método espectrofotométrico en el laboratorio de fisiología animal. A Bach. Caliana Vargas, por ayudarme a realizar parte del proceso de la cuantificación de PHA. A Lic. Rolando Sánchez por su ayuda en los cálculos de la producción de PHAs.

Dedicatoria

A la persona que siempre ha estado ahí apoyándome en cada una de las etapas de mi vida, a la que vivió conmigo cada una de las emociones que se fueron presentando durante este proyecto, la persona más luchadora que he conocido, a la que le debo mis frutos profesionales y académicos y mi vida entera, a mi querida madre Doña Mariana Chaves, Te amo.

Índice

Miembros del tribunal	2
Resumen	3
Agradecimientos	4
Dedicatoria	5
Índice	6
Índice de tablas	8
Índice de figuras	9
Abreviaturas	10
1. Introducción	11
1.1 Antecedentes	13
1.1.1 Generalidades de los PHAs	13
1.1.2 Estructura y clasificación de los PHA	14
1.1.3 Síntesis de los PHA	14
1.1.4 Biodegradabilidad de los PHAs	18
1.1.5 Producción y principales productores de PHAs.....	19
1.1.6 Aplicaciones	21
1.2. Justificación	22
1.3. Objetivos	24
1.3.1. Objetivo general	24
1.3.2. Objetivos específicos	24
2. Metodología	24
2.1. Lugar de trabajo	24
2.2. Aislamiento y purificación de bacterias productoras de PHAs	25
2.2.1. Obtención de la muestra	25
2.2.2. Aislamiento y purificación.....	26
2.3. Capacidad de producción de PHAs en bacterias aisladas.....	27
2.3.1. Inducción de la producción de PHAs	27

2.3.2. Selección de bacterias con capacidad de acumular PHAs.....	28
2.3.3. Cuantificación de la producción de PHAs	29
2.3.4. Curva de calibración para la cuantificación espectrofotométrica de PHAs	31
2.4. Identificación molecular de las cepas bacterianas con capacidad productora de polihidroxicanoatos.....	31
2.4.1. Extracción de ADNg, protocolo de PCR convencional y secuenciación	31
2.4.2. Análisis bioinformáticos	33
3. Resultados	34
3.1 Aislamiento de bacterias productoras de PHAs.....	34
3.2 Selección de bacterias con capacidad de acumular PHAs	35
3.3 Cuantificación de la producción de PHAs	36
3.4 Identificación molecular de las cepas bacterianas con capacidad productora de polihidroxicanoatos.....	38
4. Discusión.....	39
5. Conclusiones.....	50
6. Recomendaciones.....	51
7. Bibliografía.....	51
8. Glosario.	60
9. Anexos.....	62
Anexo 1. Medio Mínimo Mineral de sales (MMS)	62
Anexo 2. Medio KS para inducción de PHB	62
Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN genómico en bacterias	63
Anexo 4. Curva de calibración.....	67

Índice de tablas

Cuadro 1. PHAs sintetizados por diferentes bacterias	15
Cuadro 2. Principales productores de PHAs en el mundo entre los años 2003-2010.....	20
Cuadro 3. Caracterización morfológica de aislamientos bacterianos obtenidos de suelos agrícolas.....	35
Cuadro 4. Cepas de bacterias aisladas de diferentes zonas de muestreo de suelos de plantaciones agrícolas.....	36
Cuadro 5. Comparación de variables de productividad entre PC3G y control CN2G <i>Cupriavidus necator</i> utilizando glicerol como fuente de carbono.	37

Índice de figuras

Figura 1. Biosíntesis de PHAs.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2. Biomasa de PHAs producida por diferentes aislamientos bacterianos obtenidos de suelos agrícolas, utilizando diferentes fuentes de carbono.....	37
Figura 3. Árbol filogenético de las cepas productoras de PHAs basado en el análisis de máxima verosimilitud.....	39
Figura 4. Curva de calibración utilizada para la producción de PHAs en aislamientos bacterianos obtenidos de suelos agrícolas.....	67

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
ANOVA	Analysis of Variance (Análisis de Varianza)
ARNr 16S	Ácido Ribonucleico Ribosomal sub unidad 16
cm	Centímetros
g	Gramos
g/L	Gramos/Litro
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
H	Horas
mL	Mililitros
NADH ⁺	Nicotidamina Adenina Dinucleótido reducido
nm	Nanómetros
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Revoluciones por minuto
μL	Microlitros
μg	Microgramos
UV/VIS	Ultravioleta/visible
C _{PHA}	Concentración de PHA
M _{PHA}	Masas de PHA
FC	Fuente de carbono
C _{FC}	Concentración de la fuente de carbono

1. Introducción

Durante los últimos años, se ha generado una problemática ambiental debido al uso indiscriminado de plásticos sintéticos. La incorporación de éstos en la vida cotidiana se debe a que están presentes en la gran mayoría de productos en el mercado y a su bajo costo, situación que ocasiona un descontrol en el uso de los mismos. Sin embargo, los plásticos convencionales presentan una serie de características que ocasionan su acumulación y persistencia en el ambiente. Dentro de estas están la resistencia a factores químicos, biológicos y a la corrosión y su proceso de degradación es muy lento debido a que pueden tardar hasta 500 años en degradarse. A su vez, al degradarse se generan partículas más pequeñas llamadas microplásticos, los cuales se van acumulando en los mares, playas, estuarios y ríos ocasionando la contaminación de cuerpos de agua y suelo (Almeida, 2010; Plastics Europe, 2015).

De la misma manera, estos polímeros sintéticos generan un impacto en los ecosistemas, debido a que en muchas ocasiones animales como peces, tortugas, aves y mamíferos acuáticos confunden los fragmentos de plástico que flotan en la superficie del océano con alimento. La captación de estos materiales por parte de los organismos marinos se puede producir por inhalación, vía dérmica, absorción o por ingestión, siendo esta última la forma más frecuente. Además, se ha reportado que el consumo de estas fracciones de plástico puede provocarles obstrucción gastrointestinal, ulceraciones, perforaciones internas y hasta la muerte (UNEP, 2016).

Otro de los problemas que presentan los plásticos convencionales, es que funcionan como transportadores de contaminantes hacia los cuerpos de agua, debido a que tienen la capacidad de arrastrar sustancias químicas tóxicas. Algunos compuestos con baja solubilidad en agua como los metales, bifenilos policlorados, diclorodifenil, dicloroetano y nonifenoles, se adhieren a los fragmentos de plástico y son transportados a los ambientes acuáticos, lo que ocasiona un aumento en la persistencia de este tipo de contaminantes (Elías, 2015).

Por las razones mencionadas, es importante investigar el desarrollo de nuevos materiales que tengan propiedades muy similares a los plásticos convencionales pero que sean más amigables con el ambiente. Una alternativa a esta problemática es producir polihidroxicanoatos (PHA), los cuales son polímeros que se acumulan en forma de gránulos en el citoplasma de las bacterias y que han sido investigados y utilizados para la producción de bioplásticos (Kourmentza et al., 2017; Muhammadi et al., 2015).

Con respecto a las ventajas que presenta la producción de bioplásticos mediante el uso de bacterias, es que se utiliza un recurso natural para la producción de un biopolímero, a diferencia de los plásticos convencionales los cuales provienen de recursos no renovables: los combustibles fósiles. Además, este tipo de bioplásticos evitan la contaminación generada por la acumulación de desechos, debido a que se ha reportado que existen muchos microorganismos que tienen la capacidad de degradarlos para a su vez obtener energía y nutrientes, en un período corto y sin generar fragmentos de plásticos, razón que los convierte en los únicos polímeros 100% biodegradables (Akaraonye et al., 2012; Vázquez et al., 2016).

Por su parte, la síntesis y degradación de los PHAs es totalmente compatible con el ciclo del carbono y son llamados “polímeros doblemente verdes”, por su origen de fuentes renovables y ser biodegradables. Por tal razón, la sustitución de los plásticos convencionales por bioplásticos, reduciría el efecto contaminante que ejercen los plásticos en el ambiente, debido a que podrían ser tratados como desechos orgánicos o bien ser eliminados en los rellenos sanitarios en períodos cortos de tiempo (Vázquez et al., 2016).

De esta manera, la importancia de este proyecto es que permitió el desarrollo de la fase preliminar en la producción de PHAs a nivel industrial, mediante la bioprospección de cepas bacterianas con capacidad de producir PHAs. Además, a pesar de que se han descrito varias cepas bacterianas con la capacidad de almacenar PHAs intracelularmente, no todas tienen el potencial de producirlo en grandes cantidades, por lo que este trabajo permitió contribuir al conocimiento actual de las bacterias productoras de PHAs a niveles considerables.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades de los PHAs

Los polihidroxicanoatos (PHAs), son una clase de poliésteres lineales hidrofóbicos, sintetizados y acumulados por una amplia variedad de bacterias y arqueas. Estos funcionan como reservorio de carbono y energía cuando hay un desequilibrio en las condiciones del medio, ocasionado por un exceso de fuente de carbono y falta de algún nutriente esencial. Los PHAs son producidos intracelularmente como gránulos citoplasmáticos con una capa superficial de proteínas y lípidos. En estos gránulos o carbonosomas, los PHAs se encuentran en un estado amorfo y fluido, pero cuando la capa proteica se daña o el PHA queda expuesto al medio extracelular, el polímero adopta una estructura parcialmente cristalina, llamada PHA desnaturalizado o dPHA (Mozejko & Kiewisz, 2016)

El primer PHA descubierto y el que ha sido más estudiado a lo largo de los años es el polihidroxi butirato (PHB) detectado en *Bacillus megaterium* en 1926 por Maurice Lemoigne. Este es un poliéster termoplástico de cadena corta, se acumula cerca de la membrana de las bacterias y representa el 80% del peso seco de la célula (Mohapatra et al., 2017).

Por su parte, uno de los primeros microorganismos que se utilizó para la producción de PHA a escala industrial utilizando glucosa como fuente de carbono fue una cepa mutante de *Ralstonia eutropha* conocida actualmente como *Cupriavidus necator*. Esta bacteria ha sido reportada como el microorganismo modelo para estudiar la síntesis de PHAs y optimizar su producción (Pérez et al., 2016). Además, tiene la capacidad de producir P (3HB) y el copolímero P (3HB-co-3HV) el cual ha sido utilizado por Industrias Químicas Imperio bajo el nombre de Biopol™. Su síntesis es regulada por tres enzimas: β -ketatiolaza (PhaA), reductasa acetoacetyl-CoA dependiente de NADPH (PhaB) y PHA polimerasa (PhaC) (Yousuf, 2017).

1.1.2 Estructura y clasificación de los PHA

Mediante diferentes estudios basados en la caracterización de los PHAs, se ha determinado que son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos que se caracterizan por tener el mismo monómero con diferente radical alquilo que varía de 1 a 14 carbonos. Dependiendo de la composición del monómero varían las propiedades mecánicas de éstos, por lo que pueden presentarse desde estructuras cristalinas duras hasta estructuras elásticas (Mozejko & Kiewisz, 2016).

Se clasifican en tres grupos:

- **PHAs de cadena corta (PHASCL):** van de 3 a 5 carbonos, son termoplásticos y sus características son muy similares a los plásticos sintéticos. No obstante presentan mucha rigidez y baja resistencia, lo que los pone en desventaja en comparación con los PHAs de cadena media.
- **PHAs de cadena mediana (PHAMCL):** Van de 6 a 14 carbonos y son considerados como elastómeros y cauchos.
- **PHAs de cadena larga (PHALCL):** Contienen más de 14 átomos de carbono en su porción monomérica (Gross & Mekala, 2018).

1.1.3 Síntesis de los PHA

Con respecto a la síntesis de los PHA, estos pueden obtenerse mediante procesos químicos y biológicos. Químicamente se obtienen a partir de lactonas y básicamente la polimerización consiste en utilizar catalizadores a base de zinc o aluminio para la apertura del anillo y catálisis enzimáticas para romper el anillo. Sin embargo este método casi no se utiliza debido a sus altos costos. En cuanto a la síntesis de PHAs por métodos biológicos, este se descubrió desde 1923 cuando Francés Maurice Lemoigne encontró que *B. megaterium* producía ácido 3-hidroxiбутírico (P3HB), por lo que tres años más tarde apareció el procedimiento donde se describía la obtención de este polímero utilizando bacterias (Yousuf,

2017). Al inicio se consideraba como un material lipídico pero en 1950 se descubrió que consistía de un material de tipo poliéster. Además se creía que las bacterias solo podían producir P3HB, pero en 1974 Wallen & Rohwedder lograron obtener 3HV y 3HHx en extractos de cloroformo (Gómez, 2013). A partir de ese momento y con el avance de los estudios relacionados en este campo se estableció que las bacterias podían producir una variedad de PHAs, tal como se muestra en la Cuadro 1.

Cuadro 1. PHAs sintetizados por diferentes bacterias

Bacteria	PHA producido	Sustrato específico
<i>Cupriavidus necator</i> (antes <i>Ralstonia eutropha</i>)	PHB y PHVB, P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-3HV-co-5HV), P(3HB-co-4HV-co-3HV), P(3HB-co-3HV-co-4HV)	---
<i>Azohydromonas lata</i> (antes <i>Alcaligenes lactus</i>)	PHB y PHVB, P(3HB-co-3HP), P(3HB-co-4HB),	---
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	P(3HB-co-3HV-co-3H4-pentanoato)	4-ácido pentenoico o ácido pentanoico
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Homopolímero P(3HV)	Valerato de sodio
<i>Delftia acidovarans</i>	P(3HB-co-4HB)	1,4-Butanodiol
<i>Methylobacterium</i>	P(3HB-co-4HB)	Metanol + 3-Hidroxi propionato
<i>Comomonas testosterone</i>	P(3HB-co-4-Hidroxiproato [HC]) P(3HB-co-3HC-co-3HO)	---
<i>Sphaerotilus natans</i>	P(3HB-co-3HV)	Glucosa + propionato de sodio

Tomado de Gómez (2013).

Los PHAs se producen por enzimas que se encuentran en el interior de las células bacterianas. Estas enzimas llamadas polimerasas o sintasas (debido a que son encargadas de la polimerización) se encuentran en la membrana fosfolipídica que rodea a los gránulos de PHA junto con las enzimas despolimerasas (encargadas de la despolimerización o degradación). La función de la PHA polimerasa es polimerizar los monómeros de (R)-hidroxialcanoil-CoA ((R)-HA-CoA), liberando una molécula de coenzimaA (CoA) (Ali et

al., 2018).

Existen muchos genes codificantes para las enzimas que están directa o indirectamente relacionadas con la síntesis de PHA, por lo que existen varias rutas metabólicas que las bacterias pueden utilizar para sintetizar el biopolímero. A través de varias investigaciones se ha determinado que existen ocho vías a seguir, siendo Acetil-CoA el componente clave para obtener (R)-hidroxialcanoil-CoA. Sin embargo la vía que utilice la bacteria va a depender de la maquinaria enzimática que posee y el sustrato utilizado, siendo los azúcares y ácidos grasos las fuentes de carbono más utilizadas. Básicamente las principales enzimas involucradas en la síntesis de PHAs son: phaA (β -cetotiolasa), phaB (acetoacetil-CoA reductasa), phaC (PHA sintasa), phaG (proteína transportadora de 3-hidroxiacil-acil Coenzima A transferasa), phaJ (enoil-CoA hidratasa), entre otras (Chen & Jiang, 2017).

Las rutas biosintéticas más conocidas son la degradación de carbohidratos, la degradación de ácidos grasos o β -oxidación y la biosíntesis de ácidos grasos (Fig. 1). En términos generales, la síntesis de PHAs de cadena corta se basa en la vía de degradación de carbohidratos a partir del cual se obtiene acetil-CoA y en donde se ven implicadas tres enzimas: β -cetotiolasa, acetoacetil-CoA reductasa y PHA sintasa (Ruta I). Esta ruta es la más conocida y es la que ha sido desarrollada por la bacteria *R. eutropha* (*C. necator*) para la producción de PHB. La síntesis de PHAs de cadena media se basa en las vías involucradas en el metabolismo de ácidos grasos. La ruta II utiliza la β -oxidación de ácidos grasos y la ruta III utiliza la biosíntesis de ácidos grasos para producir intermediarios que se convierten en monómeros, los cuales pueden polimerizarse y formar PHAs de cadena media (Chen & Jiang, 2017).

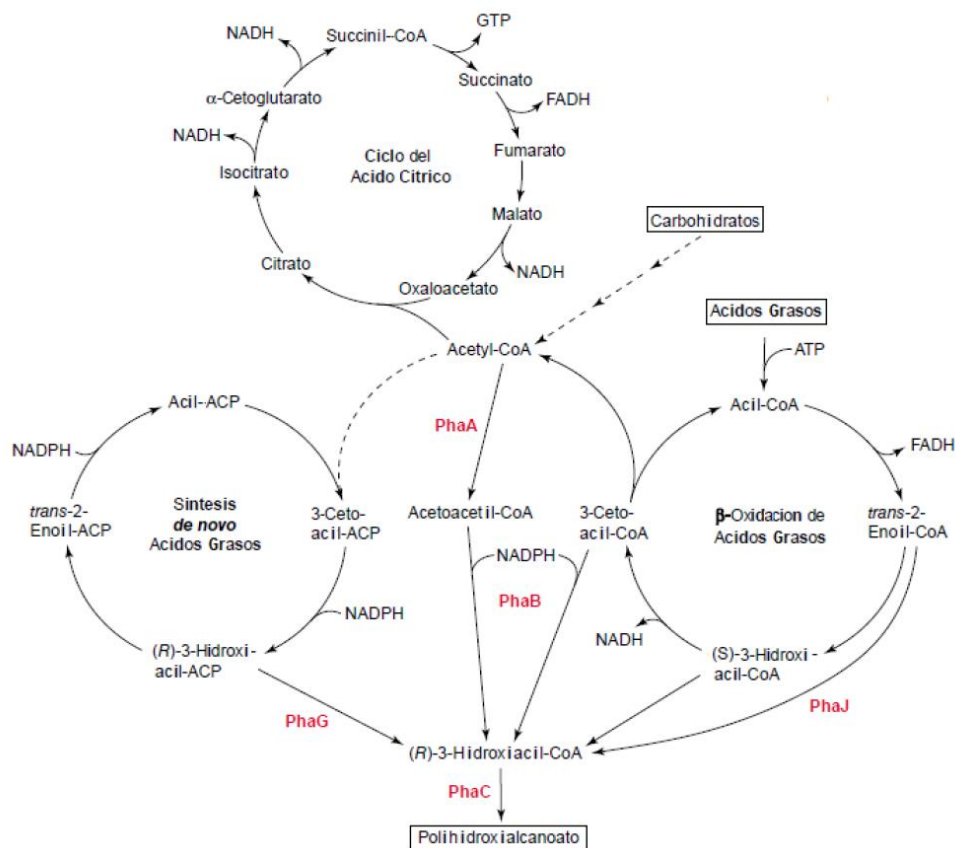


Figura 1. Biosíntesis de PHAs. Abreviaciones: PhaA, 3-cetotilasa; PhaB, (R)-3-cetoacil-CoA reductasa (para la biosíntesis de PHB, la enzima es acetoacetyl-CoA reductasa); PhaC, PHA sintasa o polimerasa; PhaG, (R)-3-hidroxiacil ACP: CoA transacilasa; PhaJ, (R)- específica enoil-CoA hidratasa. PhaC, específica para monómeros enantioméricos en la configuración [R]. Tomado de Gómez 2013.

No obstante cabe resaltar que las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de PHA compiten con las vías metabólicas que normalmente desempeñan las células como el ciclo de Krebs, la β -oxidación de ácidos grasos y la biosíntesis de ácidos grasos. Para la síntesis de PHAs es necesario cofactores como NADPH y metabolitos como el acetyl-CoA. Este último es el punto clave, debido a que la célula bacteriana lo puede utilizar como sustrato para producir PHAs o bien para la oxidación en el ciclo de Krebs. Esto está relacionado también con la limitación de nutrientes, debido a que generalmente la producción de PHAs se produce cuando se limita un nutriente esencial y se excede la fuente de carbono. Cuando

esto ocurre, el acetyl-CoA es dirigido hacia la síntesis de PHA, no obstante durante el crecimiento de la célula la Co-A libre inhibe la β -cetotiolasa, por lo que el acetyl-CoA es utilizado en el ciclo de Krebs (Tsuge et al., 2015).

1.1.4 Biodegradabilidad de los PHAs

En cuanto a la biodegradación de estos biopolímeros, se ha reportado que existe una gran variedad de microorganismos presentes en la naturaleza que tienen la capacidad de degradarlos. Dentro de estos están las Gram positivas, Gram negativas, actinobacterias y los hongos. El tiempo que duran en degradarse depende de la composición y estructura física del polímero, así como de las condiciones ambientales a las que sean expuestos. Se ha observado la degradación de los PHAs en ambientes marinos, salinos, aerobios, anaerobios, entre otros y se ha evidenciado que bajo condiciones aeróbicas pueden ser convertidos en dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) y en metano (CH_4) en ambientes anaeróbicos. También pueden ser sujetos a degradación térmica e hidrólisis enzimática o bien por la acción de las enzimas depolimerasas de las células bacterianas (Gross & Mekala, 2018; Muhammadi et al., 2015).

La degradación enzimática de PHAs puede implicar dos procesos diferentes: La degradación intracelular y extracelular de PHA. La primera es el proceso por el cual la célula acumuladora de PHA moviliza su reserva para crecer cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables tras un proceso de desequilibrio. Es realizada por PHA depolimerasas intracelulares, enzimas hidrolíticas asociadas a la superficie del gránulo de PHA. Mientras que la segunda, es un proceso por el cual un microorganismo, (no necesariamente productor de PHA), secreta PHA depolimerasas solubles para hidrolizar PHA que se encuentra presente en el medio como resultado de la lisis celular de bacterias productoras de PHA. A su vez, estos microorganismos degradadores utilizan los productos resultantes como fuente de carbono alternativa en ausencia de sustratos más adecuados (Almeida, 2010).

1.1.5 Producción y principales productores de PHAs

La producción de PHAs se logra cuando hay un exceso de la fuente de carbono y una limitación de los nutrientes esenciales como nitrógeno o fósforo en el medio de cultivo. Por esta razón, se considera una estrategia desarrollada por las bacterias para incrementar su supervivencia en condiciones de estrés y ambientes cambiantes (Cui et al., 2017).

Existen dos tipos de microorganismos capaces de producir PHAs, los microorganismos nativos, aquellos aislados de ambientes naturales y los microorganismos genéticamente modificados. Con respecto a los microorganismos nativos, aproximadamente el 30% de los aislados del suelo, lodos activados y de altamar tienen la capacidad de producir este compuesto. Dentro de los géneros reportados con capacidad de acumular PHAs están: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Aeromonas*, *Rhodobacter*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, entre otros (Gross & Mekala, 2018).

Sin embargo, no todos los microorganismos pueden acumular PHAs a nivel industrial debido a diversas desventajas a nivel biotecnológico tales como la cantidad de polímero producida, los tiempos de duplicación extensos, los tiempos de fermentación y la dificultad para lisarlas, lo cual complica el proceso de extracción del PHA (Verlinden et al., 2007). De esta manera la producción de PHAs depende del tipo de microorganismo, del sustrato utilizado y de la maquinaria enzimática del microorganismo (Ciesielski et al., 2010). Dentro de los microorganismos reportados que logran acumular PHAs en altas cantidades están *Bacillus megaterium*, *Alcaligenes latus*, *Alcaligenes eutrophus*, *Pseudomonas oleovorans*, *Azotobacter vinelandii* y cepas recombinantes de *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Alcaligenes eutrophus* (Rodríguez et al., 2018; Mozejko & Kiewisz, 2016).

Hasta ahora se ha logrado producir a nivel industrial los polímeros: ácido poli-3-hidrobutírico (P(3HB)), poli(3-hidroxi-*n*-butirato-*co*-3-hidroxi-*n*-valerato) (P(3HB-*co*-3-HV)) o poli(3-hidroxi-*n*-butirato-*co*-4-hidroxi-*n*-butirato) (P(3HB-*co*-4-HB)), poli(3-hidroxi-*n*-butirato-*co*-3-

hidroxihexanoato (P(3HB- *co*-3HHx) y PHAs de cadena mediana (Mozejko & Kiewisz, 2016). Por ejemplo PHB industrial S.A, Brazil utiliza *Bacillus sp*, la cual produce >90% de peso seco de P(3HB) al usar caña de azúcar como fuente de carbono, mientras que ETH, Switzerland utiliza *Pseudomonas putida* y ácidos grasos como fuente de carbono produciendo cerca del 60% de peso seco de mcl-PHAs (Aeschelmann & Carus, 2015). En el Cuadro 2 se presenta la situación mundial de la producción de PHAs entre los años 2003 y 2010.

Cuadro 2. Principales productores de PHAs en el mundo entre los años 2003-2010

Nombre del producto: PHA	Compañía	Sustrato	Precio (US\$/kg)	Producción (Ton/año)
Biomer®: P(3HB)	Biotechnoly Co., Alemania	Producción a pequeña escala	25 (2003) 17 (2004) 3,75 -6,25 (2010)	50 (2003)
Biocycle®: P(3HB)	PHB industrial S/A Company, Brazil	Caña de azúcar	12,5 -15 (2003) 3,12-3,75 (2010)	1400 (2003) 30-60000 (2010)
Biogreen®: P(3HB)	Mitsubishi GAS Chemical, Japon	Metanol	2,75 (2010)	10000 (2010)
Mirel™ : P(3HB)	Metabolix, Telles, US	Maíz, Azúcar	14 -17 (2004) 2,13 (2010)	50000 (2010)
Enmat®: PHBV, PHBV+Ecoflex blend	Tianan Biologic Material Co., Ltda. Ningbo, China	-	4,64 (2010)	10000 (2010)
Nodax™:PHBH	P&G, US	-	3,56 (2010)	20000-50000 (2010)
Nodax™: PHBH	Lianyi Biotech, China	-	5,27 (2010)	2000 (2010)

Tomado de Gómez (2013).

Cabe resaltar que para obtener altas productividades se necesita que los medios de cultivo mantengan una relación óptima entre las fuentes de carbono y los nutrientes esenciales. De

esta manera, si se realiza una limitación temprana de algún nutriente durante tiempos prolongados, se puede obtener como resultado una baja concentración celular y por ende rendimientos y productividad del polímero bajos (Cui et al., 2017).

A pesar de que los PHAs se descubrieron a inicios de la década de 1920, su elaboración a gran escala se ha visto limitada debido fundamentalmente a los altos costos de producción, el cual es más alto en comparación con los plásticos convencionales. Se estima que el costo de producción de PHB se encuentra entre US\$2.25–2.75/lb, de los cuales el 30-40% corresponde a la fuente de carbono, mientras que para los polímeros derivados del petróleo el costo se encuentre entre US\$0.60–0.87/lb (Singh et al., 2019). Además, se ha evidenciado que la producción rentable a escala industrial depende de varios factores como habilidad del microorganismo para emplear una fuente de carbono económica, velocidad de crecimiento y síntesis del polímero, costo del medio de cultivo, calidad y cantidad del PHA y el costo de los procesos subsiguientes para la producción del polímero (Koller et al., 2017).

Ante esta situación, actualmente la mayoría de investigaciones se basan en reducir estos costos, por lo que se han planteado soluciones como búsqueda de cepas nativas con capacidad de acumular mayores niveles de PHAs, utilizar fuentes de carbono de bajo costo como desechos agrícolas y subproductos industriales así como evaluar la capacidad del microorganismo para utilizar estas materias primas económicas. También algunos estudios se basan en mejorar los procesos de extracción y purificación de los PHAs, la evaluación de microorganismos genéticamente modificados, el uso de consorcios microbianos, y la variación en las estrategias del proceso fermentativo (en lotes, lotes alimentados y continuo) (Koller et al., 2017; Rodríguez et al., 2018).

1.1.6 Aplicaciones

Debido a las diferentes estructuras de los PHAs, su uso en el mercado varía, por lo que pueden ser utilizados en diferentes áreas como medicina, farmacia, cosméticos, agricultura, alimenticia, entre otras. Se ha demostrado que los PHAs son biocompatibles, es decir, no

producen efectos tóxicos en los organismos vivos, por esta razón han sido muy utilizados en diferentes aplicaciones médicas (Verlinden et al., 2007) como suturas quirúrgicas, parches de reparación del pericardio y del tabique auricular, tratamiento dental y maxilofacial, andamios para la regeneración de tejidos arteriales, injertos vasculares, válvulas cardíacas y como sistemas para la liberación controlada de fármacos y hormonas (Anjum et al., 2016).

Por su parte, en la industria de empaques se han utilizado para la fabricación de recipientes para cosméticos, botellas para bebidas, forros de pañales, vasos y cubiertos, espumas, fibras; en la industria alimentaria para empaques de alimentos (Álvarez, 2016). También se han utilizado para fabricar materiales de pesca, construcción e industria agrícola, así como para la eliminación de los contaminantes orgánicos liposolubles en el tratamiento de aguas residuales (Muhammadi et al., 2015).

1.2. Justificación

A medida que la sociedad se desarrolla, se incrementa exponencialmente la población mundial, lo que trae consigo una serie de impactos ambientales que se ven reflejados en dos aspectos: el agotamiento de los recursos naturales y el aumento de los desechos contaminantes. Este último aspecto se ve influenciado por los plásticos sintéticos, que al no ser biodegradables y ser resistentes a diversos factores, se vuelven persistentes en el ambiente ocasionando contaminación ambiental (Elías, 2015).

Como consecuencia a esta problemática, surgen diversas opciones con el fin de disminuir la contaminación. Una de estas es el reciclaje del plástico, sin embargo los materiales tienen un tiempo de vida útil por lo que sólo se pueden reciclar por un tiempo definido, esto ocasiona que los plásticos finalmente terminen desechándose en los rellenos sanitarios. Otra de las opciones que se ha implementado para no generar desechos es la incineración de los materiales, sin embargo ésta genera gases de efecto invernadero que incrementan la contaminación ambiental (UNEP, 2016).

Ante esta situación surge la producción de PHAs como alternativa a los plásticos sintéticos. Estos poliésteres presentan las mismas propiedades que los plásticos derivados del petróleo, pero presentan características que los pone en ventaja debido a que son biodegradables, biocompatibles y producidos por numerosas especies de bacterias. De esta manera el uso de estos biopolímeros abre un gran potencial en beneficio del ambiente, debido a que podrían reemplazarse los materiales de origen petroquímico, evitando la contaminación por acumulación de materiales recalcitrantes (Ali et al., 2018; Mozejko & Kiewisz, 2016)

En Costa Rica son pocos los estudios que se encuentran relacionados a la producción de PHAs a partir de microorganismos. Uno de los pocos centros de investigación enfocados en esta línea es el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) y el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la UCR, quienes trabajan de forma conjunta con 16 socios en un proyecto desarrollado por un consorcio europeo llamado biotransformación de biomateriales de frutas y hortalizas de la agroindustria (TRANSBIO). Una de las líneas de investigación de este proyecto es el desarrollo del polímero biodegradable PHB utilizando la bacteria *Ralstonia eutropha* (conocida actualmente como *Cupriavidus necator*) y jugo de banano como fuente de carbono.

Por lo tanto, la importancia del desarrollo de este proyecto es que permitió contribuir al conocimiento actual de las bacterias productoras de PHAs y a la obtención de bacterias con capacidad de producción PHAs a niveles considerables. De esta manera con esta investigación se logró la fase preliminar en la producción de PHAs a nivel industrial.

Cabe resaltar que esta investigación se encuentra enmarcada en el área del manejo activo de los recursos naturales, debido a que se da un aprovechamiento de los recursos, en este caso los microorganismos aislados de suelos, para el desarrollo de nuevos productos biodegradables, que reducen en gran medida el impacto a los ecosistemas. De esta manera, se da un equilibrio sostenible entre el uso del recurso natural y el beneficio que se obtiene de ese uso (Gómez, 2013).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de producción de polihidroxicanoatos en bacterias aisladas de suelo, para su potencial aplicación como plásticos biodegradable a través de fermentaciones con diferentes fuentes de carbono.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Aplicar técnicas microbiológicas para el aislamiento, purificación y caracterización de cepas bacterianas obtenidas a partir de diferentes muestras de suelo.
2. Determinar la capacidad productora de PHAs en bacterias aisladas mediante el uso de técnicas cualitativas y cuantitativas basadas en métodos de microscopía de fluorescencia y espectrofotométricos, respectivamente.
3. Identificar molecularmente, mediante el marcador genético 16S ARNr, las cepas bacterianas con mayor capacidad productora de polihidroxicanoatos.

2. Metodología

2.1. Lugar de trabajo

El desarrollo experimental de esta investigación se llevó a cabo en la Universidad Nacional (UNA), localizada en Heredia, Costa Rica y en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), ubicado en Pavas, San José, Costa Rica.

2.2. Aislamiento y purificación de bacterias productoras de PHAs

2.2.1. Obtención de la muestra

Los sitios de muestreo se seleccionaron de acuerdo a lo argumentado por diferentes autores, en el cual indican que los suelos agrícolas poseen limitaciones nutricionales. Esto ocasiona condiciones de estrés que les permite a las bacterias la acumulación y producción de PHAs (González et al., 2013; Gómez et al., 1996; Moreno et al., 2007, Rodríguez et al., 2018).

Las muestras de suelo se obtuvieron de tres sitios diferentes: una plantación de Piña (*Ananas comosus*), ubicada en Pital, San Carlos, Alajuela, Costa Rica (10°29'41.9"N 084°14'39.5"O), una plantación de banano (*Musa AAA*) localizada en Cahuita, Limón, Costa Rica (9°46'6.10"N 82°53'59.27"O) y una plantación de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) localizado en Jiménez, Cartago (9°53'41.81"N 83°44'52.68"O). Las visitas a los sitios de muestreo se realizaron el 9 de octubre 2015, 12 de octubre 2015 y 11 de noviembre 2015, respectivamente.

Para el caso de la plantación de piña se seleccionaron dos zonas de muestreo. A una de las zonas se le llamó desecho debido a que el suelo del terreno había sido sometido a un proceso de labranza y quedaban desechos de rastrojo seco (PD). La segunda zona contenía rastrojo de piña fresco y sin cortar (adherido al suelo) y se le llamó cultivo (PC). Para el caso de caña de azúcar se eligieron cuatro zonas: desecho (CD) en donde el suelo se encontraba con restos de caña seca, cultivo (CC), cachaza (CCH) y bagazo (CB). Mientras que para la plantación de banano se eligió solo el cultivo (BC) como zona de muestreo.

En cada una de estas zonas de muestreo se recolectó una muestra compuesta para esto se seleccionaron cinco puntos distintos de manera aleatoria. En cada punto se recolectaron 100 g de suelo a una profundidad de 10 cm, para obtener un total de 500 g. La muestra de suelo se almacenó en una bolsa estéril con su respectiva rotulación, se mantuvo a temperatura

ambiente hasta su almacenamiento a 4 °C durante 24 h previo a su procesamiento.

2.2.2. Aislamiento y purificación.

De la muestra de suelo se pesaron 10 g y se suspendieron en erlenmeyers de 250 mL que contenían 90 mL de Agua Peptonada Estéril (APE). Posteriormente, se agitaron a 120 rpm durante 30 min a temperatura ambiente, en un agitador orbital. Al finalizar, se agitaron en un vórtex por 30 s para asegurar una completa homogenización de las muestras.

Se realizaron los aislamientos por el método de dilución y siembra en placa. De esta manera, se hicieron diluciones seriadas en agua peptonada hasta 10^{-5} y se colocó un inóculo de 100 μ L de todas las diluciones en placas petri que contenían Medio Mínimo Mineral de Sales suplementado con glucosa al 20% (MMS) (Anexo 1). Las placas se inocularon por esparcido.

Las placas se dejaron en incubación durante 48 h a 30 °C, para obtener el crecimiento bacteriano. Posterior al tiempo de incubación, se seleccionaron por observación directa los diferentes morfotipos coloniales, a partir de estos se realizó el aislamiento y purificación de los consorcios bacterianos nativos. Se realizaron las resiembras necesarias en MMS hasta obtener cepas puras y se incubaron en las mismas condiciones de crecimiento descritas anteriormente. Para la caracterización de las cepas purificadas se evaluaron características físicas como color, aspecto, forma, superficie, borde y se realizaron tinciones de Gram.

Las cepas purificadas se enriquecieron en agar tripticasa de soya y se incubaron durante 48 h a 30 °C. Una vez obtenido el crecimiento bacteriano se almacenaron en refrigeración de 2 °C a 4 °C, para su posterior utilización en la inducción de la producción de PHA.

Las cepas enriquecidas se criopreservaron en tubos eppendorf de 1.5 mL que contenían caldo cerebro corazón al 30% de glicerol y se mantuvieron a -20 °C.

2.3. Capacidad de producción de PHAs en bacterias aisladas.

Para todo el proceso de producción de PHAs se utilizó *Cupriavidus necator* ATCC 17699 como cepa control, llamada de aquí en adelante como CN2. Esta bacteria fue donada por el CITA-UCR.

2.3.1. Inducción de la producción de PHAs

Se realizaron fermentaciones para cada una de las cepas purificadas y para la bacteria control, para esto se utilizó un medio líquido de inducción de PHA (Medio KS) (Khanna & Srivastava, 2005) (Anexo 2) suplementado con fuente de carbono. Para cada bacteria se utilizaron tres fuentes de carbono: Sacarosa 20g/L, lactosa 20g/L y glicerol 20g/L.

Inicialmente las bacterias se colocaron en condiciones para la producción de biomasa. Para esto se tomó una asada de la bacteria, se colocó en un Erlenmeyer que contenía 50 mL de TSB (BD Tryptic Soy Broth) y se incubó en agitación durante 24 h a 30 °C a 150 rpm en un agitador orbital. Esto se realizó por triplicado para cada cepa, de manera que se obtuviera biomasa para el proceso de inducción con las tres fuentes de carbono.

Una vez finalizado el tiempo de incubación en agitación, se transfirieron los 50 mL del cultivo a un tubo cónico de 150 mL y se centrifugó a 4000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con Medio KS + fuente de carbono, para luego colocar ese resuspendido en un Erlenmeyer que contenían 25 mL de Medio KS + fuente de carbono (Sacarosa, lactosa, y glicerol). Finalmente se incubaron en agitación durante 72 h a 30 °C a 150 rpm.

Transcurrido este tiempo de incubación se seleccionaron aquellas bacterias que tenían la capacidad de acumular PHAs, según se describe a continuación.

2.3.2. Selección de bacterias con capacidad de acumular PHAs

Para seleccionar las cepas productoras de PHAs, se desarrolló la técnica de tinción con sulfato de nilo azul A utilizando microscopía de fluorescencia. El sulfato de nilo azul A es una oxazina básica soluble en agua y en alcohol etílico. La forma oxazona se forma por la oxidación del Azul del Nilo A en solución acuosa y es soluble en lípidos neutros que se encuentran en estado líquido a la temperatura de coloración (Ostle & Holt, 1982). Debido a la naturaleza lipofílica de este colorante los gránulos de PHAs que se encuentran inmersos en el citoplasma de las células bacterianas se tiñen.

De esta manera, transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente 1.5 mL del cultivo bacteriano y resuspendió en agua destilada. De la suspensión se realizó un frotis el cual se tiñó con una solución acuosa de sulfato de nilo azul al 1% y se colocó en un horno de convección a 55 °C durante 10-15 min. Se realizaron lavados con agua destilada, ácido acético 8% durante un minuto y agua destilada nuevamente, y finalmente se visualizaron los frotis teñidos en un microscopio de fluorescencia Axio Scope. A1. El sulfato de nilo azul emite fluorescencia entre 570-580 nm, por lo que se tomó como resultado positivo si la bacteria se mostraba fluorescente (fluorescencia naranja), indicando la presencia de gránulos de PHAs. Este método permite analizar cualitativamente la producción de polímeros, debido a que la intensidad de la fluorescencia observada está directamente relacionada con la concentración del polímero en el interior de la célula (Bello et al., 2009).

Las fermentaciones de las bacterias que presentaron fluorescencia se procesaron para posteriormente utilizarlos en la cuantificación de PHAs. Para esto, se transfirieron las fermentaciones de KS + fuente de carbono a tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron a 4000 rpm, a temperatura ambiente durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se almacenó el pellet a -20 °C, hasta ser utilizado en el proceso de cuantificación.

2.3.3. Cuantificación de la producción de PHAs

La determinación cuantitativa de PHAs se realizó de acuerdo al método propuesto por Nordeste et al. (2010) con algunas modificaciones. Este método consiste en descomponer químicamente el polímero PHB en sus unidades monoméricas, las cuales luego van a ser convertidas en un compuesto que se puede medir por espectrofotometría. Esto se logra al hervir una muestra que contenga PHB con ácido sulfúrico concentrado, lo que ocurre es una reacción de deshidratación que convierte las unidades monoméricas del ácido hidroxibutírico en ácido crotónico. Éste último absorbe la radiación ultravioleta (UV) a 235 nm y aparece como un pico agudo en el espectro. De esta manera se ha determinado que la cantidad de radiación UV absorbida por el ácido crotónico es directamente proporcional a la cantidad de PHB presente en la muestra, por lo que este método se puede utilizar para cuantificar el PHB mediante un espectrofotómetro UV.

Se agregó 5 mL de TBS (Tris-buffered saline) 1X al tubo cónico que contenía pellet de la bacteria fluorescente y se resuspendió. De esta resuspensión se tomó una alícuota de 2 mL, se traspasó a un tubo de vidrio, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se agregó un volumen de 3 mL de hipoclorito de sodio al 24%, se homogenizó con ayuda de un vórtex y se incubó a 37 °C a 2500 rpm durante 1 h. Esto permite una completa digestión de los componentes celulares a excepción del PHB. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente, y se descartó el sobrenadante. Se realizaron lavados por duplicado con 10 mL de agua MiliQ, 9 mL de acetona y 9 mL de metanol. Se dejó evaporar el metanol en uno horno de convección a 80 °C durante 1 h. Seguidamente se agregó un volumen de 10 mL de cloroformo, se taparon bien los tubos y se colocaron en un horno de convección a 75 °C hasta que el PHB se disolviera. Se tomó 1 mL de esa suspensión por triplicado y se colocaron los tubos sin tapar en un horno de convección a 75 °C hasta que se evaporará el cloroformo. A cada tubo se le adicionó 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, se sellaron completamente y se colocaron en un horno de convección a 94 °C-96 °C durante 1 h, para una completa conversión del PHB a ácido crotónico, se dejó enfriar a temperatura

ambiente y se homogenizó en un vórtex.

Finalmente se determinó la absorbancia a 235 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Jasco V-730. Se utilizaron cubetas de cuarzo y ácido sulfúrico concentrado como blanco. La absorbancia de la muestra se utilizó en la ecuación de la curva estándar para determinar la concentración de PHA. En el anexo 5 se muestra la curva de calibración utilizada para realizar los cálculos de concentración de PHAs en las cepas bacterianas.

Con base a los valores de concentración obtenidos mediante la curva de calibración se realizaron los siguientes cálculos:

$$C_{PHA} \left(\frac{ug}{mL} \right) = \frac{(Abs + b)}{m} * \left(\frac{50}{3} \right)$$

Donde el factor $\frac{50}{3}$ corresponde a un factor de ajuste, derivado del procesamiento de la muestra, desde el proceso de fermentación hasta el proceso de cuantificación de PHAs.

$$Biomasa_{PHA} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{m_{PHA}(g)}{V(L)}$$

Donde

$$m_{PHA} = C_{PHA}(ugmL^{-}) * V(mL) * 10^{-6}$$

$$Rendimiento\ específico \left(\frac{gPHA}{gFC} \right) = \frac{m_{PHA}(g)}{FC(g)}$$

Donde

$$m_{PHA} = C_{PHA}(ugmL^{-}) * V(mL) * 10^{-6}$$

$$FC = C_{FC}(gL^{-}) * V(L)$$

2.3.4. Curva de calibración para la cuantificación espectrofotométrica de PHAs

Se pesó 0.01 g de PHB comercial ALDRICH CAS: 29435-48-1 en un tubo de vidrio al cual se le adicionaron 10 mL de cloroformo, se tapó y se calentó en baño maría a 65 °C - 70 °C hasta que la solución se aclaró. Esta corresponde a una solución stock de 1 mg/mL de PHB. Se tomó 1 mL de esta solución stock, se transfirió a un tubo de vidrio, se agregaron 9 mL de cloroformo, se calentó nuevamente a 65 °C - 70 °C durante 20 min y se agitó por último en un vortex. Esta corresponde a una solución 100 µg/mL PHB. De esta última solución patrón se tomaron alícuotas de 1000 µL (10 µg/mL), 800 µL (8 µg/mL), 600 µL (6 µg/mL), 400 µL (4 µg/mL), 200 µL (2 µg/mL), se depositaron en cinco tubos de vidrios y se calentaron a una temperatura de 40°C para evaporar el cloroformo. Una vez que todo el cloroformo se evaporó, se le agregaron a cada uno de los tubos 10 mL de H₂SO₄ y se colocaron dentro de un baño de agua en ebullición a 94 °C-96 °C por 20 min hasta lograr una completa conversión del PHB en ácido crotónico. Es importante asegurar que no entre humedad en los tubos y que la presión interna no sea muy alta (Nordeste et al., 2010)

Posteriormente, los tubos se enfriaron a temperatura ambiente y se mezclaron vigorosamente, para luego medir su absorbancia en un espectrofotómetro. Para esto se tomó aproximadamente 1ml de cada muestra, se depositó en una cubeta de cuarzo y se midió la absorbancia a 235 nm (pico característico del ácido crotónico).

2.4. Identificación molecular de las cepas bacterianas con capacidad productora de polihidroxicanoatos.

2.4.1. Extracción de ADNg, protocolo de PCR convencional y secuenciación

La identificación molecular de las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante la detección y amplificación de ARNr 16S utilizando la técnica de PCR (Park & Crowley, 2005). La extracción del ADN se realizó según lo indicado por Araya (2010) (Anexo 4). Para medir la concentración y el grado de pureza del ADN se utilizó un Nanodrop Thermo Scientific

Modelo 2000, para esto se colocó 1,5 μL de la suspensión de ADN extraído en el lector óptico del equipo y se midió la absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm. Además, se realizó un gel de agarosa al 1% con GelRed 1X en una cámara de electroforesis con 1X buffer TAE. Se cargaron 5 μL de ADN + 1 μL de loading buffer (Nucleic Acid Sample Loading buffer 5X, Biorad), y se utilizó 2.5 μL de Marcador de Peso Molecular (Generuler 1kb plus DNA ladder + Gel red, Fermentas).

La amplificación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en un termociclador AB Applied Biosystems utilizando las siguientes condiciones: 1 ciclo de 94 °C por 5 min, 10 ciclos touch-down de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s, 72 °C por 1 min, 20 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y finalmente 1 ciclo de 72 °C por 10 min. Cada reacción de PCR contenía: 10 μL de Master Mix Ready to Use Thermo Scientific, 7 μL de agua libre de ADNasas, 0.5 μL de primer reverse, 0.5 μL de primer forward y 2 μL de ADN. Los primers utilizados fueron 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Park & Crowley, 2005).

Una vez realizada la corrida de PCR, se realizó un gel de agarosa al 1% con GelRed 1X en una cámara de electroforesis con 1X buffer TAE (Tris-Acetate-EDTA). Se cargaron 5 μL de ADN + 1 μL de loading buffer (Nucleic Acid Sample Loading buffer 5X, Biorad), y se utilizó 2.5 μL de Marcador de Peso Molecular (Generuler 100 pb plus DNA ladder + Gel red, Fermentas).

Para la secuenciación todas las muestras se marcaron en dos direcciones por medio del Kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Primeramente se realizó una limpieza de los productos de PCR. Para esto se utilizó por cada reacción: 0.5 μL de Enzima Exol, 1 μL de Enzima Fast AP (Fosfatasa Alcalina) y 5 μL del producto de PCR. Se incubó a 37 °C por 15 min y luego a 85 °C por 15 min. Una vez limpios los productos de PCR se procedió a realizar la reacción de secuenciación por duplicado, de manera que una reacción se hizo para la hebra forward y otra reacción para la hebra reverse. Por cada reacción se utilizó: 1 μL de Ready Reaction Mix, 1.5 μL de Buffer RRM, 1 μL de Primer, 5 μL de agua libre de ADNasas

y 1.5 μL de producto de PCR limpio. La reacción se incubó durante 1 h. Seguidamente se realizó la purificación de la reacción de secuenciación con el kit de purificación BigDye® XTerminator™ (Applied Biosystems), para lo cual por cada reacción se utilizó: 22.5 μL de SAM solución, 5 μL de X terminator y 5 μL del producto de la reacción de secuenciación. Luego se colocaron en agitación a 30x100 rpm por 30 min y se centrifugaron a 15000 rpm en una microcentrifuga por 10 min. Finalmente, se dispensaron 10 μL de ADN en los pozos de microplacas y se realizó la secuenciación en un analizador genético automatizado 3130xl (Applied Biosystems), ubicado en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot). Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación fueron editados utilizando el programa DNA Baser v4.36.0.

2.4.2. Análisis bioinformáticos

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron analizadas mediante el programa en línea BLASTn (Altschul et al., 1990) disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), para realizar la respectiva identificación nucleotídica comparando cada secuencia editada con la base de datos de secuencias nucleotídicas almacenadas en la plataforma. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas utilizando el programa Geneious 5.6.7 entre las secuencias editadas de las cepas productoras de PHA con las secuencias reportadas en la base de datos del NCBI (GenBank) y se utilizó *Lactobacillus* como grupo externo. Se utilizó el MAFFT aligner, con el algoritmo G-INS-i y un scoring matrix de 100 PAM/k=2. Se realizaron bloques de 200 a 1200 pb (el total de alineamiento fue de 1559 pb) y se hizo un realineamiento con los bloques.

Además, se realizó un árbol filogenético para determinar el posicionamiento taxonómico de las secuencias obtenidas. Para esto se utilizó un algoritmo de máxima verosimilitud derivado del programa raxmlGUI v.7.4.2 (Stamatakis et al., 2005) bajo el modelo de sustitución nucleotídica GTRGAMMA, el cual se obtuvo mediante el programa jModelTest v2.1.10 (Darriba et al., 2012) bajo el criterio de información de Akaike (AIC) y mediante un análisis basado en 2000 repeticiones. Finalmente, el árbol se editó en el programa FigTree

v1.4 (Rambaut, 2009).

2.5 Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas en la biomasa de PHAs producida en cada una de las cepas. Los valores se ajustaron a Intervalos de Bonferroni. Para estos análisis se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XV. Para el diseño del gráfico se utilizó el programa R.

3. Resultados

3.1 Aislamiento de bacterias productoras de PHAs

Se obtuvieron un total de 31 aislamientos bacterianos de suelos agrícolas, de los cuales solo nueve se consideraron para el presente estudio, debido a que estos fueron los que se mostraron positivos en la producción de PHAs en las pruebas cualitativas y cuantitativas. La gran mayoría de estos aislamientos bacterianos corresponden a Bacilos Gram positivos, sin embargo la PD2 corresponde a un Coco Gram positivo. Cabe resaltar que la cepa PC3 fue el único aislamiento que presentó una forma y borde filamentoso (Cuadro 3).

Cuadro 3. Caracterización morfológica de aislamientos bacterianos obtenidos de suelos agrícolas.

Cepa	Color	Aspecto	Forma	Superficie	Borde	Gram	Morfología
PC3	Blanco tiza	Tiza-seco	Filamentosa	Convexa	Filamentoso	Positivo	Bacilos
PD2	Blanca crema	Cremosa opaca	Circular	Plana	Redondo	Positivo	Cocos
BC7	Blanca transparente	Opaco	Puntiforme	Plana	Redondo	Positivo	Bacilos
BC8	Blanca	Cremosa opaca	Circular	Plana	Redondo	Negativo	Bacilos
CD4	Crema-amarillo	Opaca con anillo	Circular	Plana	Redondo	Positivo	Bacilos
CD9	Crema amarillo	Opaca sin anillo	Circular	Plana	Redondo	Positivo	Bacilos
CD10	Amarillo	Cremosa	Circular	Plana	Redondo	Positivo	Bacilos
CC5	Transparente	Mucosa	Circular	Plano-convexa	Redondo	Negativo	Bacilos
CC6	Blanca	Cremosa	Circular	Plano-convexa	Redondo	Negativo	Bacilos

3.2 Selección de bacterias con capacidad de acumular PHAs

Se detectaron nueve aislamientos bacterianos como positivos para la acumulación de PHAs al emitir fluorescencia naranja con la tinción sulfato de nilo azul A. El cultivo en el que se presentaron la mayor cantidad de bacterias fluorescentes fue el de caña de azúcar. Por su parte con respecto al sustrato utilizado, se obtuvo que los nueve aislamientos bacterianos pueden utilizar el glicerol como fuente de carbono, mientras que ocho cepas bacterianas utilizan sacarosa y seis utilizan lactosa. Cabe resaltar que la cepa PC3 solo produce PHAs al

utilizar glicerol y que las cepas CD4 y CD10 no producen PHAs con lactosa (Cuadro 4).

Cuadro 4. Cepas de bacterias aisladas de diferentes zonas de muestreo de suelos de plantaciones agrícolas.

Plantación	Zona de muestreo	Cepa	Fluorescencia según fuente de carbono		
			Sacarosa	Lactosa	Glicerol
Piña	Cultivo	PC3			+
	Desecho	PD2	+	+	+
Banano	Cultivo	BC7	+	+	+
		BC8	+	+	+
Caña	Desecho	CD4	+		+
		CD9	+	+	+
		CD10	+		+
	Cultivo	CC5	+	+	+
		CC6	+	+	+
Control positivo		CN2	+	+	+

3.3 Cuantificación de la producción de PHAs

Se encontró que existe una diferencia estadísticamente significativa en la producción de biomasa en la cepa PC3 con un $P < 0.05$ (Fig. 2). La cantidad de polímero recuperada fue de 0.021 g/L (± 0.014) siendo el valor mínimo y 1.24 g/L (± 0.531) como valor máximo (Fig. 2). Por su parte, se obtuvo que la mayor cepa productora de PHAs es PC3 al utilizar glicerol como fuente de carbono (PC3G) (Fig. 2), presentando un rendimiento específico de 0.0621g PHA/g FC y una biomasa de 1.24 g/L (Cuadro 4). Además, PC3G mostró valores más altos en comparación con el control CN2G (*Cupriavidus necator* en glicerol como fuente de carbono) (Cuadro 5, Fig. 2).

Cuadro 5. Productividad de PC3G y control CN2G *Cupriavidus necator* utilizando glicerol como fuente de carbono.

Cepa	PC3G	CN2G
Concentración de PHA (ug/mL)	1242.28	873.42
Rendimiento específico (g PHA/g FC)	0.0621	0.044
Biomasa de PHA (g/L)	1.24	0.87

Con respecto a los otros aislamientos bacterianos, la biomasa producida presenta valores muy similares entre ellos pero por debajo de los encontrados en la cepa PC3 (Fig. 2). Además, se puede observar que en términos generales no existe una tendencia de preferencia hacia alguna de las fuentes de carbono. Sin embargo se muestra que BC7 produjo más PHAs con glicerol y CD10 produjo más PHAs con sacarosa.

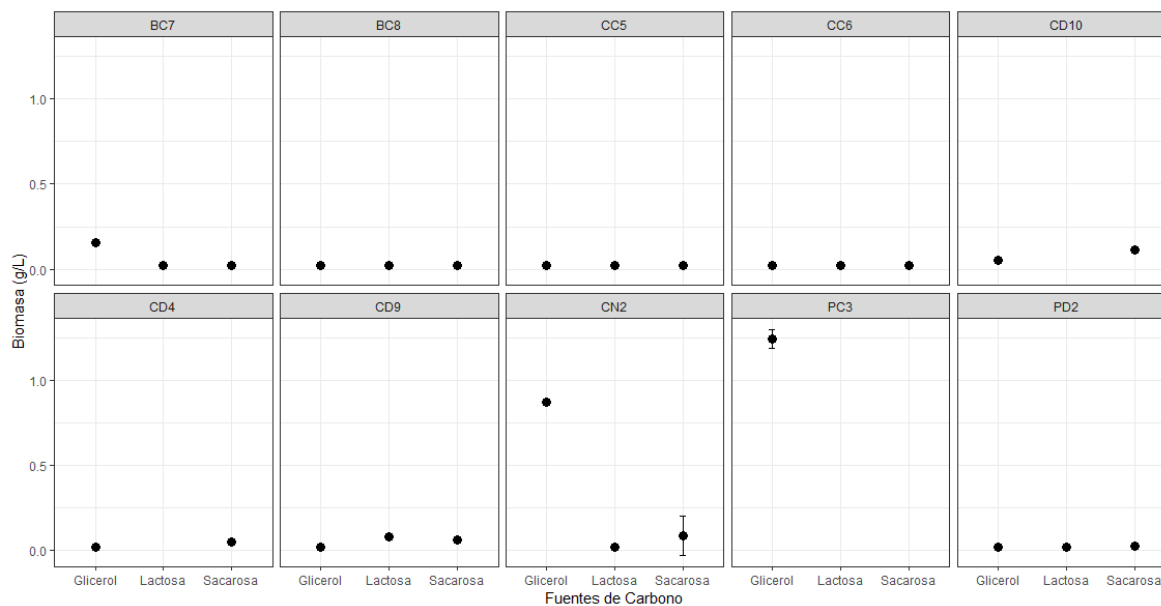


Figura 2. Biomasa de PHAs producida por diferentes aislamientos bacterianos obtenidos de suelos agrícolas, utilizando diferentes fuentes de carbono.

3.4 Identificación molecular de las cepas bacterianas con capacidad productora de polihidroxicanoatos.

De acuerdo al árbol de posicionamiento taxonómico se formaron siete agrupaciones o “clusters” (Fig. 3). La cepa BC8 se localiza en el primer grupo y se encuentra relacionada con las especies del género *Pseudomonas*. La cepa CC6 ubicada dentro del grupo dos se encuentra cercanamente relacionada a *Serratia marcescens*, mientras que la cepa CC5 se encuentra en el tercer grupo y está relacionada con especies del género *Citrobacter*. Por su parte, la cepa resultante como la mayor productora de PHA, la PC3, se ubica en el cuarto grupo y se encuentra relacionada con especies del género *Bacillus* y la cepa BC7 ubicada dentro del grupo cinco parece estar cercanamente relacionada con *Bacillus cereus*. La cepa PD2 se localiza en el grupo seis y parece estar relacionada con *Staphylococcus*, mientras que las cepas CD10, CD9, CD4 forman el último grupo y se encuentra relacionadas con el género *Bacillus*. De esta manera se muestra que en este trabajo los aislamientos bacterianos fueron identificados a nivel de género.

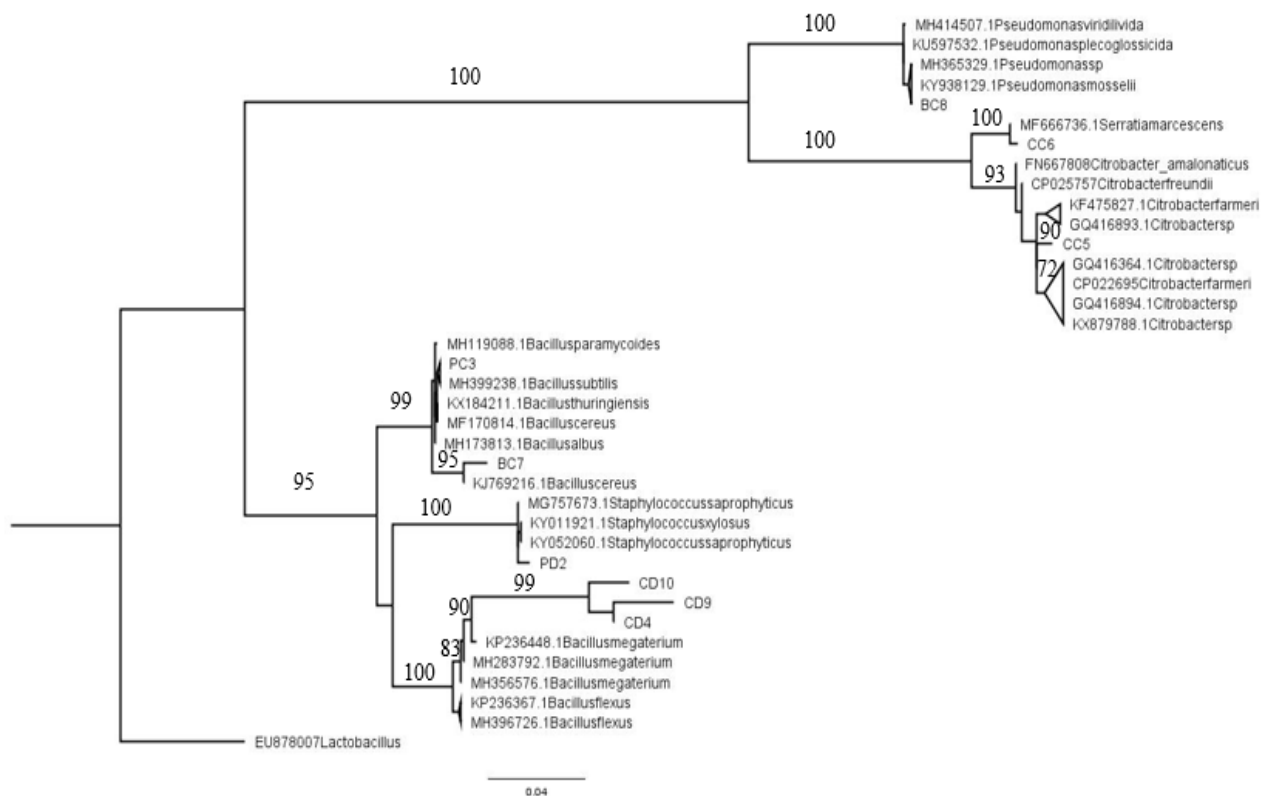


Figura 3. Árbol filogenético de las cepas productoras de PHAs basado en el análisis de máxima verosimilitud. La cifra en cada rama representa el soporte de “bootstrap”, generado a través de 2000 permutaciones. Los valores bootstrap menores a 70 no se muestran en la figura.

4. Discusión

En los últimos años se han estudiado muchos microorganismos que tienen la capacidad de producir PHAs, dentro de estos se encuentran las bacterias Gram positivas y Gram negativas (Rodríguez et al., 2018). A pesar de que en la literatura se reporta que la mayoría de bacterias que producen PHAs a escala industrial son las Gram negativas, en esta investigación la mayoría de aislamientos bacterianos que lograron acumular PHAs fueron Gram positivos.

Uno de los aislamientos bacterianos que es un bacilo Gram positivo y que presenta características morfológicas diferentes al resto de los aislamientos es la cepa PC3. Esta presenta una forma y borde filamentosos con un aspecto y color blanco tiza. Según Tortora et al. (2007), el crecimiento filamentosos representa una ventaja en ambientes tan competitivos como el suelo o lodos, debido a que les confiere una mejor relación superficie-volumen por lo que la captación de nutrientes se ve favorecida.

Aunque existen varios ambientes naturales en donde se han logrado aislar bacterias con capacidad productora de PHAs como mares, lodos y manglares (Muhammad et al., 2015), es en los suelos agrícolas donde se presenta el mayor número de aislamientos bacterianos. Estos últimos han sido los más utilizados por diferentes autores para el aislamiento de bacterias productoras de PHAs, debido a que poseen limitaciones nutricionales, lo que ocasiona condiciones de estrés que les permite a las bacterias la acumulación y producción de PHAs (González et al., 2013).

Con respecto a los suelos agrícolas de donde se aislaron las muestras en la presente investigación, la plantación de *Saccharum officinarum* fue donde se obtuvo la mayor cantidad de bacterias productoras de PHA. Estos resultados concuerdan con lo reportado en estudios anteriores, en donde la mayor cantidad de bacterias productoras de PHAs provienen de cultivos de caña de azúcar (González et al., 2013; Gómez et al., 1996; Moreno et al., 2007; Rodríguez et al., 2018). Por su parte, Moreno et al. (2007), mencionan que esto se debe a que los suelos de los cultivos de caña de azúcar mantienen niveles altos de carbono y niveles bajos de nitrógeno, por lo que como respuesta al estrés ocasionado por el desbalance de nutrientes, los microorganismos acumulan PHAs.

A pesar de que se han aislado varios microorganismos con capacidad productora de PHAs, muchos de estos no pueden ser considerados como productores a nivel industrial debido a que la capacidad de sintetizar PHAs es insuficiente. De esta manera, las investigaciones actualmente se basan no solo en la búsqueda de microorganismos que tengan la capacidad de

producir PHAs, sino que tengan la capacidad de producirlos en altas cantidades para su producción a gran escala (Naranjo, 2010).

Una de las bacterias que tiene la capacidad de acumular altas cantidades de PHAs es *Cupriavidus necator*, razón por la cual se utilizó como control (CN2) en esta investigación. El proceso de fermentación de esta bacteria es uno de los más efectivos, debido a que es capaz de sintetizar 76% de P(3HB) y 110 g/L del copolímero P(3HB-co-3HV) en un proceso de fermentación “fed batch” manteniendo las concentraciones de glucosa entre 10-20 g/L durante 50 horas de cultivo (Kim et al., 1994). Recientemente, el ácido oleico y 1-pentanol han sido utilizados para producir 66% de peso seco de P (3HB-co-3HV) de un nuevo aislamiento de *Cupriavidus sp* (Shantini et al., 2015). Por su parte Pérez et al., (2016), demostró que *C. necator* 293 DSM 545 alcanzó una concentración de PHB de 4.91 g/L y una productividad de 0.05 g/L.h en un fermentación tipo “batch” utilizando glicerol como fuente de carbono.

En el presente trabajo, la cepa catalogada como la mejor productora de PHAs utilizando glicerol como fuente de carbono es la PC3 (filogenéticamente relacionada con el género *Bacillus*), llegando a obtener valores por encima de los obtenidos por *Cupriavidus necator*. Esto se puede deber a que ambas cepas presentan condiciones de crecimiento y producción de PHA distintas. Esto ha sido reportado por Naranjo (2010) en un estudio en el cual compara la producción de PHB de *Cupriavidus necator* NCIMB 11842 con *Bacillus megaterium*; este autor menciona que existe una diferencia marcada en la velocidad de crecimiento y en los tiempos de fermentación entre cada microorganismo.

Para el caso de *C. necator*, la fase de latencia se presenta entre las horas 0-69 h, la fase exponencial se observa a partir de la hora 69 hasta la hora 130 y de ahí en adelante se registra una fase estacionaria. El tiempo de fermentación total fue de 140 horas con una concentración final de biomasa de 9.42g/l. Mientras que para *B. megaterium*, la fase de latencia se presenta entre las horas 0-4, la fase exponencial se observa a partir de la hora 4 hasta la hora 27 y de ahí en adelante se registra una fase estacionaria. El tiempo de fermentación total fue de 45

horas y alcanzando una concentración de biomasa de 5.7g/l.

De esta manera el autor postula que existe una diferencia en los tiempos de fermentación y que *C. necator* requiere tiempos de fermentación más largos, ya que mientras que *C. necator* alcanza su mayor productividad de 0.0682 g de PHB/l*h en 140 h utilizando 20 g/L de glicerol, *B. megaterium* alcanza una máxima productividad de 0.0248 g de PHB/l*h a las 45 h utilizando la misma concentración de glicerol. Además, menciona que la hora de inicio de producción de PHB para *C. necator* es a las 116 h mientras que para *B. megaterium* es a las 10 h.

Esto podría explicar el hecho de que la cepa PC3 presenta valores más altos de concentración, rendimiento específico y biomasa en comparación a *C. necator*, debido a que el tiempo de fermentación en la presente investigación fue de 72 h y como se menciona anteriormente *C. necator* requiere de tiempos de fermentación más largos para lograr obtener una mayor producción cuando se utiliza glicerol como fuente de carbono. De esta manera el tiempo de fermentación utilizado en la presente investigación favoreció a la cepa PC3 en la producción de PHAs, al obtener una mayor cantidad de PHAs en comparación a *C. necator* y a las demás cepas.

Por otro lado, se obtuvo que una gran parte de las cepas productoras de PHAs corresponden al género *Bacillus*. Las especies del género *Bacillus* se han convertido en organismos modelo en la industria debido a que presentan una serie de características que los ponen en ventaja en comparación con otros microorganismos. Dentro de estas están su estabilidad genética, presentan una mayor tasa de crecimiento en comparación con otras bacterias, la ausencia de lipopolisacáridos en su capa externa hace que la extracción de PHAs sea mucho más sencilla, por lo que es de gran ventaja en la producción de PHA, son capaces de producir PHAs mediante fuentes de carbono de bajo costo, tienen la capacidad de segregar una cantidad de enzimas hidrolíticas que pueden utilizarse en la industria para diferentes fines lo que permite compensar los costos de producción de PHAs (Mohapatra et al., 2017).

No obstante el principal inconveniente que presenta este género para la producción de PHAs es su naturaleza esporulante, debido a que tanto la esporulación como la formación de los gránulos de PHAs se producen cuando existen condiciones de estrés. De esta manera, algunas investigaciones se han basado en inhibir la esporulación manteniendo condiciones de pH ácido y deficiencia de potasio, estas estrategias no solo inhiben la formación de esporas en *Bacillus* sino que también pueden mejorar la productividad de los PHA (Mohapatraa et al., 2017).

Investigaciones previas han reportado que existen varias especies del género *Bacillus* con capacidad de acumular PHAs. Dentro de estas se encuentran: *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *B. sphaericus*, *B. circulans*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. mycoides*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B.* y *thuringiensis*. Además, se han caracterizado por sintetizar diferentes homo y copolímeros tales como P(3HB), P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx), P(3HB-co-4HBco-3HHx), P(3HB-co-6HHx-co-3HHx) (Katircioglu et al., 2003; Porwal et al., 2008; Rodríguez et al., 2018). No obstante en esta investigación solo se logró la identificación molecular a nivel de género, por lo cual sería importante ampliarla a nivel de especie utilizando otro marcador molecular diferente al 16S.

Se ha reportado que el género *Bacillus* es un grupo muy heterogéneo y que existe una variación en los niveles de PHAs producidos según la subespecie (Shrivastav et al., 2010). Esto se logró evidenciar en esta investigación debido a que las cantidades de PHAs producidas varían dentro del mismo género *Bacillus*. Además, de acuerdo a varios autores, la producción de PHAs depende del tipo de microorganismo, del metabolismo del mismo, e inclusive las curvas de crecimiento de un microorganismo del mismo género pueden presentar diferencias de una especie a otra. Se ha reportado que la acumulación de PHAs depende de los genes involucrados en las rutas biosintéticas de PHA, por lo que la presencia de una clase u otra de PHA sintasa dependerá del tipo de microorganismo del que se trate. En un estudio realizado por Kihara et al. (2017), se determinó que tanto *B. cereus* y *B. megaterium* acumulan PHAs, pero el grupo de genes *pha* que codifican para proteínas implicadas en la biosíntesis de este biopolímero son diferentes. De los siete genes del grupo

pha que analizaron, cinco presentaron homología entre *B. cereus* YB-4 y *B. megaterium* (*pha*RYB4, *pha*BYB4, *pha*CYB4, *pha*QYB4 y *pha*PYB4), sin embargo ORF1 y *pha*JYB4 no se encontraron en *B. megaterium*. Esto puede explicar las variaciones en las concentraciones de PHAs en las diferentes cepas que fueron relacionadas filogenéticamente con el género *Bacillus*, de manera que al tener diferentes proteínas implicadas en la biosíntesis de PHAs se van a presentar variaciones en la acumulación de PHAs.

Por otra parte, se ha demostrado que la mayor producción de PHAs se produce al cabo de las 72 horas, razón por la cual las mediciones cualitativas y cuantitativas se realizaron durante este tiempo en esta investigación. Además, según algunos estudios, las primeras 24 h funcionan para inducir la producción de biomasa y es en la fase estacionaria a las 72 horas donde se da una mayor producción del biopolímero (González et al., 2013). De acuerdo a Rojas (2006), cuando no existe crecimiento bacteriano (fase estacionaria) debido a la ausencia total de nitrógeno en el medio, la cantidad de carbono excedente es utilizada en la síntesis de PHAs.

No obstante, cabe resaltar que existen algunas cepas bacterianas que presentan una mayor acumulación de PHAs durante la fase exponencial. En un estudio realizado por González et al. (2013), la concentración final de PHB a las 72 horas varía según la especie. Este autor reporta que *Pseudomonas aeruginosa* presenta una concentración de 45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en su pico máximo a las 72 horas, mientras que para *P. pseudomallei* al cabo de las 72 horas la concentración es muy baja, llegando a 8.15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. De igual manera la concentración final varía en *P. cepacia*, presentando una mayor concentración de PHAs a las 48 h (168 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Adicionalmente, de acuerdo a una curva de crecimiento realizada para *P. pseudomallei* se obtuvo una concentración superior de PHAs de 85 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ durante fase de crecimiento a las 24 h, sin embargo a las 72 horas vuelve a aumentar tanto la concentración celular y PHAs (42.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), no obstante esta concentración es baja en comparación a la obtenida a las 24 h. Esto refleja el hecho de que existen algunas cepas que producen una mayor concentración de PHAs durante la fase exponencial, por lo que las bajas concentraciones obtenidas en este estudio para la cepa BC8 relacionada filogenéticamente con el género *Pseudomonas*, puede

deberse a que la cepa aislada de esta investigación no le favorece una mayor producción a las 72 horas.

Lo anteriormente mencionado también ha sido reportado por Durner et al. (2001) y Klinke et al. (2000), quienes reportan que algunas especies del género *Pseudomonas* acumulan PHAs durante el crecimiento exponencial. Rojas et al. (2006) explican que en esta fase, la disponibilidad de carbono intracelular se realiza por la ruta metabólica Entner-Doudoroff (EDP), ya que la ruta oxidativa de las pentosas fosfato no está activa y las reacciones para la generación de Ribosa-5-fosfato (R5P) participan de acuerdo al sentido inverso de la ruta pentosa fosfato (PP). De esta manera el flujo de Acetil-CoA se dividen en tres fracciones: síntesis del polímero, síntesis de citrato en ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT) y en las rutas anabólicas (involucradas en la construcción de aminoácidos, lípidos, etc). En este esquema, la fracción mayor de Acetil-CoA es utilizada para la generación de PHAs, lo cual disminuye el flujo hacia el ciclo CAT y hacia las rutas anabólicas que lo consumen.

Es importante mencionar también que a lo largo de varias investigaciones se ha demostrado que el tipo de fermentación y la limitación de nutrientes varía de un género a otro, por lo que este es un punto clave para obtener un mayor porcentaje de acumulación de PHAs. Varios autores han determinado que para el caso de *Cupriavidus necator* las mayores concentraciones de PHAs se obtienen al utilizar una fermentación en lote alimentado (Fed-Batch) con altas concentraciones de fuente de carbono y baja concentraciones de nitrógeno (Cavalheiro et al., 2009; Lee et al., 2008; Schmidt et al., 2016). Además Shantini et al. (2015) menciona que la fermentación mediante “fed-batch” resulta en un incremento de 200% en la productividad. Cavalheiro et al. (2009) obtuvo 51.2 g/L de P (3HB) utilizando glicerol comercial como fuente de carbono y nitrógeno ((NH₄)₂SO₄) como factor limitante. El mismo autor obtuvo 38.1 g/L de P (3HB) al utilizar un desecho de glicerol obtenido de una planta productora de biodiesel y nitrógeno como limitante.

En cuanto a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* según diversos estudios se ha

determinado que el proceso fermentativo que más les favorece es la fermentación discontinua o “batch”. Para el caso de *Pseudomonas* algunos autores realizan una limitación de nitrógeno en la fermentación mientras que otros no consideran estas condiciones limitantes. Por ejemplo Gumel et al. (2014) reportan porcentajes de acumulación de PHAs de 49.7-68.9% (10.12-15.45 g/L) en *P. putida* al utilizar ácidos grasos como fuente de carbono y nitrógeno como limitante. Mientras que He et al. (1998) con *P. stutzeri* al utilizar glucosa como fuente de carbono sin limitación de nitrógeno obtuvo un 52% de acumulación de PHA. Por su parte algunos autores han utilizado decanoato (nitrógeno como limitante) (Hori et al., 2002), ácido terephatalico (nitrógeno como limitante) (Kenny et al., 2008) y ácido 10-undecinoico (sin limitación de nitrógeno) (Kim et al., 2000) como fuente de carbono obteniendo porcentajes de acumulación de PHA de 23%, 27% y 1.8-37.4% respectivamente, en diferentes cepas de *P. putida*. Por su parte, Khandpur et al. (2012) obtuvo un 60% de acumulación de PHA en *P. aeruginosa* al utilizar bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono y sin limitación de nitrógeno.

Con respecto al género *Bacillus*, López et al. (2012) obtuvieron que al comparar la fermentación discontinua (Batch) y fermentación en lote alimentado en *B. megaterium*, la primera favorece la acumulación de PHB, al obtener un 59% en comparación al lote alimentado (Feed-batch) donde se obtuvo un 29% de acumulación de PHB. Además los mismos autores evaluaron el efecto de la limitación de nutrientes, encontrando que cuando hay una mayor proporción de carbono a nitrógeno ocasiona una menor acumulación de PHB, en comparación a cuando no existe un desbalance de nutrientes. Kulpreecha et al. (2009) obtuvieron en *B. megaterium* utilizando melaza de caña de azúcar un 62% de acumulación de PHB en una fermentación discontinua o Batch, mientras que este porcentaje bajó a un 42% cuando realizaron el proceso con limitación de nutrientes.

La fermentación en lote alimentado o Fed-batch es capaz de desencadenar dos etapas metabólicas diferentes necesarias para acumular altos niveles de PHB: crecimiento celular equilibrado con baja biosíntesis de biopolímeros, seguida de una alta biosíntesis de PHB sin producción de biomasa residual. Sin embargo, para el caso de las especies de *Bacillus*, es

típico encontrar resultados opuestos, debido a que la energía normalmente utilizada para producir PHB también se emplea para la formación de esporas, lo que resulta en una disminución de la síntesis de PHB cuando se imponen estas condiciones limitantes (López et al., 2012). De esta manera se ha demostrado que en el caso del género *Bacillus* la limitación de nutrientes en las fermentaciones inducen la formación de esporas y por tanto una baja productividad de PHB.

Cabe resaltar también que existen varios factores que pueden afectar la producción de PHAs, dentro de ellos se encuentra el pH. Según Gómez et al. (1996), el pH ideal que favorece tanto el crecimiento como la acumulación por bacterias productoras de PHAs es de 7.0, razón por la cual se ajustó este valor en los medios de cultivo para la acumulación de PHA. Sin embargo, algunos estudios demuestran que el pH varía durante las fases de crecimiento y que un descenso en el mismo puede repercutir en la formación de PHAs. Se ha determinado que este descenso puede ser atribuido tanto al consumo de los iones de amonio como al metabolismo de los ácidos grasos libres provenientes de la ruptura de los triglicéridos por acción de las lipasas bacterianas (González et al., 2013). No obstante en un estudio realizado por Ávila (2007), se determinó que la cepa *P. putida* IPT 046 acumula PHAs en cantidades considerables a pesar de presentar un descenso en el pH, probablemente debido a que las PHA sintasas en este linaje actúan bajo un pH más ácido, lo que favoreció la producción del polímero en mayores cantidades. De esta manera, esto demuestra que posiblemente las bajas concentraciones de PHAs obtenidas en las cepas bacterianas se pueden deber a una variación en las PHA sintasas y que a su vez el pH puede influir en el funcionamiento de las mismas.

Otro de los factores que puede influir en la acumulación de PHAs es el nivel de oxígeno. Lasala et al. (2004) menciona que las bajas concentraciones de PHAs pueden deberse a una oxigenación elevada, que desvía el metabolismo hacia cuotas de respiración más altas, mayor oxidación del sustrato y por tanto menor disponibilidad de Acetil-CoA, sustrato requerido para la producción de PHAs. Por lo tanto, cuando existen bajos niveles de oxigenación y exceso de fuente de carbono, el metabolismo energético genera elevadas concentraciones de

NADH⁺ y Acetil-CoA que deben ser convertidos en formas osmóticamente neutras que no afecten el balance redox de la célula y esto conlleva a la síntesis de PHAs.

En relación a las fuentes de carbono utilizadas en esta investigación, se mostró que no existe una tendencia de preferencia hacia una de las fuentes de carbono utilizadas. Sin embargo se mostró que dependiendo de la cepa bacteriana, va a producir más PHAs de acuerdo a la fuente de carbono utilizada o como el caso de la cepa PC3 que solo produce PHAs al utilizar glicerol como fuente de carbono. Se ha reportado que dependiendo del tipo de microorganismo, de la ruta metabólica y de la maquinaria enzimática de las bacterias, va a favorecer el uso de una u otra fuente de carbono para la acumulación de PHAs. Por este motivo es que algunas bacterias les favorece utilizar glicerol como sustrato, mientras que otras optan por utilizar azúcares para la producción de PHAs (Shrivastav et al., 2010).

Existen varios estudios reportados que utilizan glicerol como fuente de carbono. Ashby et al. (2011) encontró que *P. oleovorans* NRRL B-14682 produce 2.84 g/L y 2.54 g/L de biomasa con alto y bajo contenido de glicerol respectivamente y que *P. corrugata* 388 alcanzó un crecimiento celular máximo de 2.1 g/L utilizando co-productos de la producción de biodiesel. De la misma manera, Cavalheiro et al. (2012) en un estudio utilizando *C. necator* obtuvo rendimientos de sustrato en polímero (YPHA/S) entre 0.05 y 0.11gPHA/gs y productividades (PPHA) entre 0.15 y 0.35 g/L*h, mediante estrategias de lote alimentado. Con la misma cepa, Naranjo (2010) reportó productividades de 0.024 y 0.1068 g/L*h, variando las concentraciones iniciales de glicerol.

Cabe resaltar que el glicerol ha sido utilizado por diferentes autores debido a que se puede encontrar subproductos de este que reducen los costos de producción. En particular, el glicerol residual es una fuente de carbono económica para el proceso de producción de PHA debido a que es un subproducto de la transesterificación de aceites empleados en el proceso de fabricación de biodiesel (Shrivastav et al., 2010).

Por su parte, se ha reportado que entre sacarosa y lactosa, la primera favorece la

acumulación de PHAs, esto debido a que genera un 5% de acetyl Co-A, produciendo más PHAs. Además, la sacarosa es un azúcar formado por glucosa y fructosa y esta última es un azúcar de cinco carbonos, mientras que la lactosa está compuesta por glucosa y galactosa y ambas son hexosas, por lo que la estructura de las moléculas puede influir en la degradación de las mismas por parte de las bacterias. En un estudio se obtuvo que 44 de 108 aislamientos bacterianos, producían PHAs cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono. Esto representa una ventaja a nivel industrial, debido a que se podría utilizar sustratos económicos como la melaza que contiene un 36% de sacarosa y así se reducir los costos de producción del polímero (Mozejko & Kiewisz, 2016).

En relación a la cepa CC5 identificada molecularmente dentro del género *Citrobacter*, muestra bajas producciones de PHAs, mostrando los valores más altos cuando se utilizó sacarosa como fuente de carbono. Estos datos concuerdan con estudios realizados anteriormente, en donde la mayor producción se encuentra en su fase estacionaria al cabo de las 72 horas, sin embargo produce muy bajas cantidades de PHAs en comparación con otras cepas (Arshad et al., 2007; González et al., 2013). De acuerdo a curvas de crecimiento realizada por González (2013) presenta valores de 7.70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y de 31 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en fase estacionaria.

En cuanto al género *Staphylococcus* no existen estudios que la definan como una productora eficiente de PHAs. Algunas investigaciones han detectado la presencia de inclusiones de PHAs al realizar tinciones lipofílicas en cepas de este género (López et al. 2008; Martínez et al. 2018; Rodríguez et al. 2018), sin embargo no figura como una de las cepas con alta capacidad de producción de PHAs. Esto se evidencia en este trabajo, debido a que si bien la cepa PD2 relacionada filogenéticamente con *Staphylococcus* muestra inclusiones fluorescentes de PHAs, las cantidades de PHAs producidas son muy bajas en comparación con el control *C. necator* (CN2).

Con respecto al género *Serratia* se ha reportado que tiene la capacidad de acumular PHB cuando hay una deficiencia de nitrógeno y un exceso en la fuente de carbono. Algunos

estudios reportan que este género es capaz de acumular monómeros de HA cuando se somete a un estrés alcalino (pH de 8.6–9.2). Kritika et al. (2016) analizaron diferentes variables para estandarizar cuales eran las mejores condiciones para producir PHB. En resumen ellos obtuvieron que al utilizar xilosa como fuente de carbono, sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, un pH de 7.0 y una temperatura de 25 durante 48 horas *Serratia sp.* es capaz de producir un 37.50% de PHB de su peso seco.

5. Conclusiones

- Los suelos del cultivo de *Saccharum officinarum* favorecen el crecimiento de cepas potencialmente productoras de PHAs debido a que al mantener niveles altos de carbono y niveles bajo de nitrógeno ocasiona un estrés celular en las bacterias que se ve reflejado en la acumulación de PHAs.
- El método de digestión con ácido sulfúrico es un método eficiente para la cuantificación de PHAs a nivel de bioprospección.
- La presente investigación brinda un aporte al conocimiento de las cepas nativas que tienen la capacidad de acumular PHAs y aquellas que son capaces de producirlo en altas cantidades.
- La cepa PC3 identificada preliminarmente dentro del género *Bacillus* es la mejor productora de PHA en la presente investigación al utilizar glicerol como fuente de carbono y un tiempo de fermentación de 72 h.
- La producción de PHAs presenta variaciones inclusive entre especies de un mismo género, debido a que a pesar de que gran parte de los aislamientos bacterianos corresponden a *Bacillus*, solo la PC3 logró producir PHAs en altas cantidades.
- La fuente de carbono utilizada por los aislamientos bacterianos para la acumulación de PHAs varía de una cepa bacteriana a otra, por lo que no existe una tendencia de preferencia hacia alguna de las fuentes de carbono. Hay bacterias que les favorece la producción de PHAs en glicerol, otras en sacarosa y otras en lactosa.
- Este estudio permitió desarrollar la fase preliminar en la producción de bioplásticos

producidos por microorganismos: la biosprospección de bacterias con capacidad de producir PHAs, por lo que esta investigación funciona como una alternativa biotecnológica para la reducción del uso de polímeros sintéticos.

6. Recomendaciones

- Realizar curvas de crecimiento de los nueve aislamientos bacterianos productores de PHAs para determinar cuál es el pico máximo de producción y con ello poder caracterizar la cinética de crecimiento para su posible escalamiento y utilización.
- Realizar una fermentación con tiempos más largos para el caso de *C. necator* para comparar los tiempo óptimos de *C. necator* con la cepa PC3.
- El pH y la oxigenación son factores importantes que pueden influir en la acumulación de PHAs, por lo que es importante monitorearlos durante las fases de crecimiento bacterianos.
- Caracterizar el tipo de PHA producido por medio de técnicas químicas como HPLC o cromatografía de gases.
- Completar la identificación molecular de las bacterias a nivel de especie por medio de un marcador molecular más específico que el 16S como el pyrH, el gyrB, recA.
- Se podría evaluar la producción de PHAs con desechos agroindustriales como por ejemplo aceites de cocina en aquellas bacterias que produjeron PHAs en glicerol, lactosuero en aquellas que produjeron en lactosa y melaza en aquellas que produjeron en sacarosa, esto aportaría en la búsqueda de fuentes de carbono de bajo costo para disminuir los costos de producción de PHAs.

7. Bibliografía

Aeschelmann, F., & Carus, M. (2015). Bio-based buildings blocks and polymers in the world-capacities, production and applications: status Quo and trends toward. *Industrial Biotechnology*, 11,150514132956000. doi: 10.1089/ind.2015.28999.fae

- Akaraonye, E., Moreno, C., Knowles, J., Keshavarz, T., & Ipsita, R. (2012). Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Bacillus cereus* SPV using sugarcane molasses as the main carbon source. *Biotechnology*, 7, 293-303. doi:10.1002/biot.201100122
- Ali, Z., Abida, S., & Banatb, I. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45-56. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001
- Almeida, A. (2010). Análisis de cepas recombinantes de *Escherichia coli* productoras de poli (3-hidroxibutirato): efecto de la acumulación del polímero y de la proteína PhaP sobre el metabolismo y la expresión génica (Tesis de doctorado). Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 21, 403-410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Álvarez, L. (2016). Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxialcanoatos (Tesis de licenciatura). Universidad de Sevilla, España.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K., Noreen, A., Anjum, M., & Tabasum, S. (2016.) Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161-174. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- Araya, E. (2010). Relaciones genéticas entre fuentes de germoplasma de palma aceitera americana (*Elais oleífera Cortes*) del programa de mejoramiento genético de ASD Costa Rica. (Tesis de maestría). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Arshad, U., Jamil, N., Naheed, N., & Hasnain, S. (2007). Analysis of bacterial strains from contaminated and non-contaminated sites for the production of biopolymers. *African Journal of Biotechnology*, 6, 115-1121.
- Ashby, R., Solaiman, D., & Strahan, G. (2011). Efficient utilization of crude glycerol as

- fermentation substrate in the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) biopolymers. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 949–959. doi: 10.1007/s11746-011-1755-6
- Ávila, A. (2007). Determinación del efecto producido por diferentes tipos de aceites vegetales y combinaciones en la biosíntesis y composición del polihidroxialcanoato producido por *Pseudomonas putida* IPT 046 y *Pseudomonas aeruginosa* IPT 171. (Tesis de licenciatura). Universidad de Sao Paulo, Brasil.
- Bello, D., Otero, M., Ortega, G., & Carrera, E. (2009). Estado del arte en la producción microbiológica de Polihidroxialcanoatos. ICIDCA. *Sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, 153, 3-13.
- Cavalheiro, J., De Almeida, M., Grandfils, C., & Da Fonseca, M. (2009). Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Process Biochemistry*, 44, 509–515. doi:10.1016/j.procbio.2009.01.008
- Cavalheiro, J., Raposo, R., De Almeida, M., Cesário, M., Sevrin, C., Grandfils, C., & Da Fonseca, M. (2012). Effect of cultivation parameters on the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-4-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. *Bioresource Technology*, 111, 391-7. doi: 10.1016/j.biortech.2012.01.176
- Chen, G., & Jiang, X. (2017). Engineering bacteria for enhanced polyhydroxyalkanoates (PHA) biosynthesis. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2, 192-197. doi: 10.1016/j.synbio.2017.09.001
- Ciesielski, S., Mozejko, J., & Przybyłek, G. (2010a). The influence of nitrogen limitation on mcl-PHA synthesis by two newly isolated strains of *Pseudomonas* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37, 511-520. doi: 10.1007/s10295-010-0698-5
- Cui, Y., Shi, Y., & Gong, X. (2017). Effects of C/N in the substrate on the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and extracellular polymeric substances by *Haloferax mediterranei* via kinetic model analysis. *RSC Adv*, 7, 18953–18961. doi:

10.1039/C7RA02131C.

- Darriba, D., Taboada, G., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9, 772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- Durner, R., Zinn, M., Witholt, B. & Egli, T. (2001). Accumulation of poly [(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in Batch and Chemostat culture with different carbon sources. *Biotechnology and Bioengineering*, 72, 278-288.
- Elías, R. (2015). Mar del plástico: una revisión del plástico en el mar. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero*, 27, 83-105.
- Gómez, J., Rodríguez, M., Alli, R., Torres, B., Oliviera, C., & Silva, L. (1996). Evaluation of soil Gram negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 785-791. doi: 10.1007/s002530050763
- Gómez, J. (2013). Producción y caracterización de polihidroxicanoatos sintetizados por microorganismos nativos a partir de residuos grasos. (Tesis de doctorado), Universidad Nacional de Colombia, Medellín.
- González, Y., Meza, J., González, O., & Córdova, J. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 77-115.
- Gross, R., & Mekala, S. (2018). Microbial and Enzymatic Synthesis of Polymers. Lipid modification by enzymes and engineered microbes, 239-256. doi: 10.1016/B978-0-12-813167-1.00011-6
- Gumel, A., Anuar, M., & Heidelberg, T. (2014). Growth kinetics, effect of carbon substrate in biosynthesis of mcl-PHA by *Pseudomonas putida* Bet001. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 427-438. doi: 10.1590/S1517-83822014000200009
- He, W., Tian, W., Zhang, G., Chen, G., & Zhang, Z. (1998). Production of novel

- polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. *FEMS Microbiol Letters* banner, 169, 45–49. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13297.x
- Hori, K., Marsudi, S., & Unno, H. (2002). Simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol Bioengineering*, 78, 699–707. doi:10.1002/bit.10248
- Katircioglu, H., Aslim, B., Yksekd, Z., Mercan, N., & Beyatli, Y. (2003). Production of polyE-hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative *Bacillus* mutant strains by SDS-PAGE of total cell protein. *African Journal of Biotechnol*, 2, 147-149.
- Kenny, S., Runic, J., Kaminsky, W., Woods, T., Babu, R., Blau, W & O'Connor, K. (2008). Up-cycling of PET (polyethylene terephthalate) to the biodegradable plastic PHA (polyhydroxyalkanoate). *Environmental Science and Technol*, 42, 7696–7701. doi: 10.1021/es801010e
- Khandpur, P., Jabeen, E., Rohini, K., & Varaprasad, Y. (2012). Study on production, extraction and analysis of polyhydroxyalkanoate (PHA) from bacterial isolates. *IOSR Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, 1, 31–38. doi: 10.9790/3008-0113138.
- Khanna, S., & Srivastava, A. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process biochemistry*, 40, 2173-2182. doi:10.1016/j.procbio.2004.08.011
- Kihara, T., Hiroe, A., Ishii-Hyakutake, M., Mizuno, K., & Tsuge, T. (2017). *Bacillus cereus*-type polyhydroxyalkanoate Biosynthetic gene cluster contains R-specific enoyl- Coa hydratase gene. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 81, 1627-1635 doi:10.1080/09168451.2017.1325314
- Kim, B., Lee, S., Lee, S., Chang, H., Chang, Y., & Woo, S. (1994). Production of poly-(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate feeding using on-line glucose analyzer. *Enzyme*

Microbiological Technology, 16, 556-561. doi: 10.1016/0141-0229(94)90118-X

Kim, D., Kim, Y., & Rhee, Y. (2000). Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28: 23–29. doi: 10.1016/S0141-8130(00)00150-1

Klinke, S., Dauner, M., Scott, G., Kessler, B., & Witholt, B. (2000). Inactivation of Isocitrate lyase leads to increased production of medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 909-913.

Koller, M., Salerno, E., Muhr, A., Reiterer, A., Chiellini, E., Casella, S., Horvat, P., & Brauneegg, G. (2017). Whey lactose as a raw material for microbial production of biodegradable polyesters. Saleh: INTECH Open Access Publisher.

Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H.N., & Reis, M. (2017). Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Bioengineering*, 4, 55. doi:10.3390/bioengineering4020055

Kritika, S., Pragya, R., Nandin, P., & Priti, S. (2016). Optimization of PHB (polyhydroxybutyrate) Synthesis by *Serratia sp.* Isolated from Soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5, 665-673. doi: 10.20546/ijcmas.2016.506.072

Kulpreecha, S., Boonruangthavorn, A., Meksiriporn, B., & Thongchul, N. (2009). Inexpensive fed-batch cultivation for high poly (3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience. Bioengineering*, 107, 240-245. doi:10.1016/j.jbiosc.2008.10.006

Lasala, F., Martínez, J., Núñez, R., Rozsa, Ch., Carballo, M., & Solano, R., (2004). Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por bacterias diazótroficas II. Estudio de la síntesis a escala de Zaranda con *Mesorhizobium plurifarum* (4033). *Revista*

Biológica, 2, 136-146.

- Lee, W., Loo, C., Nomura, C., & Sudesh, K. (2008). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from mixtures of plant oils and 3-hydroxyvalerate precursors. *Bioresource. Technol*, 99, 6844–6851. doi:10.1016/j.biortech.2008.01.051
- López, A., Lanz, A., & García, J. (2008). Screening and isolation of PHB-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. *Microbial Ecology*, 56, 112-120. doi: 10.1007/s00248-007-9329-8
- López, J., Naranjo, J., Higuera, J., Cubitto, M., Cardona, C., & Villar, M. (2012). Biosynthesis of PHB from a New Isolated *Bacillus megaterium* Strain: Outlook on Future Developments with Endospore Forming Bacteria. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17, 250-258. doi 10.1007/s12257-011-0448-1
- Martínez, C., Latisnere, H., García, J., & López, A. (2018). Screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria and PhaC-encoding genes in two hypersaline microbial mats from Guerrero Negro, Baja California Sur, México. *Peer Journal*, 6, e4780. doi: 10.7717/peerj.4780
- Mohapatra, S., Maity, S., Ranjan, H., Das, S., Pattnaik, S., Charan, C., & Samantaray, D. (2017). Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12, 206–213. doi:10.1016/j.bbrep.2017.10.001
- Moreno, N., Gutiérrez, I., Malagón, D., Grosso, V., Revelo, D., Suárez, D., & Montoya, D. (2007). Biosprospecting and characterization of poly- β -hydroxyalkanoate (PHAs) producing bacteria isolated from Colombian sugarcane producing areas. *African Journal of Biotechnology*, 6, 1536-1543.
- Mozejko, J., & Kiewisz, R. (2016.) Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, 271-282. doi:10.1016/j.micres.2016.07.010
- Muhammadi, S., Muhammad, A., & Shafiqat, H. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8, 56-

77. doi:10.1080/17518253.2015.1109715

Naranjo, J. (2010). Producción de polihidroxitirato a partir de residuos agroindustriales. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.

Nordeste, R., Trainer, M., & T.C. (2010). Methods for the isolation of genes encoding novel PHB cycle enzymes from complex microbial communities. *Metagenomics*, 688:235-246. doi: 10.1007/978-1-60761-823-2_16

Ostle, A., & Holt, J. (1982). Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 44, 238-241.

Park, J., & Crowley, D. (2005). Normalization of soil DNA extraction for accurate quantification of target genes by real-time PCR and DGGE. *BioTechniques*, 38, 579-586.

Plastics Europe, 2015. Plastics-The Facts 2014/2015 An analysis of European plastics production, demand and waste data. Recuperado de http://www.plasticseurope.org/documents/document/20150227150049final_plastics_the_facts_2014_2015_260215.pdf.

Porwal, S., Kumar, T., Lal, S., Rani, A., Kumar, S., Cheema, S., Purohit, H., Sharma, R., Patel, S., & Kalia, V. (2008). Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of microbes from diverse habitats by dark fermentative process. *Bioresource Technology*, 99, 2444-2451. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.011

Pérez, C., Sun, C., Theodoropoulos, C., & Webb, C. (2016). Building a predictive model for PHB production from glicerol. *Biochemical Engineering Journal*, 116, 113-121. doi: 10.1016/j.bej.2016.04.016

Rambaut, A. (2009). FigTree v1.4 2012–2014: Tree Figure Drawing Tool. Recuperado de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.

R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- Rodríguez, J., Favaro, L., Pizzocchero, V., Lomolino, G., Basaglia, M., & Casella, S. (2018). Nuclease expression in efficient polyhydroxyalkanoates-producing bacteria could yield cost reduction during downstream processing. *Bioresource Technology*, 261, 176-181. doi: 10.1016/j.biortech.2018.04.021
- Rodríguez, S., Serrano, A., Panti6n, A., & Alonso, B. (2018). Challenges of scaling-up PHA production for waste streams. A Review. *Journal of Environmental Management*, 205, 215-230. doi:10.1016/j.jenvman.2017.09.083
- Rojas, O., Villafa6na, J., Gonz6lez, O., & Nungaray, J. (2006). An6lisis de rutas metab6licas en *Pseudomonas aeruginosa* para la producci6n de polihidroxialcanoatos a partir de glucosa usando modos elementales. *e-Gnosis*, 4, 1-29.
- Schmidt, M., Lutz, J., Kelin, L., Zanfonato, K., Schmidel., W., & Falcao, G. (2016). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production in a system with external cell recycle and limited nitrogen feeding during the production phase. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 130-135. doi: 10.1016/j.bej.2016.04.013
- Shantini, K., Yahya, A., & Amirul, A. (2015). Influence of feeding and controlled Dissolved Oxygen Level on the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA2-4 and its characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176, 1315-1334. doi: 10.1007/s12010-015-1648-5
- Shrivastav, A., Mishra, S., Shethia, B., Pancha, I., Jain, D., & Mishra, S. (2010). Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel byproduct, *International Journal of Biological Macromolecules*, 47, 283–287. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.04.007
- Singh, A., Srivastava, J., Chandel, A., Sharma, L., Mallick, N., & Singh, S. (2019). Biomedical applications of microbially engineered polyhydroxyalkanoates: an insight into recent advances, bottlenecks, and solutions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 2007–2032. doi: 10.1007/s00253-018-09604-y

- Stamatakis, A., Ludwig, T., & Meier, H. (2005). RAxML-III: a fast program for maximum likelihoodbased inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 21, 456-463. doi: 10.1093/bioinformatics/bti191
- STATGRAPHICS® Centurion XV (2005). StatPoint, Inc. United States of America. URL <http://www.statgraphics.com>
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A.
- Tsuge, T., Hyakutake, M., & Mizuno, K. (2015). Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied Microbioly and Biotechnology*, 99, 6231–6240. doi: 10.1007/s00253-015-6777-9
- UNEP (United Nations Environmental Programme) (2016). “Marine plastic debris and microplastics – Global lessons and research to inspire action and guide policy change”. United Nations Environment Programme, Nairobi.
- Vázquez, A., Velasco, M., Valdemar, M., & Beltrán, M. (2016). Bioplásticos y plásticos degradables. Universidad Autónoma Metropolitana. doi:10.13140/RG.2.1.1294.4241
- Verlinden, R., Hill, D., Kenward, M., Williams, C., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbioly*, 102, 1437-1449. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x
- Yousuf, R. (2017). Novel polyhydroxybutyrate (PHB) production using a waste date seed feedstock. (Tesis de Doctorado). The University of Manchester, England.

8. Glosario.

Labranza: es la remoción de la capa vegetal del suelo, que se realiza antes de la siembra, para facilitar la germinación de la semilla y el crecimiento, desarrollo y producción de la planta cultivada. Así mismo permite el control de malezas y busca el mejoramiento de las

propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo.

Rastrojo: es el conjunto de restos de tallos hojas que quedan en el terreno tras cortar un cultivo

Cachaza: subproducto de la industria azucarera. Es utilizada para el mejoramiento de las propiedades físicas y químicas del suelo. Es rica en Fósforo, Calcio, Nitrógeno y baja en Potasio. También es una fuente importante de Zinc, Boro y carbono.

Bagazo: subproducto de la industria azucarera. Es parcialmente utilizado en calderas o para la extracción de subproductos como alcohol.

Lactonas: compuesto orgánico del tipo Ester cíclico

Aluminoxanos: compuestos que se obtienen de la hidrólisis parcial de compuestos de trialquilaluminio

Poliésteres: Resina plástica que se obtiene mediante una reacción química y que es muy resistente a la humedad y a los productos químicos.

9. Anexos.

Anexo 1. Medio Mínimo Mineral de sales (MMS)

Reactivo	Cantidades para 1L
Na ₂ HPO ₄ * H ₂ O	12.8 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g
Agar	15 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O 1M	2 mL
Glucosa al 20%	20 mL
CaCl ₂ 1M	0.1 mL
Cicloheximida	500 mg

Nota: pH 7.0

Anexo 2. Medio KS para inducción de PHB

Reactivo	Cantidades para 1L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄	0.6 g
MgSO ₄ _7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂	20 mg
Elementos traza	10 mL
Yeast extract	0.1 g

Nota: pH 7.0

Reactivo	Cantidades para 1L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.3 mg
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.6 mg
H ₃ BO ₃	0.6 mg

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN genómico en bacterias

1. Preparación de las disoluciones

1 molar Tris-HCl pH 8.0: por cada mililitro de disolución se debe pesar 0.121 g de Tris base (peso molecular 121.14 g/mol). En una balanza granataria se pesa la cantidad apropiada de Tris base, se agrega en un beaker y se disuelve en agua ultrapurificada y esterilizada sin llegar al volumen final, con ayuda de un agitador-calentador magnético y una pastilla magnética. Cuando el Tris base está disuelto, se coloca el electrodo del pH metro dentro de la disolución en agitación y se ajusta el pH a 8.0, con la ayuda de HCl 10 M y HCl 1 M. Se debe tener cuidado de no sobrepasar el volumen final. Se ajusta al volumen final en una probeta y se trasvasa a una botella previamente esterilizada en autoclave.

0.5 molar EDTA pH 8.0: por cada mililitro de disolución se debe pesar 0.186 g de EDTA sal disódica (peso molecular 372.24 g/mol). En una balanza granataria se pesa la cantidad apropiada de EDTA sal disódica, se agrega en un beaker y se disuelve en agua ultrapurificada y esterilizada sin llegar al volumen final, con ayuda de un agitador-calentador magnético y una pastilla magnética. Cuando el EDTA sal disódica está disuelto, se coloca el electrodo del pH metro dentro de la disolución en agitación y se ajusta el pH a 8.0, con la ayuda de NaOH 10 M y NaOH 1 M. Se debe tener cuidado de no sobrepasar el volumen final. Se ajusta al volumen final en una probeta y se trasvasa a una botella previamente esterilizada en autoclave.

5 molar NaCl: por cada mililitro de disolución se debe pesar 0.292 g de NaCl (peso molecular 58.44 g/mol). En una balanza granataria se pesa la cantidad apropiada de NaCl, se agrega en un beaker y se disuelve en agua ultrapurificada y esterilizada sin llegar al volumen

final, con ayuda de un agitador-calentador magnético y una pastilla magnética. Se ajusta al volumen final en una probeta y se trasvasa a una botella previamente esterilizada en autoclave.

Buffer de extracción de ADN (100 mL): la concentración final de los componentes del buffer de extracción son las siguientes: 100 mM Tris HCL, 1.4 M NaCl 1.4 M, 20 mM EDTA, 2% (m/v) CTAB, 2% (m/v) PVP, 2% (v/v) β -mercaptoetanol.

En un beaker previamente autoclavado se agrega 10 mL de 1 M Tris HCL pH 8.0, 28 mL de 5 M NaCl y 4 mL de 0.5 M EDTA y 20 mL de agua ultrapura. Luego se agrega 2 g de CTAB, se incorpora una pastilla magnética y se coloca el beaker en un agitador-calentador. Se aplica agitación y calor a una temperatura de 70°C hasta que se disuelva el CTAB. Luego se agrega 2 g de PVP hasta que se disuelva. Se ajusta el volumen a 100 mL en una probeta y se trasvasa a una botella previamente esterilizada en la autoclave. En una capilla extractora de gases se agrega 200 μ L de β -mercaptoetanol. Se almacena el buffer de extracción a temperatura ambiente y protegido de la luz.

Buffer TE (Tris-EDTA): a partir de las disoluciones 1M Tris-HCl pH 8.0 y 0.5M EDTA pH 8.0, se prepara el buffer TE concentración final de 10 mM y 1 mM respectivamente.

Buffer TE con ARNasa: se prepara al momento de disolver el ADN. Por cada 50 μ L de buffer TE, se agrega 1 μ L de ARNasa (10 mg/mL).

Mezcla de cloroformo: octanol (100 mL): en una capilla extractora de gases se mide 96 mL de cloroformo en una probeta y se afora a 100 mL agregando 4 mL de octanol. Se trasvasa a una botella previamente autoclavada.

Isopropanol enfriado a -20°C: en un tubo cónico de 50 mL se agrega 50 mL de isopropanol y se almacena a -20°C.

Etanol al 70% (100 mL): en una probeta se agrega 70 mL de etanol absoluto y 30 mL de agua ultrapura. Luego se trasvasa a una botella previamente autoclavada y se almacena a -

20°C.

2. Procedimiento para extracción de ADN

1. De la placa petri con el crecimiento bacteriano, se toma una asada y se inocula en un tubo eppendorf de 2 mL que contiene 100 μ L de agua desionizada. Se centrifuga a 15000 rpm por 5 min y se descarta el sobrenadante. El pellet obtenido es sobre el cual se trabaja.
2. Se agrega 750 μ L de buffer de extracción de ADN precalentado a 65 °C.
3. Se agita la mezcla en un vórtex.
4. Se incuban los tubos en un bloque calentador a 65 °C durante 20 min agitando cada 5 min.
5. Se retiran los tubos del bloque calentador, se agrega 750 μ L de Cloroformo-Octanol (24:1) y se mezcla invirtiendo los tubos al menos 20 veces.
6. Se centrifugan los tubos por 5 min a 15000 rpm
7. Se extrae 300 μ L del sobrenadante y se transfiere a un tubo de 1.5 mL previamente rotulado.
8. Se agrega 300 μ L de isopropanol enfriado a -20°C.
9. Se colocan los tubos en un vórtex por 5 min.
10. Se centrifuga a 15000 rpm por 5 min.
11. Se descarta el sobrenadante con cuidado de no desprender el pellet.
12. Se agrega 500 μ L de etanol al 70% enfriado a -20°C.
13. Se centrifuga por 2 min 15000 rpm y se descarta el etanol.
14. Se seca el resto de etanol colocando los tubos en un bloque térmico a 42 °C por 20 a 30 min. Inspeccionar los tubos para asegurarse de que se secó todo el etanol.
15. Se resuspende el pellet con 50 μ L de buffer Te con ARNasa.
16. En un bloque térmico se incuban los tubos a 37 °C por 30 min.
17. Se almacena el ADN a -20°C hasta usarlo para las reacciones de PCR.

Cuantificación del ADN en NanoDrop

- Agitar los tubos con el ADN en un vórtex antes de iniciar con la medición.

- Limpiar la superficie superior e inferior del NanoDrop con un papel libre de peluza humedecido con agua ultrapura.
- Abrir el programa propietario del NanoDrop y seleccionar la aplicación de ácidos nucleicos.
- Subir el brazo superior del Nanodrop y colocar una gota de 1.5 μL de buffer TE en el pedestal de la superficie óptica inferior.
- Bajar el brazo superior con cuidado de no golpear fuertemente la gota y seleccionar la opción "Measure Blank".
- Limpiar las superficies superior e inferior con una toalla libre de pelusa.
- Escribir el nombre la muestra en el recuadro superior derecho del programa.
- Colocar una gota de 1.5 μL del ADN en el pedestal de la superficie óptica inferior.
- Bajar el brazo superior con cuidado de no golpear fuertemente la gota y seleccionar la opción "Measure".
- Repetir los pasos 6 a 9 para hacer una segunda medición del ADN.
- La lectura de concentración de ADN ($\text{ng}/\mu\text{L}$) entre la primera y la segunda medición no debe diferir en 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Si esto ocurre se debe realizar una tercera lectura.
- Se continúa con la medición del resto de las muestras y al finalizar se imprime el informe para usar los datos de concentración de ADN para las diluciones respectivas

Dilución del ADN

Con base en la concentración de ADN obtenida por el NanoDrop, se ajusta la concentración de ADN a aproximadamente 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ haciendo una dilución en un tubo de 1.5 mL. Se sigue el siguiente procedimiento:

$$\boxed{C_{n1} \times V_1 = C_{n2} \times V_2}$$

donde C_{n1} es la concentración del ADN obtenida en el NanoDrop, V_1 es el volumen que deberá medirse para realizar la dilución, C_{n2} es la concentración final (50 $\text{ng}/\mu\text{L}$) del ADN y V_2 es el volumen final de la nueva disolución. Por ejemplo, se asume una concentración

obtenida en el NanoDrop de 200 ng/uL y se prepararán 100 uL de disolución final a 50 ng/uL: por lo que el cálculo es el siguiente:

$$200 \text{ ng/uL} \times V1 = 50 \text{ ng/uL} \times 100 \text{ uL}$$

$$V1 = (50 \text{ ng/uL} \times 100 \text{ uL}) / 200 \text{ ng/uL}$$

$$V1 = 25 \text{ uL}$$

Por lo tanto se toman 25 uL del ADN a 200 ng/uL, se agregan en tubo de 1.5 mL debidamente rotulado con el nombre la muestra y se adiciona 75 uL de agua ultrapura.

Anexo 4. Curva de calibración

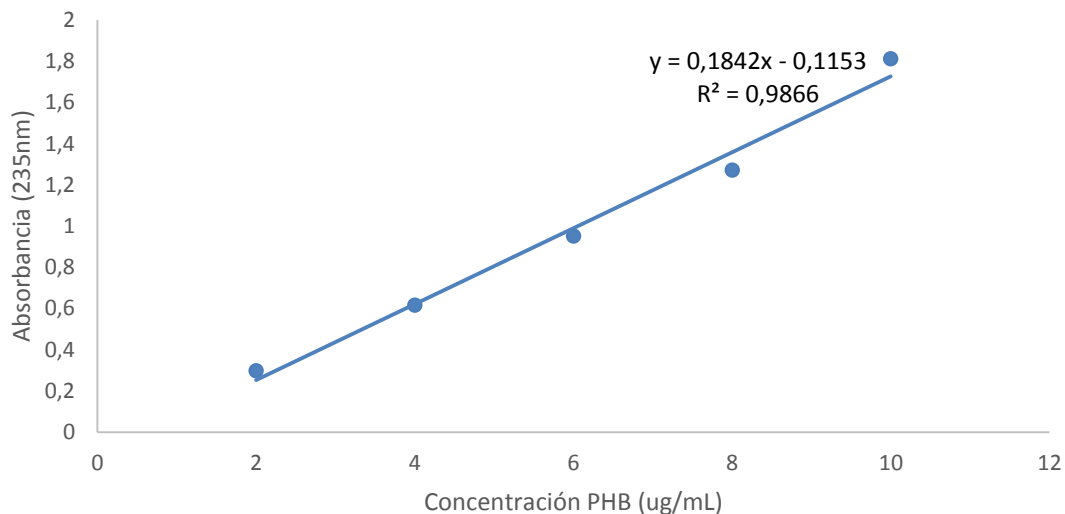


Figura 4. Curva de calibración utilizada para la producción de PHAs en aislamientos bacterianos obtenidos de suelos agrícolas.