



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**BIOPROSPECCIÓN Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS
PRODUCTORAS DE POLI(β -HIDROXIBUTIRATO)
DE UN TAPETE MICROBIANO**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

p r e s e n t a

Alberto Lanz Landázuri

La Paz, B.C.S. Febrero del 2006.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 26 del mes de enero del 2006, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Bioprospección y aislamiento de bacterias productoras de poli- β -hidroxibutirato de un tapete microbiano"

Presentada por el alumno:

Alberto Lanz Landázuri

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

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

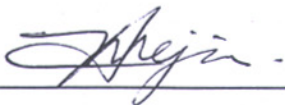


Dr. Alejandro López Cortés
DIRECTOR DE TESIS

LA COMISION REVISORA



Dra. Guadalupe Espín Ocampo
CO-TUTOR



Dr. Humberto Mejía Ruíz
CO-TUTOR



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

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

Comité tutorial:

Director de tesis: Dr. Alejandro López Cortés

Co-Tutor: Dra. Guadalupe Espín Ocampo

Co-Tutor: Dr. Humberto Mejía Ruiz

Comité revisor de tesis:

Director de tesis: Dr. Alejandro López Cortés

Co-Tutor: Dra. Guadalupe Espín Ocampo

Co-Tutor: Dr. Humberto Mejía Ruiz

Jurado de examen de grado:

Director de tesis: Dr. Alejandro López Cortés

Co-Tutor: Dra. Guadalupe Espín Ocampo

Co-Tutor: Dr. Humberto Mejía Ruiz

Suplente: Dr. Francisco García de León

RESUMEN

El poli- β -hidroxibutirato (PHB) es un poliéster de ácido β -hidroxibutírico, sintetizado intracelularmente por bacterias como un polímero de reserva de energía y carbono. El biopolímero que se obtiene tiene las propiedades de un termoplástico, biodegradable y reciclable; se considera un recurso renovable ya que su biodegradación resulta en CO₂ y H₂O. Sus características físicas, son muy similares a la de plásticos petroquímicos, por lo que son una alternativa real al uso de materiales recalcitrantes, además de que ofrecen una novedad en aplicaciones biomédicas. Este trabajo corresponde al primer peldaño de cualquier proceso biotecnológico, la prospección de organismos, dentro de la biodiversidad de una localidad, que tenga potencial para desarrollar la producción y acumulación significativa de PHB. La localidad seleccionada se ubica en Puerto San Carlos, Baja California Sur, donde se muestrearon dos sitios “La Curva” y “La Enlatadora”, ésta última eutrofizada por el derrame de una planta de tratamiento primario de una enlatadora de productos pesqueros, propiciando la formación de una alfombra microbiana. El proyecto enfatiza a la biodiversidad como fuente de innovación en biotecnología y el aprovechamiento de materiales típicamente denominados “de desecho”, como es el caso del efluente, el cual promueve el enriquecimiento de microorganismos, para el aislamiento de bacterias productoras de PHB. Se utilizaron tres técnicas de microscopía para la detección de las cepas productoras de PHB. La primera empleó el uso de iluminación de contraste de fases para la búsqueda de inclusiones citoplasmáticas refringentes (ICR). La segunda y la tercera requirieron de tinciones lipofílicas: negro Sudán y rojo Nilo, con iluminación de campo claro y epifluorescencia respectivamente. Se realizó taxonomía polifásica para la identificación de las cepas, además de un análisis molecular de la comunidad bacteriana basado en electroforesis de gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) y secuenciación parcial del gen 16S rARN. Para conocer el rendimiento de la producción de biopolímero de las cepas se determinó la producción y productividad de PHB en dos condiciones de cultivo, usando glucosa e hidroxibutirato como fuente de carbono. El efluente de La Enlatadora rico en compuestos orgánicos modificó la estructura de la comunidad bacteriana bentónica de la playa; donde se encontró una mayor abundancia y diversidad de bacterias cuando se comparó con la de La Curva, ésta última alejada de la influencia del efluente. De ambas localidades se obtuvieron 126 cepas de bacterias aisladas de las cuales se seleccionaron 14 de ellas con base en las observaciones de las ICR y de inclusiones de PHB por las tinciones antes mencionadas. Las bacterias que resultaron ser productoras de PHB pertenecen a cinco géneros: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Paracoccus* y *Methylobacterium*. *Bacillus* presentó rendimientos de PHB de 50-66% de su peso celular seco, *Paracoccus* acumuló de 28-52%, mientras que *Staphylococcus* y *Rhodococcus* estuvieron por debajo del 15%. Este es el primer trabajo que se enfoca en el aislamiento de bacterias productoras de PHB en la península de Baja California, y parece que también es el primero donde un tapete microbiano es la fuente de prospección y aislamiento de bacterias productoras de PHB, para fines en biotecnología.

Palabras clave: *Poli- β -hidroxibutirato, tapete microbiano, bioprospección, bioplástico.*

ABSTRACT

Poly- β -hydroxybutyrate is a polyester derived from β -hydroxybutyric acid, a energy and carbon storage material synthesized in bacteria. This polymer has thermoplastic, biodegradable, and recyclable properties, it is considered a renewable resource because its complete biodegradation leads in CO₂ and H₂O. Its physical characteristics are very similar to those of petrochemical plastics, thus the material is an alternative to the use of recalcitrant plastics. Additionally, they offer novel biomedical applications. This work describes the first step of any biotechnological process—organisms bioprospecting within local biodiverse community that could show significant PHB production and accumulation potential. Two study sites, “La Curva” and “La Enlatadora,” are at Puerto San Carlos, Baja California Sur. La Enlatadora has undergone eutrophication from wastewater from a fish cannery effluent, this process has led to development of a microbial mat. The project emphasizes biodiversity as a source of innovation in biotechnology and the use of waste materials, such as cannery effluent that promotes enrichment of microorganisms for isolating PHB-producing bacteria. Three microscopic techniques were used for the detection of PHB-producing strains. First, phase contrast microscopy to look for cytoplasmic refringent inclusions (ICR). Second and third were lipophilic stains: Sudan black and Nile red, with the help of white light and epifluorescence microscopy, respectively. Polyphasic taxonomy was used to identify bacterial strains. Molecular analysis of the natural bacteria community was undertaken with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and 16S-rRNA partial sequencing were performed. PHB production was determined in two culture media, using glucose and hydroxybutyrate as carbon sources. La Enlatadora’s effluent is rich in organic compounds and it modified the benthic bacterial community structure of the beach. A greater abundance of bacteria and diversity occurs here, compared with La Curva, which is more distant from the impact of the effluent. The survey found 126 isolates at both sites. From the ICR and stained inclusions techniques mentioned before, 14 strains were selected. The PHB-producing bacteria belong to five genera: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Paracoccus*, and *Methylobacterium*. *Bacillus* showed PHB accumulation of 50-66% cell dry weight; *Paracoccus* yield was 28-52%; and *Staphylococcus* and *Rhodococcus* were below 15% cdw. This is the first work to focus on isolation of PHB-producing bacteria in the Baja California Peninsula, and the first where a microbial mat is the source for bioprospecting and isolating PHB-producing bacteria for biotechnological purposes.

Key words: *Poly- β -hydroxybutyrate*, *microbial mat*, *bioprospecting*, *bioplastics*.

DEDICATORIA

Este trabajo, el tiempo dedicado a él, el esfuerzo que representó, el conocimiento generado y la emoción de verlo desarrollarse de una manera exitosa es dedicado:

EN MEMORIA DE

Miguel Lanz Herrera

A:

Mi madre y a mi hermano, por su apoyo incondicional
Miriam, mi inspiración, por estar a mi lado en esta aventura

AGRADECIMIENTOS

Comité tutorial:

Director: Dr. Alejandro López Cortés
Co-Tutor: Dra. Guadalupe Espín Ocampo
Co-Tutor: Dr. Humberto Mejía Ruiz

Gracias por su tiempo, conocimiento, dedicación, apoyo y enseñanzas.

Apoyo financiero:

Proyecto PC4.7. Biodiversidad del Noroeste de México, Programa de Planeación Ambiental y Conservación, CIBNOR, 2005. Alejandro López Cortés, responsable.

Proyecto 45914. Diversidad microbiana: Fuente de innovación en biotecnología. SEP-CONACyT, 2004-2007. Alejandro López Cortés, responsable.

Beca-crédito del programa de excelencia CONACyT 167937, para ALL.

Apoyo económico, Programa de Posgrado CIBNOR, para ALL.

Apoyo técnico:

Laboratorio de Ecología Microbiana Molecular-LES.6.08

Ángel E. Carrillo García

Jesús N. Gutiérrez Rivera

Norma A. Ochoa Álvarez

Arturo F. Almeida Soto

Arturo P. Sierra Beltrán

Ma. Carmen Rodríguez Jaramillo

Francisco García de León

René R. Rebollar Prudente

MACROGENE Inc., Corea

Apoyo moral:

Miriam Ortiz Ibarra

Gisela Landázuri Benítez

Martín Lanz Landázuri

Cesar Orozco Medina

José Q. García Maldonado

CONTENIDO

| | Págs. |
|--|-----------|
| RESUMEN | <i>i</i> |
| ABSTRACT | <i>ii</i> |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Estructura, síntesis y propiedades del poli- β -hidroxibutirato. | 1 |
| 1.2. Antecedentes. | |
| 1.2.1. Estado del arte. | 4 |
| 1.2.2. Detección y aislamiento de bacterias productoras de PHB. | 7 |
| 1.3. Justificación. | |
| 1.3.1. Problemática ambiental. | 9 |
| 1.3.2. Estudio de la diversidad microbiana. | 11 |
| 1.4. Objetivos. | |
| 1.4.1. Objetivos generales. | 13 |
| 1.4.2. Objetivos particulares. | 13 |
| 1.5. Hipótesis. | 13 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | |
| 2.1. Colecta de muestras. | 14 |
| 2.2. Análisis fisicoquímico del agua. | 15 |
| 2.3. Aislamientos y cultivos. | 16 |
| 2.4. Detección de cepas productoras de PHB. | 17 |
| 2.5. Identificación polifásica. | |
| 2.5.1. Fenotípica | 18 |
| 2.5.2. Filogenética | |
| 2.5.2.1. Extracción de ADN. | 19 |
| 2.5.2.2. Condiciones de PCR y secuenciación. | 20 |
| 2.5.2.3. Árbol filogenético. | 21 |
| 2.6. Condiciones de DGGE. | 21 |
| 2.7. Parámetros de crecimiento celular. | 22 |
| 2.8. Determinación de la producción de PHB y productividad de las cepas. | 22 |
| 2.9. Pruebas estadísticas. | 23 |
| 3. RESULTADOS | |
| 3.1. Caracterización del sitio de muestreo. | |
| 3.1.1. Parámetros fisicoquímicos. | 24 |
| 3.1.2. Estimación de la densidad poblacional bacteriana. | 26 |
| 3.2. Detección y aislamiento de cepas productoras de PHB. | |
| 3.2.1. Aislamientos y observaciones de Inclusiones Citoplasmáticas Refringentes. | 28 |
| 3.2.2. Detección de inclusiones lipídicas. | 28 |

| | |
|---|-----|
| 3.3. <i>Identificación polifásica de las cepas productoras de PHB.</i> | |
| 3.3.1. <i>Identificación fenotípica.</i> | 33 |
| 3.3.2. <i>Identificación filogenética.</i> | 35 |
| 3.4. <i>Producción de PHB de las cepas.</i> | |
| 3.5.1. <i>Cuantificación de la producción y porcentaje de acumulación de PHB.</i> | 41 |
| 3.5.2. <i>Determinación de la productividad de las cepas.</i> | 45 |
| 3.5. <i>Análisis de la comunidad natural (DGGE).</i> | 49 |
| | |
| 4. DISCUSIÓN | |
| 4.1. <i>Parámetros fisicoquímicos.</i> | 52 |
| 4.2. <i>Comunidad bacteriana de los sitios.</i> | 54 |
| 4.3. <i>Obtención de aislamientos y detección de cepas productoras de PHB.</i> | 58 |
| 4.4. <i>Identificación polifásica de los productores de PHB.</i> | 63 |
| 4.5. <i>Acumulación y productividad de PHB por las cepas.</i> | 69 |
| 4.6. <i>Proyecciones a futuro.</i> | 78 |
| | |
| 5. CONCLUSIONES | 81 |
| | |
| 6. REFERENCIAS | 83 |
| | |
| 7. ANEXO 1 | 97 |
| | |
| 8. ANEXO 2 | 103 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Págs. |
|---|-------|
| Figura 1. Ubicación de la localidad y de los sitios de muestreo, la flecha azul en el mapa de Puerto San Carlos indica la dirección de la corriente. Fotos: A) sitio La Enlatadora, B) muestra de sedimento de La Enlatadora y C) muestra de sedimento de la curva. | 15 |
| Figura 2. Densidad bacteriana expresada en número de células por gramo de sedimento para los sitios de La Enlatadora y La Curva. Se presentan conteos de los seis medios utilizados en el aislamiento. | 27 |
| Figura 3. Contenido promedio de ADN en las muestras naturales obtenidos con el Kit de extracción BIO 101. | 27 |
| Figura 4. Micrografías de los tres criterios de detección de PHB, inclusiones citoplasmáticas refringentes (A-C), rojo Nilo (D-F) y negro Sudán (G-I). | 33 |
| Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Fragmento 341-926 (585 pb) del gen 16S rARN de las cepas. | 35 |
| Figura 6. Árbol filogenético de secuencias de bacterias productoras de PHB de La Curva y La Enlatadora con sus secuencias semejantes más cercanas. Diagrama con base a la secuenciación parcial del gen 16S rARN y los resultados de BLAST. Análisis de parsimonia, <i>E. coli</i> es el grupo externo. | 40 |
| Figura 7. Valores promedio de producción de biomasa (peso seco), y PHB por litro de medio (PYM) a las 24 horas de cultivo. Los números indican porcentaje de peso seco de acumulación de PHB correspondiente a cada cepa. | 43 |
| Figura 8. Valores promedio de producción de biomasa (peso seco), y PHB por litro de medio (PYM) a las 48 horas de cultivo. Los números indican porcentaje de peso seco de acumulación de PHB correspondiente a cada cepa. | 43 |
| Figura 9. Valores promedio de producción de biomasa (peso seco), y PHB por litro de medio (HB) a las 24 horas de cultivo. Los números indican porcentaje de peso seco de acumulación de PHB correspondiente a cada cepa. | 44 |
| Figura 10. Valores promedio de producción de biomasa (peso seco), y PHB por litro de medio (HB) a las 72 horas de cultivo. Los números indican porcentaje de peso seco de acumulación de PHB correspondiente a cada cepa. | 45 |

- Figura 11. Productividad promedio de PHB para cada una de las cepas probadas a las 24 y 48 horas de cultivo. El medio utilizado es PYM. 46
- Figura 12. Gráfica tridimensional donde se relaciona la acumulación de PHB, y la tasa de crecimiento (k), con los niveles de productividad de cada cepa. Las agrupaciones son según el nivel de productividad. 48
- Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR para el fragmento 341-926 del gen 16S rARN de la muestras naturales. 49
- Figura 14. DGGE. Electroforesis en gel de acrilamida 6%, con un gradiente desnaturalizante del 30% al 70%. Fragmentos 341-926 del gen 16S rARN. 51

ÍNDICE DE TABLAS

| | Págs. |
|--|-------|
| Tabla I. Diluciones utilizadas en la siembra de placas para los diferentes medios. | 17 |
| Tabla II. Valores promedio de las determinaciones de los parámetros físicos: temperatura y salinidad, y de los parámetros químicos: oxígeno disuelto y pH. | 25 |
| Tabla III. Valores promedio de las determinaciones de nutrientes: amonio, nitritos, nitratos, ortofosfatos y fósforo total. | 25 |
| Tabla IV. Determinaciones de la presencia de PHB empleando rojo Nilo en cultivos a las 24, 48 y 72 horas del sitio La Curva. | 29 |
| Tabla V. Determinaciones de la presencia de PHB empleando rojo Nilo en cultivos a las 24, 48 y 72 horas del sitio La Enlatadora. | 30 |
| Tabla VI. Determinaciones de la presencia de PHB empleando negro Sudán B en cultivos a las 24 y 72 horas del sitio La Curva. | 31 |
| Tabla VII. Determinaciones de la presencia de PHB empleando negro Sudán B en cultivos a las 24 y 72 horas del sitio La Enlatadora. | 32 |
| Tabla VIII. Resultados de las pruebas fenotípicas diagnósticas para las 14 cepas seleccionadas. | 34 |
| Tabla IX. Resultados de BLAST para las bacterias de La Curva productores de PHB. Se presentan el género, especie, cepa y el porcentaje de similitud de los 5 resultados mejor calificados, así como su número de acceso. | 36 |
| Tabla X. Resultados de BLAST para las bacterias de La Enlatadora productores de PHB. Se presentan el género, especie, cepa y el porcentaje de similitud de los 5 resultados mejor calificados, así como su número de acceso. | 36 |
| Tabla XI. Tiempos de generación (t_g) y tasas de crecimiento (k) calculados a partir de la fase exponencial de crecimiento para cada una de las cepas. | 47 |
| Tabla AI. Registro de las bacterias aisladas del sitio La Curva. Primera aproximación a la acumulación de gránulos de PHB. | 97 |
| Tabla AII. Registro de las bacterias aisladas del sitio La Enlatadora. Primera aproximación de la acumulación de gránulos de PHB. | 99 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AMA | Agua marina artificial |
| AZ | Medio diazotrófico |
| BLAST | Herramienta de búsqueda por alineamiento básico local (por sus siglas en inglés) |
| BLS | <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i> |
| °C | Grado centígrado |
| DGGE | Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (por sus siglas en inglés) |
| GC | Guanina-Citosina |
| gr | Gramo |
| h | Hora |
| HB | Hidroxibutirato |
| HHX | Hidroxihexanoato |
| HV | Hidroxivalerato |
| ICR | Inclusiones citoplasmáticas refringentes |
| L | Litro |
| LM | Medio para bacterias luminiscentes |
| m | Metro |
| mg | Miligramo |
| MHB | Medio con hidroxibutirato |
| ml | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| ng | Nanogramo |
| nm | Nanómetro |
| NS | Negro Sudán |
| PA | <i>Pseudomonas</i> agar |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés) |
| PHA | Polihidroxialcanoato |
| PHB | Polihidroxibutirato |
| PHBV | Copolímero de hidroxibutirato e hidroxivalerato |
| PHV | Polihidroxivalerato |
| PY | Medio peptona-levadura |
| PYM | Medio peptona-levadura marino |
| rARN | Ácido ribonucleico ribosomal |
| RN | Rojo Nilo |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| U | Unidades |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| ups | Unidades prácticas de salinidad |
| UV | Ultravioleta |

| | |
|----|------------|
| V | Volt |
| μg | Microgramo |
| μl | Microlitro |
| μM | Micromolar |

1. INTRODUCCIÓN

Sustentabilidad, industria ecológica, y química verde son los nuevos principios que guían el desarrollo de la nueva generación de materiales, productos y servicios. La investigación de la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) ha venido cobrando cada vez más importancia por ser una alternativa real a los plásticos tradicionales de origen petroquímico, los cuales son un factor de contaminación. Por otro lado, su importancia en aplicaciones biomédicas hace que este material sea más interesante en cuanto a su potencial se refiere. Aunque el desarrollo de un sistema biotecnológico eficiente no se ha logrado, para esto, se requiere entre otras cosas, el encuentro de un sistema biológico de síntesis con una gran productividad a base de sustratos relativamente económicos, como lo pueden ser algunas bacterias.

Este trabajo se enfoca en la búsqueda, aislamiento, identificación y estudios de rendimiento de bacterias productoras de PHB de tapetes microbianos de un ambiente marino bentónico litoral impactado por un efluente de una planta enlatadora de productos marinos. Proponiendo que las bacterias aisladas son capaces de obtener sus requerimientos nutricios de dicho efluente, utilizando un sustrato “económico” para la producción de PHB.

1.1. Estructura, síntesis y propiedades del poli- β -hidroxibutirato.

El poli- β -hidroxibutirato es un poliéster (polímero con enlaces tipo éster) de ácido β -hidroxibutírico, el más común entre los polihidroxicanoatos (PHA), sintetizado por bacterias como un polímero de reserva de energía y carbono (Anderson y Dawes, 1990;

Aslim *et al.*, 2002), así como un depósito de equivalentes reductores (Ojumu *et al.*, 2004); se acumula en forma de gránulos intracelulares cuando éstas se encuentran en condiciones de abundancia de carbono pero limitadas por otro nutriente (nitrógeno, azufre, fosfatos, hierro, magnesio o potasio) u oxígeno (Hustede *et al.*, 1993; Lee, 1996; Madison y Huisman, 1999). Las condiciones limitantes de nutrientes pueden ser parciales o totales, sin embargo hay especies que son capaces de acumular PHA bajo condiciones normales (Lee, 1996). La producción y acumulación de PHB se ha propuesto como una estrategia de sobrevivencia de las bacterias a condiciones ambientales adversas (James *et al.*, 1999; Kadouri *et al.*, 2003; Segura *et al.*, 2003b).

Las rutas metabólicas de síntesis están ligadas a la beta oxidación de lípidos, a la *novo* síntesis de ácidos grasos y a la elongación de 3-hidroxicanoatos por moléculas de acetil-CoA. Cuando la producción de PHA se da utilizando ácidos grasos como sustrato la ruta de la β -oxidación es más activa, mientras que si es basada en carbohidratos, la síntesis de ácidos grasos provee de los precursores de PHA (Klinke *et al.*, 1999). Existen alrededor de 150 monómeros diferentes que pueden ser constituyentes de biopolímeros tipo PHA (Rehm, 2003), la composición monomérica determinará las propiedades reológicas del material que se obtenga.

La vía de síntesis de PHB generalmente está mediada por tres enzimas, una β -cetotiolasa (PhbA) que cataliza la condensación de dos unidades de acetil-CoA para formar una de acetoacetil-CoA; una acetoacetil CoA reductasa dependiente de NADPH (PhbB) se encarga de la reducción a D(-)-3-hydroxybutyryl-CoA y una PHB polimerasa o sintasa (PhbC) la cual genera el polímero final (Peoples y Sinskey, 1989; Slater *et al.*, 1998;

Madison y Huisman, 1999). Las dos primeras enzimas pueden estar involucradas en otras vías metabólicas, como lo es la beta oxidación, al contrario, la enzima PHB polimerasa es exclusiva de la síntesis de PHB (Kichise *et al.*, 2002), por lo que la detección del gen que la codifica, *phbC*, es un indicador ideal para revelar la presencia de bacterias productoras de PHB tanto en muestras naturales como en cultivos.

Se reconocen cuatro clases diferentes de PHA sintasas. Clase I: representada por la polimerasa de *Ralstonia eutropha*, constituida por sólo una unidad y con una preferencia a polimerizar monómeros de 3 a 5 carbonos. Clase II: polimerasa característica de *Pseudomonas oleovorans*, ésta también es conformada por una unidad, pero tiene mayor afinidad por sustratos de 6 o más carbonos, produciendo PHA de cadena lateral mediana (PHA_{mcl}, por sus siglas en inglés). Clase III: representadas por la sintasa de *Chromatium vinosum*, constituida por dos subunidades (PhaC y PhaE), con una afinidad a monómeros de 3 a 5 carbonos como las de tipo I (Zhang *et al.*, 2004). Clase IV: se encuentra en *Bacillus megaterium*, también es de dos subunidades pero en este caso PhaE es sustituido por PhaR (Rehm, 2003). Algunos autores consideran que las clases III y IV forman una sola, ya que las polimerasas tienen dos subunidades y tienen afinidad hacia monómeros pequeños. La gran cantidad de organismos que producen y acumulan PHB representan un espectro amplio de condiciones intracelulares en las cuales las enzimas tuvieron que adaptarse para funcionar eficientemente. Esto se ve reflejado en el bajo nivel de conservación entre las secuencias de diferentes PHA sintasas (Madison y Huisman, 1999), lo que sugiere que existen enzimas con diferentes propiedades y capacidades en los sistemas de síntesis.

El biopolímero (PHB) que se obtiene tiene las propiedades de un termoplástico, biodegradable y reciclable con un punto de fusión cercano a los 175 °C (Madison *et al.*, 1999). Sus características físicas en cuanto a material se refieren, son muy similares a la de plásticos petroquímicos tipo poliolefinas como el polipropileno y polietileno (Madison y Huisman, 1999, Kansiz *et al.*, 2000). Se le considera un recurso renovable ya que su biodegradación aeróbica completa resulta en CO₂ y H₂O (Aslim *et al.*, 2002), mientras que en condiciones anaeróbicas también se genera metano (Ojumu *et al.*, 2004). Sus principales aplicaciones se busca que sea en empaques, botellas, fibras, láminas, pinturas, y hasta solventes biodegradables (productos de su hidrólisis) (Madison y Huisman, 1999). Además, debido a su biocompatibilidad y aceptación por el cuerpo humano también tiene aplicaciones biomédicas como es el encapsulamiento de sustancias activas para el desarrollo de medicamentos de liberación controlada, el uso como suturas de vasos sanguíneos, implantes de huesos y soportes para la regeneración de tejidos (Williams *et al.*, 1999), los cuales con el tiempo son degradados y asimilados por el cuerpo.

1.2. Antecedentes.

1.2.1. Estado del arte.

El PHB se describió por primera vez en 1926 en *Bacillus megaterium* por Lemoigne. Actualmente se conocen diversas bacterias productoras de PHA entre las cuales se encuentran los géneros *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhodobacter*, *Rhodospirillum*, entre muchas otras (Madison y Huisman, 1999). Actualmente el organismo más estudiado y utilizado como fuente de PHB es *Ralstonia*

eutropha (Pötter *et al.*, 2004), no obstante nuevos candidatos bacterianos pudieran competir con *R. eutropha* en términos de su productividad, definiendo a ésta como la cantidad de PHB que puede producir por litro por hora de cultivo, lo cual es muy diferente a la capacidad de acumulación de una célula.

En trabajos anteriores se han realizado estudios intensivos de las rutas metabólicas de la síntesis de PHB y análisis moleculares de los genes involucrados con el fin de entender los mecanismos de producción y acumulación, esto para poder mejorar y generar una producción eficiente (Sun *et al.*, 2000). Se han aislado, purificado y caracterizado enzimas participantes en la síntesis de PHA de diferentes organismos para determinar su actividad (Lee, 1996; Slater *et al.*, 1998; Taguchi *et al.*, 2001; Kadori *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004) y entonces poder seleccionar aquellas bacterias que pueden ofrecer mejor eficiencia. El desempeño de la enzima PhbC está estrechamente relacionado con las propiedades del poliéster sintetizado, tal como el peso molecular, la polidispersidad y la variación de la composición en el caso de copolímeros (Kichise *et al.*, 2002), por lo que la búsqueda de nuevas secuencias que codifiquen para enzimas con propiedades más deseables (alta actividad, estabilidad) o bacterias que sean mejores candidatas para la producción de PHA son parte de los objetos de estudio para la culminación de una producción rentable. Así también estudios de los mecanismos de regulación de los sistemas de producción, y mutaciones tanto aleatorias como dirigidas en estos sistemas han logrado obtener una mejoría en las cepas con el fin de generar una línea de organismos modificados genéticamente sobreproductores de biopolímero (York *et al.*, 2001; Peralta-Gil *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2003a; Segura y Espín, 2004; Hoffmann y Rehm, 2004).

El estudio de las propiedades reológicas de diferentes copolímeros de PHA (Ojumu *et al.*, 2004; Luzier, 1992) ha demostrado que la composición monomérica es el elemento determinante para el diseño de materiales con propiedades plásticas específicas para un uso. Las oportunidades de obtener un polímero con monómeros nuevos o con una combinación inusual de estos en el futuro, depende de una bioprospección exitosa de bacterias que sinteticen estos sustratos endógenamente a partir de una fuente de carbono simple y económica (Steinbüchel y Valentin, 1995).

En los años 70, después de la primera crisis de petróleo, la empresa inglesa Imperial Chemical Industries (ICI) comenzó a investigar y desarrollar la producción del copolímero PHBV en *Ralstonia eutropha* y *Alcaligenes latus*, sacando al mercado un material bajo el nombre de “Biopol” (Katircioglu *et al.*, 2003). El problema que actualmente presenta la industria de PHA es el costo del producto final, el cual es de diez a quince veces mayor al costo de una producción equivalente de plásticos petroquímicos como el polipropileno (Lee, 1996; Reddy *et al.*, 2003). En estudios económicos de la producción de PHA se han determinado diferentes factores que afectan el costo de producción, los principales son: el costo y tipo del sustrato sobre el cual se crece la bacteria y del cual obtiene la fuente de carbono para producir el biopolímero (Hustede *et al.*, 1993; Choi y Lee, 2000), la productividad de la cepa (Aslim *et al.*, 2002; Yüksesdag *et al.*, 2003), el tipo de sistema de cultivo y el proceso de recuperación de PHA (Lee, 1996), así como el tratamiento de los desechos del proceso de fermentación y extracción (Page y Cornish, 1993). Por lo que hay dos vías para mejorar los costos de producción, la parte tecnológica que se refiere al mejoramiento de los sistemas de producción y recuperación; y

la parte biológica, que es la búsqueda de nuevos organismos con características más deseables. En lo que se refiere a la productividad de la cepa se busca que ésta tenga un sistema de enzimas más activas para la síntesis de copolímeros y que sea capaz de asimilar sustratos más económicos (i.e. aguas residuales o desechos de industrias alimenticias). Por otro lado, para disminuir los costos de producción también se ha intentado el desarrollo de plantas transgénicas, alfalfa (Sarrul *et al.*, 2002), algodón (John y Keller, 1996) y maíz (Reddy *et al.*, 2003) para la obtención de PHB en cultivos agrícolas, sin embargo los rendimientos no han sido lo suficientemente altos para que esta opción sea rentable, aunado a que las políticas para la liberación de transgénicos son más rigurosas.

1.2.2. Detección y aislamiento de bacterias productoras de PHB.

La mayoría de las búsquedas que se han realizado para el aislamiento de bacterias productoras de PHB ha sido en suelos, pastizales, terrenos agrícolas y lodos activados entre otros (Pal y Paul, 2001; Aslim *et al.*, 2002; de Lima *et al.*, 1999). Esto porque se ha mencionado que las bacterias de suelo generalmente producen PHB (Aslim *et al.*, 2002). De aquí radica parte de la decisión de realizar esta búsqueda en un sistema poco estudiado como el costero-marino. Recientemente Cho y Giovannoni (2004) aislaron y describieron dos bacterias marinas del Mar Sargaso que acumulan gránulos de PHB proponiendo los nombres de *Oceanicola granulosus* y *Oceanicola batsensis*, pertenecientes al orden Rhodobacterales, pero su objetivo no era el del aislamiento de productores de PHB.

La detección de organismos productores de PHB en muestras naturales se ha realizado tradicionalmente a partir de cultivos con procesos posteriores de tinción.

Inicialmente las técnicas implicaban microscopia y después se desarrollaron otras que permiten una discriminación desde las colonias (Starr *et al.*, 1981; Liu *et al.*, 1998; de Lima *et al.*, 1999; Spiekermann *et al.*, 1999), sin embargo las técnicas de detección a partir de tinciones son dependientes del medio y las condiciones de cultivo, siendo valiosas para evidenciar la producción de PHA en una u otra condición. Conforme se han mejorado las técnicas moleculares, y el conocimiento de los genes ha sido suficiente para desarrollar pruebas específicas, se ha comenzado la detección molecular de cepas productoras de PHA (Sheu *et al.*, 2000), utilizando genes clave como indicadores. A pesar que la detección molecular puede ser más específica y sensible tiene el inconveniente de que no permite el cultivo del organismo con dicha capacidad, por lo que cada método de detección es útil para diferentes cuestionamientos.

Rothermich y colaboradores (2000) estudiaron las variaciones diarias y estacionales de PHA en tapetes microbianos fotosintéticos e hicieron una comparación de la producción de PHA en condiciones naturales en tapetes microbianos de España y Australia, encontrando que de una gran diversidad de ambientes, es en los tapetes donde se registran las mayores cantidades de PHA por gramo de sedimento; aunque no realizaron aislamientos de los organismos productores.

En otro trabajo se estudió un tapete microbiano, desarrollado en una poza hidrotermal de Yellowstone, donde identifican organismos pertenecientes a *Heliothrix oregonensis* en los cuales se observa la acumulación de gránulos de PHB. Sin embargo, la observación del biopolímero se realizó como un rasgo descriptivo del organismo, y no con fines en biotecnología (Pierson, 2005).

En la península de Baja California no se ha realizado trabajo alguno donde el objeto de estudio sean los polihidroxicanoatos, por lo que este es el primero que se enfoca en el aislamiento de bacterias productoras de PHB en la península de Baja California, y quizá también es el primero donde un tapete microbiano es la fuente de prospección y aislamiento, con fines biotecnológicos. Sin embargo, sí se ha mencionado el potencial de Arqueobacterias halófilas extremas como productores de PHB, estudiadas en las salinas de Baja California Sur (López-Cortés *et al.*, 1990), aunque sólo se comenta el potencial y a la fecha no se ha realizado un estudio específico.

1.3. Justificación.

1.3.1. Problemática ambiental.

El estudio de la producción de polímeros biodegradables es justificado por el problema de contaminación por sólidos, el cual está llegando a su límite máximo, y por el uso excesivo de recursos fósiles no renovables. El uso de materiales plásticos, sobre todo de origen petroquímico, se ha incrementado exponencialmente en las últimas décadas a nivel mundial, debido a sus propiedades tan deseables como la durabilidad, peso ligero, estabilidad química, resistencia a corrosivos y actividad biológica, además de su versatilidad en estructura (Volke, 1998). Los polímeros sintéticos han proliferado desde los cuarenta, ya que han venido remplazando materiales de construcción como madera, vidrio y hasta metales, en la industria, el hogar y el ambiente (Ojumu *et al.*, 2004). De todas las aplicaciones el 60% representan materiales plásticos que se desechan en corto tiempo y se utilizan principalmente en empaques, envases y en la agricultura (Volke, 1998). Debido a

su característica recalcitrante la concentración de plásticos no biodegradables en el ambiente ha originado problemas de contaminación, acumulándose en el planeta 25 millones de toneladas de estos materiales cada año (Wong *et al.*, 2002). En México, los plásticos representan alrededor del 20% del volumen total y del 12% de peso de los desechos sólidos, solamente rebasado por el papel con 35% de volumen total (Volke, 1998).

Las superficies destinadas para rellenos sanitarios se ven cada vez más limitadas. Como soluciones para la degradación de polímeros petroquímicos se ha optado desde la incineración, lo cual no es conveniente ya que algunos plásticos producen químicos tóxicos (ácido clorhídrico y cianuro de hidrógeno) durante su cremación; también se han desarrollado programas de reciclaje, que ha sido una de las soluciones más fuertes, sin embargo no todos los países o ciudades cuentan con las tecnologías y la organización para tal propósito, además estas opciones no disminuyen el gasto de recursos fósiles ni disminuyen las emisiones de dióxido de carbono, elementos que comienzan a ser preocupantes a nivel global. La continua disminución de los recursos fósiles no renovables genera un mayor énfasis en la necesidad de materiales plásticos provenientes de recursos renovables, como es el caso de los plásticos microbianos (Katircioglu *et al.*, 2003). La tasa a la cual se generan recursos fósiles como el petróleo está en completo desbalance con la tasa a la cual están siendo consumidos. Algo similar sucede con las emisiones de CO₂, las cuales son mayores a las cantidades que se secuestran como recursos fósiles (Narayan, 2004). Por lo que el desarrollo de materiales biodegradables que puedan sustituir a los plásticos petroquímicos tiene gran relevancia.

Sustentabilidad, industria ecológica, y química verde son los nuevos principios que guían el desarrollo de la nueva generación de materiales, productos y servicios. Los materiales biológicos son promisorios para alcanzar la meta de un desarrollo sustentable bajo el principio de industria ecológica, ya que forman parte del ciclo biológico del carbono (Narayan, 2004). Como una opción real se encuentran los biopolímeros entre los cuales están polihidroxicanoatos (PHA), policaprolactonas, poliésteres alifáticos, polisacáridos, polibutilenosuccinato, poliéstercarbonato y polilactidas (Volke, 1998, Tokiwa y Calabia, 2004). El PHA es un polímero biodegradable del tipo poliéster, que puede ser producido intracelularmente por bacterias, arqueobacterias y cianobacterias, siendo el grupo de las bacterias el más diverso en cuanto a productores de PHA. La ventaja de este material sobre otros bioplásticos es que éste no requiere de condiciones ambientales especiales para su degradación, ya que puede ser biodegradado bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Tokiwa y Calabia, 2004). El término biodegradación se define como el rompimiento de un compuesto orgánico por microorganismos en la presencia de oxígeno en bióxido de carbono, agua y sales minerales más biomasa (ISO, 1999).

1.3.2. Estudio de la diversidad microbiana.

El uso de herramientas moleculares en los últimos 20 años ha demostrado que sólo una fracción extremadamente pequeña de la diversidad microbiana de todos los hábitats investigados se ha logrado cultivar (Head *et al.*, 1998; Muyzer *et al.*, 1998). Existiendo entonces un gran reservorio inexplorado de componentes naturales con un potencial en diversidad que pueden ser usados como recursos para innovación en biotecnología y el

desarrollo de procesos, productos y servicios (Bull *et al.* 1992; Keller y Zengler, 2004), en este caso la producción de PHB.

El punto de partida para el desarrollo biotecnológico es la búsqueda y descubrimiento de fenómenos biológicos explotables. La planeación y la optimización de los programas de prospección son tan cruciales como cualquier otra fase de la operación del bioproceso. La búsqueda y descubrimiento se consideran como la secuencia de varias etapas, comenzando por la obtención del material biológico adecuado, siguiendo con la bioprospección de la propiedad deseada, la selección de la mejor opción del conjunto de organismos prospeccionados, culminando con el desarrollo y aceptación del producto o proceso final (Bull *et al.*, 1992). Nuestro trabajo se ubica en el primer peldaño de cualquier proceso biotecnológico que es la prospección de un organismo, dentro de la biodiversidad de un sitio, que tenga potencial para desarrollar la producción y acumulación significativa de PHB.

El sitio seleccionado se encuentra eutrofizado por el derrame de una planta de tratamiento primario de una enlatadora de productos pesqueros. Este es un sistema de enriquecimiento para el desarrollo selectivo de ciertas poblaciones de bacterias heterótrofas, bacterias fotótrofas anoxigénicas y cianobacterias, formando una alfombra microbiana, capaces de emplear compuestos orgánicos que caracterizan el efluente de la enlatadora de Puerto San Carlos. La visión de este proyecto enfatiza el aprovechamiento de materiales típicamente denominados “de desecho”, como es el caso del efluente de la enlatadora, el cual promueve el enriquecimiento de bacterias, proponiendo el uso de cultivos de bacterias heterótrofas como sistema de tratamiento de las aguas residuales que

además de disminuir la carga de materia orgánica del desecho, permita la obtención de poli- β -hidroxibutirato, ofreciendo así un valor agregado al efluente.

1.4. Objetivos.

1.4.1. Objetivos generales.

Utilizar la biodiversidad presente en un tapete microbiano como una fuente de biotecnología y aprovechar un efluente, producto de un tratamiento primario, que promueve el enriquecimiento de bacterias, para el aislamiento de bacterias productoras de PHB candidatas para una producción industrial.

1.4.2. Objetivos particulares.

- Aislar y detectar bacterias productoras de PHB a partir de un tapete microbiano de origen marino.
- Identificar a nivel de género las bacterias aisladas por método polifásico.
- Valorar el rendimiento de la producción de PHB en las diferentes cepas.

1.5. Hipótesis.

Si la diversidad de bacterias productoras de PHB está bien representada en microorganismos heterótrofos, esperamos recuperar con mayor abundancia bacterias productoras de PHB en un ambiente impactado por un derrame rico en materia orgánica, el cual enriquece a las poblaciones heterótrofas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. *Colecta de muestras.*

Se realizó la salida de campo, el 15 de octubre del 2004, a Puerto San Carlos, Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. En dicha localidad se visitaron dos sitios: 1) “La Curva”, con la posición geográfica $24^{\circ} 48' 19''$ N y $112^{\circ} 06' 43.6''$ O (Figura 1), al cual lo consideramos en este trabajo como una localidad no impactada por el efluente de la enlatadora de productos pesqueros, el sedimento que presenta es característico de playas arenosas (Figura 1C); y 2) “La Enlatadora”, con las coordenadas $24^{\circ} 46' 56.4''$ N y $112^{\circ} 06' 21.1''$ O (Figura 1), sitio que si se encuentra impactado por el efluente de desecho de la enlatadora que descarga directamente tanto dentro del mar como en la línea de costa (Figura 1A). El sustrato de la zona intermareal se encuentra cubierto por una alfombra microbiana de aproximadamente 1 cm de grosor (Figura 1B).

En cada uno de los sitios se establecieron dos cuadrantes, a 5 m (E1 y C1, La Enlatadora y La Curva respectivamente) y 15 m (E2 y C2) de la rompiente mar adentro. En cada cuadrante se obtuvo una muestra de sedimento por duplicado (i.e. E1_A y E1_B), obteniendo un total de cuatro muestras por sitio. Simultáneamente se colectaron dos litros de agua marina, una parte fue utilizada para análisis de oxígeno disuelto por el método de Winkler, mientras la otra se filtró para análisis de nutrientes; el pH y la temperatura se midieron *in situ*.

Las muestras de sedimento que se obtuvieron fueron submuestreadas y almacenadas en nitrógeno líquido para la extracción de ADN de la comunidad natural, el resto se mantuvo fresco para la obtención de los aislamientos de las bacterias.

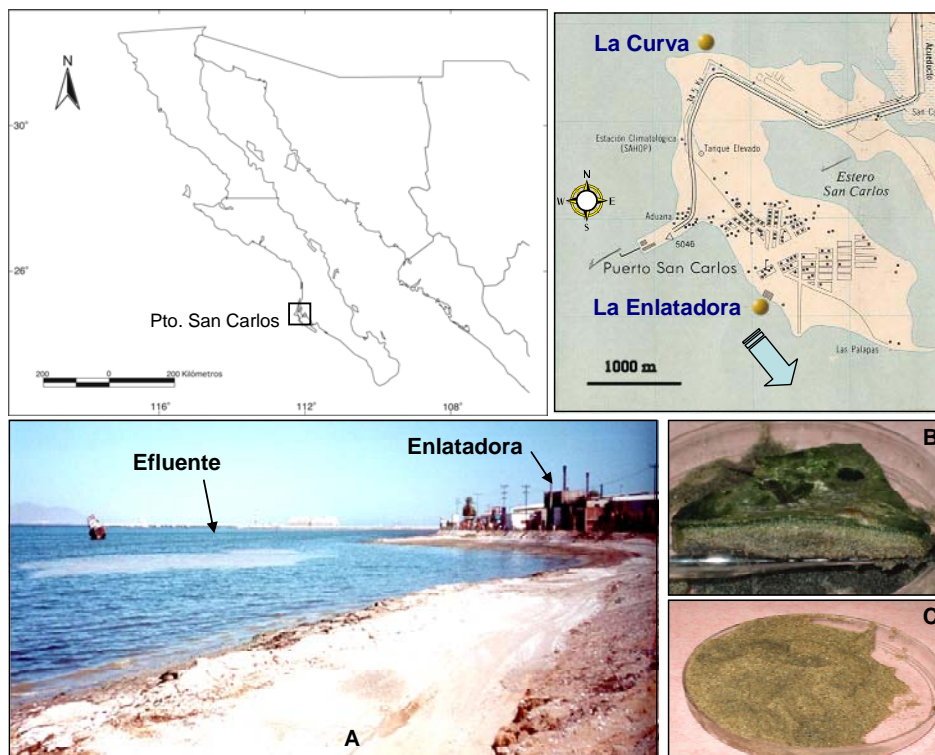


Figura 1. Ubicación de la localidad y de los sitios de muestreo, la flecha azul en el mapa de Puerto San Carlos indica la dirección de la corriente. Fotos: A) sitio La Enlatadora, B) muestra de sedimento de La Enlatadora (tapete microbiano) y C) muestra de sedimento de la curva.

2.2. Análisis fisicoquímico del agua.

Las muestras de agua se entregaron al Laboratorio de Análisis Químico de Agua del CIBNOR para realizar las determinaciones de salinidad, oxígeno disuelto, amonio, nitritos, nitratos, ortofosfatos y fósforo total. La temperatura y el pH (potenciómetro sympHony SB20: VWR) fueron medidos *in situ*.

2.3. Aislamientos y cultivos.

La recuperación de bacterias heterótrofas de las muestras naturales se realizó aproximadamente 20 horas después de la colecta, para esto se sembraron placas con inóculos de cada una. Se pesó un gramo de sedimento o tapete microbiano y se homogeneizó en 9 ml de agua marina artificial $\frac{1}{2} \times$ (AMA $\frac{1}{2} \times$, gr L⁻¹ de agua: NaCl, 11.675; KCl, 0.75; MgSO₄·7H₂O, 12.35; CaCl₂·2H₂O, 1.45; Tris HCl Buffer 1.0 M pH 7.5 5%) estéril. A partir de este homogeneizado se realizaron diluciones seriadas en AMA $\frac{1}{2} \times$ hasta 1×10^{-10} (Starr *et al.*, 1981). Se utilizaron seis medios de cultivo para realizar los aislamientos: 2216: agar marino 2216 (Difco); medio libre de nitrógeno AZ (Azotobacter #3 de DSMZ) (gr L⁻¹: glucosa, 5; manitol, 5; CaCl₂ · 2 H₂O, 0.1; MgSO₄ · 7 H₂O, 0.1; Na₂MoO₄ · 2 H₂O, 0.005; K₂HPO₄, 0.9; KH₂PO₄, 0.1; FeSO₄ · 7 H₂O, 0.01; CaCO₃, 5; agar, 15); medio para bacterias marinas luminiscentes LM (gr L⁻¹, AMA $\frac{1}{2} \times$ -Tris-HCl: NH₄Cl, 1; K₂HPO₄, 0.076; FeSO₄ · 7 H₂O, 0.028; extracto de levadura, 5; triptona, 5; CaCO₃, 1; agar, 15; 3 ml de glicerol 3%); PA, *Pseudomonas* agar (Difco); medio peptona-levadura (con agua destilada) PY (gr L⁻¹: peptona, 5; extracto de levadura, 3; glucosa, 20; agar, 15) (Segura *et al.*, 2003a); medio peptona-levadura marino (con agua AMA $\frac{1}{2} \times$) PYM (gr L⁻¹: peptona, 5; extracto de levadura, 3; glucosa, 20; agar, 15).

Para cada medio se sembraron cinco diluciones, aunque éstas no fueron las mismas para todos debido a la selectividad de cada uno de ellos. En aquellos donde el medio presenta mayor selectividad, se utilizaron diluciones menores, con el fin de lograr los aislamientos (Tabla I). Así mismo las diluciones utilizadas para cada sitio también fueron diferentes, ya que la densidad microbiana esperada en La Enlatadora era mayor a la de La

Curva. Las placas inoculadas fueron incubadas a 30 °C, y fueron inspeccionadas a las 24, 48, 72 y 96 horas en búsqueda de nuevas colonias.

Tabla I. Diluciones utilizadas en la siembra de placas para los diferentes medios.

| Medio | La Enlatadora | La Curva |
|-------|--|---------------------------------------|
| 2216 | $1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-10}$ | $1 \times 10^{-2} - 1 \times 10^{-5}$ |
| AZ | $1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-7}$ | $1 \times 10^{-1} - 1 \times 10^{-4}$ |
| LM | $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-9}$ | $1 \times 10^{-2} - 1 \times 10^{-5}$ |
| PA | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$ | $1 \times 10^{-2} - 1 \times 10^{-5}$ |
| PY | $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-8}$ | $1 \times 10^{-2} - 1 \times 10^{-5}$ |
| PYM | $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-9}$ | $1 \times 10^{-2} - 1 \times 10^{-5}$ |

Cada colonia que presentó un morfotipo diferente en los diferentes medios, fue transferida a medio PYM para su aislamiento. Simultáneamente cada cepa fue observada en un microscopio Nikon con contraste de fases para dos fines: 1) el de conocer el tipo células que conforman la colonia y 2) la búsqueda de inclusiones citoplasmáticas refringentes (ICR) sugestivas de la presencia de PHB (Starr *et al.*, 1981).

2.4. Detección de cepas productoras de PHB.

Se utilizaron tres criterios morfológicos para la detección de cepas productoras de PHB. El primero fue la búsqueda de inclusiones citoplasmáticas refringentes con microscopia de contraste de fases (Starr *et al.*, 1981). Los otros dos criterios fueron las

tinciones lipofílicas negro Sudán (Burdon, 1946; Starr *et al.*, 1981; de Lima *et al.*, 1999) y rojo Nilo (James, 1999; Spiekermann, 1999), con esto se determinó si los ICR observados en contraste de fases eran de origen lipídico como el PHB.

a) Rojo Nilo: La tinción con rojo Nilo se realizó *in vivo*. Se adicionó el colorante en el medio a una concentración de $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de medio. Los cultivos líquidos se realizaron en tubos eppendorf de 1.5 ml, incubados a 30°C y se observaron a las 24, 48 y 72 horas en un microscopio Nikon de epifluorescencia, excitando el rojo Nilo a una longitud de onda de 540 nm, en busca de la señal naranja que emite al reaccionar con el PHB (Spiekermann, 1999) (Figura 4).

b) Negro Sudán B: Se realizó un frotis fijado a la flama, se tiñó durante 10 minutos con solución negro Sudán B (0.3 gr NS-B, 75 ml etanol 95%, 25 ml H_2O), se secó con papel filtro Watman no.1, se clarificó con gotas de xileno, se volvió a realizar el secado y se tiñó con Safranina acuosa al 0.5% como contraste (NCBE, 1995). Las preparaciones se realizaron a partir de cultivos líquidos en tubo de 5 ml de volumen, a 30°C y en agitación a 110 rpm y se observaron a las 24 y 72 horas con un microscopio Nikon en campo claro en búsqueda de inclusiones oscuras dentro de las células (Figura 4).

2.5. Identificación polifásica.

2.5.1. Fenotípica.

Para la identificación de nuestras cepas se realizó una aproximación polifásica (fenotípica y filogenética), se ensayaron las siguientes pruebas diagnósticas de la parte fenotípica: morfología colonial; morfología celular: forma y tamaño; tinción Gram (BBL) a

las seis horas de cultivo; motilidad con agar blando (Extracto de levadura 0.1%, K_2HPO_4 0.01% y 0.2% de agar); crecimiento en agar nutritivo con 12% de NaCl; desarrollo en condiciones anaeróbicas evaluado en medio Brewer Tioglicolato (Difco) y agar de anaerobiosis Brewer (Difco); otras pruebas fueron: producción de oxidasa (BBL) y catalasa (H_2O_2); y la capacidad de crecer en un medio diazotrófico.

2.5.2. Filogenética.

2.5.2.1. Extracción de ADN.

Se utilizaron dos métodos (kits) de extracción, uno para las muestras naturales y otro para los cultivos. La extracción del material genético de las muestras naturales se realizó utilizando el FastDNA SPIN Kit (BIO 101 system) para muestras de suelo. Posteriormente fue necesaria su purificación con el GENCLEAN KIT (BIO 101 system). Por otro lado, la extracción de ADN de los cultivos se realizó empleando el DNeasy Tissue Kit (QIAGEN).

La visualización del ADN se realizó con electroforesis en geles de agarosa al 1% adicionado con bromuro de etidio al 3% de una solución de 10 mg ml^{-1} , auxiliados de un fotodocumentador UV transilluminator UVP (BioDoc-It System). Las corridas de la electroforesis se realizaron a 100 V. El ADN se cuantificó con la ayuda de un espectrofotómetro BioPhotometer Eppendorf.

2.5.2.2. Condiciones de PCR y secuenciación.

Para la amplificación del fragmento 341-926 del gen 16S rARN se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 1X Buffer termofilico DNA Poly (M190A-Promega), mezcla de nucleótidos para PCR (C1141-Promega) 0.53 mM de todos, MgCl₂ (Promega) 1.5mM, primer 5'- 3' (341F+GC) 2.6 ng μl⁻¹, primer 3'- 5' (907R) 2.6 ng μl⁻¹, Taq DNA Polimerasa en Buffer B (M1661-Promega) 0.04 U μl⁻¹, ADN de 50 a 100 ng de los cultivos o muestras naturales. La temperatura de alineación fue de 56 °C, y la amplificación sucedió en 35 ciclos. El primer 5'- 3' lleva una secuencia (cola) extra de Guanina-Citosina (GC), esto para obtener una mayor resolución en la técnica de DGGE. Se seleccionó el gen 16S rARN por su alto grado de conservación intercalado con regiones más variables y por el amplio uso como marcador filogenético que se le ha dado (Head *et al.*, 1998; Roselló-Mora y Amann, 2001).

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados (específicos para bacterias) (Muyzer *et al.*, 1998) se presentan a continuación:

341F: 5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3'

907R: 5' - CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT - 3'

Cola de GC: 5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG
GGG G – 3', (enlazado al oligo 341F en su extremo 5')

Los productos de PCR se enviaron a MACROGEN, Inc., Corea para su secuenciación.

2.5.2.3. Árbol filogenético.

Las secuencias recibidas de MACROGEN fueron analizadas con ayuda del programa Chromas Pro v1.132, donde se recortaron las colas de Guanina-Citosina (GC), y los extremos que no eran confiables, también se evaluaron aquellas bases indeterminadas con ayuda del cromatograma. Se utilizó la herramienta de búsqueda por alineamiento básico local (BLAST por sus siglas en inglés) (Altschul *et al.*, 1997) de la base de datos NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) para obtener secuencias similares a la de las cepas. Con el programa Clustal X v1.8 se realizó el alineamiento de las secuencias, y mediante el uso de PUAP* 4.0 beta 10 para Windows se realizó un análisis de parsimonia para la creación del árbol filogenético y el cálculo de sus parámetros (Hall, 2004).

2.6. Condiciones de DGGE.

La electroforesis en gel con gradiente desnaturizante se realizó en geles de poliacrilamida al 6%, a partir de una mezcla de Acrilamida/Bisacrilamida al 40% (BioRad). El gradiente desnaturizante que se manejó fue de 30% a 70%, considerando 40% de formamida (BioRad) y 42% de urea (Sigma) como 100% de agente desnaturizante. En la parte superior del gel se formó una sección de empaquetamiento el cual no contenía formamida ni urea (0% de desnaturizante). La electroforesis se llevó a cabo a 60 °C y a 50 V durante 19 horas (modificado de Garbeva *et al.*, 2003). La visualización se realizó con luz UV tiñendo el gel con bromuro de etidio durante 20 minutos.

2.7. Parámetros de crecimiento celular.

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada una de las cepas, a partir de una medición sistemática de la densidad óptica. Se prepararon tubos de vidrio con 10 ml de medio PYM los cuales fueron inoculados con una asada de cada una de las cepas productoras, y fueron incubados durante 24 horas a 28 °C a 120 rpm. De estos tubos se tomaron 5 ml como inóculo para matraces de 1 litro con 300 ml de medio PYM, cada cepa por duplicado (se utilizó el mismo tubo para inocular las réplicas). A partir del momento de inoculación se midió la densidad óptica cada 6 horas durante 48 horas, utilizando un espectrofotómetro JENWAY 6505 UV/Vis a una longitud de 580 nm.

2.8. Determinación de la producción de PHB y productividad de las cepas.

El porcentaje de acumulación de PHB y la productividad de las cepas se evaluó en dos medios. El primero fue en PYM, medio en el cual se detectó la producción de PHB. Para esta primera aproximación se tomaron muestras de cultivo del experimento para la determinación de los parámetros de crecimiento celular. Se cosecharon 30 ml de cultivo a las 24 y 48 horas, de los cuales 15 ml se centrifugaron y liofilizaron para la determinación del peso seco, y 15 ml para la determinación del contenido de PHB mediante el método modificado de Law y Speckley (1961). La lisis celular se realizó con hipoclorito de sodio (Clorox) incubando a 37 °C durante una hora, y el PHB precipitado fue lavado con agua, acetona y etanol sucesivamente. Posteriormente el PHB extraído es convertido en ácido crotónico mediante una digestión en ácido sulfúrico a 100 °C durante 10 minutos y cuantificado con ayuda de un espectrofotómetro a 235 nm (Law y Speckley, 1961).

La segunda etapa se realizó con un medio basal pobre en nitrógeno y enriquecido con la sal hidroxibutirato de sodio, medio MHB (con agua AMA $\frac{1}{2}$ x) (gr L^{-1} : NH_4Cl , 0.5; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0.076; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.028; Hidroxibutirato de Sodio, 4.0; y Tris-HCl pH = 7.5, 50 ml) (Starr *et al.*, 1981). Se prepararon tubos con 5 ml de medio MHB, los cuales fueron inoculados con una asada de las cepas, y fueron incubados a 28 °C y 120 rpm, durante 24 horas para su adaptación. De estos tubos se tomaron 2 ml para inocular matraces de 125 ml con 40 ml de medio MHB por duplicado. Se tomaron 3 ml de medio a las 24 horas y 30 ml a las 72 horas, de los cuales la mitad fue para determinar peso seco y la mitad para determinar el contenido de PHB.

2.9. Pruebas estadísticas.

Los análisis comparativos de las determinaciones de los parámetros fisicoquímicos y del contenido de material genético en el sedimento entre los sitios se realizaron con pruebas tipo ANOVA, utilizando un intervalo de confianza del 95% y el programa SPSS 12.0.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterización del sitio de muestreo.

3.1.1. Parámetros fisicoquímicos.

En ambos sitios de muestreo se tomaron muestras de agua para determinar concentraciones de diversos nutrientes y poder determinar diferencias entre los sitios. Los nutrientes analizados fueron amonio, nitritos, nitratos, ortofosfatos, fósforo total, además de que se determinó la salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto. Los valores promedio los parámetros fisicoquímicos y de los nutrientes para cada sitio se presentan en la Tabla II y III respectivamente. La salinidad promedio fue similar para ambos sitios encontrándose alrededor de las 32.5 ups, siendo ligeramente mayor para La Enlatadora. El oxígeno disuelto tampoco mostró diferencia significativa, teniendo ambos sitios un valor menor de 5 ml/L, sin embargo La Curva es el sitio que presentó valores mayores. En el caso de la temperatura se presentan 29.6 °C y 31.0 °C para La Curva y La Enlatadora respectivamente. El pH fue mayor en La Enlatadora con un valor de 8.46, mientras que La Curva presentó un valor de 8.2. En el caso de los nitritos la concentración es mínima, por debajo del límite de detección, por lo que se cuantificó como menor a 0.1 µM para ambos sitios. Los nitratos presentaron una concentración promedio de 0.837 µM y 0.761 µM para La Curva y La Enlatadora respectivamente. Ninguno de los parámetros anteriores presenta una diferencia significativa entre sitios, sólo la hay para el caso del amonio, los ortofosfatos y el fósforo total, estando los tres en mayor concentración en La Enlatadora.

Tabla II. Valores promedio de las determinaciones de los parámetros físicos: temperatura y salinidad, y de los parámetros químicos: oxígeno disuelto y pH. En la última fila se presentan los valores de probabilidad estadística que determinan si las diferencias observadas son significativas ($P < 0.05 = \text{dif. sig.}$). ups = unidades prácticas de salinidad.

| Muestra | Salinidad (ups) | Temperatura °C | Oxígeno disuelto (ml/L) | pH |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------|
| La Curva | 32.425 | 29.6 | 4.846 | 8.20 |
| La Enlatadora | 32.600 | 31.0 | 4.183 | 8.46 |
| P | 0.93 | | 0.52 | |

Tabla III. Valores promedio de las determinaciones de nutrientes: amonio, nitritos, nitratos, ortofosfatos y fósforo total. En la última fila se presentan los valores de probabilidad estadística que determinan si las diferencias observadas son significativas ($P < 0.05 = \text{dif. sig.}$).

| Muestra | Amonio NH ₄ (μM) | Nitrito NO ₂ (μM) | Nitrato NO ₃ (μM) | Ortofosfato PO ₄ (μM) | Fósforo total PO ₄ -Total (μM) |
|----------------------|--|---|---|---|--|
| La Curva | 1.127 | < 0.1 | 0.837 | 0.293 | 0.724 |
| La Enlatadora | 3.763 | < 0.1 | 0.761 | 2.638 | 3.503 |
| P | 0.02 | | 0.86 | < 0.01 | < 0.01 |

Con base en los resultados de las determinaciones de nutrientes en la columna de agua, principalmente los de amonio, ortofosfatos y fósforo total, se evidencia que efectivamente el efluente de la enlatadora está eutrofizando la zona costera adyacente a su descarga. Esta eutrofización está permitiendo el enriquecimiento selectivo de microorganismos, lo cual está resultando en la formación y crecimiento del tapete microbiano frente a la enlatadora de Puerto San Carlos.

3.1.2. *Estimación de la densidad poblacional bacteriana.*

Con el fin de determinar diferencias en la estructura de la comunidad bacteriana entre los dos sitios, se determinó las cuentas viables en seis medios de cultivo diferentes a partir del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de las placas que se utilizaron para realizar los primeros aislamientos. Como se utilizaron seis medios diferentes para los aislamientos se tiene un conteo por cada medio (Figura 2). En el caso de los medio PA y PY para La Curva no se pudo obtener un dato fiable ya que las placas presentaron efecto de *swarming* lo que hizo incontables las placas y se consideraron como no determinadas. El medio 2216 y el PYM nos pueden dar una mejor idea de la densidad bacteriana de los sitios, esto por ser medios inespecíficos para bacterias marinas. En el caso del medio 2216 se tiene una densidad de 9.66×10^9 UFC y 8.33×10^5 UFC para La Enlatadora y La Curva respectivamente; mientras que en el medio PYM es de 2.27×10^8 y 6.67×10^5 , respectivamente; siendo claro que hay una mayor abundancia de bacterias (de 3 a 4 órdenes de magnitud) en el sitio La Enlatadora que en La Curva. Este resultado era presumible por el hecho de la presencia del tapete microbiano, así con el conteo queda corroborado.

Por otro lado al momento de hacer la extracción de ADN de las muestras naturales se observó una diferencia significativa ($P < 0.01$) en el contenido de material genético por gramo de sedimento, siendo éste casi un orden de magnitud superior en las muestras de La Enlatadora ($18.549 \mu\text{g}/\text{gr}$), mostrando una mayor abundancia de organismos que en La Curva ($2.497 \mu\text{g}/\text{gr}$) (Figura 3).

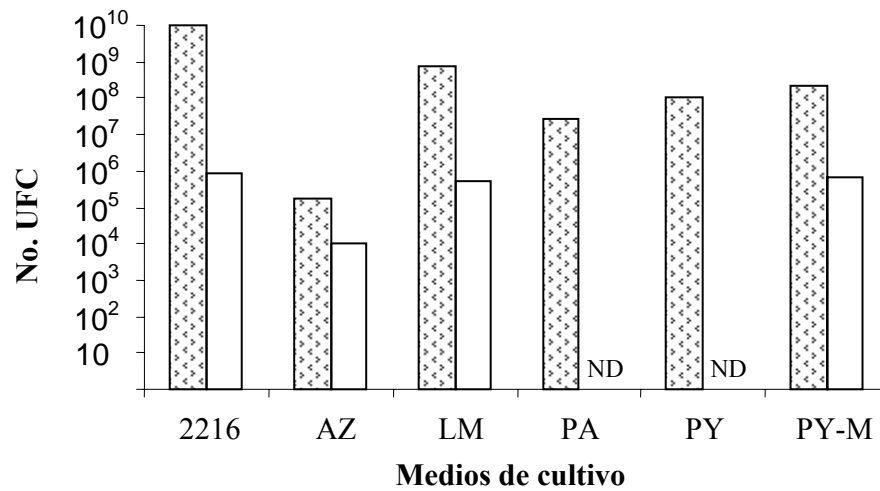


Figura 2. Densidad bacteriana expresada en número de células por gramo de sedimento para los sitios de La Enlatadora (▨) y La Curva (□). Se presentan conteos de los seis medios utilizados en el aislamiento. ND = no determinado.

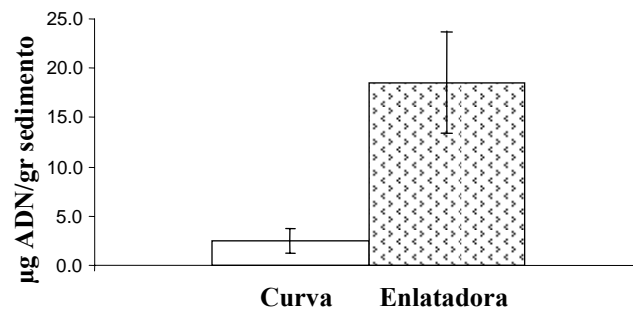


Figura 3. Contenido promedio de ADN en las muestras naturales obtenidos con el Kit de extracción BIO 101. La concentración se expresa en μg de ADN por gramo de sedimento. La barra de error es igual a la desviación estándar, $n = 12$ en cada sitio.

3.2. Detección y aislamiento de cepas productoras de PHB.

3.2.1. Aislamientos y observaciones de Inclusiones Citoplasmáticas Refringentes.

A partir de los crecimientos que sucedieron en las placas donde se realizaron los conteos de UFC se seleccionaron las colonias que presentaban diferentes características morfológicas (color, textura, tamaño, bordes, brillo, medio de cultivo) y se transfirieron a medio PYM para su purificación. Durante el proceso de transferencia, se tomó una muestra de la colonia para su observación con un microscopio de contraste de fases con dos finalidades: 1) la de conocer su morfología celular, y 2) la búsqueda de inclusiones citoplasmáticas refringentes (ICR) que sugieren la acumulación de PHB.

Se obtuvieron 54 cepas aisladas totales para La Curva de los cuales 10 presentaron ICR claros además de 8 cepas con estructuras sugestivas pero no del todo claras. Para las muestras de La Enlatadora se lograron 72 aislamientos totales de los que sólo 18 presentaron ICR bien definidos y 5 cultivos tentativos. El registro de las cepas aisladas, el medio en que fueron aisladas, el color de la colonia, la forma celular y la presencia/ausencia de ICR se presentan en la Tabla A.I y A.II del Anexo 1.

3.2.2. Detección de inclusiones lipídicas.

De las 126 cepas aisladas logradas para La Curva (54) y La Enlatadora (72), se registraron 10 y 18 cultivos, respectivamente, que presentaron inclusiones citoplasmáticas refringentes (ICR) claras, sugestivo de gránulos de PHB. Para determinar si estas inclusiones eran de naturaleza lipídica se emplearon los tintes rojo Nilo (RN) y negro Sudán B (NS) (Figura 4). Siendo positivas para el rojo Nilo seis cepas (11%) para La Curva (Tabla IV) y ocho (11%) para La Enlatadora (Tabla V). Mientras que en el caso del

negro Sudán resultaron positivas cinco cepas (9%) para La Curva (VI) y diez (14%) para La Enlatadora (Tabla VII). En estas pruebas se incluyeron las cepas que se habían identificado como sugestivas pero no claras en la observación de ICR, por esta razón se presentan más de las 28 cepas ICR positivos. Porcentualmente, la prueba con negro Sudán B nos revela que en La Enlatadora hay una mayor abundancia de cepas productoras de PHB en los aislamientos logrados. Mientras que para el rojo Nilo la abundancia relativa de productores de PHB es igual en ambos sitios, sin embargo numéricamente La Enlatadora sigue teniendo una mayor abundancia de estos organismos. Pero no hay que olvidar que estas tinciones identifican cuerpos lipídicos los cuales pueden ser distintos al PHB, por lo que la determinación final de las cepas productoras se realizó con la extracción y cuantificación química del polímero.

Tabla IV. Determinaciones de la presencia de PHB empleando rojo Nilo en cultivos a las 24, 48 y 72 horas del sitio La Curva. En la segunda columna (RN) se indica la interpretación de los resultados de la prueba, (+) positivo altamente confiable, (P) probable o sugestivo, (-) negativo.

| Cepa | RN | 24 horas | 48 horas | 72 horas |
|--------|----|---|--|--|
| C-1 | + | No hay señal | Intensidad media a baja, se distinguen gránulos. | Media, gránulos, pero ya no es abundante |
| C-5 | - | No hay señal | Nada claro | No hay señal clara |
| C-18 | + | Buena señal, se distinguen gránulos, mezcla | Positivo | |
| C-19 | + | Señal débil, gran cantidad de gránulos | Positivo | |
| C-20R | + | Señal media, células saturadas, gránulos | Positivo | |
| C-20L | + | Señal intensa, se distinguen gránulos | Positivo | |
| C-41AM | - | No hay señal | No se observan gránulos | No hay señal |
| C-41TR | - | No hay señal | No hay señal | No hay señal |

| | | | | |
|------|---|---|-------------------------|--------------|
| C-46 | - | No hay señal | Señal de las células | No hay señal |
| C-47 | - | No hay señal | No se observan gránulos | No hay señal |
| C-48 | - | No hay señal | No hay señal | No hay señal |
| C-50 | - | No hay señal clara | No hay señal | No hay señal |
| C-52 | - | No hay señal clara | No hay señal | No hay señal |
| C-53 | - | No hay señal | No hay señal | No hay señal |
| C-54 | + | Señal buena, poca, se distinguen gránulos | Positivo | Positivo |

Tabla V. Determinaciones de la presencia de PHB empleando rojo Nilo en cultivos a las 24, 48 y 72 horas del sitio La Enlatadora. En la segunda columna (RN) se indica la interpretación de los resultados de la prueba, (+) positivo altamente confiable, (P) probable o sugestivo, (-) negativo.

| Cepa | RN | 24 horas | 48 horas | 72 horas |
|------------------|----|--|---|---|
| E-3 | + | Señal intensa, parece teñirse toda la célula | Señal buena | Positivo |
| E-4 | + | Señal intensa, parece teñirse toda la célula, se distinguen gránulos | Señal intensa, | Positivo |
| E-4 ^a | + | Señal intensa, mayor señal en agregados | Señal intensa | Positivo |
| E-6b | + | Señal intensa | Señal intensa, parece toda la célula | |
| E-7 | P | Señal intensa en agregados, no se distinguen gránulos claros | | |
| E-13 | + | Señal intensa y clara, gránulos grandes | Señal intensa y clara | Positivo |
| E-22 | - | No hay señal clara | No hay señal | No hay señal |
| E-32 | - | Señal media y poca, | No hay señal | No hay señal |
| E-33 | - | No hay señal clara | Ligera señal pero no clara | No hay señal clara |
| E-36 | P | No hay señal clara | No hay señal | Parecen muchos gránulos pequeños, no es intensa |
| E-38 | - | Señal tenue al fondo | Señal muy tenue | No hay señal |
| E-45 | + | Poca señal, intensidad media, gránulos | Señal media, se distinguen gránulos | Positivo |
| E-46BL | - | No hay señal | Nada claro | No hay señal |
| E-46CF | P | No hay señal | Poca señal, gránulos bien definidos, intensidad media | Muy poca señal |

| | | | | |
|-------------------|---|---|----------------------------|--|
| E-51 | P | No hay señal clara | No hay señal clara | Señal muy tenue, se ven células teñidas |
| E-56 | - | No hay señal clara | No hay señal clara | No hay señal clara |
| E-62 | P | Señal muy pobre | No hay señal | Gránulos de intensidad media, poco abundante |
| E-63 ^a | P | Señal tenue al fondo | Señal media con fantasma | |
| E-63b | - | Señal tenue al fondo, | Señal tenue | No hay señal |
| E-70 | - | Señal muy tenue | Señal muy tenue nada claro | Sólo fantasma |
| E-71 | + | Señal intensa y clara, gránulos grandes y definidos | Señal muy clara, gránulos | Positivo |
| E-72 | + | No hay señal clara, conglomerados | No hay señal clara | Buena señal |

Tabla VI. Determinaciones de la presencia de PHB empleando negro Sudán B en cultivos a las 24 y 72 horas del sitio La Curva. En la segunda columna (NS-B) se indica la interpretación de los resultados de la prueba, (+) positivo altamente confiable, (P) probable o sugestivo, (-) negativo.

| Cepa | NS-B | 24 horas | 72 horas |
|-------------|-------------|---|-----------------------------|
| C-1 | P | Sólo pocas células, o en poca cantidad | muy pequeños, frecuente |
| C-5 | - | Nada claro | Negativo |
| C-18 | + | Gránulos claros, abundantes | Positivo |
| C-19 | + | Gránulos medianos a grandes, abundantes | Gránulos chicos, frecuentes |
| C-20L | + | Gránulos claros, abundantes, grandes | Positivo |
| C-20R | + | Gránulos claros, abundantes, grandes | Positivo |
| C-41TR | - | Nada claro | Negativo |
| | | Nada claro, unos parecen presentar | |
| C-41AM | - | pequeños gránulos | Negativo |
| C-47 | - | Nada claro | Negativo |
| C-48 | - | Nada claro | Negativo |
| C-50 | - | Nada claro | Negativo |
| C-52 | P | Nada claro | Gránulos chicos, frecuentes |
| C-53 | - | Nada claro | Negativo |
| C-54 | + | Gránulos claros | Positivo |

Tabla VII. Determinaciones de la presencia de PHB empleando negro Sudán B en cultivos a las 24 y 72 horas del sitio La Enlatadora. En la segunda columna (NS-B) se indica la interpretación de los resultados de la prueba, (+) positivo altamente confiable, (P) probable o sugestivo, (-) negativo.

| Cepa | NS-B | 24 horas | 72 horas |
|-------------------|-------------|---|-----------------------------------|
| E-3 | P | Pequeñas inclusiones oscuras sugestivas | |
| E-4 | + | Gránulos claros | Positivo |
| E-4 ^a | P | Cocos, muy difícil distinguir pero se ven oscuros | |
| E-6b | P | Difícil distinguir, efecto claro-oscuro. | |
| E-7 | - | Nada claro | Nada claro |
| E-13 | + | Se ven tinciones negras en la célula | Positivo |
| E-22 | + | Gránulos muy pequeños | Negativo, nada claro |
| E-32 | - | Nada claro | Negativo |
| E-33 | + | Gránulos medianos a grandes, abundantes | Abundantes, medianos a grandes |
| E-36 | P | Difícil distinguir, efecto claro-oscuro. | |
| E-38 | - | Nada claro | Negativo |
| E-45 | + | Se observan gránulos. | Positivo |
| E-46CF | + | Se observan gránulos. | Abundantes, medianos |
| E-46BL | P | Bacilos cortos presentan gránulos | Negativo |
| E-51 | P | Difícil distinguir, efecto claro-oscuro. | |
| E-56 | - | No se observan gránulos | Negativo |
| E-62 | + | Gránulos medianos | Pocos, chicos, no del todo claros |
| E-63 ^a | + | Se observan gránulos. | Positivo |
| E-63b | + | Gránulos pequeños pero presentes | Negativo |
| E-70 | - | Nada claro | Nada claro |
| E-71 | + | Gránulos abundantes | Positivo |
| E-72 | - | Nada claro, pero parecen tener gránulos | Nada claro |

Con base en estos resultados, se seleccionaron 14 cepas por presentar en menos de 48 horas inclusiones lipídicas evidentes, grandes y abundantes: para La Enlatadora las cepas E4, E13, E33, E36, E45, E46CF (posteriormente E46), E51, E63a (posteriormente E63) y E71; y para La Curva las C18, C19, C20L, C20R y C54.

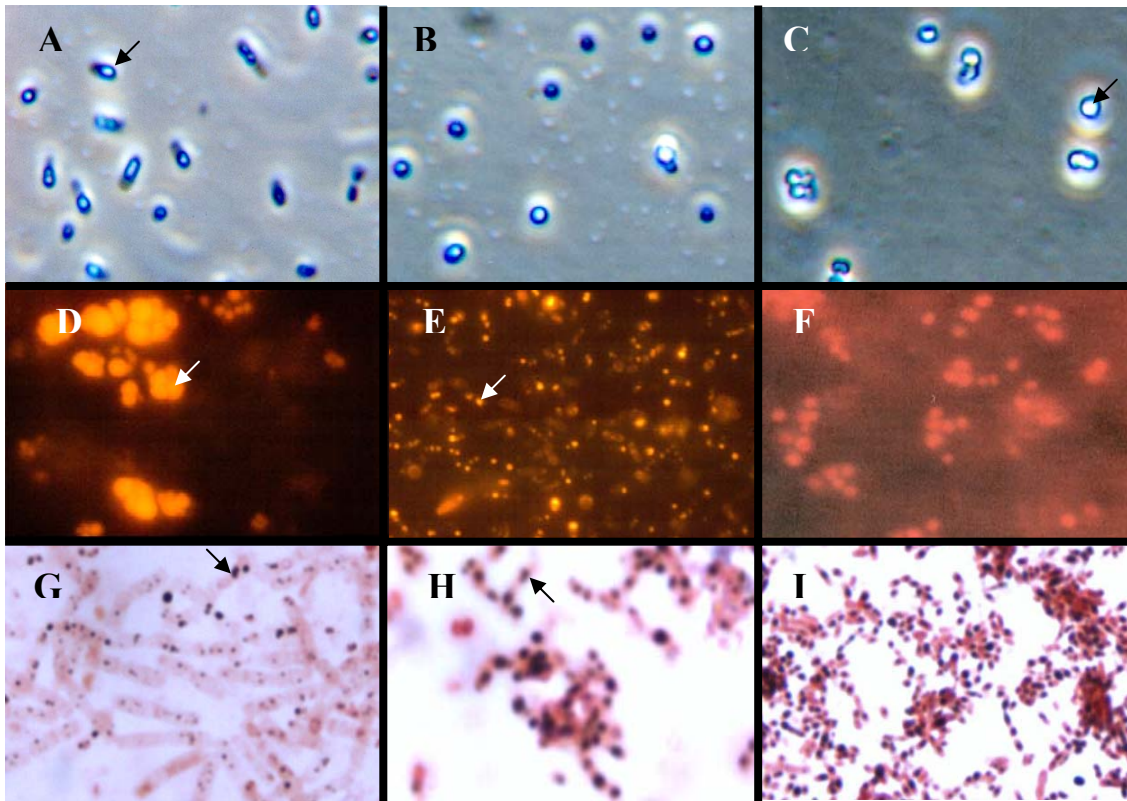


Figura 4. Micrografías de los tres criterios de detección de PHB, inclusiones citoplasmáticas refringentes (A-C), rojo Nilo (D-F) y negro Sudán (G-I). Las micrografías corresponden a las cepas: A) E71, B) E13, C) E51, D) E13, E) E46, F) E4, G) C19, H) E33 e I) E46. Las flechas señalan las inclusiones.

3.3. Identificación polifásica de las cepas productoras de PHB.

3.3.1. Identificación fenotípica.

Con las 14 cepas seleccionadas se procedió a realizar una serie de pruebas diagnósticas, con el objeto de tener una aproximación fenotípica para la identificación a nivel género de los organismos aislados. Las pruebas que se realizaron son: tinción Gram, prueba de motilidad en agar blando, tolerancia a la ausencia de oxígeno (anaerobiosis), producción de oxidasa y catalasa, crecimiento en medio diazotrófico (fijación de nitrógeno) y resistencia a salinidad (12% NaCl). De las 14 cepas seleccionadas cuatro

presentaron morfología cocoidal, cuatro bacilos cortos y seis en forma de bacilos largos. Se tienen siete gram positivas, cuatro gram negativas, y tres gram variables. Sólo se identificaron dos cepas mótils por el método de agar blando (C18 y C19). Cinco resultaron ser anaeróbicas facultativas tanto por el tubo de tioglicolato como por la placa Brewer, sólo teniendo una cepa de divergencia. A la prueba de oxidasa nueve resultaron positivas, mientras que a la producción de catalasa todas son positivas excepto E4. Se tienen identificados cinco cepas fijadoras de nitrógeno, que fueron desde un inicio aisladas en medio diazotrófico. Se realizó una prueba de resistencia a salinidades altas (12%) a las cepas E36 y E51, resultando nulo su crecimiento (Tabla VIII).

Tabla VIII. Resultados de las pruebas fenotípicas diagnósticas para las 14 cepas seleccionadas. La prueba de tioglicolato y agar Brewer son pruebas de anaerobiosis. Var = variable, fac = facultativo.

| Cepa | Gram | Motil | Tioglico. | Agar | | | Fija N ₂ | 12% NaCl |
|------|------|-------|-----------|--------|---------|----------|---------------------|----------|
| | | | | Brewer | Oxidasa | Catalasa | | |
| E4 | + | | | | - | - | | |
| E13 | + | - | fac | + | - | + | | |
| E33 | - | - | fac | - | + | + | + | |
| E36 | + | - | - | - | + | + | | - |
| E45 | - | - | - | - | + | + | + | |
| E46 | - | - | - | - | + | + | + | |
| E51 | + | - | - | - | + | + | | - |
| E63 | + | - | fac | + | - | + | | |
| E71 | - | - | fac | + | + | + | + | |
| C18 | + | + | fac | + | + | + | | |
| C19 | + | + | - | + | + | + | | |
| C20L | var | - | - | - | - | + | | |
| C20R | var | - | - | - | - | + | | |
| C-54 | var | - | - | - | + | + | + | |

3.3.2. Identificación filogenética.

Se realizó la extracción de ADN de las 14 cepas, y se amplificó el fragmento 341-926 (585 pb) del gen 16S rARN con la pareja de primers 341F+GC/907R, la electroforesis de los fragmentos se presenta en la figura 5.

Los productos de PCR se enviaron a MACROGEN Inc. Corea, para su secuenciación. Con ayuda del programa Chromas Pro se analizaron los espectrogramas recibidos, se eliminaron los extremos de Guanina-Citosina, se definió la secuencia con una señal confiable y se evaluaron aquellas bases indeterminadas; obteniendo las secuencias para las cepas que se presentan en el Anexo 2. Estas secuencias son las que se ingresaron en la base de datos (NCBI) utilizando la herramienta BLAST para determinar secuencias similares e identificar el género al cual probablemente pertenecen las cepas (Tabla IX y X).

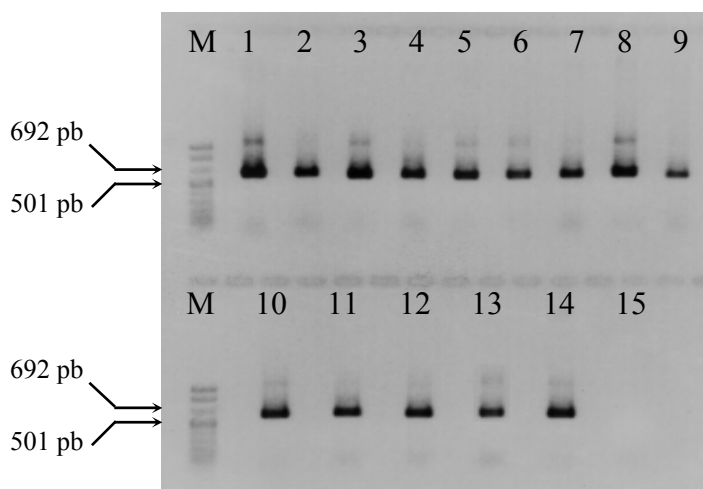


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Fragmento 341-926 (585 pb) del gen 16S rARN de las cepas. Carriles: M) marcador molecular VIII (ROCHE), 1) E4, 2) E13, 3) E33, 4) E36, 5) E45, 6) E46, 7) E51, 8) E63, 9) E71, 10) C18, 11) C19, 12) C20L, 13) C20R 14) C54, 15) blanco.

Tabla IX. Resultados de BLAST para las cepas productoras de PHB de La Curva. Se presentan el género, especie, cepa y el porcentaje de similitud de los 5 resultados mejor calificados, así como su número de acceso.

| Cepa aislada | Género | Especie | Cepa | % simil. | No. acceso |
|--------------|-------------------------|--------------------|---------------------------|----------|------------|
| C18 | <i>Bacillus</i> | sp. | 12 | 100.0 | AY269875.1 |
| | <i>Bacillus</i> | sp. | 11 | 100.0 | AY269874.1 |
| | <i>Bacillus</i> | sp. | ICS20418 | 100.0 | AY456216.1 |
| | <i>Bacillus</i> | sp. | ICS20415 | 100.0 | AY456214.1 |
| | <i>Bacillus</i> | sp. | SAFR-048 | 100.0 | AY167860.1 |
| | <i>Bacillus</i> | <i>mycoides</i> | c2 | 100.0 | AY373357.1 |
| C19 | <i>Bacillus</i> | sp. | 2(2003) | 99.0 | AY269865.1 |
| | <i>Bacillus</i> | <i>megaterium</i> | SAFN-04 | 99.0 | AY167803.1 |
| | <i>Bacillus</i> | sp. | Bt176 OTU1 | 99.0 | AY965250.1 |
| | Bacteria no cultivada | | clon AKIW925 | 99.0 | DQ129522.1 |
| | Bacteria no cultivada | | clon AKIW745 | 99.0 | DQ129436.1 |
| C20L | <i>Rhodococcus</i> | <i>ruber</i> | | 99.0 | RR16SR6 |
| | <i>Rhodococcus</i> | sp. | P15 | 99.0 | AY822615.1 |
| | <i>Rhodococcus</i> | <i>rhodochrous</i> | | 99.0 | AF439261.1 |
| | <i>Rhodococcus</i> | <i>ruber</i> | M2 | 99.0 | AY247275.1 |
| | <i>Rhodococcus</i> | sp. | An | 99.0 | AF529079.1 |
| C20R | <i>Staphylococcus</i> | sp. (no cultivado) | Clon Gpanamen9 | 100.0 | AF467419.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | <i>cohnii</i> | | 100.0 | AB009936.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | <i>cohnii</i> | CV38 | 99.0 | AJ717378.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | sp. | 98TH11317 | 99.0 | AY159883.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | <i>saprophytic</i> | MAFF911473, ATCC15305T | 99.0 | STA16SRR19 |
| C54 | <i>Methylobacterium</i> | <i>podarium</i> | | 100.0 | AF514774.1 |
| | <i>Methylobacterium</i> | <i>aminovorans</i> | | 100.0 | AJ851086.1 |
| | <i>Methylobacterium</i> | sp. | CBMB130 | 100.0 | AY683048.1 |
| | <i>Methylobacterium</i> | sp. | CBMB120 | 100.0 | AY683047.1 |
| | <i>Methylobacterium</i> | sp. | PB210 | 100.0 | AB220100.1 |

Tabla X. Resultados de BLAST para las cepas productoras de PHB de La Enlatadora. Se presentan el género, especie, cepa y el porcentaje de similitud de los 5 resultados mejor calificados, así como su número de acceso.

| Cepa Aislada | Género | Especie | Cepa | % simil. | No. acceso |
|--------------|----------------------------------|----------------------|--------------|----------|------------|
| E4 | <i>Staphylococcus</i> | <i>arlettae</i> | | 100.0 | AB009933.1 |
| | Bacteria de hielo del mar ártico | | ARK9973 | 99.0 | AF468443.1 |
| | Bacteria no cultivada | | clon AKIW491 | 99.0 | DQ129418.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | <i>saprophyticus</i> | ATCC 15305 | 99.0 | AP008934.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | sp. | RA90 | 99.0 | AY121979.1 |

| | | | | | |
|------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|-------|--------------------------|
| E13 | <i>Bacillus</i> | sp. | 12 | 100.0 | AY269875.1 |
| | <i>Bacillus</i> | sp. | 11 | 100.0 | AY269874.1 |
| | <i>Bacillus</i> | sp. | ICS20418 | 100.0 | AY456216.1 |
| | <i>Bacillus</i> | sp. | SAFR-048 | 100.0 | AY167860.1 |
| | <i>Bacillus</i> | <i>mycoides</i> | c2 | 100.0 | AY373357.1 |
| E33 | <i>Paracoccus</i> | <i>zeaxanthinifaciens</i> | R-1506 | 99.0 | AF461159.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | <i>zeaxanthinifaciens</i> | ATCC 21588 | 99.0 | AF461158.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | sp. | MBIC3966 | 99.0 | AB018688.1 |
| | Bacteria no cultivada | | clon mdl09c12 | 99.0 | AY538081.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | sp. | RA19 | 99.0 | AJ507806.2 P SP507806 |
| E36 | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | SAFR-002 | 99.0 | AY167858.1 |
| | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | | 99.0 | AF542073.1 |
| | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | aisl. CV44 | 99.0 | AJ717369.1 |
| | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | aisl. CV39 | 99.0 | AJ717368.1 |
| | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | aisl. CV31 | 99.0 | AJ717367.1 |
| E45 | <i>Paracoccus</i> | <i>zeaxanthinifaciens</i> | R-1506 | 99.0 | AF461159.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | <i>zeaxanthinifaciens</i> | ATCC 21588 | 99.0 | AF461158.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | sp. | MBIC3966 | 99.0 | AB018688.1 |
| | Bacteria no cultivada | | clon mdl09c12 | 99.0 | AY538081.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | sp. | RA19 | 99.0 | AJ507806.2 P SP507806 |
| E46 | <i>Paracoccus</i> | <i>zeaxanthinifaciens</i> | R-1506 | 99.0 | AF461159.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | <i>zeaxanthinifaciens</i> | ATCC 21588 | 99.0 | AF461158.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | sp. | MBIC3966 | 99.0 | AB018688.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | sp. | RA19 | 99.0 | AJ507806.2 P SP507806 |
| | Bacteria no cultivada | | clon mdl09c12 | 99.0 | AY538081.1 |
| E51 | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | SAFR-002 | 99.0 | AY167858.1 |
| | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | | 99.0 | AF542073.1 |
| | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | aisl. CV44 | 99.0 | AJ717369.1 |
| | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | aisl. CV39 | 99.0 | AJ717368.1 |
| | <i>Micrococcus</i> | <i>luteus</i> | aisl. CV31 | 99.0 | AJ717367.1 |
| E63 | <i>Staphylococcus</i> | sp. (no cultivado) | clon Gpanamen9 | 100.0 | AF467419.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | <i>cohnii</i> | | 100.0 | AB009936.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | <i>cohnii</i> | aisl. CV38 | 99.0 | AJ717378.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | sp. | 98TH11317 | 99.0 | AY159883.1 |
| | <i>Staphylococcus</i> | <i>saprophyticus</i> | MAFF911473, ATCC15305T | 99.0 | D83371.1 STA 16SRR19 |
| E71 | <i>Paracoccus</i> | <i>seriniphilus</i> | MBT-A4 | 99.0 | AJ428275.1 P SE428275 |
| | <i>Paracoccus</i> | <i>zeaxanthinifaciens</i> | R-1506 | 99.0 | AF461159.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | <i>zeaxanthinifaciens</i> | ATCC 21588 | 99.0 | AF461158.1 |
| | <i>Paracoccus</i> | sp. | MBIC3966 | 99.0 | AB018688.1 |
| | Bacteria no cultivada | | clon mdl09c12 | 99.0 | AY538081.1 |

Todas las secuencias comparadas presentan el 99 ó 100% de similitud con alguna otra de la base de datos, por lo que podemos hablar de secuencias extremadamente cercanas e idénticas, indicando que las cepas sí pertenecen al género y posiblemente hasta la especie que se presentan en las tablas IX y X. Las cepas C18 y E13 presentan una secuencia idéntica a *Bacillus mycoides* c2, sin embargo el rasgo fenotípico de motilidad las diferencian, comprobando que sólo con una combinación de análisis exhaustivos se logra una identificación correcta. De las otras cepas que presentan secuencias idénticas están C20R y E63 con *Staphylococcus cohnii*, C54 con *Methylobacterium aminovorans* y *M. podarium*, E4 con *Staphylococcus arlettae*. Y las cepas con secuencias extremadamente cercanas (99% de similitud) son C19 con *Bacillus megaterium*, C20L con *Rhodococcus ruber* y *R. rhodochrous*, E33, E45, E46 y E71 con *Paracoccus zeaxanthinifaciens* y por último E36 y E51 con *Micrococcus luteus*. El hecho de que una secuencia sea extremadamente cercana a dos especies diferentes nos señala que la secuenciación parcial de gen 16S rARN solo nos sirve para identificar organismos hasta nivel de género. Las secuencias de las cepas aisladas del género *Paracoccus*, *Staphylococcus* y de la cepa C19 son extremadamente cercanas a secuencias de organismos no cultivados.

Además de realizar el “BLAST” en la base de datos se realizó un árbol filogenético con las secuencias de las cepas que se presentan en la tabla IX y X (Figura 6). En este gráfico se definen diferentes agrupaciones, en el grupo uno se encuentran aquellas cepas pertenecientes al género *Rhodococcus*, siendo la bacteria aislada C20L la única cepa filogenéticamente cercana. En la agrupación número dos se concentran las secuencias del género *Micrococcus*, donde E36 y E51 son pertenecientes. El tercer grupo es el

correspondiente al género *Staphylococcus* con los aislamientos C20R, E4 y E63 como representantes. El cuarto conjunto está formado por secuencias pertenecientes al género *Bacillus*, donde se incluyen a los cultivos C19, C18 y E13, siendo los dos últimos más cercanos entre sí. En el quinto agregado se ubica sólo la cepa C54 de La Curva junto con las cepas correspondientes al género *Methylobacterium*. En sexto y último grupo es el que contiene un mayor número de nuestros cultivos, todos de La Enlatadora (E33, E45, E46 y E71), en éste se concentran las secuencias correspondientes al género *Paracoccus*.

En resumen, las 14 cepas aisladas y seleccionadas presuntas productoras de PHB se identificaron como pertenecientes a seis géneros: *Bacillus* (3), *Staphylococcus* (3), *Rhodococcus* (1), *Micrococcus* (2), *Paracoccus* (4) y *Methylobacterium* (1) (Tabla IX y X). Los únicos grupos que tienen representantes en ambos sitios son *Bacillus* con dos cepas de La Curva y uno de La Enlatadora, y el grupo *Staphylococcus*, con uno en La Curva y dos en La Enlatadora.

Además podemos ver que el grupo 3 (*Micrococcus*) y 4 (*Rhodococcus*) están relacionados filogenéticamente con el grupo de actinomicetos. Así como el grupo 5 (*Paracoccus*) y 6 (*Methylobacterium*) también derivan de un grupo en común, las proteobacterias alfa. Y el grupo 1 (*Staphylococcus*) y 2 (*Bacillus*) están distantemente relacionados, ambos son de la clasificación Gram positivos *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (BLS).

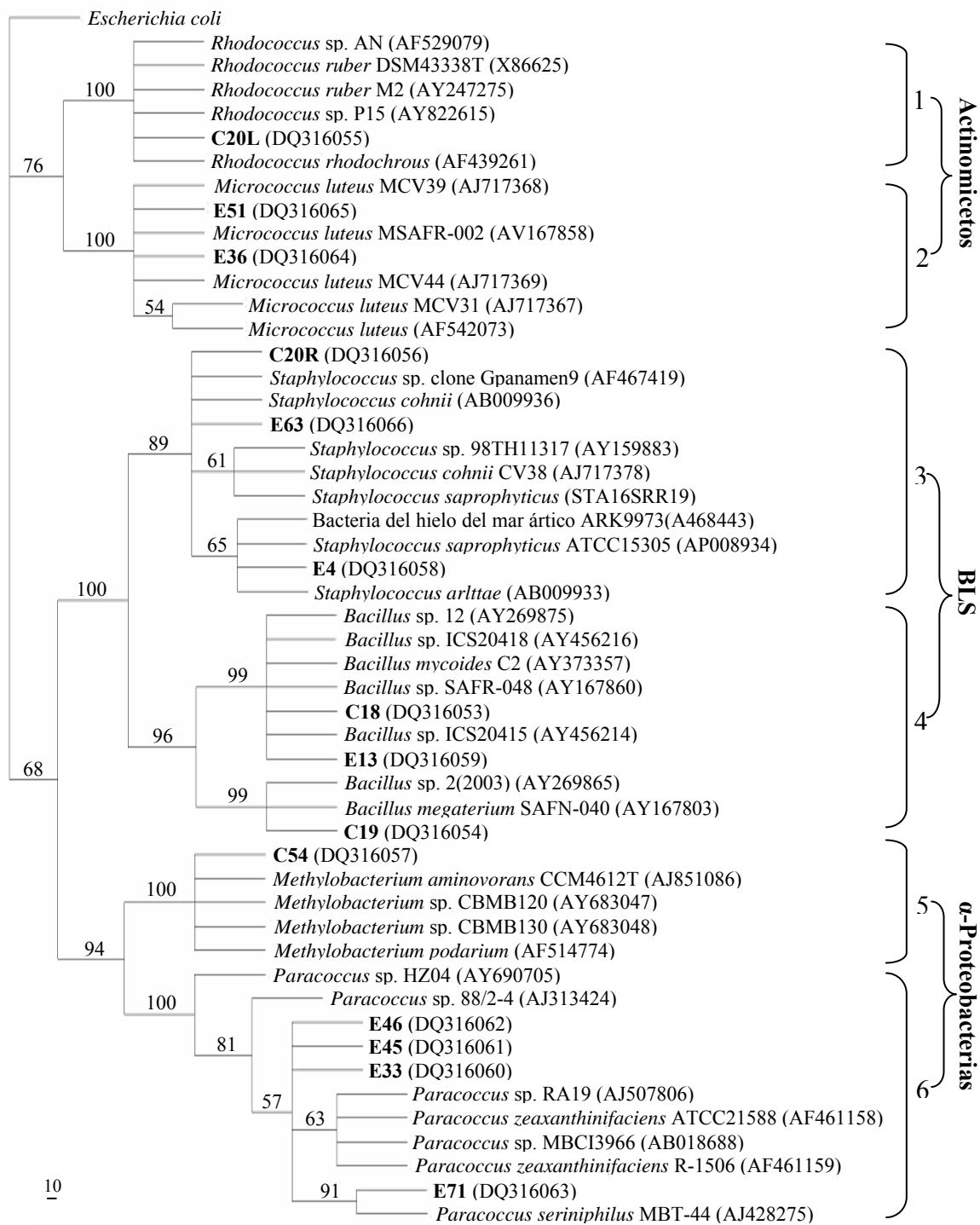


Figura 6. Árbol filogenético de secuencias de cepas productoras de PHB de La Curva y La Enlatadora con las secuencias semejantes más cercanas. Diagrama con base a la secuenciación parcial del gen 16S rARN y de los resultados de BLAST. Análisis de parsimonia, *E. coli* es el grupo externo. Los valores de los nodos indican el porcentaje de probabilidad según los análisis de Bootstrap, índice de consistencia de 0.83. Las claves entre paréntesis son los números de acceso a las secuencias depositadas en GenBank.

3.4. Producción de PHB de las cepas.

3.5.1. Cuantificación de la producción y porcentaje de acumulación de PHB.

El objeto de esta última sección es la de definir que cepas tienen potencial para ser objeto de un escalamiento en el proceso de producción de PHB, por lo que de entrada se eliminaron 3 cepas de las 14 con las que se venía trabajando, éstas son las cepas E4, E63 (*Staphylococcus*) y C54 (*Methylobacterium*), ya que las tres presentaron crecimientos incipientes y lentos en el medio que se utilizó para la producción de PHB (PYM). Para fines prácticos y con el objetivo de obtener un mayor rendimiento en la producción de PHB se seleccionaron las cepas con base a los siguientes criterios: rápido crecimiento, fácil reconocimiento de las cepas, crecimiento y producción de PHB en medio líquido, producción evidente y significativa de PHB en menos de 48 horas. Además se dejó a un lado la cepa E46 (*Paracoccus*) ya que es prácticamente idéntica que E33 y E45, y muy similar a E71, esto para simplificar el trabajo.

La primera cuantificación de PHB se realizó en medio PYM (300 ml), en matraces de un litro con determinaciones a las 24 y 48 horas. Se calcularon tres parámetros indicadores de la viabilidad de las cepas para un escalamiento industrial. El porcentaje de peso seco de acumulación de PHB, la producción neta de polímero por volumen de medio, y la productividad de las cepas: gramos de PHB por volumen y tiempo. Así mismo, se determinó la curva de crecimiento de cada una de las cepas y se determinaron los tiempos de generación (t_g) y la tasa de crecimiento (k) (Tabla XI) en la fase exponencial de cada cepa. En 48 horas de cultivo se alcanzó el inicio de la fase estacionaria para todas las cepas excepto para C20L, C20R y E13.

Entre las cepas se puede observar una diversidad de comportamientos en la producción de biomasa y acumulación de PHB (Figura 9 y 10), los cuales se pueden resumir en 5 casos:

Caso 1: Producción considerable de biomasa y PHB, con un porcentaje de acumulación relativamente alto (38 – 47%) a las 24 horas, con un aumento continuo para las 48 horas en ambas determinaciones (50 – 66% de peso seco a las 48 horas), caso para las cepas C18 y E13 pertenecientes al género *Bacillus*.

Caso 2: Comportamiento de las cepas C19 (*Bacillus*), E33 y E71 (*Paracoccus*). Producción considerable de biomasa, pero poca producción de polímero generando porcentajes de acumulación relativamente bajos (6 – 30%) a las 24 horas. Teniendo una acumulación de PHB notablemente incrementada (43 – 60%) para las 48 horas, y también un aumento constante en la biomasa.

Caso 3: Porcentaje de acumulación considerable (24 – 46%) a las 24 horas, con poca producción de biomasa y por lo tanto poca producción neta de polímero. Aumento significativo de biomasa para las 48 horas de cultivo, pero el porcentaje de acumulación disminuye drásticamente (3 – 13%), hay que notar que para estas cepas no se alcanzó en inicio de la fase estacionaria, C20L (*Rhodococcus*) y C20R (*Staphylococcus*).

Caso 4: Representado sólo por la cepa E45 (*Paracoccus*), presenta una producción de biomasa media, con un porcentaje de acumulación relativamente alto (50.9 %) a las 24 horas de cultivo. Al doblar el tiempo de incubación la biomasa casi se duplica, pero la producción neta de polímero se mantiene, y por esto el porcentaje de acumulación disminuye prácticamente a la mitad (28.3 %).

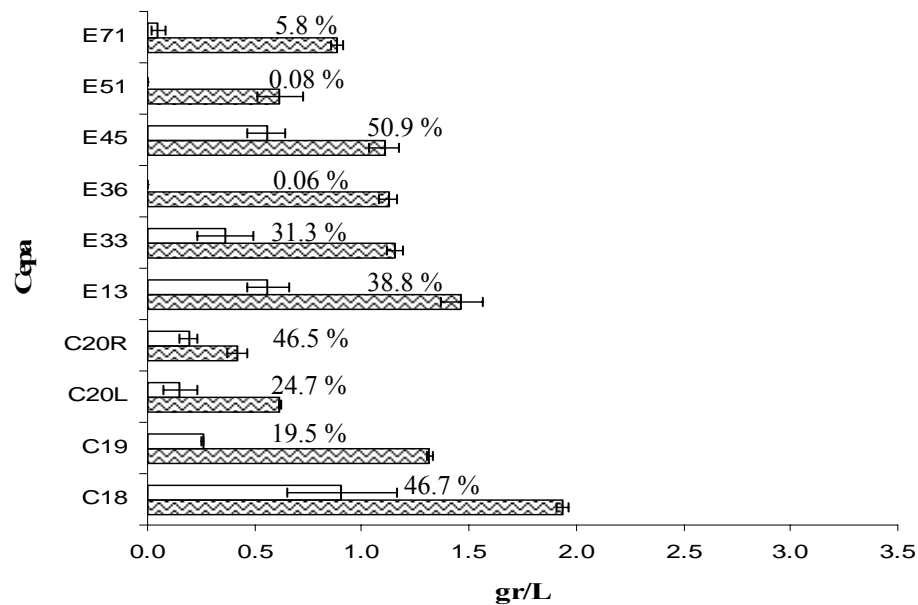




Figura 7. Valores promedio de producción de biomasa (peso seco, ) y PHB () por litro de medio (PYM) a las 24 horas de cultivo. Los números indican porcentaje de peso seco de acumulación de PHB correspondiente a cada cepa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

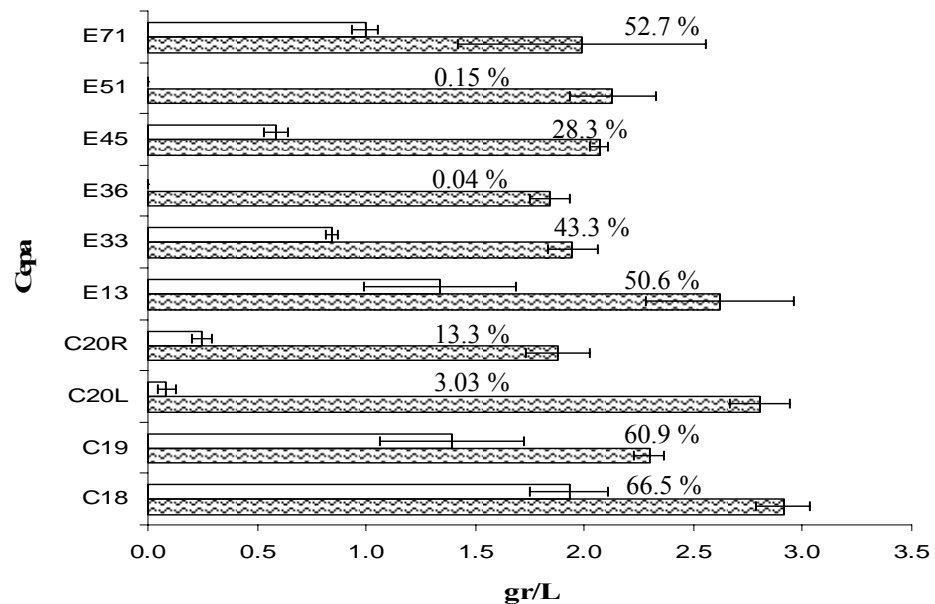




Figura 8. Valores promedio de producción de biomasa (peso seco, ) y PHB () por litro de medio (PYM) a las 48 horas de cultivo. Los números indican porcentaje de peso seco de acumulación de PHB correspondiente a cada cepa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Caso 5: Hay crecimiento celular constante a las 24 y 48 horas, la detección de PHB es mínima en ambos tiempos (0.04 – 0.15 %), prácticamente indetectable. Este es el caso de las cepas E36 y E51 pertenecientes al género *Micrococcus*.

Se realizó un segundo experimento para determinar la acumulación de PHB con medio MHB, el cual está formulado con hidroxibutirato de sodio. No todas las cepas se adaptaron, logrando crecer únicamente aquellas pertenecientes al género *Paracoccus* (E33, E45 y E71) y *Rhodococcus* (C20L), sin embargo esta última no acumuló PHB y tuvo un crecimiento mínimo. No se obtuvieron los resultados que se esperaban, ya que los porcentajes de acumulación no fueron muy altos. Se hicieron determinaciones a las 24 y 72 horas, obteniéndose valores de 11.3 – 32.9 % para las 24 horas (Figura 11), y de 26.7 – 48.2 % a las 72 horas (Figura 12). Con este medio se esperaba obtener una mayor producción pero parece ser que el medio no fue el mejor.

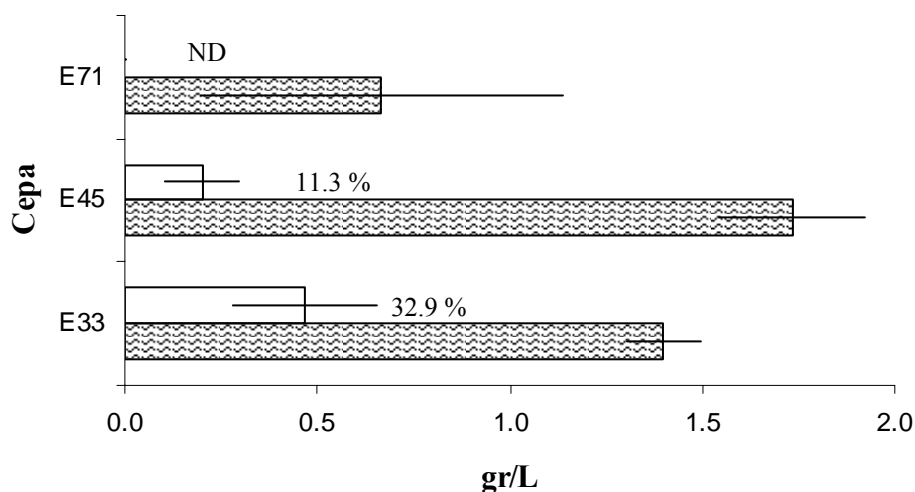




Figura 9. Valores promedio de producción de biomasa (peso seco, ) y PHB () por litro de medio (MHB) a las 24 horas de cultivo. Los números indican porcentaje de peso seco de acumulación de PHB correspondiente a cada cepa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. ND = no detectado.

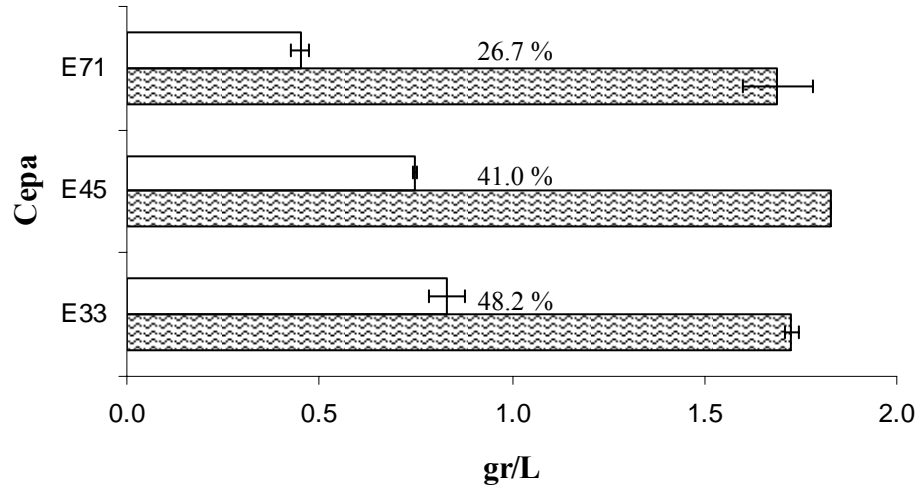




Figura 10. Valores promedio de producción de biomasa (peso seco, ) y PHB () por litro de medio (MHB) a las 72 horas de cultivo. Los números indican porcentaje de peso seco de acumulación de PHB correspondiente a cada cepa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

3.5.2. Determinación de la productividad de las cepas.

Para determinar la productividad de las cepas se consideraron los datos obtenidos de los cultivos en medio PYM ya que fueron los que produjeron mayor rendimiento en todas las cepas. La productividad se define como la cantidad de material, en este caso gramos de PHB producidos por litro de medio por hora de cultivo. La mayor productividad se obtuvo para la cepa C18 a las 24 y 48 horas, seguida de las cepas C19 y E13; y posteriormente la cepa E45 a las 24 horas y la E71 a las 48 horas (Figura 13). Las cepas que definitivamente no son factibles para un escalamiento, al menos en este medio, son las C20L y C20R ya que su productividad es muy baja, ya no se diga de las E36 y E51, las cuales se pueden considerar como no productoras de PHB bajo las condiciones probadas.

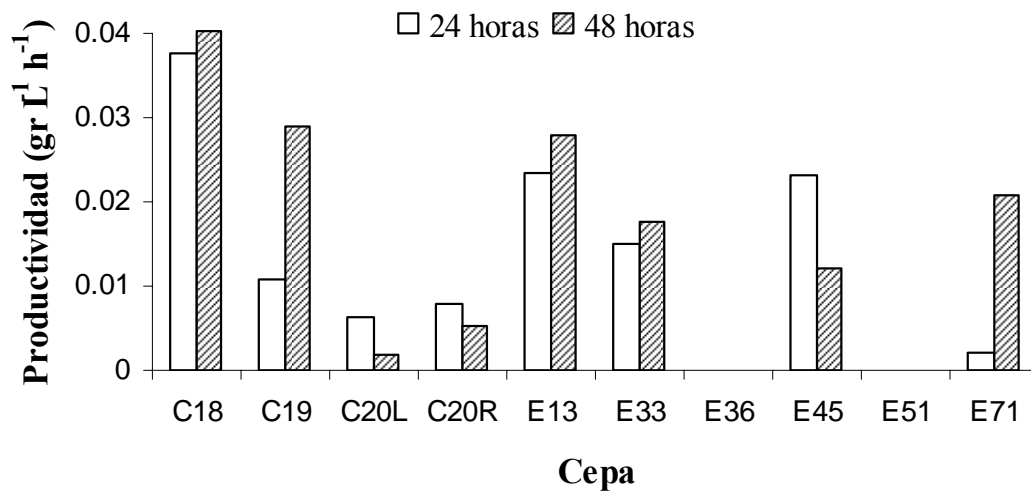


Figura 11. Productividad promedio de PHB para cada una de las cepas probadas a las 24 y 48 horas de cultivo. El medio utilizado es PYM.

Las tasas de crecimiento y los tiempos de generación (Tabla XI) se calcularon a partir de las fases exponenciales del crecimiento bacteriano. Se graficaron contra los porcentajes de acumulación y la productividad (Figura 13). Las tasas de crecimiento varían de 0.058 a 0.203 generaciones por hora, o lo que correspondería en tiempo de generación de 17.197 a 5.159 horas para las cepas E13 y E36 respectivamente. Los valores de E13 son muy diferentes al resto de las cepas, ya que la que le sigue en menor tasa de crecimiento es E33 con un valor k de 0.127 generaciones y t_g de 7.899 horas. Por el tiempo de generación podemos decir que en los cultivos de 48 horas ocurrieron en su mayoría de 6 a 10 generaciones.

Tabla XI. Tiempos de generación (t_g) y tasas de crecimiento (k) calculados a partir de la fase exponencial de crecimiento para cada una de las cepas. Se encuentran ordenados de mayor a menor tasa de crecimiento.

| Cepa | Género | Gram | k | t_g | % acumulación | Productividad gr PHB L ⁻¹ h ⁻¹ |
|-------------|-----------------------|------|-------|--------|------------------|---|
| E36 | <i>Micrococcus</i> | + | 0.203 | 5.159 | 0.04 | < 0.0001 |
| C18 | <i>Bacillus</i> | + | 0.206 | 5.576 | 66.5 | 0.040 |
| E51 | <i>Micrococcus</i> | + | 0.188 | 5.584 | 0.15 | < 0.0001 |
| C19 | <i>Bacillus</i> | + | 0.189 | 6.059 | 60.9 | 0.029 |
| C20L | <i>Rhodococcus</i> | + | 0.152 | 7.173 | 3.03 | 0.002 |
| E45 | <i>Paracoccus</i> | - | 0.139 | 7.202 | 28.3 | 0.012 |
| C20R | <i>Staphylococcus</i> | + | 0.150 | 7.236 | 13.3 | 0.005 |
| E71 | <i>Paracoccus</i> | - | 0.131 | 7.780 | 52.7 | 0.020 |
| E33 | <i>Paracoccus</i> | - | 0.127 | 7.899 | 43.3 | 0.017 |
| E13 | <i>Bacillus</i> | + | 0.058 | 17.197 | 50.6 | 0.027 |

Se graficó el porcentaje de acumulación y la tasa de crecimiento contra la productividad de PHB, con el objeto de definir cual de las dos primeras variables tiene un mayor efecto en la última (Figura 14). Observamos que se forman tres grupos principales: grupo A el cual está conformado por las cepas pertenecientes al género *Bacillus*, las cuales presentan un mayor valor de productividad (datos de 48 horas de cultivo). Con este grupo podemos decir que la productividad está principalmente ligada al porcentaje de acumulación ya que la cepa E13 a pesar de tener la tasa de crecimiento más baja mantiene su alta productividad. El grupo B está conformado por las cepas identificadas como del grupo *Paracoccus*, presentando una productividad media la cual muy probablemente se puede incrementar, además recordemos que fueron las únicas capaces de crecer en un

medio basal suplementado con hidroxibutirato de sodio. Y finalmente el grupo C, donde se ubican las cepas E36 y E51 (*Micrococcus*), C20R (*Staphylococcus*) y C20L (*Rhodococcus*) los cuales presentan una productividad muy baja.

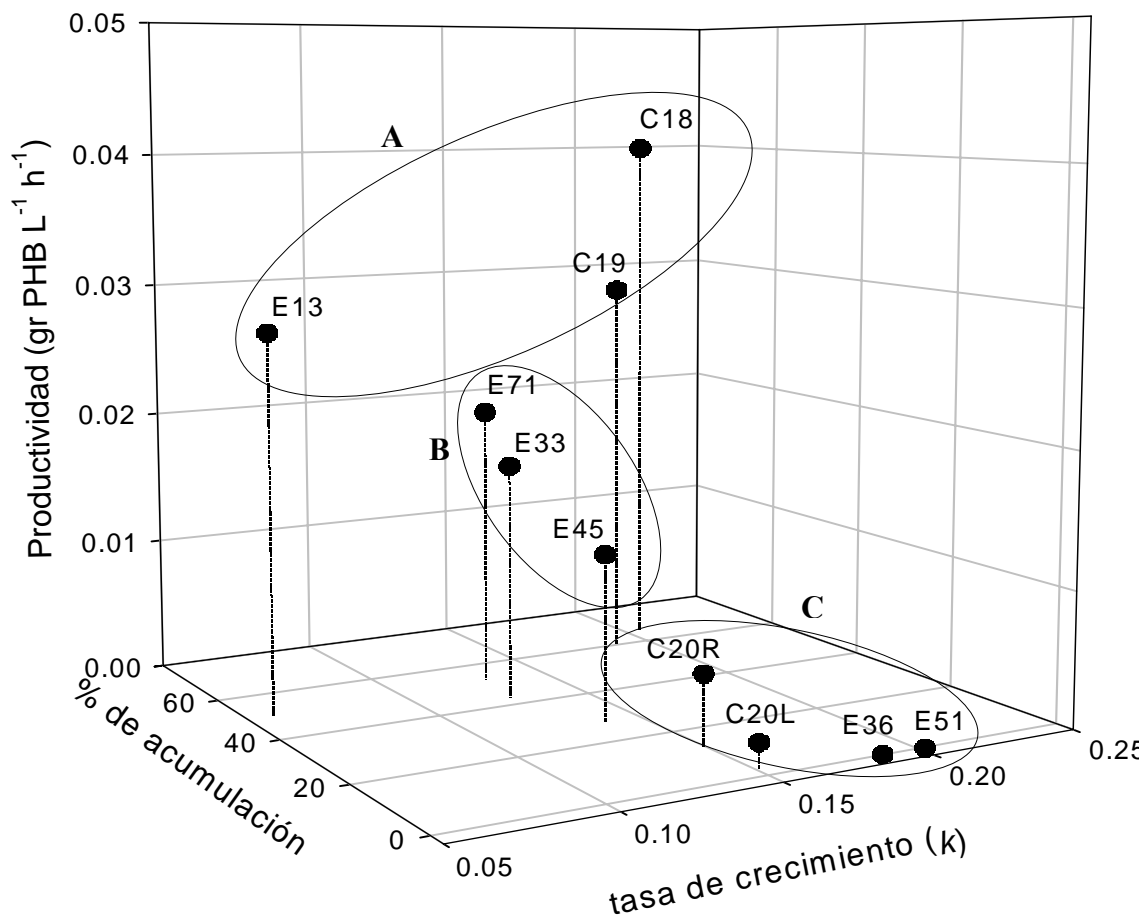


Figura 12. Gráfica tridimensional donde se relaciona la acumulación de PHB (porcentaje de peso seco), y la tasa de crecimiento (k), con los niveles de productividad de cada cepa. Las agrupaciones son según el nivel de productividad.

3.5. Análisis de la comunidad natural (DGGE).

Para estudiar la estructura de la comunidad bacteriana se amplificó el mismo fragmento (341-926) del gen 16S rARN de la comunidad bacteriana en las muestras naturales de La Curva y La Enlatadora (Figura 7). Posteriormente se separaron los alelos mediante una electroforesis en gel de acrilamida con gradiente desnaturalizante (DGGE), donde podemos visualizar la abundancia relativa de nuestras cepas (Figura 8). Esta técnica permite separar fragmentos de ADN del mismo tamaño pero de diferente secuencia.

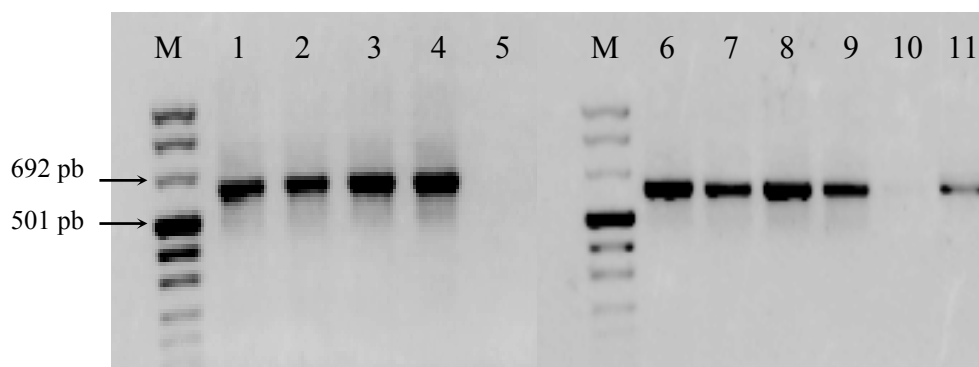


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR para el fragmento 341-926 del gen 16S rARN de la muestras naturales. Carril M) marcador molecular VIII (ROCHE), 1) E1_A, 2) E1_B, 3) E2_A, 4) E2_B, 5) Blanco, 6) C1_A, 7) C1_B, 8) C2_A, 9) C2_B, 10) Blanco, 11) *R. eutropha* (Control positivo).

Para definir la abundancia relativa de las bacterias aisladas en las muestras naturales mediante DGGE, fue necesario primero generar un estándar que nos permitiera visualizar la correspondencia de las bandas. Las cepas E4 y E63 (*Staphylococcus*); E33, E45 y E46 (*Paracoccus*); y las cepas E36 y E51 (*Micrococcus*) se traslapan entre si, esto por ser filogenéticamente cercanos y tener secuencias muy similares. Por lo que sólo se utilizaron cinco cepas para generar el estándar para La Enlatadora, las cepas: E4 (banda 1), E13 (banda 2), E33 (banda 3), E71 (banda 4) y E36 (banda 5) (Figura 8). En el caso de La

Curva sólo se traslaparon las cepas C18 (*Bacillus*) y C20R (*Staphylococcus*), por lo que se utilizaron los cultivos C18 (banda I), C19 (banda II), C54 (banda III) y C20L (banda IV) (Figura 8) para generar el estándar de las muestras de La Curva.

Los carriles con las muestras naturales fueron cargados con la misma concentración de amplicones en cada uno (5.25 µg), de esta manera la intensidad de las bandas es comparable entre las diferentes muestras, y nos proporciona una idea de las diferencias en la comunidad bacteriana.

En las muestras de La Curva se logran identificar 8 bandas totales bien definidas en las cuatro muestras. En las muestras C1_A, C1_B y C2_A se observan 7 en cada carril (A-G), y sólo la muestra C2_B presenta la banda H, sin embargo el resto de las bandas se ven más difusas. Sólo la banda G, que está mas definida en la muestra C1_{A y B}, pudiera corresponder con la banda II del estándar, el cual corresponde a un genotipo de *Bacillus*, siendo la cepa C19 la mejor representada en la muestra natural de las productoras de PHB (Figura 8).

Dado el patrón de bandeo de las muestras de La Curva y de La Enlatadora (Figura 8) es evidente que hay un cambio de la estructura de la comunidad bacteriana, muy probablemente ocasionado por el efecto del efluente de la enlatadora el cual está alterando las concentraciones de nutrientes y la materia orgánica disponible.

Para La Enlatadora se identificaron 16 bandas totales bien definidas en las cuatro muestras. Siendo la muestra E2_B la que presenta una mayoría de estas (14 bandas: c – p). No hay gran diferencia entre muestras, sólo las bandas *n*, *o* y *p* no se aprecian en las muestras E1 mientras que en E2 sí, aunque están presentes sólo que en menor abundancia (intensidad). De las 5 secuencias utilizadas para el estándar, tres pudieran tener

correspondencia en las muestras naturales; las bandas 2 (*Bacillus*), 3 (*Paracoccus*) y 4 (*Paracoccus*) del estándar con la bandas *j*, *l* y *m* de las muestras, respectivamente. Siendo la banda *m* la más abundante de todas en la muestra E2_B, pero la banda *j* es la que está mejor representada ya que se encuentra en todas las muestras.

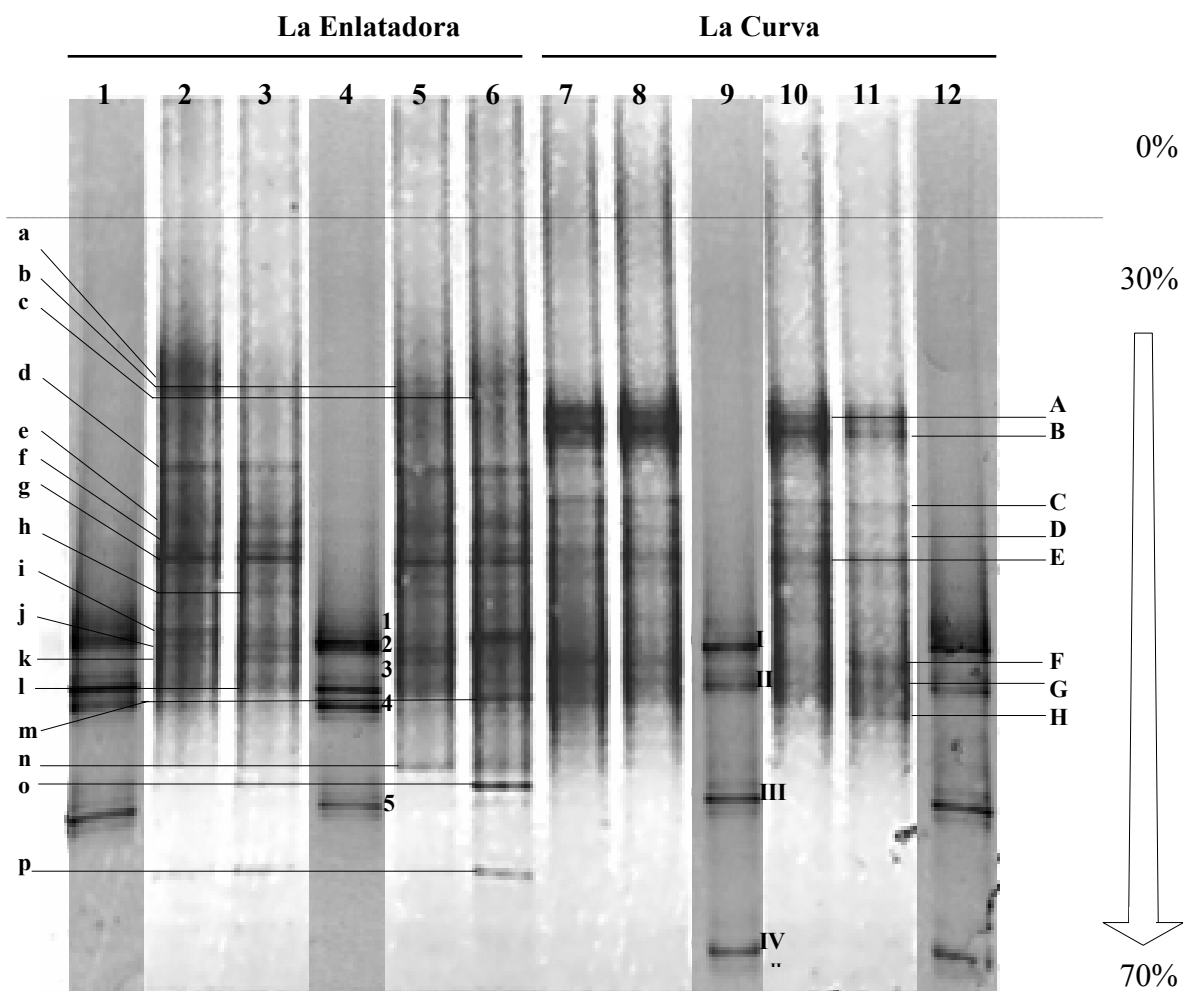


Figura 14. DGGE. Electroforesis en gel de acrilamida 6%, con un gradiente desnaturante del 30% al 70%. Fragmentos 341-926 del gen 16S rARN. Carriles: 1 y 4) estándar para muestras de La Enlatadora, 2) E1_A, 3) E1_B, 5) E2_A, 6) E2_B, 7) C1_A, 8) C1_B, 9 y 12) estándar para muestras de La Curva, 10) C2_A y 11) C2_B.

4. DISCUSIÓN

4.1. *Parámetros fisicoquímicos.*

Los parámetros fisicoquímicos nos indican que el efluente de la enlatadora está causando un efecto verdadero de eutrofización sobre el ambiente que impacta. Hay un aumento en los nutrientes (amonio y fosfatos), y aunque no es significativo también hay una disminución en el oxígeno. Además se tiene reportado anteriormente un incremento en el contenido de materia orgánica (6 veces) y de lípidos (hasta de 0.29 mg/ml) en el agua con respecto a muestras no impactadas por la descarga de la enlatadora (López, 2002). La concentración de materia orgánica probablemente es la causante de la disminución de oxígeno. Mientras que el aumento de nutrientes es un efecto directo del efluente. Análisis proximales de productos pesqueros muestran que estos tienen un alto contenido proteína (Huss, 1998), lípidos y fósforo. La descomposición de los residuos proteínicos que termina en la generación de amonio (Lehninger *et al.*, 1993) y el alto contenido de lípidos y fosfatos en los productos pesqueros, es la fuente principal de los compuestos que están eutrofizando la costa frente a la enlatadora.

A pesar de que se pudiera pensar que en La Enlatadora todos los parámetros de nutrientes deberían de ser mayores por el efecto de el efluente, los nitratos presentan una concentración más baja en el sitio impactado; esto muy probablemente se explique por los consorcios microbiológicos que ahí habitan, ya que varios organismos, como el abundante *Paracoccus*, son capaces de realizar procesos de desnitrificación (Berry *et al.*, 2003), funcionando como una entrada de nitrógeno a los ciclos biogeoquímicos tan complejos que

sucedan en un tapete microbiano, aunque este proceso de desnitrificación se puede ver inhibido por las altas concentraciones de amonio en la columna de agua. Además, las cianobacterias, que componen una parte importante del tapete microbiano, utilizan los nitratos como fuente de nitrógeno (Hu *et al.*, 2000), formando un sumidero de este compuesto, factor que en La Curva no se presenta en la misma escala. El consumo de nutrientes por autótrofos también se observa en el crecimiento incrementado del alga *Ulva lactuca* que se da en las playas aledañas de La Enlatadora y que no se presenta en La Curva, y que en otros lugares esto se relaciona con eventos de eutrofización. Para poder definir esto con más precisión es claro que se necesitan análisis de nutrientes, oxígeno y materia orgánica en el sedimento además de en la columna de agua.

Los altos contenidos de amonio, materia orgánica y lípidos pueden generar un efecto tóxico sobre las comunidades que ahí habitan, por lo que los organismos se ven obligados a generar estrategias para disminuir o resistir estos efectos. En un trabajo anterior se ha propuesto que la síntesis de PHA es un mecanismo que funciona como destoxificación cuando las células crecen en altas concentraciones de ácidos grasos, como lo es el caso del sitio La Enlatadora. La destoxificación consiste en disminuir la concentración de estos compuestos, asimilándolos y dirigiéndolos hacia la ruta de síntesis de PHA, de tal forma que en los alrededores de las colonias las concentraciones de ácidos grasos estén debajo de las inhibitorias. Dicha capacidad de destoxificación hace a la bacteria más competitiva en ciertos ambientes (Kranz *et al.*, 1997), como lo sería en el caso del efluente de la enlatadora, por lo que hace pensar que la producción de PHA en el tapete microbiano pudiera no ser sólo un mecanismo de reserva para condiciones adversas

temporales, sino un sistema para poder crecer en las condiciones que predominan en ese sitio.

4.2. Comunidad bacteriana de los sitios.

La selección de los sitios estudiados fue correcta, ya que realmente hay una divergencia en la estructura de la comunidad bacteriana, la cual se explica por el efecto del efluente de la enlatadora que se encuentra sobre la línea de costa. Dicho desagüe está aportando al medio primordialmente amonio y fosfatos, permitiendo el desarrollo y crecimiento de una alfombra microbiana laminar, formada principalmente por cianobacterias, bacterias heterótrofas y bacterias fotosintéticas anoxigénicas, sugiriendo que el aporte de nutrientes es el factor principal y directo que propicia el desarrollo de la alfombra microbiana. También se ha propuesto que la bioperturbación y pastoreo son los principales factores que previenen el desarrollo de las alfombras microbianas (Kühl *et al.*, 2003), por lo que otra hipótesis que surge ahora, es que la contaminación causada por el efluente, tanto en el incremento de nutrientes (toxicidad del amonio), la disminución en el oxígeno, el enrarecimiento e incremento de la turbidez del agua han ocasionado que la fauna emigre a otras zonas, disminuyendo el impacto de bioperturbación y permitiendo entonces el crecimiento del tapete microbiano de una forma indirecta, más que por el incremento de nutrientes, o bien, una combinación de las dos. Las alfombras microbianas son consideradas como ecosistemas bien desarrollados, ya que suceden una gran cantidad de procesos biológicos y geoquímicos bien interconectados, por lo que no requieren de

grandes fuentes exógenas de nutrientes (Kühl *et al.*, 2003), lo que da más peso a la hipótesis de la ausencia de bioperturbación.

El sitio de La Enlatadora presenta una comunidad bacteriana más compleja, ya que la aproximación molecular (DGGE) y los cultivos indican una mayor diversidad y abundancia bacteriana que en La Curva. Esto si consideramos el número de bandas presentes en el gel de electroforesis del DGGE como el número de miembros predominantes en la comunidad (Muyzer y Smalla, 1998) y el número de bacterias aisladas obtenidas en cada medio como indicador de la diversidad; mientras que la abundancia se ve reflejada en la intensidad de las bandas del mismo gel, así como en la cuantificación de UFC y del contenido de ADN de las muestras, en todos los casos mayores en el sitio impactado. El número de bandas que se observan en las muestras de La Enlatadora es el doble que en las de La Curva, además de que su ubicación en el gel abarca un mayor gradiente desnaturizante lo que nos indica de que las secuencias tienen poca similitud entre ellas y por lo tanto hay una mayor distancia filogenética entre las poblaciones de La Enlatadora, a diferencia de las secuencias del sitio no impactado, donde el patrón de bandeo se encuentra más concentrado en una región del gel. Sin embargo, estos resultados pueden estar subestimados, ya que así como tuvimos traslapes en algunas secuencias (i.e. *Bacillus* y *Staphylococcus*) en la generación de los estándares, también pueden existir traslapes en las secuencias de la muestras naturales. Las muestras que se tomaron a 5 y 15 m de la zona de rompiente presentan patrones de bandeo (DGGE) muy similares dentro de cada sitio, sugiriendo que no hay grandes diferencias en las poblaciones de bacterias más representativas de los sitios a 5 ó 15 m de la zona de rompiente. Entre los sitios hay

tres bandas que se presentan en ambos casos, las bandas A, E y G de La Curva, lo que sugiere que en el sitio impactado persiste el 35% de las poblaciones nativas a pesar del enriquecimiento del sistema.

La correspondencia de las bandas *j*, *l* y *m*, con los estándares de *Bacillus* y *Paracoccus* en La Enlatadora, y de la banda *G* con el estándar de *Bacillus* en La Curva, nos sugiere que estos géneros son los más abundantes en los sitios en cuanto a productores de PHB se refiere. Esto concuerda con el número de cepas aisladas para cada uno, ya que son los géneros con mayor recuperación. Sin embargo, hay que dejar claro que es necesaria la corroboración de la identidad de las secuencias de las muestras naturales ya que no se logró la reamplificación de las bandas. Por otro lado, podemos decir que el grupo *Bacillus* es nativo de los sitios y que *Paracoccus* ha logrado establecerse gracias a las alteraciones del efluente de la enlatadora.

El aumento en la diversidad y abundancia de bacterias en la alfombra microbiana incrementa la probabilidad de que en esa comunidad estén presentes los organismos buscados y de que se logre su aislamiento. También nos proporciona elementos para pensar que se pueden obtener más y diferentes organismos con características propias para una innovación en biotecnología, siendo en este caso el aislamiento exitoso de productores de PHB. El incremento de la diversidad microbiana, y el desarrollo de cepas con habilidad potencial para producir PHA ya se ha relacionado con el desbalance de las condiciones nutricias en los ambientes (de Lima *et al.*, 1999).

Las poblaciones de bacterias frecuentemente se encuentran expuestas a estrés debido a limitaciones o cambios en su medio (i.e. nutrientes, temperatura, salinidad, etc.).

Algunos factores son compartidos por los sitios estudiados como es la desecación en marea baja y la intensidad de irradiación (UV); pero el que hace la diferencia y en el cual se centra el interés de este trabajo es el efluente de la enlatadora, porque a pesar de que el tapete microbiano pudiera estar adaptado, el efluente provoca un estrés ya que no es constante en su flujo y probablemente tampoco lo sea en su composición, variando las condiciones ambientales. La habilidad de un organismo de perdurar durante el estrés determina su persistencia en el ambiente, por lo que han desarrollado diversas estrategias de sobrevivencia dentro de las cuales se encuentra la acumulación de materiales de reserva como lo es el PHB (Guerrero *et al.*, 2002).

Las tasas de producción primaria en bosques y pastizales, son cercanas a las que se han observado en tapetes microbianos, siendo las de las selvas las más altas. Sin embargo, si se consideran las tasas de asimilación de carbón a biomasa, las alfombras microbianas y los pastizales son los más altos (Guerrero *et al.*, 2002). Esto nos habla de la capacidad que tienen estos sistemas de asimilar el carbón y transformarlo en compuestos orgánicos, ya sea biomasa o materiales de reserva como el PHB, es decir son sistemas altamente activos y productivos, características deseadas para lograr una producción más eficiente de cualquier producto biotecnológico.

Rothermich *et al.* (2000) estudia las variaciones diarias y estacionales de PHA en tapetes fotosintéticos y hace una comparación de la producción de PHA en condiciones naturales de ambientes como tapetes microbianos de España y Australia, suelo de jardín, composta, lodos activados, sedimentos de manglar y estuarinos, arenas ricas en yeso, plancton, biopelículas de río, agua de estanques, lagos y lagunas, encontrando que después

de los lodos, los tapetes microbianos son los que presentan de manera natural una mayor cantidad de PHA (0.02 - 0.5 % de peso seco de tapete). Si consideramos esto y la alta productividad y diversidad de los tapetes, los hace un objeto interesante de estudio para el aislamiento de productores de PHA.

4.3. Obtención de aislamientos y detección de cepas productoras de PHB.

Se logró una mayor recuperación de cepas (33% más) en La Enlatadora que en La Curva por tener mayor diversidad y abundancia, aumentando la probabilidad de recuperar un mayor número de productores de PHB, lo que al final sucedió así, teniendo 6 productores de PHB en La Curva y 12 en La Enlatadora, siendo detectados por alguna de las dos tinciones. Aunque quedaba en duda si producían PHB o algún otro tipo de material lipídico. Con la extracción química se tienen 4 cepas para La Enlatadora y 2 para La Curva con una producción y acumulación significativa. En el sitio de La Curva se tienen otras dos cepas que producen cantidades menores de PHB, siendo entonces 4 los productores de PHB para ambos sitios, sin haber una diferencia significativa entre el número de cepas productoras de PHB aislados para cada sitio, esto si no consideramos la cepa E46 a la cual no se le extrajo PHB pero es muy similar a E33 y E45 (productores de PHB), de La Enlatadora.

A pesar de lograr un buen número de organismos aislados, muy probablemente queda mucho potencial biológico en la muestra ya que las condiciones de cultivo que se manejaron son condiciones medias y análogas al medio marino. Sin embargo, los microambientes presentes en un tapete microbiano son tan diversos que la recuperación de

bacterias está sesgada hacia las condiciones de cultivo utilizadas, seguramente fueron eliminadas algunas poblaciones como bacterias fotosintéticas al ser incubadas en oscuridad o anaeróbicas por la presencia de oxígeno, lo que deja la posibilidad de que haya otros productores de PHB. Si consideramos que estos organismos se quieren utilizar para una aplicación biotecnológica habrá que hacer un balance de los beneficios y desventajas que conlleva realizar los aislamientos en una u otra condición, ya que en condiciones medias pudiera ser más fácil su crecimiento pero más probable a una contaminación, no siendo el caso de un extremófilo que ha desarrollado capacidades para vivir donde otros organismos no pueden.

El primer criterio utilizado para la detección de cepas productoras de PHB fue la búsqueda de inclusiones citoplasmáticas refringentes, siendo ésta una aproximación con un grado sugestivo ya que existen otras estructuras intracelulares que pueden tener características similares como son inclusiones de polifosfatos y endoesporas (Krieg y Holt, 1984) o hasta cuerpos lipídicos diferentes al PHB como esterres de ceras (Álvarez *et al.*, 1997) y triacilgliceridos (Spiekerman *et al.*, 1999). En algunas cepas se han observado inclusiones de polifosfatos y de PHA simultáneamente (Álvarez *et al.*, 1997). Para diferenciar de estas estructuras se pueden utilizar diversas tinciones, azul de metilo para los polifosfatos o rojo Nilo y negro Sudán para cuerpos grasos hidrofóbicos; también así observaciones morfológicas como posición, forma y número de las inclusiones (Bradshaw, 1979). Las dos tinciones empleadas, negro Sudán y rojo Nilo, son tinciones lipofílicas que pueden identificar esterres de ceras y triacilgliceroles (Greenspan y Fowler, 1985; Spiekermann *et al.*, 1999), por lo que también lo hace ser sólo una aproximación, aunque

más precisa. A pesar de esto, el azul Nilo y el rojo Nilo, el segundo derivado de la oxidación del primero, han sido ampliamente utilizados para la detección de la producción de PHB (James *et al.*, 1999; Spiekermann *et al.*, 1999; Rothermich *et al.*, 2000; Pal y Paul, 2001).

El rojo Nilo no permite diferenciar entre la producción de PHB u otro tipo de PHA, es un método sencillo y altamente sensitivo, detectando acumulaciones de aproximadamente 3 – 5 %, siendo una herramienta poderosa para discriminar entre las cepas productoras y no productoras de PHA (Spiekermann *et al.*, 1999). También se ha clasificado como una prueba hidrofóbica fluorescente (Greenspan *et al.*, 1985), ya que emite una señal naranja cuando se encuentra en un ambiente hidrofóbico. La técnica que se utilizó fue *in vivo*, los que nos permitió realizar la prospección sobre un mismo cultivo durante 72 horas, así como se ha utilizado en otros trabajos para monitorear el consumo de PHB en condiciones de escasez de alimento (James *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la concentración de tinte utilizado no afecta ni el crecimiento celular ni la producción de PHB (Spiekermann *et al.*, 1999).

En varios casos no se observaron bien definidos los gránulos dentro de las células, y en otros casos parecía que se teñía toda la célula con la tinción rojo Nilo, por lo que se utilizó negro Sudán, otra tinción lipofílica también ampliamente utilizada para la detección de PHB (Starr *et al.*, 1981; Liu *et al.*, 1998; de Lima *et al.*, 1999; Bradshaw, 1979). Negro Sudán es muy sensitivo para lípidos, soluble en grasas neutras, ligeramente básico por lo que se combina con los grupos ácidos de los compuestos lipídicos. La ventaja de este método es que se utiliza un colorante de contraste (safranina) lo que permite observar

claramente si los cuerpos teñidos se encuentran dentro de las células, en que número, y en que proporción en relación a la célula completa; lo que hace posible generar un criterio de las cepas con mayor producción en relación al número y tamaño de los gránulos por célula. Los métodos de tinción, ya sea de colonias o de preparaciones fijadas son recomendables y útiles para la prospección de un gran número de cepas, aunque tienen la desventaja que para su detección es necesario el uso de la fuente de carbono y las condiciones de cultivo adecuadas (Sheu *et al.*, 2000).

Con estas tinciones eliminamos las cepas que en la observación de ICR se hubieran confundido con endoesporas, polifosfatos u otro tipo de inclusión. Sin embargo, se identifican tres cepas (C18, C19 y E13) formadoras de endoesporas pero a su vez productoras de PHB, estando todas dentro del género *Bacillus*. El criterio más claro para la selección de las cepas productoras de PHB fue la tinción con negro Sudán, ya que al estar fija la muestra y el permitirnos ver la célula nos proporcionó una mejor idea de aquellas que pudieran presentar un buen rendimiento en la producción del biopolímero. La selección siempre se pensó hacia el aislamiento de cepas con alto rendimiento por eso sólo se fueron conservando aquellas donde su acumulación de PHB era evidente y considerable, a pesar que otras mostraran ser positivas a las tinciones. La selección de los presuntos productores de PHB, para su identificación y valoración productiva, se basó en las observaciones de las tinciones, sólo las cepas E36 y E51 se seleccionaron a pesar de que las tinciones no eran muy claras, pero las inclusiones refringentes observadas eran muy grandes y sugestivas.

De las tres técnicas utilizadas para la detección de bacterias productoras de PHB, la prospección de ICR con microscopia de contraste de fases es muy práctica ya que no requiere de mayor procedimiento más que la preparación de la muestra, sin embargo es la menos precisa ya que no se define la naturaleza de las inclusiones. Si el objetivo es solo determinar la presencia o producción de PHB, considero que la tinción negro Sudán es mejor, ya que permite observar con claridad inclusiones lipídicas dentro de las células, aunque éste método requiere de más tiempo para realizar la tinción. Sin embargo, si se cuenta con un espectrofluorómetro y se quiere realizar una cuantificación de PHB, la tinción con rojo Nilo es más propia para tal propósito, así mismo es una excelente herramienta si se desea una tinción *in vivo*.

Las estrategias de cultivo tradicionales usan condiciones completamente diferentes a las de ambiente natural para muchos organismos y son un factor importante para el fracaso del cultivo de la mayoría de los organismos en cultivo puro (Keller y Zengler, 2004). Por lo que el uso de herramientas moleculares para definir el número de sistemas productores de PHB se convierte en un elemento indispensable e interesante. Pero existen varios factores que pueden dificultar su detección por estos métodos como es la baja abundancia en la muestra, o que la secuencia del gen que se busca sea diferente a las reportadas anteriormente, además de que existen diversos sistemas de producción los cuales tienen valores de identidad muy variables (8-96%) (Rehm, 2003), lo que dificulta el diseño de oligonucleótidos para la amplificación del gen *phaC*.

4.4. Identificación polifásica de los productores de PHB.

La identificación polifásica actualmente es esencial ya que se sabe que ni la aproximación molecular (genómica) ni la identificación fenotípica son 100% eficaces por si solas, por lo que es indispensable su combinación para una correcta taxonomía de las bacterias (Roselló-Mora y Amann, 2001). El interés de este trabajo no es taxonómico ni filogenético, por lo que sólo se realizaron las pruebas fenotípicas elementales y sólo fue secuenciado un fragmento del gen 16S rARN, permitiéndonos identificar las cepas hasta nivel de género.

Las principales desventajas de analizar el fenotipo de un organismo, es que la información potencialmente disponible de un genoma procariótico nunca es expresado en su totalidad, ya que su fenotipo se encuentra directamente relacionado con las condiciones ambientales (Roselló-Mora y Amann, 2001). Por lo que la identificación de las cepas se basó principalmente en la comparación directa de las secuencias del gen 16S rARN y se corroboraron las identidades con las características fenotípicas, siendo la secuenciación del gen 16S rARN la herramienta más poderosa para la identificación, ya que el gen está presente en todas las especies de bacterias, son verdaderamente homólogos en todos los organismos y hoy en día se cuenta con una amplia y creciente base de datos que permite la identificación de organismos cultivados y no cultivados (Boivin *et al.*, 1995). Estos análisis de comparación han demostrado un alto poder de resolución para medir el grado de relación existente entre organismos arriba del nivel de especie (Roselló-Mora y Amann, 2001).

Las bacterias productoras de PHB pertenecen a 6 géneros de tres grupos, proteobacterias alfa (*Paracoccus* y *Methylobacterium*), actinomicetos (*Micrococcus* y *Rhodococcus*) y Gram positivas (*Bacillus* y *Staphylococcus*). Aunque como se verá más adelante las cepas del género *Micrococcus* no presentaron una producción significativa de PHB. La diversidad de géneros y de grupos sugiere la posibilidad de contar con diferentes sistemas de acumulación y capacidades de producción de distintos copolímeros.

Bacillus, bacilos Gram positivos, se presentaron dos cepas motiles C18 y C19, y una no mótil, E13, se sabe que *B. mycoides* no es mótil (HPA, 2003; Krieg y Holt, 1984) lo cual concuerda para la identificación genotípica de E13, y a pesar de ser cercana, no es así para C18, la cual probablemente pertenece a *B. cereus* ya que estos sí presentan motilidad y tienen la misma calificación en la búsqueda de BLAST (presentan alta homología), no obstante son pocas pruebas las realizadas para aventurar a definir especie, por lo que nos mantenemos a nivel de género. Se encontraron poblaciones de *Bacillus* tanto en La Enlatadora como en La Curva, por lo que probablemente son miembros de la comunidad nativa. En el manual de Bacteriología Bergey's se reporta la acumulación de PHB para *B. cereus* y *B. mycoides* como un rasgo taxonómico, a diferencia de *B. megaterium*, donde fue descubierto, no todas las cepas de esta especie lo acumulan (Krieg y Holt, 1984). La distribución de algunos miembros del género *Bacillus* es común en el Océano Pacífico, dentro de los cuales se reporta a *B. cereus* y *B. mycoides*. Algunos de estos *Bacillus* de origen marino se ha mostrado que producen metabolitos diferentes a aquellos aislados en ambientes terrestres (Ivanova *et al.*, 1999).

En 1984 la producción de PHB en *Paracoccus*, bacilos Gram negativos, proteobacterias alfa, era un rasgo a nivel de género y no presentaban actividad de nitrogenasa, sin embargo, sólo había dos especies cuando se definió esto. Con el tiempo se han reclasificado algunas especies como el caso de la especie marina *P. zeaxanthinifaciens* (Berry *et al.*, 2003), esta especie es la que presenta mayor homología a las secuencias de las cepas aisladas, de la cual, en su descripción no se menciona la producción de PHB. *P. halodenitrificans* presenta un alto contenido del polímero, el cual refleja la alta respiración endógena. Es un organismo versátil capaz de adaptar su metabolismo a las condiciones prevalecientes del ambiente. Bajo condiciones heterótrofas es capaz de utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de carbono y energía (Krieg y Holt, 1984), esto también se ve reflejado en las cepas aisladas de *Paracoccus* ya que fueron las únicas con el potencial de crecer significativamente en el medio MHB y acumular PHB. Los organismos que se obtuvieron pertenecientes a este grupo todos presentaron la habilidad de crecer en un medio diazotrófico (AZ), sugiriendo su capacidad como fijadoras de nitrógeno, proceso que no se ha reportado para miembros del grupo *Paracoccus*, considerando esto y que tampoco se describe la producción de PHB en *P. zeaxanthinifaciens* quizá estamos hablando que nuestras cepas representan una especie o variante nueva. Se ha identificado que el grupo *Paracoccus* tiene una PHB polimerasa Clase I, aunque el gen no está colocalizado con otros genes de la síntesis de PHB (Rehm, 2003).

Además, por su capacidad de utilizar una gran diversidad de compuestos como fuente de carbono, por ejemplo hidroxibutirato, y su habilidad de desnitrificación, los miembros del género *Paracoccus* pueden tener un uso potencial como sistemas de

biorremediación de ambientes impactados por efluentes ricos en materia. Una cosa que llama la atención es que en el árbol filogenético se observa que dentro del grupo *Paracoccus* las cepas E33, E45 y E46, muy similares entre ellas, forman un grupo completamente diferente de las otras secuencias a pesar de ser extremadamente cercanas. Esto provoca prestar especial atención en un futuro sobre estos organismos, los cuales pudieran representar una especie antes no descrita o al menos bien diferenciada.

Methylobacterium, 20 especies que pertenece a la subclase α -2 de proteobacterias; son bacilos Gram negativos, aerobios estrictos, con pigmentos rosas, metilótrofas facultativas. Pueden crecer en compuestos de sólo un carbón como formato, formaldehído y metanol como fuente única de energía y carbono. Tienen la ruta metabólica de la serina para la asimilación de formaldehído (Green 2000 en Gallego *et al.*, 2005). Por su capacidad de asimilación de fuentes de carbono relativamente económicas son potenciales productores de PHA a nivel industrial. Son ampliamente distribuidos en la naturaleza y algunas cepas presentan etapas de receso en la cual pueden formar quistes de lípidos caracterizados por grandes inclusiones principalmente compuestas por PHB y la formación de una capa gruesa en la superficie exterior de la célula. Se reportan cepas fijadoras de nitrógeno dentro de este grupo (Krieg y Holt, 1984), como la aislada en La Curva. Al igual que el grupo *Paracoccus* tienen una PHB sintasa Clase I (Rehm, 2003) y

Rhodococcus, bacilos Gram positivos del grupo actinomicetos, tiene la capacidad de utilizar una amplia gama de compuestos orgánicos como única fuente de carbono y energía, además de que son capaces de degradar hidrocarburos (Sharma y Pant, 2000). Pueden utilizar medios muy simples, como fuente de nitrógeno usan amonio, aminoácidos

y nitrato, y como fuente de carbono glucosa, fructuosa, manosa, sacarosa, acetato, propionato y butirato, los tres últimos muy utilizados en la sobreproducción de PHB y de copolímero de PHBV (Pieper-Fürst *et al.*, 1995), ya que el propionato estimula la producción de PHV. Se pueden aislar de ambientes terrestres, acuáticos y marinos (Sharma y Pant, 2000). Se identificó como gran variable, sin embargo se clasifica como Gram positiva. Pueden presentar glóbulos de lípidos y gránulos de polifosfatos como característica (Krieg y Holt, 1984). Las inclusiones lipídicas parecen tener una estructura definida y con algunas proteínas asociadas para su formación llegando a acumular 76 - 87% del peso seco (Alvarez *et al.*, 1996), éstas pueden ser confundidas por inclusiones de PHB aún y con las tinciones, lo que puede sobre estimar la acumulación por métodos visuales o tener una detección falsa positiva. A pesar que la cepa aislada de *Rhodococcus* proviene del sitio La Curva, éste es otro grupo que puede ser considerado como potencial para cuestiones de biorremediación ya que además de su plasticidad en el uso de fuentes de carbonó es capaz de remover fosfatos acumulándolos como polifosfatos.

Staphylococcus, son cocos Gram positivos con bajo porcentaje molar de Guanina-Citosina en el ADN, lo que los hace agruparse junto con los *Bacillus* en el árbol filogenético. El género *Staphylococcus* pertenece filogenéticamente al cluster *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* (BLS). Son anaerobios facultativos y oxidasas negativas, algunas cepas no producen catalasa mientras que la mayoría sí, de las tres que se tienen de este género una no presentó actividad de catalasa (E4), la dificultad de su crecimiento no permitió el análisis de más características fenotípicas. Pueden crecer en salinidades hasta del 15%. En el árbol filogenético se observa como el cluster de *Staphylococcus* presenta

una mayor diversidad entre sus miembros, lo que sugiere que las tres cepas pertenecientes a este género pudieran tener diferentes propiedades. Este grupo tiene la habilidad natural de biodegradar aceites de petróleo (Nweke y Okpokwasili, 2003), lo que les da la capacidad de crecer en ambientes como el de La Enlatadora y lo que les da un potencial como agentes de biorremediación, algunas de estas cepas se han reportado de origen marino.

Micrococcus, cocos Gram positivos, en tétradas, catalasa y oxidasa positivos, tienen un alto contenido de GC (>60% mol) en su ADN (Stackebrandt *et al.*, 1995) lo que lo diferencia de *Staphylococcus* y lo clasifica dentro del grupo de los actinomicetos junto con *Rhodococcus* que presenta esta misma característica. Con las últimas reclasificaciones sólo abarca tres especies *M. lylae*, *M. luteus* y *M. antarcticus*, siendo *M. luteus* el más diverso (Wieser *et al.*, 2002). Utiliza carbohidratos y aminoácidos como fuente de carbono y energía. Sus requerimientos nutricionales son variables y crecen en presencia de 5% de NaCl (Krieg y Holt, 1984). Se ha logrado el aislamiento de cepas marinas con propiedades antibióticas (Jayaprakash *et al.*, 2005), pero ninguna descripción del género menciona la producción de PHB.

Entonces, los seis géneros identificados se pueden dividir inicialmente en dos grandes grupos Gram negativos (*Paracoccus* y *Methylobacterium*) y Gram positivos (*Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Rhodococcus*); y posteriormente el segundo grupo en aquellos con contenido menor a 50% mol de GC en el ADN (*Bacillus* y *Staphylococcus*) y los de mayor a 60% mol de GC en el ADN (Actinomicetos: *Micrococcus* y *Rhodococcus*). Las pruebas fenotípicas realizadas concuerdan con aquellas

reportadas en el manual de Bacteriología Bergey's para los géneros identificados. Teniendo sólo un caso que presenta una característica rara para su género, la cepa E4 que es catalasa negativa raro en *Staphylococcus* (Krieg y Holt, 1984).

4.5. Acumulación y productividad de PHB por las cepas.

La producción de PHA determinada en diferentes trabajos usualmente no permite hacer comparaciones directas, dado a que la diversidad de organismos utilizados, la diferente composición del polímero, los sustratos y las condiciones de crecimiento varían de laboratorio a laboratorio (Madison y Huisman, 1999), pero es parte del reto ver qué organismo, con qué sustrato y bajo qué condiciones produce la mayor cantidad y calidad de PHA al más bajo costo. Una alta productividad es uno de los factores más importantes para una producción económica. Los altos contenidos de PHA por célula normalmente resultan en altos rendimientos del material, además de ser benéfico para el proceso de recuperación (Lee, 1996). La productividad normalmente está principalmente determinada por la capacidad de acumulación de PHB de cada cepa, sin embargo si ésta no presenta en buen crecimiento celular, o no puede alcanzar cultivos de altas densidades, la productividad se va a ver directamente afectada.

El mayor costo de la producción de PHA es el sustrato y el proceso de recuperación, por esto es de gran importancia que el grado de acumulación sea al menos del 60% de peso seco (Ramsay, 1990) para que sea factible un escalamiento con las tecnologías de hoy día. Las determinaciones de la acumulación de los asilamientos de este estudio se encuentran muy cercanas a estos valores, principalmente las cepas de los

géneros *Bacillus* y *Paracoccus*; además se obtuvieron en condiciones no óptimas, por lo que optimizando las condiciones de crecimiento y de producción de PHB estos valores seguramente se pueden incrementar considerablemente.

En la mayoría de las bacterias productoras de PHB la mayor acumulación se da en la fase estacionaria de crecimiento, una fase larga de crecimiento es esencial para obtener un cultivo de alta densidad celular. La limitación de nutrientes es necesaria para iniciar la acumulación de PHB, y generalmente el amonio es un factor crítico en la producción ya que detiene el crecimiento celular y la síntesis de PHB. Por lo que considerar estos factores para cada cepa como un caso particular puede mejorar el proceso y la productividad (Sun *et al.*, 2000).

El método de cuantificación de PHB descrito por Law y Slepecky (1961) es sencillo y específico, solo que existen varios compuestos biológicos que tienen interferencia ya que absorben a longitudes de 200-230 nm después de la digestión en ácido sulfúrico, por lo que este procedimiento requiere que las muestras sean bien purificadas. Los pasos de purificación pueden resultar en la pérdida de cierta cantidad de material sobre todo de PHA de cadena corta (PHB), resultando en una subestimación del contenido real (Karr *et al.*, 1983). Inversamente si el polímero no está bien purificado puede generar sobreestimación del contenido. En el caso de nuestro procedimiento podríamos pensar que hubo una pérdida de material en los pasos de purificación, por lo que una determinación más precisa pudiera elevar los valores de producción actuales.

Se ha reportado la producción de PHB en una gran diversidad de bacterias (Madison y Huisman, 1999), dentro de las cuales se encuentran el género *Bacillus*

(Ramsay, 1990; Aslim *et al.*, 2002; Katircioglu *et al.*, 2003; Yüksekdag *et al.*, 2004), el cual ha sido ampliamente estudiado desde que el PHB se descubrió en una cepa de *Bacillus megaterium* en 1925, también se ha reportado para los géneros *Micrococcus* (Ramsay, 1990), *Methylobacterium* (Yellore y Desai, 1998; Korotkova *et al.*, 2002), *Staphylococcus* (Wong *et al.*, 2000), *Rhodococcus* y *Paracoccus* (Krieg y Holt, 1984; Ueda *et al.*, 1996). Se ha reportado la acumulación de PHA entre los actinomicetos, sin embargo se conoce muy poco de la biosíntesis y de los genes involucrados en la producción de PHA de estos organismos (Ramachander y Rawal, 2004).

Las cepas pertenecientes al género *Bacillus* son las que presentaron un mayor porcentaje de acumulación, teniendo, los miembros de este grupo, valores similares de producción neta y productividad en La Enlatadora y en La Curva. Aunque los valores de productividad de PHB fueron mayores para las cepas del sitio no impactado. Esto probablemente se deba a que en este sitio puede haber eventos de mayor escasez de fuentes de carbono por lo que quizá los organismos que lo habitan tienen que desarrollar sistemas de mayor acumulación para perdurar en tales momentos.

La producción de PHB dentro del género *Bacillus* es ampliamente representada, en el trabajo de Aslim y colaboradores (2002) se estudia a 27 cepas pertenecientes a 8 especies diferentes, pero no *B. mycoides* ni *B. cereus*. El medio utilizado es medio nutritivo, el máximo porcentaje de acumulación que obtienen es de 48.13% para *B. megaterium* Y6, siendo este inferior al determinado para nuestras cepas C19, C18 y E13, también del género *Bacillus*. Además la producción de biomasa y de PHB reportada (Biomasa: 0.28-1.04 gr L⁻¹ PHB: 0.068-0.207 gr L⁻¹) son muy inferiores a los obtenidos en

este trabajo (Biomasa: 2.29-2.91 gr L⁻¹; PHB: 1.33-1.93 gr L⁻¹). La determinación del tiempo de máxima producción es un factor importante ya que en otro trabajo un cultivo de *B. megaterium* disminuyó su contenido más del 60% de 45 a 48 horas de incubación, posiblemente relacionado con el proceso de esporulación. Obteniendo los niveles más altos de acumulación de PHB (77% peso seco) en medio nutritivo con peptona proteasa para *B. megaterium*, aunque la producción de biomasa fue mínima y por lo tanto su producción de polímero neta también (Biomasa: 0.75 gr L⁻¹; PHB: 0.059 gr L⁻¹) (Yüksekdag *et al.*, 2004). La misma cepa de *B. megaterium* Y6, en otro trabajo de este grupo, es sometida a mutación química (Acriflavin y 5-bromourasil) y física (radiación UV) obteniendo mutantes con capacidad de acumular 63.45% de PHB en lugar de 48.13% que acumulaba la cepa silvestre (Katircioglu *et al.*, 2003), siendo este valor ligeramente superior a los determinados en este trabajo, lo que demuestra que la producción de PHB se puede mejorar mediante simples procesos de mutación.

Se ha reportado para *Methylobacterium* en un medio adicionado con sacarosa y pobre en nitrógeno una acumulación de PHB de 40% y hasta 48.1% con formato en el medio, generando una producción neta de 1.24 y 1.64 gr L⁻¹, respectivamente, en 48 horas. El mayor rendimiento lo presentó cuando se creció con malato, que a pesar de tener una acumulación de 40.8%, la producción de biomasa fue mayor y por lo tanto la producción neta de PHB también (2.08 gr L⁻¹) (Yellore *et al.*, 1999). En otro trabajo similar, la misma cepa presenta una mayor productividad que *Alcaligenes eutrophus* H16 y *Pseudomonas cepacia* cuando se utiliza lactosa como fuente de carbono (Yellore y Desai, 1998). No se estudió la producción de la cepa de este género dado que el crecimiento que presentaba en

el medio de trabajo era mínimo, queda abierto para un trabajo futuro. Bacterias del tipo metilótrofas se han estudiado para este tipo de aplicaciones debido a que tienen un gran potencial por su capacidad de asimilar compuestos relativamente económicos. Dada esta característica estos organismos fueron el primer objeto de investigación para una producción industrial por ICI, Co. (Madison y Huisman, 1999). Es necesario definir un medio en el cual el desarrollo de la cepa C54 perteneciente al género *Methylobacterium* tenga un crecimiento celular y acumulación de PHB óptimos. A pesar que es filogenéticamente cercana a las cepas de *Paracoccus* de La Enlatadora, este organismo fue aislado en La Curva.

Las tinciones no fueron claras en las cepas de *Micrococcus* de La Enlatadora, sin importar esto y tomando en cuenta la estructura de las inclusiones citoplasmáticas refringentes, se decidió proceder con la extracción y cuantificación de PHB de estos organismos, obteniendo valores inferiores a 0.25% de peso seco. Se considera que no son productoras de PHB ya que los valores determinados son tan bajos que pudieran haber sido generados por alguna interferencia. Posiblemente las estructuras observadas corresponden a inclusiones de polifosfatos o de otro tipo de lípidos. Soportado por las observaciones de estructuras intracelulares que contienen polifosfatos en *Micrococcus lysodeikticus* (Friedberg y Avigad, 1968) y *Micrococcus* sp. (Sidat *et al.*, 1999). Sin embargo, *Micrococcus halodenitrificans* se ha reportado como productor de copolímeros de PHB-PHV cuando utiliza glucosa como fuente de carbono y ácido propiónico bajo condiciones limitadas de nitrógeno (Ramsay, 1990), lo que nos permite pensar que bajo condiciones de crecimiento sobre glucosa el polímero sintetizado es prácticamente de puro PHB, aunque

no fue así en nuestro trabajo. Pero después de la reclasificación del género *Micrococcus* (Stackebrandt *et al.*, 1995; Wieser *et al.*, 2002) este organismo quedó fuera de este grupo, por lo que podemos decir que a la fecha no hay reporte de *Micrococcus* productores de PHB.

Una cepa de *Staphylococcus epidermidis* aislada de aceite de ajonjolí es capaz de sintetizar PHB de relativamente alto peso molecular. Crecido en un medio con fructuosa en frasco se obtuvo 2.5 gr L^{-1} de biomasa con una acumulación del 15.02% de PHB de peso seco, ligeramente superior a lo acumulado por la cepa C20R en 48 horas. La alta acumulación relativa que se determinó a las 24 horas, se debe principalmente a la acumulación generada por el inóculo, ya que la densidad bacteriana tardó 20 horas en comenzar la fase exponencial. A pesar de que los valores de acumulación son bajos con respecto a otras cepas, estos son más altos que los reportados para otras cepas de *Staphylococcus* donde utilizando malta de desecho como sustrato de fermentación se logró una biomasa de 1.76 gr L^{-1} y 6.93% de acumulación de PHB en frasco; y 3.5 gr L^{-1} y 3.31%, respectivamente en un fermentador (Wong *et al.*, 2000).

Con la cepa de *Rhodococcus* sucede algo similar, ya que presenta una mayor acumulación a las 24 horas que a las 48 horas. Pensando que la producción se dio en las células del inóculo, y conforme comenzó a crecer la población disminuyó la proporción con el peso seco, y al no alcanzar la fase estacionaria, las nuevas células no tuvieron oportunidad de acumular PHB; por otro lado también debemos de tener en cuenta que la acumulación de PHB es un balance entre el proceso de síntesis y de degradación, y que quizá hubo degradación del polímero ya acumulado hasta que alcanzara la fase estacionaria

del crecimiento, punto que no se dio. Probablemente si se manejan mejor las condiciones de cultivo y se logra alcanzar la fase estacionaria de crecimiento se logre una mayor acumulación y productividad de PHB. Por otro lado se ha comprobado que *Rhodococcus opacus* produce triacilgliceroles y es detectado por negro Sudán (Spiekermann *et al.*, 1999), siendo posible que se haya sobreestimado la acumulación de PHB mediante la observación de las preparaciones teñidas. Otra especie, *Rhodococcus ruber*, tiene la capacidad de acumular PHA que contiene 3HV sin la necesidad de tener como sustrato un precursor de éste como propionato o valerato (Madison y Huisman, 1999). *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126 produce copolímeros con composiciones de 75% mol de 3HV y 25% mol de 3HB a partir de glucosa como fuente de carbono. Y si se utilizan otros sustratos es capaz de producir copolímeros con monómeros de tipo 4-hidroxi butirato (4HB), 5-hidroxi valerato (5HV) o 3-hidroxi hexanoato (3HHx), mientras que el uso de ácido valérico como sustrato resulta en la obtención de polímeros de 99 % mol 3HV (Haywood *et al.*, 1991). Esto es de gran ventaja biotecnológica para la producción de copolímeros específicos sin la necesidad de sustratos complejos. En otro trabajo, *Rhodococcus ruber* acumuló PHBV en un rango de 2-8% de peso seco, similar a lo obtenido en este trabajo, aunque también se detectó la acumulación de triacilgliceroles (Füchtenbusch y Steinbüchel, 1999). Lo que nos sugiere que este grupo acumula PHB, PHV, PHBV, o triacilgliceroles de fuentes de carbono similares. Por lo que si se logra incrementar la producción de polímero y destinar la fuente de carbono hacia los materiales de reserva adecuados, este tipo de organismo puede ser de gran valor en la industria biotecnológica.

Paracoccus, es el grupo que se encuentra en segundo lugar en cuanto a una acumulación significativa y productividad de PHB, además que fue el único que tuvo la capacidad de crecer y acumular PHB utilizando hidroxibutirato como fuente de carbono. El porcentaje de acumulación llegó a ser superior para la cepa E71 que en la E13 perteneciente al género *Bacillus* a las 48 horas, así como la productividad de la cepa E45 es similar y superior a las cepas E13 y C19, respectivamente también del género *Bacillus*, lo que sugiere que los dos grupos están en un mismo nivel de factibilidad o potencialidad para desarrollarlos como fuente rentable de PHB. En un trabajo previo se ha observado la síntesis del copolímero PHBV en *Paracoccus denitrificans* bajo condiciones limitantes de nitrógeno, utilizando ácido acético y valérico como sustrato. Además, modificando las proporciones de sustrato se lograron diferentes contenidos de HV en el copolímero (Mothes, 2004). Por otro lado, Ueda y colaboradores (1996), determinan una acumulación de PHA de 24.3% de peso seco, con más del 90% de 3HV utilizando metanol y pentanol. Un grado de acumulación inferior al obtenido por nuestras cepas, pero a base de sustratos relativamente económicos. Por su versatilidad de sustratos, su capacidad de síntesis de copolímeros, así como su relativa alta productividad, estas cepas muestran ser merecedoras de atención para estudios futuros.

La producción de PHB en organismos heterótrofos ha llegado a 10 gr L^{-1} en un sistema de fermentación tipo lote (Batch), a comparación de los casi 2 gr L^{-1} logrados por la cepa C18, indicador de que es necesaria la optimización de las condiciones de crecimiento y producción de PHB. La máxima cantidad obtenible está dada por el rendimiento de biomasa producido por el sustrato y por la concentración máxima inicial de

la fuente de carbono que puede ser usado sin inhibir el crecimiento celular (Ramsay, 1990). El número y tamaño de los gránulos varía considerablemente dependiendo de la naturaleza del organismo, las condiciones de crecimiento, el sustrato de crecimiento y el grado de acumulación del polímero (Pal y Paul, 2001).

Wang y Lee (1997) reportan valores de productividad muy elevados, $5.13 \text{ gr L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en *Alcaligenes latus*, dos órdenes de magnitud superior a nuestra máxima productividad, estos niveles se obtuvieron en cultivos alimentados controlando los niveles de oxígeno y fuente de nitrógeno, así como la temperatura optimizada, además de que maneja una producción de biomasa previa a la producción de PHB. *Ralstonia eutropha* bajo condiciones limitantes de fosfatos, con el pH controlado en un sistema alimentado (fed-batch) se encontró que acumula 80% de peso seco de PHB con una productividad de $3.14 \text{ gr L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Ryu *et al.* en Madison y Huisman, 1999). Para *Azotobacter vinelandii* UWD se ha determinado una producción de PHB de hasta 85% de peso seco, con una productividad de $1.0 \text{ gr L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ en un medio de peptona de pescado y glucosa, y un sistema de cultivo alimentado (Page y Cornish, 1993). El uso de cepas recombinantes de *E. coli* también se ha dado, obteniendo una acumulación de 73% y una productividad de $3.4 \text{ gr L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Esto también es logrado con el uso de sistemas de cultivo alimentado (Wang y Lee, 1997). Teóricamente se pueden producir grandes cantidades de PHA en sistemas de cultivo continuos. Este tipo de sistemas son altamente deseables en la producción comercial ya que son potencialmente más productivos que un sistema de lote (Ramsay, 1990; Lee, 1996). Por lo que si se quiere ver la potencialidad de nuestras cepas para producción industrial, considero necesario el estudio de estos procesos en sistemas donde los parámetros

químicos, físicos y nutricios puedan ser controlados, ya que este es el elemento que provoca productividades bajas en nuestro trabajo.

Si nos basamos en los resultados obtenidos sería muy interesante y prometedor estudiar las cepas de *Bacillus* y *Paracoccus*. Sin embargo considero que dejar de lado otros organismos puede ser un error, ya que el hecho de que no hayan mostrado una producción significativa en las condiciones ensayadas no elimina la posibilidad que bajo otros regímenes no sean buenos candidatos. Aunque si tuviera que elegir una cepa, creo que *Paracoccus* es un objeto interesante de estudio, esto por su habilidad de usar diversas fuentes de carbono y por su capacidad de síntesis de copolímeros.

4.6. Proyecciones a futuro.

Este trabajo, como ya se mencionó anteriormente, es la base para el desarrollo de un proceso biotecnológico. Quedan muchas preguntas por responder, así como objetivos que alcanzar para lograr una producción de biomaterial eficiente. Se detectaron, aislaron y se identificaron a nivel de género ocho cepas productoras de PHB, las condiciones de evaluación de la producción de PHB fueron iguales para todas las cepas, por lo que las condiciones óptimas de crecimiento y producción para cada una se necesitan determinar de tal forma que se incremente la productividad de PHA. Para facilitar el conocimiento de los sustratos o condiciones de crecimiento que se pueden utilizar para cada cepa y para definir exactamente con que organismo estamos trabajando es de gran importancia realizar la secuenciación completa del gen 16S rARN y las pruebas necesarias para identificar las cepas hasta nivel de especie.

Otro punto de investigación relevante es sobre organismos capaces de sintetizar copolímeros, dos de los cuatro géneros identificados como productores de PHB se han reportado capaces de sintetizar copolímeros. Las diversas composiciones que se pueden obtener dentro de los polímeros de PHA, las variaciones como el incremento de la fracción HV en un copolímero PHBV produce varias mejorías como es la disminución del punto de fusión, una reducción en la cristalinidad y un aumento en la flexibilidad y resistencia del material (Luzier, 1992). El estudio de la adición de algunos sustratos como acetato, propionato, formato, malato y glutamato (ácidos orgánicos) (Yellore *et al.*, 1999) en el medio y los análisis de la composición monomérica de los PHA producidos por las cepas es un objeto interesante de investigación y en un futuro, de importancia para su comercialización. Este tipo de análisis se ha venido realizando principalmente por cromatografía de gases (Kessler y Palleroni, 2000).

La visión de este trabajo es la del aprovechamiento de materia orgánica de desecho como fuente de carbono para la producción de PHB. Evaluar el uso del efluente de la enlatadora como medio de crecimiento definiría la posibilidad de la producción de biopolímero con las cepas aisladas bajo la fuente de carbono que ofrece el desecho de la enlatadora. El uso de materiales económicos y fácilmente adquiribles puede hacer que el costo de producción de este tipo de polímeros se reduzca considerablemente (Lee, 1996 en Yellore *et al.*, 1999). Proponiendo que las bacterias aisladas son capaces de obtener sus requerimientos nutricios de dicho efluente, utilizando un sustrato “económico” para la producción de PHB y funcionar como un sistema de biorremediación.

Si la productividad de la cepa también es un factor que determina el costo del producto final, entonces los mecanismos de regulación como la activación de la expresión de los genes *pha* por una señal ambiental (i.e. limitante de nutrientes), la activación de las enzimas Pha por componentes celulares o metabolitos intermediarios, la inhibición de las enzimas metabólicas por competencia de otras rutas metabólicas o el mantenimiento de la superficie de los gránulos (Kessler y Witholt, 2001; Madison y Huisman, 1999) tienen que ser entendidos y manipulados para una implementación exitosa de productores transgénicos.

Se le ha dado mucha importancia a los polímeros bacterianos como alternativas a plásticos recalcitrantes. La falta de conocimiento sobre el proceso de síntesis y regulación, no ha permitido que la producción de PHB o PHA se vea próxima a alcanzar un nivel competitivo frente a los plásticos petroquímicos. Los avances en el conocimiento de la producción de PHA con diferentes propiedades y el desarrollo de aplicaciones específicas, abren la posibilidad de evaluar y desarrollar aplicaciones médicas (Williams *et al*, 1999). Si consideramos la importancia biomédica de estos materiales, entonces se podrían justificar los costos de producción actuales, por lo que para estos fines, puede ser pensada una producción en un futuro más cercano. Por ejemplo, en lo que se refiere a matrices para ingeniería tisular, el PHA tiene ventajas sobre otro tipo de materiales, ya que con ayuda de diversos tratamientos se le pueden adherir compuestos bioactivos, se pueden alterar las propiedades mecánicas y de superficie y se pueden modificar para obtener diferentes tasas de degradación específicas (Williams *et al*, 1999). El PHB se ha detectado como un componente normal en el plasma humano, por lo que no presenta rechazo por el cuerpo.

5. CONCLUSIONES

Se realizó la bioprospección de un sitio impactado por el derrame de una enlatadora de productos pesqueros y de un sitio no impactado, logrando exitosamente la detección, el aislamiento y la identificación de cepas productoras de PHB, así como la valoración de su producción.

Los parámetros fisicoquímicos demuestran un aporte de nutrientes en el sitio impactado, a causa del efluente de la enlatadora, modificando la estructura de la comunidad bacteriana, tanto en diversidad como en abundancia, propiciando el desarrollo de una alfombra microbiana intermareal. La combinación de cultivos y aproximación molecular nos permitió tener una mejor visión de la diversidad y complejidad de la comunidad.

Se obtuvo un mayor número de cepas aisladas para el sitio impactado; en lo que a productores de PHB se refiere, se demostró la presencia de 3 géneros para La Curva: *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*; y 2 para La Enlatadora: *Bacillus* y *Paracoccus*, éste último con mayor abundancia. Entre los cuatro géneros se tienen representantes de los grupos: alfa proteobacterias, *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* y actinomicetos.

Se reconocen nueve cepas productoras de PHB, de las cuales seis (*Bacillus* y *Paracoccus*) presentan una acumulación significativa bajo las condiciones probadas; las tres pertenecientes al género *Bacillus*, presentan una producción considerablemente alta, cercana a lo mínimo deseado para una producción industrial. Por lo que determinar las

condiciones óptimas de crecimiento y producción de PHB de estas cepas es importante para incrementar la productividad y considerarlas organismos potenciales de explotación.

No se obtuvieron productividades de PHB superiores a las obtenidas por otras cepas, sin embargo, se aislaron cepas con niveles de acumulación de PHB mayores a los reportados anteriormente para su género, Los niveles de productividad fueron bajos; además de las condiciones de crecimiento y producción de PHB, el sistema de cultivo utilizado está relacionado. Los resultados de este trabajo nos proporcionan el material biológico para una subsecuente investigación en el desarrollo de una alta producción de PHB y evaluar su capacidad como potenciales competidores como fuente de biopolímero.

El uso de cepas axénicas o de consorcios microbiológicos, como puede ser *Bacillus-Paracoccus-Staphylococcus*, puede ser pensado como un sistema de bioremediación de efluentes de desecho, además de dar un valor agregado al proceso con la producción de bioplástico a partir de dichos contaminantes.

A pesar de la controversia entre el potencial del PHA como alternativa a contaminantes como los plásticos petroquímicos y su actual costo de producción, su importancia como material en aplicaciones biomédicas justifica la investigación para el desarrollar la industria del PHA en un corto plazo.

Además de que la investigación del metabolismo, síntesis, regulación y producción de PHA se ha visto limitada sólo a ciertos grupos, el encuentro de sistemas biológicos novedosos es de gran interés, por lo que sigue siendo necesaria una mayor bioprospección de organismos productores de PHA.

6. REFERENCIAS

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, 1997. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** Nucleic. Acids. Res., 25:3389-3402.

- Alvarez, H. M., F. Mayer, D. Fabritius, A. Steinbüchel, 1996. **Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630.** Archiv. Microbiol. (Historical Archive), 165(6):377-386.

- Alvarez, H. M., O. H. Pucci, A. Steinbüchel, 1997. **Lipid storage compounds in marine bacteria.** Appl. Microbiol. Biotech., 47(2):132-139.

- Anderson, A. J., E. A. Dawes, 1990. **Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates.** Microbiological. Rev., 54(4):450-472.

- Aslim, B., Z. N. Yüksekdao, Y. Beyatli, 2002. **Determination of PHB growth quantities of certain *Bacillus* species isolated from soil.** Turk. Electronic J. Biotechnol., Special Issue, p:24-30.

- Berry, A., D. Janssens, M. Hümbelin, J. P. M. Jore, B. Hoste, I. Cleenwerck, M. Vancaneyt, W. Bretzel, A. F. Mayer, R. Lopez-Ulibarri, B. Shanmugam, J. Swings, L. Pasamontes, 2003. ***Paracoccus zeaxanthinifaciens* sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53:231-238.

- Boivin-Jahns, V., A. Bianchi, R. Ruimy, J. Garcin, S. Daumas, R. Christen, 1995. **Comparision of Phenotypical and Molecular Methods for the Identification of**

Bacterial Strains Isolated from a Deep Subsurface Environment. Appl. Environ. Microbiol., 61(9):3400-3406.

- Bradshaw, L. J., 1979. **Laboratory Microbiology.** 3^a ed., Saunders, USA, 338 p.p.

- Bull, A. T., M. Goodfellow, J. H. Slater, 1992. **Biodiversity as a source of innovation in biotechnology.** Annu. Rev. Microbiol., 46:219-252.

- Burdon, K. L., 1946. **Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations.** J. Bacteriol., 52(6):665-678.

- Cho, J. C., S. J. Giovannoni, 2004. ***Oceanicola granulosa* gen. nov., sp. nov. and *Oceanicola batsensis* sp. nov., poly- β -hydroxybutyrate-producing marine bacteria in the order *Rhodobacterales*.** Int. J. Syst. Microbiol., 54:1129-1136.

- Choi, J., S. Y. Lee, 2000. **Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 53:646-649.

- de Lima, T. C. S., B. M. Grisi, M. C. M. Bonato, 1999. **Bacteria Isolated from a Sugarcane Agroecosystem: Their Potential Production of Polyhydroxyalkanoates and Resistance to Antibiotics.** Rev. Microbiol., 30:214-224.

- Friedberg, I., G. Avigad, 1968. **Structures Containing Polyphosphate in *Micrococcus lysodeikticus*.** J. Bacteriol., 96(2):544-553.

- Fächtenbusch, B., A. Steinbüchel, 1999. **Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates from low-rank coal liquefaction products by *Pseudomonas oleovorans* and *Rhodococcus ruber*.** Appl. Microbiol. Biotechnol., 52(1):91–95.

- Gallego, V., M. T. García, A. Ventosa, 2005. ***Methylobacterium adhaesivum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from drinking water.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., en prensa, publicado en línea (<http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63966-0>).

- Garbeva, P., J. A. van Veen, J. D. van Elsas, 2003. **Predominant *Bacillus* spp. In Agricultural Soil Under Different Management Regimes Detected via PCR-DGGE.** Microb. Ecol., 45:302-316.

- Greenspan, P., S. D. Fowler, 1985. **Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red.** J. Lipid. Res., 26:781-789.

- Greenspan, P., E. P. Mayer, S. D. Fowler, 1985. **Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets.** The J. Cell Biol., 100:965-973.

- Guerrero, R., M. Piqueras, M. Berlanga, 2002. **Microbial mats and the search for minimal ecosystems.** Int. Microbiol., 5:177-188.

- Hall, B. G., 2004. **Phylogenetic Trees Made Easy.** 2ª edición, Sinauer Associates Inc., U.S.A., 221 p.p.

- Haywood, G. W., A. J. Anderson, D. R. Williams, E. A. Dawes, D. F. Ewing, 1991. **Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126.** Int. J. Biol. Macromol., 13(2):83-8.

- Head, I. M., J. R. Saunders, R.W. Pickup, 1998. **Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms.** Microb. Ecol., 35:1-21.

- Health Protection Agency (HPA), 2003. **Identification of *Bacillus* species**. Standards Unit, Evaluation and Standards Laboratory, Inglaterra, 11 p.p.

- Hoffmann, N., B. H. A. Rehm, 2004. **Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa***. FEMS Microbiol. Lett., 237:1-7.

- Hu, Q., P. Westerhoff, W. Vermaas, 2000. **Removal of Nitrate from Groundwater by Cyanobacteria: Quantitative Assessment of Factors Influencing Nitrate Uptake**. Appl. Environ. Microbiol., 66(1):133-139.

- Huss, H.H., 1998. **El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad**. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 348. Roma, FAO, 202 p.p.

- Hustede, E., A. Steinbuechel, H. G. Schlegel, 1993. **Relationship between the photoproduction of hydrogen and the accumulation of PHB in non-sulphur purple bacteria**. Appl. Microbiol. Biotechnol., 39:87-93.

- ISO (Internacional Standard Organization) 14855, 1999. **Determination of the ultimate aerobic biodegradability and disintegration of plastic materials under controlled composting conditions- Method by analysis of evolved carbon dioxide**. ISO.

- Ivanova, E. P., M. V. Vysotskii, V. I. Svetashev, O. I. Nedashkovskaya, N. M. Gorshkova, V. V. Mikhailov, N. Yumoto, Y. Shigeri, T. Taguchi, S. Yoshikawa, 1999. **Characterization of *Bacillus* strains of marine origin**. Internatl. Microbiol., 2:267-271.

- James, B. W., W. S. Mauchline, P. J. Dennis, C. W. Keevil, R. Wait, 1999. **Poly-3-Hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an Energy Source for Survival in Low-Nutrient Environments**. Appl. Environ. Microbiol., 65(2):822:827.

- Jayaprakash, N. S., S. S. Pai, A. Anas, R. Preetha, R. Philip, I. S. B. Singh, 2005. **A marine bacterium, *Micrococcus* MCCB 104, antagonistic to vibrios in prawn larval rearing systems.** Diseases of aquatic organisms, 68:39-45.

- John, M. E., G. Keller, 1996. **Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells.** Appl. Biolog. Scien., 93:12768-12773.

- Kadouri, D., S. Burdman, E. Jurkevitch, Y. Okon, 2002. **Identification and Isolation of Genes Involved in Poly(β -Hydroxybutyrate) Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and Characterization of a *phbC* Mutant.** Appl. Environ. Microbiol., 68(6):2943-2949.

- Kadouri, D., E. Jurkevitch, Y. Okon, 2003. **Involvement of the Reserve Material Poly- β -Hydrxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization.** Appl. Environ. Microbiol., 69(6):3244-3250.

- Kansiz, M., H. Billman-Jacobe, D. McNaughton, 2000. **Quantitative Determination of the Biodegradable Polymer Poly(β -hydroxybutyrate) in a Recombinant *Escherichia coli* Strain by Use of Mid-Infrared Spectroscopy and Multivariate Statistics.** Appl. Environ. Microbiol., 66(8):3415-3420.

- Karr, D. B., J. K. Waters, D. W. Emerich, 1983. **Analysis of Poly- β -Hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection.** Appl. Environ. Microbiol., 46(6):1339-1344.

- Katircioglu, H., B. Aslim, Z. N. Yüksekdao, N. Mercan, Y. Beyatli, 2003. **Production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative *Bacillus* mutants strains by SDS-PAGE of total cell protein.** Afr. J. Biotechnol., 2(6):147-149.

- Keller, M., K. Zengler, 2004. **Tapping into microbial diversity.** Nature Reviews, 2:141-150.

- Kessler, B., N. J. Palleroni, 2000. **Taxonomic implications of synthesis of poly- β -hydroxybutyrate and other poly- β -hydroxyalkanoates by aerobic pseudomonads.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50:711-713.

- Kessler, B., B. Witholt, 2001. **Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism.** J. Biotechnol., 86:97-104.

- Kichise, T., S. Taguchi, Y. Doi, 2002. **Enhanced Accumulation and Changed Monomer Composition in Polyhydroxyalkanoate (PHA) Copolyester by In Vitro Evolution of *Aeromonas caviae* PHA Synthase.** Appl. Environ. Microbiol., 68(5):2411-2419.

- Klinke, S., Q. Ren, B. Witholt, B. Kessler, 1999. **Production of Medium-Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoates) from Gluconate by Recombinant *Escherichia coli*.** Appl. Environ. Microbiol., 65(2):540-548.

- Korotkova, N., L. Chistoserdova, M. E Lidstrom, 2002. **Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthesis in the Facultative Methylophilic *Methylobacterium extorquens* AM1: Identification and Mutation of *gap11*, *gap20*, and *phaR*.** J. Bacteriol., 184(22):6174-6181.

- Kranz, R. G., K. K. Gabbert, M. T. Madigan, 1997. **Positive Selection Systems for Discovery of Novel Polyester Biosynthesis Genes Based on Fatty Acid Detoxification.** Appl. Environ. Microbiol., 63(8):3010-3013.

- Krieg, N. R., J. G. Holt, 1984. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins, U.S.A., Vol. I y II, 1599 p.p.

- Kühl, M., T. Fenchel, J. Kazmierczak, 2003. **Growth, structure and calcification potential of an artificial cyanobacterial mat**. In: **Krumbein, W.E., Paterson D., and Zavarzin G. (eds.), Fossil and recent biofilms, a natural history of life on Earth**. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 77-102 p.p.

- Law, J.H., R. A. Slepecky, 1961. **Assay of poly- β -hydroxybutyric acid**. J. Bacteriol., 82:33-36.

- Lee, S. Y., 1996. **Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria**. TIBTECH, 14:431-438.
- Lehninger, A. L., D. L. Nelson, M. M. Cox, 1993. **Principles of Biochemistry**. 2a edición, Worth Publishers, USA, 1013 p.p.

- Liu, M., J. E. González, L. B. Willis, G. C. Walker, 1998. **A Novel Screening Method for Isolating Exopolysaccharide-Deficient Mutants**. Appl. Environ. Microbiol., 64(11):4600-4602.

- López-Cortés, A., R. Vázquez-Duhalt, J. L. Ochoa, 1990. **Biología de las Salinas Costeras**. Conferencia presentada en el II Simposium sobre Biotecnología Marina, La Paz, B.C.S., México.

- López-Cortés, A. 2002. Informe final del proyecto Microbial Mats for Bioremediation. The SFS Center for Coastal Studies Mexico A.C. Centro para Estudios Costeros/Fundación Pakard. Clave interna CIBNOR 916.

- Luizer, W. D., 1992. **Materials derived from biomass/biodegradable materials.** Proc. Natl. Acad. Sci., 89:839-842.

- Madison, L. L., G. W. Huisman, 1999. **Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic.** Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63(1):21-53.

- Mothes, G., J. U. Ackermann, W. Babel, 2004. **Mole Fraction Control of Poly([R]-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/HV) Synthesized by *Paracoccus denitrificans*.** Engineering in Life Sciences, 4(1):247-251.

- Muyzer, G., K. Smalla, 1998. **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology.** Antonie van Leeuwenhoek, 73:127-141.

- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer, C. Wawer, 1998. **Denaturing gradient gel electroforesis (DGGE) in microbial ecology.** Molecular Microbial Ecology Manual, Holanda, 3.4.4.:1-23.

- Narayan, R., 2004. **Drivers & Rationale for Use of Biobased Materials Based on Life Cycle Assessment (LCA).** Global Plastic Environment Conference.

- NCBE: National Center for Biotechnology Education, 1995. **Practical Biotechnology a guide for schools and colleges: Plastic from Bacteria.** NCBE. 2 p.p.

- Nweke, C. O., G. C. Okpokwasili, 2003. **Drilling fluid base oil biodegradation potential of a soil *Staphylococcus* species.** Afr. J. Biotechnol., 2(9):293-295.

- Ojumu, T. V., J. Yu, B. O. Solomon, 2004. **Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer.** Afr. J. Biotechnol., 3(1):18-24.

- Page, W. J., A. Cornish, 1993. **Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly- β -Hydroxybutyrate.** Appl. Environ. Microbiol., 59(12):4236-4244.

- Pal, S., A. K. Paul, 2001. **Studies of poly(3-hydroxybutyric acid) inclusions in whole cells of *Azotobacter chroococcum* MAL-201.** Curr. Science, 81(2):210-212.

- Peoples, O. P., A. J. Sinskey, 1989. **Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) Biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16.** The Journal of Biological Chemistry, 264(26):15298-15303.

- Peralta-Gil, M., D. Segura, J. Guzmán, L. Servín-González, G. Espín, 2002. **Expresión of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic *phbBAC* Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR.** J. Bacteriol., 184(20):5672-5677.

- Pieper-Fürst, U., M. H. Madkour, F. Mayer, A. Steinbüchel, 1995. **Identification of the Region of a 14-Kilodalton Protein of *Rhodococcus ruber* That Is Responsible for the Binding of This Phasin to Polyhydroxyalkanoic Acid Granules.** J. Bacteriol., 177(9):2513-2523.

- Pierson, B., 2005. **Characterization of a Hot-Spring Bacterium Resembling *Heliothrix oregonensis*.** Honors Thesis, U. Puget Sound, 12 p.p.

- Pötter, M., H. Müller, F. Reinecke, R. Wiczorek, F. Fricke, B. Bowien, B. Friedrich, A. Steinbüchel, 2004. **The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*.** Microbiol., 150:2301-2311.

- Prieto, M. A., B. Bühler, K. Jung, B. Witholt, B. Kessler, 1999. **PhaF, a Polyhydroxyalkanoate-Granule-Associated Protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 Involved in the Regulatory Expression System for *pha* Genes.** J. Bacteriol., 181(3):858:868.

- Ramachander, T. V. N., S. K. Rawal, 2004. **PHB synthase from *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2009.** FEMS Microbiol. Lett., (en prensa).

- Ramos-Comerzana, A., M. Monteoliva-Sánchez, 2000. **Potencial Biofarmacéutico de los residuos de la industria oleícola.** Ars. Pharmaceutica., 41(1):129-136.

- Ramsay, B. A., K. Lomaliza, C. Chavarie, B. Dubé, P. Bataille, J. A. Ramsay, 1990. **Production of Poly-(β -Hydroxybutyric-Co- β -Hydroxyvaleric) Acids.** Appl. Environ. Microbiol., 56(7):2093-2098.

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

- Rehm, B. H. A., 2003. **Polyester synthases: natural catalysts for plastics.** Biochem. J., 376:15-33.

- Rosselló-Mora, R., R. Amann, 2001. **Review: The species concept for prokaryotes.** FEMS Microbiol. Rev., 25:39-67.

- Rothermich, M. M., R. Guerrero, R. W. Lenz, S. Goodwin, 2000. **Characterization, Seasonal Occurrence, and Diel Fluctuation of Poly(hydroxyalkanoate) in Photosynthetic Microbial Mats.** Appl. Environ. Microbiol. 66(10):4279-4291.

- Saruul, P., F. Sreenc, D. A. Somers, D. A. Samac, 2002. **Production of a Biodegradable Plastic Polymer, Poly- β -Hydroxybutyrate in Transgenic Alfalfa.** *Crop Science*, 42:919-927.

- Segura, D., J. Guzmán, G. Espín, 2003a. ***Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly- β -hydroxybutyrate or alginate.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 63: 159-163.

- Segura, D., T. Cruz, G. Espín, 2003b. **Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis.** *Arch. Microbiol.*, 179:437-443.

- Segura, D., G. Espín, 2004. **Inactivation of *pycA* encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65:414-418.

- Sharma, S. L., A. Pant, 2000. **Biodegradation and conversion of alkane and crude oil by a marine *Rhodococcus*.** *Biodegradation*, 11(5):289-294.

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

- Sidat, M., F. Bux, H. C. Kasan, 1999. **Polyphosphate accumulation by bacteria isolated from activated sludge.** *Water SA*, 25(2):175-178.

- Slater, S., K. L. Houmiel, M. Tran, T. A. Mitsky, N. B. Taylor, S. R. Padgett, K. J. Gruys, 1998. **Multiple β -Ketothiolases Mediate Poly(β -Hydroxyalkanoate) Copolymer Synthesis in *Ralstonia eutropha*.** *J. Bacteriol.* 180(8):1979-1987.

- Spiekermann, P., B.H.A. Rehm, R. Kalscheuer, D. Baumeister, A. Steinbüchel, 1999. **A sensitive, viable-colony staining method using Nile Red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds.** Arch. Microbiol. 171:73-80.

- Stackebrandt, E., C. Koch, O. Gvozdiak, P. Shumann, 1995. **Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend.** Int. J. Syst. Bacteriol., 45:682-692.

- Starr, M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, H. G. Schlegel, 1981. **The Prokaryotes: A Handbook of Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria.** Vol. II, Springer-Verlag, USA, pag.1302-1331.

- Steinbüchel, A., H. E. Valentin, 1995. **Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids.** FEMS Microbiol. Lett., 128:219-228.

- Sun, J., X. Peng, J.V. Impe, J. Vanderleyden, 2000. **The *ntxB* and *ntxC* Genes Are Involved in the Regulation of Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis by Ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7.** Appl. Environ. Microbiol., 66(1):113-117.

- Taguchi, S., A. Maehara, K. Takase, M. Nakahara, H. Nakamura, Y. Doi, 2001. **In vivo assay system of the polymerase as a key enzyme for PHA biosynthesis.** RIKEN Review, 42:3-6.

- Tokiwa, Y., B. P. Calabia, 2004. **Degradation of microbial polyesters.** Biotechnol. Lett., 26:1181-1189.

- Ueda, S., T. Yabutani, A. Maehara, T. Yamane, 1996. **Molecular Analysis of the Poly(3-Hydroxyalkanoate) Synthase Gene from a Methylophilic Bacterium, *Paracoccus denitrificans*.** J. Bacteriol., 178(3):774-779.

- Volke-Sepulveda, T. L., 1998. **Los plásticos en la actualidad y su efecto en el entorno.** Ciencia y Desarrollo, 139:55-61.

- Wang, F., S. Y. Lee, 1997. **Poly(3-Hydroxybutyrate) Production with High Productivity and High Polymer Content by a Fed-Batch Culture of *Alcaligenes latus* under Nitrogen Limitation.** Appl. Environ. Microbiol., 63(9):3703-3706.

- Wang, F., S. Y. Lee, 1999. **Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by Fed-Batch Culture of Filamentation-Suppressed Recombinant *Escherichia coli*.** Appl. Environ. Microbiol., 63(12):4765-4769.

- Wieser, M., E. B. M. Denner, P. Kämpfer, P. Shumann, B. Tindall, U. Steiner, D. Vybiral, W. Lubitz, A. M. Maszenan, B.K.C Patel, R. J. Seviour, C. Radax, H. J. Busse, 2002. **Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974).** Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52:629-637.

- Williams, S. F., D. P. Martin, D. M. Horowitz, O. P. Peoples, 1999. **PHA applications addressing the price performance issue: Tissue engineering.** Int. J. Biolog. Macromol., 25:111-121.

- Wong, A. L., H. Chua, P. H. F. Yu, 2000. **Microbial Production of Polyhydroxyalkanoates by Bacteria Isolated from Oil Wastes.** Appl. Biochem. Biotechnol., 84-86(1-9):843-858.

- Wong, P. A. L., H. Chua, W. Lo, H. G. Lawford, P. H. Yu, 2002. **Production of Specific Copolymers of Polyhydroxyalkanoates from Industrial Waste.** Appl. Biochem. Biotechnol., 98-100:655-662.
- Yellore, V., A. Desai, 1998. **Production of poly-3-hydroxybutyrate from lactose and whey by *Methylobacterium* sp. ZP24.** Lett. Appl. Microbiol., 26:391-394.
- Yellore, V. S., N. B. Thakur, A. Desai, 1999. **Enhancement of growth and poly 3-hydroxybutyrate production from *Methylobacterium* sp. ZP24 by formate and other organic acids.** Lett. Appl. Microbiol., 29:171-175.
- York, G. M., J. Stubbe, A. J. Sinskey, 2001. **New Insight into Role of the PhaP Phasin of *Ralstonia eutropha* in Promoting Synthesis of Polyhydroxybutyrate.** J. Bacteriol., 183(7):2394-2397.
- Yüksekdao, Z. N., B. Aslim, Y. Beyatli, N. Mercan, 2004. **Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12.** Afr. J. Biotechnol., 3(1):63-66.
- Zhang, S., S. Kolvek, S. Goodwin, R. W. Lenz, 2004. **Poly(hydroxyalkanoic acid) Biosynthesis en *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*: Characterization and Reactivity of a Type III PHA Synthase.** Biomacromolecules, 5(1):40-48.

7. ANEXO 1

Tabla AI. Registro de las bacterias aisladas del sitio La Curva. Primera aproximación a la acumulación de gránulos de PHB. En la última columna (ICR) se indica el resultado de la búsqueda de ICR: (+) positivo: altamente confiable, (P) probable o sugestivo, (-) negativo.

| No. | Muestra | Medio del aislamiento | Dilución del inóculo | Color de la colonia | Morfología celular | Diámetro celular μm | Longitud celular μm | ICR |
|-----|-----------------|-----------------------|----------------------|---------------------|--|--------------------------------|--------------------------------|--------|
| 1 | C1 _A | PY | -3 | Blanca | Cocos, algunos ovalados | 3-4 | | + |
| 2 | C1 _B | PY | -3 | Blanca-Cristal | Bacilos móviles, en pares | 1 | 3-4 | - |
| 3 | C1 _B | PY | -5 | Crema | Bacilos móviles, sencillos o en pares term. redondas | 1 | 3-4 | - |
| 4 | C2 _A | PY | -2 | Crema | Bacilos, term. redondas | 1 | 6 | - |
| 5 | C2 _A | PY | -2 | Blanca | Bacilos móviles, sencillos o en pares term. ligera. cónicas | 1 | 3 | + |
| 6 | C2 _B | PY | -4 | Crema | Filamentos Cocos (pocos) | 1 | 15 | - |
| 7 | C2 _B | PY-M | -3 | Blanca | Bacilos cocoidales, unos amorfos | 1.5 | | + |
| 8 | C2 _B | PY-M | -3 | Blanca | Bacilos, sencillos o en pares | 1 | 1.5 - 2 | - |
| 9 | C2 _B | PY-M | -4 | Blanca-Crema | Bacilos irregulares | 1 | 3 | P |
| 10 | C2 _B | PY-M | -5 | Blanca-Crema | Bacilos cocoidales | 1-2 | 2-3 | P |
| 11 | C2 _B | PY-M | -4 | Naranja | Bacilos sencillos y en pares Bacilos | <1 1 | 1 3-4 | - - |
| 12 | C2 _B | PY-M | -5 | Blanca-Crema | Bacilos móviles, term. redondas | 1 | 2 | - |
| 13 | C1 _A | PY-M | -5 | Blanca-Crema | Bacilos, term. redondas, forman cadenas Bacilos | 1 1 | 3 4-5 | - - |
| 14 | C1 _A | PY-M | -5 | Crema | Bacilos cocoidales, móviles | 1 | | - |
| 15 | C2 _A | PA | -2 | Crema | Bacilos cocoidales Bacilos cortos | 1 1 | 3 | - - |
| 16 | C2 _B | PA | -4 | Naranja | Bacilos sencillos o en pares | 1 | 1.5 | - |
| 17 | C2 _B | PA | -4 | Blanca | Bacilos cocoidales | 1 | | - |
| 18 | C1 _A | PA | -2 | Blanca-Crema | Bacilos, term. redondas | 1 | 2 | + |
| 19 | C1 _A | PA | -4 | Café | Bacilos cocoidales Filamentos | 1 | 2 30 | + - |
| 20 | C1 _B | PA | -5 | Rosa | Bacilos, forman agregados | 1 | 2.5 | P |
| 21 | C1 _B | PA | -2 | Crema | Bacilos | 2 | 4 | - |

| | | | | | | | | |
|----|-----------------|------|----|---------------|---|-----|-----|---|
| | | | | | Bacilos | 1 | 5 | - |
| | | | | | Bacilos móviles | 1 | 2 | - |
| 22 | C2 _B | PA | -2 | Amarillo | Bacilos irregulares | 1 | 2 | - |
| 23 | C2 _A | PA | -3 | Crema | Bacilos cortos, móviles | 1 | 2 | - |
| | | | | | Bacilos irregulares | 2 | 4 | - |
| 24 | C2 _A | 2216 | -5 | Amarillo | Bacilos, term. redondas | 1 | 3-4 | - |
| | | | | | Bacilos en pares | 1 | 2 | - |
| 25 | C2 _A | 2216 | -5 | Blanca-Crema | Cocos | 1.5 | | - |
| 26 | C1 _B | 2216 | -4 | Roja | Bacilos móviles, sencillos o dobles term. redondas | 1 | 2 | - |
| 27 | C1 _B | 2216 | -4 | Blanca-Crema | Bacilos cocoidales | 1 | | - |
| | | | | | Filamentos | <1 | 5 | - |
| 28 | C1 _B | 2216 | -5 | Naranja | Bacilos en pares | 1 | 2 | - |
| 29 | C2 _A | 2216 | -4 | Café | Bacilos irregulares | 1 | 2-3 | - |
| 30 | C2 _A | 2216 | -2 | Blanca | Bacilos cortos, móviles, term. redondas | 1 | 2 | - |
| 31 | C2 _A | 2216 | -2 | Blanca | Bacilos móviles | 1 | 3-4 | - |
| | | | | | Bacilos móviles | 1 | 2 | - |
| 32 | C1 _B | 2216 | -2 | Rosa | Bacilos, algunos en pares | <1 | 1 | - |
| 33 | C1 _B | 2216 | -2 | Amarillo | Bacilos, term. redondas, unos en pares | 1 | 1.5 | - |
| | | | | | Bacilos, term. cónicas | <1 | 4 | - |
| 34 | C2 _B | 2216 | -5 | Crema | Cocos | <1 | | - |
| | | | | | Cocos | 4 | | - |
| 35 | C2 _B | 2216 | -4 | Blanca | Bacilos móviles, term. ligera. cónicas | 1 | 2.5 | - |
| 36 | C2 _B | 2216 | -2 | Naranja-Crema | Bacilos cocoidales, móviles, en pares o sencillos | 1 | | - |
| | | | | | Bacilos móviles | 1 | 2-3 | - |
| | | | | | Filamentos | 1 | 10 | - |
| 37 | C1 _A | 2216 | -5 | Blanca-Crema | Bacilos, term. redondas | 1 | 2 | - |
| 38 | C2 _A | LM | -4 | Naranja | Bacilo con espora | 3 | 5 | - |
| | | | | | Bacilo | 1 | 3 | - |
| | | | | | Bacilo cocoidal | 1 | | - |
| 39 | C2 _A | LM | -4 | Blanca | Bacilos móviles, term. ligera. cónicas | 2 | 4 | - |
| 40 | C2 _A | LM | -3 | Blanca-Crema | Bacilos con term. redondas | 1 | 2 | - |
| | | | | | Bacilos cocoidales móviles | 1 | | - |
| 41 | C1 _A | LM | -5 | Crema | Cocos | 3 | | P |
| | | | | | Bacilos irregulares | 2 | | - |
| | | | | | Bacilos | 1 | 3 | - |

| | | | | | | | | |
|----|-----------------|----|----|--------------|---|-------|-------|---|
| | | | | | Bastones | 1.5 | | - |
| 42 | C2 _B | LM | -5 | Blanca | Bacilos móviles, sencillos, pares o cadenas term. cónicas | 1 | 2-3 | - |
| 43 | C1 _B | LM | -4 | Crema | Bacilos cocoidales, term. redondas | 1.5 | | - |
| 44 | C1 _A | LM | -3 | Café | Bacilos móviles, term. redondas | 1 | 2 | - |
| 45 | C2 _B | LM | -4 | Crema | Bacilos móviles, sencillos o en pares | 1 | 3-4 | - |
| 46 | C1 _B | AZ | -3 | Transparente | Bacilos sencillos o en pares | 1 | 4-5 | - |
| | | | | | Cocos | 5 | | - |
| | | | | | Bacilos | 1 | 1.5 | + |
| 47 | C1 _B | AZ | -2 | Blanca | Cocos sencillos, pares o cadenas | 1-1.5 | | P |
| 48 | C1 _B | AZ | -2 | Blanca | Cocos sencillos y cadenas | 1.5 | | + |
| 49 | C1 _B | AZ | -2 | Transparente | Bacilos con term. redondas, forma cadenas | 1 | 5 | - |
| 50 | C1 _B | AZ | -2 | Transparente | Cocos | 4 | | - |
| | | | | | Bacilos | 2 | 10 | - |
| | | | | | Bacilos | 1.5 | 5 | - |
| | | | | | Bacilos | 1 | 3 | + |
| 51 | C1 _B | AZ | -2 | Transparente | Bacilos con term. cónicas | 1-1.5 | 2-2.5 | P |
| 52 | C2 _A | AZ | -2 | Blanca | Cocos | 2 | | + |
| | | | | | Cocos | 4 | | - |
| | | | | | Bacilos, forman cadenas | 1 | 7 | |
| 53 | C1 _A | AZ | -4 | Blanca | Bacilos | 2-3 | 7-10 | P |
| | | | | | Cocos | 1 | | + |
| | | | | | Bacilos en pares | 2 | 4 | - |
| 54 | C2 _B | AZ | -3 | Rosa | Bacilos sencillos o en pares, term. redondas | 1 | 5 | P |

Tabla AII. Registro de las bacterias aisladas del sitio La Enlatadora. Primera aproximación de la acumulación de gránulos de PHB. En la última columna (ICR) se indica el resultado de la búsqueda de ICR: (+) positivo: altamente confiable, (P) probable o sugestivo, (-) negativo.

| No. | Muestra | Medio del aislamiento | Dilución del inóculo | Color de la colonia | Morfología celular | Diámetro celular μm | Longitud celular μm | ICR |
|-----|-----------------|-----------------------|----------------------|---------------------|---|--------------------------------|--------------------------------|-----|
| 1 | E1 _B | PY-M | -7 | Blanca-Crema | Bacilos cortos móviles, forma irregular (tipo vibrio), de esféricas a bacilos | 1 -1.3 | | - |
| 2 | E1 _B | PY-M | -7 | Blanca | Bacilos móviles | 1 | 3 | - |

| | | | | | | | | |
|----|-----------------|------|----|--------------|--|---------|---------|---|
| 3 | E1 _B | PY-M | -4 | Blanca | Bacilos cortos | | | + |
| 4 | E1 _B | PY-M | -4 | Blanca-Crema | Bacilos cortos, cocoidales Individuales o en pareja | 1.5 | 2 | + |
| 5 | E1 _B | PY-M | -6 | Blanca-Crema | Bacilos cortos cocoidales en parejas algunos en cadenas | 1 | | - |
| 6 | E1 _B | PY-M | -5 | Blanca | Bacilos cocoidales, formas diversas | 1 -1.5 | | + |
| 7 | E1 _A | PY-M | -7 | Blanca-Crema | Mezcla de al menos tres bacilos | | | - |
| 8 | E1 _B | PY-M | -4 | Blanca | Bacilos cortos | 1.5 | 3 | - |
| | | | | | Bacilos cocoidales con espora | 2 | | - |
| | | | | | Bacilos grandes | 2 | 5 | - |
| 9 | E1 _B | PY-M | -8 | Blanca-Crema | Bacilos móviles, en parejas y cadenas | 2 | | - |
| 10 | E1 _B | PY | -4 | Blanca-Crema | Bacilos móviles en pares | 1 | 1.5 | - |
| 11 | E1 _B | PY | -4 | Naranja | Mezcla: Bacilos móviles | 1.5 | 3 | - |
| | | | | | Bacilos | 1 | 2 | - |
| | | | | | Bacilos | 1 | 5 | - |
| 12 | E1 _B | PY | -5 | Blanca | Bacilos móviles en pares | 1 | 1.5 | - |
| 13 | E1 _A | PY-M | -4 | Blanca | De cocoidales a bacilos, irregulares | 1.5 | 2 | + |
| 14 | E1 _A | PY-M | -6 | Crema | Bacilos cocoidales, móviles, en pares unos | <1 | | - |
| 15 | E1 _A | PY | -5 | Blanca | Bacilos móviles, en pares | 1 | 2 | - |
| 16 | E2 _B | PY | -5 | Crema | Bacilos en pares | 1 | 2 | - |
| 17 | E2 _B | PY | -4 | Amarillo | Bacilos cortos | 1 | 2 | - |
| | | | | | Bacilos largos, algunos en pares y cadenas | 1 | 6 | - |
| 18 | E2 _A | PY-M | -4 | Blanca | Bacilos cocoidales | 2 | 3 | + |
| | | | | | Bacilos largos | | 15-20 | - |
| 19 | E2 _A | PY | -4 | Blanca-Crema | Bacilos cortos, móviles, en pares o solos | <1 | 1 | - |
| 20 | E2 _B | LM | -6 | Blanca-Crema | Bacilos cortos móviles | 1 - 1.5 | 2 | - |
| | | | | | Bacilos | 1 | 4 | - |
| 22 | E2 _B | PA | -7 | Blanca-Crema | Bacilos en parejas | 1 | 2 | + |
| 23 | E2 _B | PA | -6 | Blanca-Crema | Bacilos | 1 | 3 | - |
| 24 | E2 _B | PA | -5 | Blanca-Crema | Bacilos cortos | 1 | 2.5 | - |
| 25 | E2 _B | PA | -5 | Blanca-Crema | Bacilos chicos | <1 | 1.5 - 2 | - |
| | | | | | Bacilos | 1 | 4 | - |
| 26 | E2 _B | PA | -5 | Blanca-Crema | Bacilos móviles | 1 | 3 | - |
| 27 | E2 _A | LM | -6 | Naranja | Bacilos | 1 | 6 | - |
| | | | | | Bacilos móviles | 1 | 2 | - |
| | | | | | Bacilos móviles | 1 | 4 | - |
| 28 | E1 _B | PA | -5 | Blanca-Crema | Bacilos cortos móviles, irregulares | 1 | 3 | - |

| | | | | | | | |
|----|-----------------|------|----|--------------|--|---------|-------|
| 29 | E1 _B | PA | -5 | Blanca-Crema | Cocos | 1 - 1.5 | - |
| | | | | | Bacilos cortos | 1 | 2 - |
| 30 | E1 _B | PY-M | -4 | Crema | Bacilos grandes | | - |
| | E1 _B | | | Blanca- | | | |
| 31 | | AZ | -5 | Cristalina | Bacilos, terminales cónicas en parejas o sencillas | 1 | 3 - |
| 32 | E1 _B | AZ | -3 | Blanca | Bacilos móviles, terminales redondas | 1 | 2 P |
| 33 | E1 _B | AZ | -3 | Transparente | Bacilos largos | 1 | 5 - |
| | | | | | Bacilos cortos móviles, terminales redondas | 1 | 2 + |
| 34 | E1 _B | AZ | -3 | Transparente | Bacilos móviles, sencillos, pares y cadenas Bacilos cocoidales en parejas | 1 | 3 - |
| 35 | E1 _B | 2216 | -6 | Blanca | Bacilos con terminales redondas | 1.5 | 3 - |
| 36 | E1 _B | 2216 | -6 | Amarillo | Cocos | 1.5 | + |
| 37 | E1 _B | 2216 | -6 | Blanca | Bacilos cortos móviles, term. Redondas sencillo o en pares | 1 | 2 - |
| 38 | E1 _B | 2216 | -8 | Naranja | Bacilos con term. ligeramente cónicas sencillo o en pares | 1.5 | 3 + |
| 39 | E1 _B | 2216 | -7 | Blanca | Bacilos cortos y delgados, móviles | <1 | 2.5 - |
| 40 | E1 _A | LM | -7 | Blanca-Crema | Bacilos cortos móviles, pares o sencillos | 1 | 1.5 - |
| 41 | E1 _A | LM | -7 | Amarillo | Filamentos largos Bacilos cortos | <1 | 10 - |
| | | | | | | 1 | 3 - |
| 42 | E1 _A | PA | -5 | Blanca-Crema | Bacilos cortos móviles Filamentos Bacilos medianos, en pares o sencillos | 1 | 1.5 - |
| | | | | | | <1 | 6 - |
| | | | | | | 1 | 3.5 - |
| 43 | E1 _A | PA | -5 | Blanca-Crema | Bacilos cortos irregulares | 1.5 | P |
| 44 | E1 _A | PA | -5 | Blanca | Cocos Bacilos móviles Bacilos | 1.5 | - |
| | | | | | | 1 | 2 - |
| | | | | | | 1 | 5 - |
| 45 | E1 _A | AZ | -5 | Blanca | Bacilos, irregulares, en pares o Sencillos | 1 | 2 + |
| 46 | E1 _A | AZ | -4 | Transparente | Bacilos con terminales redondas parecen móviles | 1 | 3 - 4 |
| 47 | E1 _A | AZ | -3 | Transparente | Bacilos móviles, en pares | 1 | 1.5 - |
| 48 | E1 _A | 2216 | -9 | Blanca-Crema | Bacilos móviles, term. Redondas como con huecos | | |
| 49 | E1 _A | 2216 | -8 | Blanca-Crema | Bacilos cortos y delgados, móviles term. ligera. Punteada | <1 | 2.5 - |

| | | | | | | | | |
|----|-----------------|------|-----|----------------|---|---------|--------|--------|
| 50 | E1 _A | 2216 | -6 | Naranja | Bacilos cortos | 1 | 2 | - |
| 51 | E1 _A | 2216 | -6 | Amarillo | Cocos, en pares o tétradas | 1 | | + |
| 52 | E1 _A | 2216 | -6 | Blanca | Bacilos móviles, con term. Redondas | 1 | 2 | - |
| 53 | E2 _A | LM | -6 | Amarillo | Bacilos cortos en pares o sencillos | 1 | 2 | - |
| | | | | | Bacilos largos | 1 | 6 | - |
| 54 | E2 _A | PA | -5 | Blanca-Crema | Bacilos cocoidales móviles | 1 | 2 | P |
| 55 | E2 _A | PY-M | -6 | Blanca | Bacilos con term. Redondas | 2 | 4 | P |
| 56 | E2 _A | AZ | -4 | Blanca-Cristal | Bacilos irregulares en pares o sencillos | 1 | 2.5 | + |
| 57 | E2 _A | 2216 | -8 | Naranja | Bacilos cortos | 1 | 2 | - |
| | | | | | Bacilos largos | <1 | 6 | - |
| 58 | E2 _A | 2216 | -8 | Roja | Bacilos móviles, en pares o sencillos | 0.75 | 1.5 | - |
| 59 | E2 _A | 2216 | -10 | Blanca | Bacilos cocoidales | 1 | | - |
| 60 | E2 _A | 2216 | -6 | Naranja | Filamentos largos | <1 | 15 | - |
| 61 | E2 _A | 2216 | -8 | Blanca | Cocos, algunos amorfos | 1.5 | | + |
| 62 | E2 _B | PY | 4 | Blanca | Bacilos simples, dobles o cadenas | 1 | 1-2 | P |
| 63 | E2 _B | PY | -4 | Blanca | Bacilos sencillos, pares o cadenas term. ligera. cónicas | 1.5 | 4 | + |
| 64 | E2 _B | PY-M | -6 | Blanca | Bacilos con term. ligera. redondas | 1 | 3 | + |
| 65 | E2 _B | PY-M | -6 | Blanca | Bacilos móviles Cocos | 1 4 | 3 | - - |
| 66 | E2 _B | 2216 | -10 | Amarillo | Bacilos, term. ligera. cónicas Sencillos o en pares | 1 | 1.5 | - |
| 67 | E2 _B | 2216 | -9 | Blanca | Bacilos, móviles, term. redondas | 1 | 3 | - |
| 68 | E2 _B | 2216 | -8 | Blanca | Bacilos, term. redondas | 1 | 3-4 | - |
| 69 | E2 _B | 2216 | -8 | Blanca | Bacilos, móviles, term. redondas | 1 | 3-4 | - |
| 70 | E2 _B | AZ | -3 | Blanca-Cristal | Bacilos Bacilos term. redondas | <1 1 | 1 3 | - + |
| 71 | E2 _B | AZ | -5 | Blanca | Bacilos irregulares, forman cadenas | 1 | 3 | + |
| 72 | E2 _B | AZ | -4 | Transparente | Bacilos móviles, irregulares | 1 | 4 | + |

8. ANEXO 2.

Secuencias del fragmento 341-926 del gen 16S rARN de las cepas aisladas:

LA CURVA

C18: 5'- GCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGT
ATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTACAGTTACAGACCAGAAAGTC
GCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCA
CTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGG
CTTTCACATCAGACTTAAGAAACCACCTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGATAA
CGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTA
GGTACCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTTCCTTCCCTAACAAACAGAGTTTT
ACGACCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCG
GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCG - 3' (No. acceso en GenBank: DQ316053)

C19: 5' AAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAAT
CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAAAGCCGCTTTCG
CCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCGCTTTTCT
CTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTTAC
ATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTTGC
CACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCG
TCAAGGTACGAGCAGTTACTCTCGTACTTGTTCCTTCCCTAACAAACAGAGTTTTACGACCCG
AAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCC
CTACTGCTGCCTCCCGTA - 3' (No. acceso en GenBank: DQ316054)

C20L: 5'- TCCCGTGGAAGGAAACCCACACCTAGCGCCCACCGTTTACGGCGTGACTACCA
GGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACTGCCCAGA
GACCCGCTTCGCCACCGGTGTTTCTCTGATATCTGCGCATTTACCGCTACACCAGGAA
TTCCAGTCTCCCCTGCAGTACTCAAGTCTGCCCCTGATCGCCTGCAAGCCCGCAGTTGAGCT
GCGGGTTTTACAGACGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTACGCCCAGTAATTCCG
GACAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTGGCCGGTGCTTCT
TCTGTACCTACCGTCACTTGCCTTCGTCGGTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCC
GTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTTCCCACTG
CTGCCTCCCGTA - 3' (No. acceso en GenBank: DQ316055)

C20R: 5'- GCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTCGCACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGT
CGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTCC
ACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGG
GCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCAATAATTCCGGATA
ACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGATT
AGGTACCGTCAAGACGTGCACAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAACAAACAGAGTTTT
ACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCG
GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA - 3' (No. acceso en GenBank: DQ316056)

C54: 5'- TGCAAGCAGACCAACGGCTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT
CTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGAACC GGACCAGACAGCCG
CCTTCGCCACTGGTGTCTTTCGGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGCAGTTCCGC
TGTCTCTTCCGGTCTCAAGCCAACAGTATCGAAGGCAATTCTGTGGTTGAGCCACAGG
CTTTCACCCCGACTTAATCGGCCGCCTACGCGCCCTTACGCCAGTGATTCCGAGCAAC
GCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGGGCTTATTCTTCCG
GTACCGTCATTATCGTCCCGGACAAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCAC
GCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA
- 3' (No. acceso en GenBank: DQ316057)

LA ENLATADORA

E4: 5'- GCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTT
ACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTCGCACATCAGCGT
CAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTCTCCATATCTCTGCGCATTTCA
CCGCTACACATGGAATTCACCTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGACC
CTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCTACGCGCGCTTTA
CGCCCAATAATTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG
TTAGCCGTGGCTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCACAGTTACTTACACGTTTGTTT
TTCCCTAATAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGT
CAGGCTTTCGCCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTA - 3'
(No. acceso en GenBank: DQ316058)

E13: 5'- GGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCT
TCGCCACTGGTGTCTCCATATCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCACCTT
CCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCCAGTTTCCAATGACCCTCCACGGTTGAGCCGTGGGCTTT
CACATCAGACTTAAGAAACCACTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCT
TGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGGTTAGGTA
CCGTCAAGGTGCCAGCTTATTCAACTAGCACTTGTCTTCCCTAACACAGAGTTTTACGA
CCCGAAAGCCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTGAGACTTTCGTCCATTGCGGAAG
ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA - 3' (No. acceso en GenBank: DQ316059)

E33: 5'- GCAACCCGACGACTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATC
CTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTATCGAGCCAGTGAGCCGCCTTCGC
CACTGGTGTTCACACGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGTATTCCACTCACCT
CTCTCGAACTCCAGACTGATAGTTTTGGAGGCAGTCCGAGGTTGAGCCCCGGGATTCA
CCCCAACTTTCCAGTCCGCTACGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGC
CCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGCTGGTACCG
TCATTATCTTCCAGCTGAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCAT
GGTAGATCAGGGTTGCCCCATTGTCTAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA - 3'
(No. acceso en GenBank: DQ316060)

E36: 5'- AATGGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATC
CTGTTTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCAGAGACCTGCCTTCGC
CATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCC
TACTGCACTCTAGTCTGCCGTACCCACCGCAGATCCGGGGTTAAGCCCCGACTTTCAC
GACAGACGCGACAAACCGCTACGAGCTTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTCGC
ACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCAGGTACCG
TCACTTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCAT
GGCGTGCCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA -
3' (No. acceso en GenBank: DQ316064)

- E45:** 5'- TTGCATGCAACCCGACGACTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATC
TAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTATCGAGCCAGTGAGCCGCC
TTCCGCACTGGTGTCCACCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGTATTCCACTC
ACCTCTCTCGAACTCCAGACTGATAGTTTTGGAGGCAGTTCCGAGGTTGAGCCCCGGGAT
TTCACCCCAACTTTCCAGTCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGAACAACGC
TAGCCCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGCTGGT
ACCGTCATTATCTTCCAGCTGAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCG
GCATGGCTAGATCAGGGTTGCCCCATTGTCTAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA - 3'
(No. acceso en GenBank: DQ316061)
- E46:** 5'- GTGTGTCACCGAATTGCATGCAACCCGACGACTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTATCG
AGCCAGTGAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCCACCGAATATCTACGAATTTACCTCTACA
CTCGGTATTCCACTCACCTCTCTCGAACTCCAGACTGATAGTTTTGGAGGCAGTTCCGAGG
TTGAGCCCCGGGATTTACCCCAACTTTCCAGTCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTA
ATTCCGAACAACGCTAGCCCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGG
GCTTCTTCTGCTGGTACCGTCATTATCTTCCAGCTGAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCC
TTCATCACTCACGCGCATGGCTAGATCAGGGTTGCCCCATTGTCTAAGATTCCCCACTG
CTGCCTCCCGTA - 3' (No. acceso en GenBank: DQ316062)
- E51:** 5'- GTGGAATGGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTA
TCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGACCTG
CCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAG
TCTCCCTACTGCACTCTAGTCTGCCCCGTAACCACCGCAGATCCGGGGTTAAGCCCCGGA
CTTTCACGACAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTACGCCCAATAATTCCGGATAA
CGCTCGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCA
GGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTATCC
CTCACGCGGCGTGCCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTC
CCGTA - 3' (No. acceso en GenBank: DQ316065)
- E63:** 5'- GGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTGATCCCCACGCTTTCGCACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGT
CGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTCACCGCTACACATGGAATTCC
ACTTTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCAATGACCTCCACGGTTGAGCCGTGG
GCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCAATAATTCCGGATA
ACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGATT
AGGTACCGTCAAGACGTGCACAGTTACTTACACATTTGTTCTTCCCTAATAACAGAGTTTT
ACGATCCGAAGACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCATTGCG
GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTA - 3' (No. acceso en GenBank: DQ316066)
- E71:** 5'- CTGCCCGACGACTGGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC
TGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTATCGAGCCAGTGAGCCGCCTTCGCC
ACTGGTGTTCACCGAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGTATTCCACTCACCTCT
CTCGAACTCCAGACTGATAGTTTTGGAGGCAGTTCCGAGGTTGAGCCCCGGGATTTACC
CCCAACTTTCCAGTCCGCCTACGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGAACAACGCTAGCCC
CCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGGGCTTCTTCTGCTGGTACCGTC
ATTATCTTCCAGCTGAAAGAGCTTTACAACCCTAAGGCCTTCATCACTCACGCGGCATG
GCTAGATCAGGGTTTCCCCATTGTCTAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA - 3'
(No. acceso en GenBank: DQ316063)