

Aislamiento y evaluación de bacterias productoras de poli-hidroxicanoatos de suelos con acumulación de residuos de *Cocos nucifera*

ROMERO-RAMÍREZ, Yanet*†, RODRÍGUEZ-BARRERA, Miguel Ángel, TORIBIO-JIMÉNEZ, Jeiry

*Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología y Genética Microbiana. Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, UAGro. Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. México. Tel. 4719310 ext.4525.

Recibido Mayo 3, 2013; Aceptado Noviembre 6, 2013

Resumen

Los poli-hidroxicanoatos son una familia de polímeros lineales formados por monómeros de ácidos grasos 3 hidroxilo unidos entre sí por enlaces ésteres. Son producidos por una gran variedad de especies bacterianas cuando su medio de cultivo se encuentran bajo condiciones desbalanceadas, con altas concentraciones de fuente de carbono y limitantes en algunos otros elementos esenciales como N, S, P, Mg (Verlinden *et al.*, 2007). Se almacenan en forma de gránulos en el interior de la célula y sirven como fuente de carbono, de energía para el enquistamiento en *Azotobacter* sp. y de esporulación en especies del género *Bacillus*. Esta gran diversidad de polímeros ha sido clasificada de acuerdo a su estructura química y al tamaño o número de monómeros que presentan los PHAs. Estos se han clasificado en tres tipos: los de cadena corta (SCL) que se compone de 3 a 5 átomos de carbono además son termoplásticos con un alto grado de cristalización; estos forman cristales duros lo que los hace menos flexibles mientras que los de cadena media (MCL) se componen de 6 a 16 átomos de carbono son hidrofóbicos, elásticos, poseen un bajo grado de cristalización y al igual que todos los PHAs son biodegradables y biocompatibles (Kim *et al.*, 2007) y los PHAs de cadena larga (LCL) consisten en monómeros cuya longitud de cadena está comprendida a más de 16 carbonos, poseen un amplio rango de propiedades físicas dependiendo del porcentaje de la composición en moles de los diferentes monómeros incorporados al polímero. La variabilidad de las propiedades físicas dependerá del sustrato que se suministre, la especificidad en la polimerización y las rutas metabólicas que darán como resultado la formación de monómeros. Los PHAs son insolubles en agua, termoplásticos, elastómeros, no tóxicos, biodegradables y además biocompatibles, se han vuelto aptos para aplicaciones en la industria del embalaje y como posible sustituto del plástico. El PHA tiene alta cristalinidad, hidrofobicidad es un plástico 100% biodegradable (Khanna and Sivrastava, 2004) dejando como resultado agua, dióxido de carbono y oxígeno. Por lo tanto estas propiedades les brindan un potencial para ser utilizados en diferentes áreas como la medicina, reemplazando parte de tejidos, o como materia prima de implementos médicos, en la farmacéutica como microencapsulados logrando una liberación controlada de los medicamentos, en la agricultura utilizados como productos para liberar reguladores de crecimiento en plantas o para pesticidas, además otras áreas comienzan a estudiarlos para posibles aplicaciones dentro de su área. Los microorganismos reportados que son capaces de acumular poli-hidroxicanoatos son *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia eutropha*, entre otras. Se han utilizado medios de cultivo a partir de miel fina de caña, se ha logrado reducir los costos de producción hasta seis veces, logrando así la sustitución de fuentes de carbono para obtener acumulación de PHAs, además las estrategias muestran que para disminuir los costos de producción el candidato potencial podrían ser los residuos agroindustriales.

Bacterias, Poli-hidroxicanoatos, Cocos Nucifera.

Abstract

Poly-hydroxyalkanoates are a family of linear polymers formed by monomers of 3 hydroxyl fatty acids linked by ester bonds. Are produced by a variety of bacterial species when its culture medium are under unbalanced conditions, with high concentrations of carbon source and limiting in some other essential elements such as N, S, P, Mg (Verlinden *et al.*, 2007). Is stored in granules within the cell and serve as carbon source, energy to encystment in *Azotobacter* sp. and sporulation in *Bacillus* spp. This large variety of polymers has been classified according to their chemical structure and the size or number of monomers containing PHAs. These were classified into three types: short chain (SCL) which is composed of 3 to 5 carbon atoms are also thermoplastic with a high degree of crystallization; these form hard crystals making them less flexible while the medium chain (MCL) are composed of 6 to 16 carbon atoms are hydrophobic, resilient, have a low degree of crystallization and like all PHAs are biodegradable and biocompatible (Kim *et al.*, 2007) and long chain PHAs (LCL) consist of chain length monomers falls more than 16 carbons, have a range of physical properties depending on the percentage of the molar composition of the various monomers incorporated into the polymer. The variability of the physical properties depend on the substrate is provided, in the polymerization specificity and metabolic pathways that will result in the formation of monomers. PHAs are water insoluble, thermoplastic elastomers, non-toxic, biodegradable and biocompatible addition, have become suitable for applications in the packaging industry and as a possible replacement of the plastic. The PHA has high crystallinity, hydrophobicity is a 100% biodegradable plastic (Khanna and Sivrastava, 2004) resulted leaving water, carbon dioxide and oxygen. Therefore these properties give them the potential to be used in different areas such as medicine, replacing part of tissues or as raw material for medical devices, pharmaceutical and microencapsulated achieving controlled release of drugs, used in agriculture as products to release plant growth regulators or pesticides, besides other areas begin to study for possible applications in your area. The reported microorganisms that are able to accumulate poly-hydroxyalkanoates are *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia eutropha*, among others. We used culture media from thin molasses, it has reduced production costs up to six times, achieving the substitution of carbon sources for accumulation of PHAs also show that strategies to reduce costs production potential candidate could be the agro-industrial waste

Bacteria, Poly-hydroxyalkanoates, Cocos Nucifera.

Citación: ROMERO-RAMÍREZ, Yanet, RODRÍGUEZ-BARRERA, Miguel Ángel, TORIBIO-JIMÉNEZ, Jeiry. Aislamiento y evaluación de bacterias productoras de poli-hidroxicanoatos de suelos con acumulación de residuos de *Cocos nucifera*. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 – Abril 2014, 1-1: 309-312

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: yanetromero7@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Los poli-hidroxicanoatos son una familia de polímeros lineales formados por monómeros de ácidos grasos 3 hidroxilo unidos entre sí por enlaces ésteres. Son producidos por una gran variedad de especies bacterianas cuando su medio de cultivo se encuentran bajo condiciones desbalanceadas, con altas concentraciones de fuente de carbono y limitantes en algunos otros elementos esenciales como N, S, P, Mg (Verlinden *et al.*, 2007). Se almacenan en forma de gránulos en el interior de la célula y sirven como fuente de carbono, de energía para el enquistamiento en *Azotobacter* sp. y de esporulación en especies del género *Bacillus*. Esta gran diversidad de polímeros ha sido clasificada de acuerdo a su estructura química y al tamaño o número de monómeros que presentan los PHAs. Estos se han clasificado en tres tipos: los de cadena corta (SCL) que se compone de 3 a 5 átomos de carbono además son termoplásticos con un alto grado de cristalización; estos forman cristales duros lo que los hace menos flexibles mientras que los de cadena media (MCL) se componen de 6 a 16 átomos de carbono son hidrofóbicos, elásticos, poseen un bajo grado de cristalización y al igual que todos los PHAs son biodegradables y biocompatibles (Kim *et al.*, 2007) y los PHAs de cadena larga (LCL) consisten en monómeros cuya longitud de cadena está comprendida a más de 16 carbonos, poseen un amplio rango de propiedades físicas dependiendo del porcentaje de la composición en moles de los diferentes monómeros incorporados al polímero.

La variabilidad de las propiedades físicas dependerá del sustrato que se suministre, la especificidad en la polimerización y las rutas metabólicas que darán como resultado la formación de monómeros.

Los PHAs son insolubles en agua, termoplásticos, elastómeros, no tóxicos, biodegradables y además biocompatibles, se han vuelto aptos para aplicaciones en la industria del embalaje y como posible sustituto del plástico. El PHA tiene alta cristalinidad, hidrofobicidad es un plástico 100% biodegradable (Khanna y Sivrastava, 2004) dejando como resultado agua, dióxido de carbono y oxígeno. Por lo tanto estas propiedades les brindan un potencial para ser utilizados en diferentes áreas como la medicina, reemplazando parte de tejidos, o como materia prima de implementos médicos, en la farmacéutica como microencapsulados logrando una liberación controlada de los medicamentos, en la agricultura utilizados como productos para liberar reguladores de crecimiento en plantas o para pesticidas, además otras áreas comienzan a estudiarlos para posibles aplicaciones dentro de su área. Los microorganismos reportados que son capaces de acumular poli-hidroxicanoatos son *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Ralstonia eutropha*, entre otras. Se han utilizado medios de cultivo a partir de miel fina de caña, se ha logrado reducir los costos de producción hasta seis veces, logrando así la sustitución de fuentes de carbono para obtener acumulación de PHAs, además las estrategias muestran que para disminuir los costos de producción el candidato potencial podrían ser los residuos agroindustriales.

Objetivos

- Aislar bacterias con capacidad de producir PHAs utilizando residuos de *Cocos nucifera*.
- Determinación de la producción de PHAs en cada una de las cepas obtenidas.
- Crear un banco de cepas productoras de PHAs para estudios de investigación posteriores.

Metodología

Se utilizaron cuatro muestras de suelo en presencia de residuos de *Cocos nucifera* en degradación y tres del fruto en las mismas condiciones a las que se trató para reducir el número de población bacteriana, posteriormente se inoculó cada una de las muestras en placas de Petri con medio LB. Se aislaron un total de 89 cepas en medio PY a las cuales se les aplicó el método cualitativo de opacidad que consiste en observar cual cepa presenta opacidad con respecto a la producción de poli-hidroxicanoatos, en total solo 10 cepas fueron seleccionadas por este método. Las cepas obtenidas fueron sometidas a microscopía por tinción con Azul Nilo (Bello y Brandl, 2007), las cepas que presentaron fluorescencia correspondía a las posibles sintetizadoras del polímero, siete presentaron esta característica mientras que tres no lo hicieron. Sin embargo para confirmar la producción del polímero se realizó la cuantificación por el método espectrofotométrico de Law y Slepecky (1996).

Resultados

Se identificaron diez cepas candidatas, de las cuales siete cepas fueron productoras de PHA, observando una producción de PHA va de un rango de 0.3 $\mu\text{g/ml}$ (C115) hasta 10.6 $\mu\text{g/ml}$ (S213) (Tabla 1). Se puede observar que las cepas S110 y S213 presentan una producción considerable del biopolímero. Sin embargo la cepa S110 produjo hasta un 40% menos PHA que la cepa S213, la cual fue seleccionada para futuros experimentos. Se diseñó una cinética de producción con respecto al crecimiento celular en donde se obtuvo que la producción y acumulación de PHA se inicia entre las 8 y 12 horas, logrando aumentar la concentración del polímero hasta 3 y 5 veces más a las 24 y 48 horas (Fig. 1).

Muestra	Producción en μg
C115	0.385 $\mu\text{g PHAs/ml}$
C26	1.653 $\mu\text{g PHAs/ml}$
S15	1.8743 $\mu\text{g PHAs/ml}$
S110	6.394 $\mu\text{g PHAs/ml}$
S213	10.6483 $\mu\text{g PHAs/ml}$
S218	3.969 $\mu\text{g PHAs/ml}$
S11	1.267 $\mu\text{g PHAs/ml}$
S46	ND $\mu\text{g PHAs/ml}$
S17	ND $\mu\text{g PHAs/ml}$
S26	ND $\mu\text{g PHAs/ml}$

Tabla 1 Cuantificación de PHA en las cepas aisladas. ND: No detectado

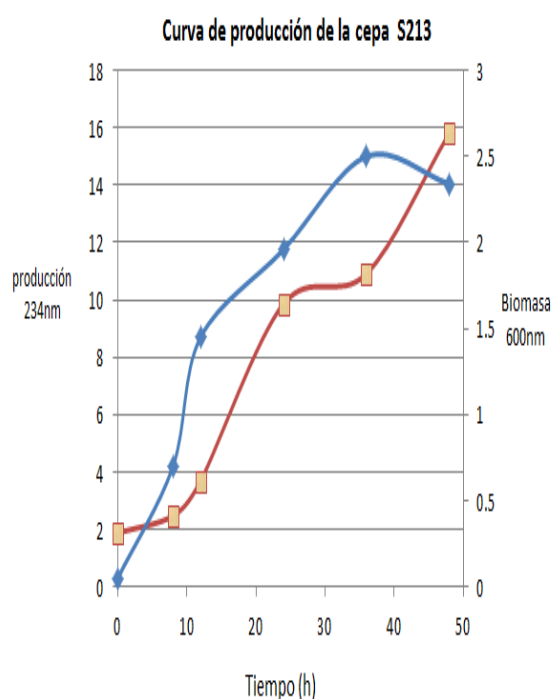


Figura 1 Cinética de producción de PHA y crecimiento microbiano de la cepa S213

Discusión

La cepa mejor productora de PHAs obtenida en este trabajo fue identificada como *Acinetobacter*, la cual tiene la capacidad de obtener fuente de carbono metabolizando los residuos sólidos de coco en degradación. Estudios anteriores han reportado el uso de este microorganismo como alternativa para controlar la eutrofización en cuerpos de agua, además de utilizar los residuos de este proceso como fuente de carbono para la síntesis de PHA lo cual indica que es apto tanto para su uso en biorremediación y el la producción de PHAs utilizando estos sustratos como fuente de carbono económica.

Conclusión

Fue la bacteria *Acinetobacter sp.* La mejor productora de PHA, obteniendo un rendimiento de 10.6483 µg de PHAs por ml durante las primeras a las 48 horas.

Referencias

Bello, D., Brandl, H. (2007). Selección de bacterias productoras de Poli-hidroxibutirato. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 2:10-18.

Khanna, S., Sivrastava, A. (2004). Recent advances in microbial Polyhydroxyalkanoates. Process Biochemistry 4:607-619.

Kim, Y., Kim, W., Chung, G., Rhee, H., (2007). Biosynthesis, Modification, and Biodegradation of BacterialMedium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. Journal of Microbiology 45(2):87-97.

Law, H., Slepecky, A. (1961). Assay of polyhydroxybutiric acid. Journal of Bacteriol 82:33–36

Verlinden, R., Hill, D., Kenward, M., Williams, C., Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. Journal or Applied Microbiology 102(6):1437-1449