

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS EN MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO CATA EN EL ESTADO DE GUANAJUATO

Santoyo Jiménez, Brenda Guadalupe (1), Noriega Luna, Berenice (2)

¹ [Licenciatura en Ingeniería Ambiental, Universidad de Guanajuato] | [brend.santoyo@gmail.com]

² [Departamento de Ingeniería Civil, División de Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [berenice.noriega@ugto.mx]

Resumen

Actualmente el plástico se ha convertido en uno de los productos más usados en la industria debido a sus características fisicoquímicas. En el año 2012, la secretaría de desarrollo social (SEDESOL) demostró a través de un estudio que el 10.9% de los Residuos sólidos urbanos (RSU) le compete a los plásticos, polímeros derivados de la industria petroquímica, posicionando a éstos en el primer lugar de productos no biodegradables, con un aporte anual de 4.58 millones de toneladas. No obstante, resulta lógico pensar que en el año 2017 este porcentaje ha aumentado. Por lo anterior, es importante proponer alternativas para la producción de plásticos biodegradables. En este contexto, los polihidroxicanoatos (PHAs), son ácidos hidroxialcanoicos sintetizados por los microorganismos y acumulados por éstos como reservas de carbono y energía en forma de gránulos intracitoplasmáticos, estos biopolímeros se utilizan en la producción de bioplásticos, los cuales son totalmente biodegradables. En este trabajo se identificaron seis cepas bacterianas productoras de PHAs de un inóculo proveniente del muestreo de un reactor diseñado para la producción de PHAs y activado con muestra del Río Cata.

Abstract

Today, plastic has become one of the most used products in the industry due to its physico-chemical characteristics. In 2012, the secretariat of social development (SEDESOL) showed through a study that 10.9% of urban Solid Waste (RSU) is responsible for plastics, polymers derived from the petrochemical industry, positioning them in the first place of non-biodegradable products, with an annual contribution of 4.58 million tons. However, it is logical to think that in 2017 this percentage has increased. Therefore, it is important to propose alternatives for the production of biodegradable plastics. In this context, polyhydroxyalkanoates (PHAs) are hydroxyalkanoic acids synthesized by microorganisms and accumulated by them as carbon and energy reserves in the form of intracytoplasmic granules, these biopolymers are used in the production of bioplastics, which are fully biodegradable. In this work, six bacterial strains of PHAs were identified from an inoculum from the sampling of a reactor designed for the production of PHAs and activated with sample from the Cata River.

Palabras Clave:

Cepas bacterias; Polihidroxicanoatos (PHAs); Bioplásticos

INTRODUCCIÓN

Generación de Residuos Sólidos Urbanos en México.

La generación de residuos a nivel mundial depende, entre otros factores, de los patrones de consumo de la población. Por ejemplo, países con menores ingresos producen menos residuos, principalmente de origen orgánico, mientras que países con mayores ingresos, generan residuos inorgánicos debido al consumo de productos manufacturados. [1]

En México un estudio realizado por la Secretaría de desarrollo Social (SEDESOL) en el año 2012, sobre la generación de Residuos Sólidos Urbanos (RSU), mostró un incremento del 43.8% del periodo comprendido entre los años de 1997 a 2012, es decir, la generación de residuos paso de 29.3 a 42.1 millones de toneladas por año. En el mismo estudio se identificaron los principales residuos generados y los porcentajes de los mismos en el siguiente orden: residuos orgánicos 52.4%, cartón, papel y sus derivados 13.8%, plásticos 10.9%, vidrios 5.9%, aluminio 1.7%, textiles 1.4%, metales ferrosos 1.1%, metales no ferrosos 0.6% y otros residuos (residuos finos, pañales desechables, etc.) 12.2%. [2]

Los plásticos son polímeros con diferentes usos en la industria que han reemplazando a los empaques de vidrio y papel debido a algunas de sus propiedades como la elasticidad y flexibilidad.[3,4] Desafortunadamente, estos polímeros son derivados de la industria petroquímica y perduran en la naturaleza por largos periodos de tiempo, debido a su alto peso y conformación molecular haciéndolos materiales recalcitrantes y resistentes a la acción degradadora de los microorganismos [5,6], no son biodegradables y se bioacumulan en los ecosistemas, produciendo grandes cantidades de sustancias tóxicas que afectan notablemente el medio ambiente.[7]

En este sentido, se ha promovido la investigación sobre la generación de bioplásticos como los polihidroxialcanoatos, que ofrecen una mejor biocompatibilidad, ocasionando menos impacto en los ecosistemas. El reto de esta tecnología radica en producir bioplásticos con propiedades similares

a los plásticos de origen petroquímico existentes en el mercado con un costo similar o menor. [8]

- Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son bioplásticos termoestables, sintetizados por bacterias que los acumulan como reservas de carbono y energía, en forma de gránulos intracitoplasmáticos. Los PHAs son sustitutos de los poliésteres de origen petroquímico, dado que tienen propiedades similares a las de varios termoplásticos y elastómeros, con la ventaja de ser totalmente biodegradables. [9,10] En la naturaleza, los microorganismos son capaces de degradarlos hasta CO₂ y agua, en condiciones aerobias, y hasta metano, en condiciones anaerobias, por acción de las enzimas PHA despolimerasas y PHA hidrolasas. [11] Otra ventaja de estos biopolímeros está asociada con los sustratos utilizados para su síntesis: mientras que para la producción de plásticos sintéticos se requiere materia prima de origen petroquímico, los PHAs se pueden obtener a partir de diferentes desechos agroindustriales, que constituyen materiales orgánicos de bajo costo [12,13]

Actualmente, se han identificado alrededor de 300 especies bacterianas productoras de PHAs sin embargo, sólo algunas se utilizan industrialmente por sus altas eficiencias en la transformación de los sustratos y concentración final del biopolímero en sus células. Entre las especies reportadas se encuentran *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *P. oleovorans* y *Azotobacter vinelandii*; una cepa de *Escherichia coli*, recombinante, varias especies del género *Bacillus*, incluyendo *B. megaterium* y *B. cereus*, así como también *actinomycetes* del género *Streptomyces*. [11]

En este trabajo se llevó a cabo la selección de cepas bacterianas con alta probabilidad para producir PHAs, en muestras de agua del Río Cata en el municipio de Guanajuato.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Toma de muestra

El sitio de muestro corresponde al Río Cata localizado en el Municipio de Guanajuato, en las coordenadas 21°01'42.84"N y 101°15'13.20"O.

Este sitio es de interés por la presencia de vertidos domésticos lo que presume la presencia de una gran diversidad microbiana.

- *Aislamiento y detección de bacterias productoras de PHA*

Para el aislamiento microbiano se realizaron diluciones decimales seriadas de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-10} de un inóculo proveniente del muestreo de un reactor diseñado para la producción de PHA y activado con muestra del Río Cata [14]. Se tomaron dos muestras de inóculo identificadas como M1 y M2. Las diluciones 1×10^{-4} , 1×10^{-6} , 1×10^{-8} , 1×10^{-9} , 1×10^{-10} se sembraron en Agar bacteriológico y se incubaron por 42 horas a 37°C . Se seleccionaron colonias por formas y se procedió al aislamiento de las mismas en Agar bacteriológico a 37°C durante 18 horas. Posteriormente, se realizó la identificación morfológica a través de la tinción de Gram. [15]

La detección de gránulos de PHA en células microbianas se llevó a cabo con el colorante lipofílico negro Sudán B. Posteriormente, a los cultivos que dieron positiva la tinción con negro Sudán B, se les realizó la tinción con azul Nilo A (cloruro de 5-amino-9-dietilaminobenzo [alfa] fenazonio), colorante con mayor afinidad y especificidad, perteneciente a la familia de las oxazinas y que presenta fluorescencia naranja a una longitud de onda de 460 nm. [16]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron diez colonias bacterianas con morfologías y tamaños variados: **a)** colonias puntiformes de color blanco, **b)** colonias translúcidas fuertemente adheridas al Agar, **c)** colonias con aspecto rizoide de color amarillo, **d)** colonias puntiformes blancas, **e)** colonias redondas mucosas de color crema brillante y **f)** colonias redondas blancas, fuertemente adheridas al Agar. En la tabla 1 se muestran las características de cada cepa.

Respecto al análisis morfológico se encontró que la morfología predominante de las células fue la forma bacilar como se muestra en la Imagen 1. En relación a la detección de gránulos, se logró identificar en la mayoría de las células inclusiones intracelulares a través de la tinción con negro

Sudán B observándose de color oscuro, mientras que la célula presentaba coloración rosa, tal como se muestra en la imagen 2. [17] Finalmente, se llevó a cabo, la tinción con azul Nilo A y los resultados de este ensayo arrojan que seis de las diez cepas emiten fluorescencia lo que indica la presencia de PHA, tal como se muestra en la Imagen 3. Respecto a la identificación de inclusiones intracelulares con esta técnica, investigaciones anteriores han demostrado la presencia de bacterias productoras de PHA en subproductos de lácteos y de caña de azúcar en bacterias Gram negativas [18]

Tabla 1: Características de los Morfotipos coloniales.

Muestra / Dilución	Morfotipos coloniales	Características
M1 1×10^{-6}	F1	Colonias amarillas translúcidas, sin borde definido y con diámetro de 2 a 3 mm.
	F2	Colonias platinadas, puntiformes y con diámetro de 1 a 2 mm. .
	F3	Colonias blancas, puntiformes y con diámetro menor a 1 mm
	F4	Colonias amorfas de color verde oscuro, de 1 mm de diámetro.
M1 1×10^{-8}	F1	Colonias redondas, con borde definido de color blanco y translúcidas en su interior, fuertemente adheridas al Agar y con diámetro de de 1.5 a 0.5 cm
M2 1×10^{-6}	F1	Colonias amarillas translúcidas, con aspecto rizoide y con diámetro de 2 a 3 mm.
	F2	Colonias verdes puntiformes con diámetro de 1 a 2 mm.
	F3	Colonias blancas puntiformes con diámetro menor a 1 mm.
M2 1×10^{-8}	F1	Colonias redondas mucosas redondas de color crema brillante y con diámetro de 0.5 a 1 cm.
M2 1×10^{-9}	F1	Colonias blancas, redondas, de 1 a 2 mm de diámetro.

Tabla 2. Identificación de morfología celular y de inclusiones intracelulares en cepas bacterianas.

Morfotipos coloniales	Tinción de Gram	Tinción con Negro Sudan B	Tinción Azul de Nilo A
M1 1x 10 ⁻⁶ F1	Bacilos Gram (+)	Presencia de inclusiones	Emisión de fluorescencia naranja
M1 1x 10 ⁻⁶ F3	Bacilos Gram (+)	Presencia de inclusiones	Emisión de fluorescencia naranja
M1 1x 10 ⁻⁶ F4	Bacilos Gram (-)	Presencia de inclusiones	Emisión de fluorescencia naranja
M2 1x 10 ⁻⁶ F1	Bacilos Gram (-)	Presencia de inclusiones	No se observó fluorescencia
M2 1x 10 ⁻⁶ F2	Bacilos Gram (-)	Escasa presencia de inclusiones	Emisión de fluorescencia naranja
M2 1x 10 ⁻⁶ F3	Bacilos y Cocos Gram (+)	Escasa presencia de inclusiones	Emisión de fluorescencia naranja
M2 1x 10 ⁻⁸ F1	Bacilos Gram (+)	Presencia de inclusiones	Emisión de fluorescencia naranja
M2 1x 10 ⁻⁹ F1	Bacilos Gram (-)	Presencia de inclusiones	No se observó fluorescencia



IMAGEN 1: Tinción de Gram. Morfotipo M1 1x 10⁻⁶ F1. Bacilos Gram negativos, observadas con microscopio óptico y objetivo 100 X.

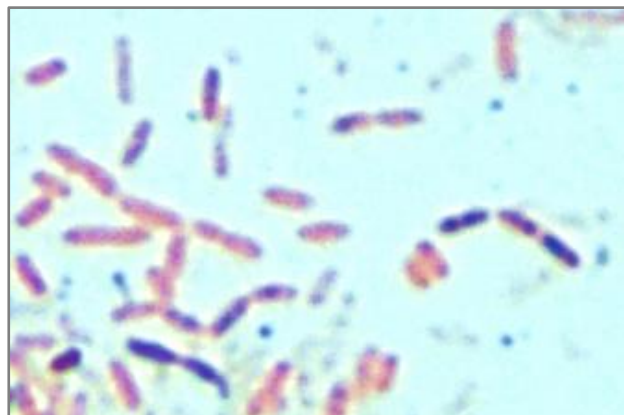


IMAGEN 2: Tinción negro Sudán B. Morfotipo M2 1x 10⁻⁶ F1. Inclusiones intracelulares se observan en color azul. Observación con microscopio óptico y objetivo 100 X.

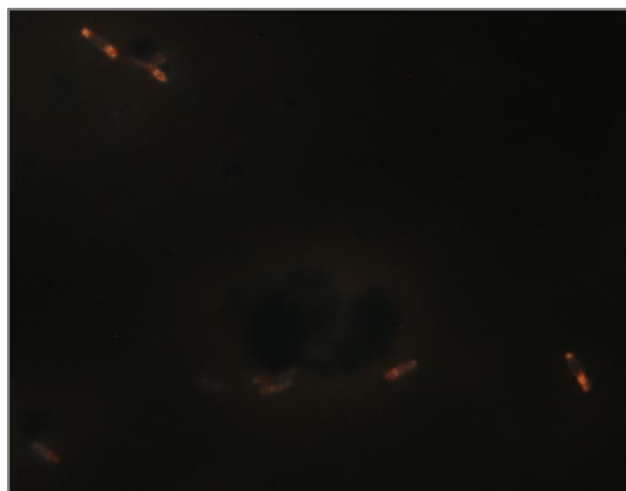


IMAGEN 3: Tinción azul de Nilo A. Morfotipo M2 1x 10⁻⁸ F1. Se observan inclusiones intracelulares con fluorescencia naranja. Observación con microscopio de fluorescencia y objetivo 100x.

CONCLUSIONES

En este trabajo se llevó a cabo una preselección de cepas bacterianas productoras de PHAs, de las cuales el morfotipo colonial M2 1x 10⁻⁸ F1 mostró los resultados más interesantes. No obstante, para la selección de estos organismos es importante considerar pruebas químicas como el análisis cromatográfico (GC/MS/SIM), que permite identificar y cuantificar el biopolímero, además de la identificación molecular y bioquímica de las cepas.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato por el apoyo otorgado para ser parte de esta gran experiencia. A los responsables de los laboratorios en donde se desarrollaron los diferentes experimentos por permitirme trabajar en los laboratorios y utilizar los equipos. A la Dra. Berenice Noriega Luna por contribuir, apoyarme y motivarme en la investigación, y a mis padres Miguel Santoyo N. y María Guadalupe Jiménez Hurtado que siempre están apoyándome y motivándome en cada momento.

REFERENCIAS

- [1] BID-OPS. Diagnóstico de la Situación del Manejo de Residuos Sólidos Municipales en América Latina y el Caribe. Banco Interamericano de Desarrollo. Washington, D. C. (1997).
- [2] Semarnatgobmx. (2017). Semarnatgobmx. Retrieved 27 June, 2017, from http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resume_n14/07_residuos/7_1_1.html
- [3] Arcos, M. (2007). Degradación de aguas residuales y producción de polihidroxialcanoatos mediante Un biorreactor discontinuo. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- [4] Grados, R.; Álvarez M.T.; Giménez A. y Mattiasson, B. (2008). Degradación anaeróbica de desecho agrícolas por consorcios microbianos para la producción de polihidroxialcanoatos. *Biofarbo* 16, 28-35
- [5] Khanna, S. and Srivastava A.K. (2005). Statistical media optimization studies for growth and PHB production by *Ralstonia eutropha*. *Process Biochemistry* 40, 2173-2182
- [6] González, Y.; Meza, J.C.; González, O. y Córdova, J.A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 29 (1), 77-115.
- [7] Wendlandt D.; Geyer W.; Mirschel G. (2005). Possibilities for controlling a PHB accumulation process using various analytical methods. *Journal of Biotechnology*. 117, 119-129.
- [8] Verlinden R. A. J.; Hill, D. J.; Kenward, M. A.; Williams, C. D. and Radecka I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 102:1437-1449
- [9] Stubbe J., Tian J. (2003). Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Natural Products Reports*. 20: 445457
- [10] Dionisi D., Majone M., Papa V., Beccari M. (2004). Biodegradable polymers from organic acid by using activated sludge enriched by aerobic periodic feeding. *Biotechnology and Bioengineering*. 85: 569-579.
- [11] Barbosa M., Moreno N., Espinosa A., Malagón D. (2005) Producción de poli-B-hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *Universitas Scientiarum*. 10: 45-54.
- [12] Vishnuvardhan-Reddy S., Thirumala M., Mahmood S.K. (2009). Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(3): 391-397.
- [13] Thirumala M., Vishnuvardhan-Reddy S., Mahmood, S.K. (2010). Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus* spp. isolated from soil and activated sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37(3): 271-278.
- [14] Grothe E., Moo-Young M. y Chisti Y. (1999). Fermentation optimization for the production of poly(beta-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. *Enzyme Microb. Tech.* 25, 132-141
- [15] Tortora, G. Funke, B. Case, C. (2007). Introducción a la microbiología (9na ed.) . Madrid, España: Editorial. Medical Panamericana, S. A.
- [16] Laboamericacom. (2017). Laboamericacom. Retrieved 1 July, 2017, from <http://www.laboamerica.com/pdfs/SPANISHLX400.pdf>
- [17] Ostle A. y Holt J.G. (1982). Nile Blue A as a Fluorescent Stain for Poly-3-Hydroxybutyrate. *Appl. Env. Microbiol.* 44, 238-241.
- [18] Echavarría, A.C. Mora A.L & Marín, M.M. (2013). Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. *Rev. Fac.Nal.Agr. Medellín* 66 (2),7129- 7140