



Estudio de la producción de polihidroxicanoatos (PHA)  
por *Bacillus sp.* utilizando glicerol como fuente de  
carbono.



Tesis de grado de Licenciatura en Biología opción Biotecnología

Estudiante: Analia Banacore

Tutoras: Guadalupe Martínez y Verónica Saravia  
Instituto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería Udelar

**2014**

# INDICE

## RESUMEN

## INTRODUCCIÓN

Plásticos derivados del petróleo y problemas asociados	1
Bioplásticos	9
PHAs	10
Degradación de bioplásticos	13
PHBs	14
Sustratos utilizados para producción de PHAs	15
Biocombustibles	17
Biodiesel	17
Glicerol	18
Microorganismos productores de PHA	21
Bacillus sp.	21
Esporulación	23
Objetivos generales y específicos	26

## MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo	27
Medio de cultivo base	27
Tinciones	27
Seguimiento del trabajo	28
Evaluación de sustratos en placas de Petri	28
Cultivo en placas con distintas concentraciones de glicerol	29
Cultivo en matraz	29

Inhibición de la esporulación	29
Relación C/N	30
Estudio de la influencia del extracto de levadura y el glicerol en la producción de PHA	30
Procedimientos analíticos	32
Cuantificación de biomasa	32
Cuantificación de glicerol	34
Cuantificación de PHA	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Tinciones	36
Evaluación de sustratos en placas de Petri	39
Cultivo en placas con diferentes concentraciones de glicerol	41
Cultivo en matraz	43
Cuantificación del crecimiento con consumo de glicerol	43
Crecimiento con distintas concentraciones de glicerol	44
Inhibición de la esporulación	50
Relación C/N	53
Estudio de la influencia del extracto de levadura y el glicerol en la producción de PHA	57
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXO	75

## RESUMEN

El plástico es uno de los materiales que más se utiliza a nivel global dado que posee diversas aplicaciones. Desafortunadamente, el manejo descuidado de los desechos plásticos han generado con el correr de los años diversas problemáticas de índole ambiental. Es gracias a esto que actualmente se hace hincapié en la utilización de materiales que generen menor impacto, como por ejemplo los bioplásticos.

Se conocen al día de hoy muchas bacterias (1,2) y plantas modificadas genéticamente (3) productoras de polímeros. Al extraer y procesar dichos compuestos se obtienen bioplásticos. Actualmente se llevan a cabo estudios para poder incrementar la producción y disminuir el costo de los bioplásticos con la finalidad de alcanzar una producción a gran escala económicamente viable. El bioplástico más comúnmente producido es el polihidroxialcanoato (PHA).

La finalidad de este trabajo es la optimización de la producción a escala de matraces para *Bacillus sp.* Se estudió el crecimiento de *Bacillus sp.* a partir de distintas fuentes de carbono: glicerol, fructosa, glucosa, lactosa, suero de leche y suero de leche ultra filtrado en una concentración de 5 g/L. Se eligió el glicerol como medio de estudio.

Se realizaron cultivos en placa y a escala de matraces con diferentes concentraciones de glicerol, cuyo resultado fue positivo para todos los casos. Como prueba del consumo de glicerol por parte de *Bacillus sp.* se realizó una curva de crecimiento con consumo de glicerol. Se eligió la concentración de 5 g/L de glicerol para estudiar la acumulación de PHA por parte del *Bacillus sp.* ya que a dicha concentración se obtuvo el mejor aprovechamiento de sustrato para la máxima producción de biomasa.

El crecimiento alcanzado con las condiciones que inhiben la esporulación del cultivo, no permitieron que el mismo alcance una concentración de biomasa mayor a 0,8 g/L. Debido a la baja proporción de PHA, no es posible una

cuantificación certera. El mayor porcentaje de acumulación de PHA se determinó en la relación C/N 5, siendo de 5 %. Las relaciones de C/N menores, producen incluso menor acumulación de PHA.

Se realizó un diseño experimental factorial con punto central para el estudio de la dependencia de extracto de levadura y glicerol en el crecimiento y la producción de PHA. Gracias a estos valores se pudo observar que la producción de PHA es dependiente del extracto de levadura e independiente del contenido de glicerol.

## **INTRODUCCIÓN**

Los plásticos son desde hace algunas décadas los materiales más versátiles y comúnmente utilizados día a día. Pero en contrapartida a su practicidad tienen desventajas que nos pesan a todos: su disposición final y la utilización de recursos fósiles. Es por eso que actualmente se está poniendo énfasis en el desarrollo de materiales con propiedades similares a los plásticos petroquímicos producidos a partir de materiales renovables y de fácil disposición final. De aquí nace entonces la iniciativa de los bioplásticos.

### **Plásticos derivados del petróleo y problemáticas asociadas:**

El término plástico deviene de la palabra de origen griego “plástikos” que significa apto para moldeado y se refiere a la plasticidad de estos materiales. Esta propiedad les permite adquirir diferentes formas. Pueden llegar a ser muy flexibles y fuertes. Gracias a todas estas características y al hecho de que en el período de la segunda guerra mundial los metales eran utilizados pura y exclusivamente para satisfacer las demandas de la guerra es que en ese momento dio comienzo a la era del plástico (4). Los plásticos han sido mejorados con los años, adquiriendo propiedades específicas convenientes para cada uso particular. Gracias a la versatilidad alcanzada por dichos materiales, es que se siguen utilizando hasta el día de hoy. Hay más de 50 plásticos de importancia comercial en este momento. Las áreas de aplicación para los plásticos son abundantes y variadas: la industria de la construcción, empaquetamiento, electrónica, recreación, usos médicos, etc. Muchos plásticos tienen una vida útil de algunos años, pero aproximadamente el 20% son utilizados con fines de empaquetamiento (5). Esto implica un corto período de utilidad del material y por lo tanto una alta tasa de desecho del mismo.

La sociedad se vuelve cada vez más dependiente al uso de este tipo de materiales en la vida cotidiana pero esta situación puede llegar en algún momento a su fin debido a que este tipo de materiales también presentan desventajas.

Aproximadamente el 5% de la producción mundial del petróleo es utilizada por la industria de los polímeros, lo cual no es conveniente ya que se estima que las reservas de petróleo mundiales remanentes se van a agotar completamente para el año 2050 (6). Esta situación genera un problema a futuro en la obtención de uno de los ingredientes más importantes en la producción a gran escala del material con un consecuente aumento en el precio del mismo.

Otra de las contrapartidas que presenta este material es que está compuesto por materiales no biodegradables como ser polietileno y polipropileno. Hay algunos polímeros procedentes del petróleo llamados plásticos oxodegradables, que contienen aditivos para facilitar su degradación, pero muy pocos son realmente biodegradables (7,8). El reciclado de plásticos ofrece posibilidades limitadas y la incineración puede liberar compuestos tóxicos (6). Esta situación deja pocas alternativas para un manejo responsable de los desechos generados por esta industria.

En este momento estamos enfrentando las consecuencias de la gran durabilidad de los plásticos junto con su utilización indiscriminada. Solamente en Costa Rica, la industria bananera utiliza 200 toneladas métricas de cuerdas de polipropileno por mes (9). La Academia de Ciencias de los Estados Unidos estimó que la cantidad anual de desechos plásticos que se introducen en el mar por año es de aproximadamente 6,4 millones de toneladas (4). Almeida et. al, 2004 observaron que hay partículas de plástico presentes en los mares de todo el mundo (10).

Los contenidos de plástico de los desechos marinos son alarmantes. Se realizó en el año 2004 un compendio de los desechos en zonas específicas de las costas del mar Mediterráneo, Atlántico y Océano del Sur en el que se presentó la tabla 1. En ella podemos observar claramente los porcentajes de plástico en los desechos colectados, presentando el mayor valor en la región del Atlántico Norte en la isla Sable.

**Tabla 1:** Desechos en el Atlántico, Mediterráneo y costas oceánicas del sur (12).

Region	Latitud	Isla/costa	desechos m-1		% plasticos	año	extensión
			Minimo	maximo			
	57°N	Rhum	0.15		48	1996	200 m
	55	Inch	0.89		68	1993	200 m
	53	Scolt Head	0.49	0.68	59	94-00	200 m
	51.5	Sherkin	0.94	1.4	63	1999	891 m
	45	Sable	2.63		92	84-86	
Atlántico	42	Cape Cod	4.50			1992	5,000 m
Norte	38	Sao Miguel	0.76		35	1996	200 m
	38	Assateague	1.30			1992	200 m
	30	Gulf	2.20			89-92	5,000 m
	28	Tenerife	2.24	2.9	53	2001	300 m
	27	Padre	70.9			89-92	5,000 m
	24	San Salvador	2.0		42	2000	200 m
	18.5	UK Virgin	0.7			91-92	100 m
	18	Puerto Rico	3.5	4.8		1990	
	18.5	Dominica	1.5	3.9	24	1991	100 m
	15	Sal	1.60	2.44	35	1996	200 m
	15	Sao Antao	1.36	12.5	40	1996	200 m
	14	St. Lucia	0.20	3.5	59	91-92	100 m
	9.5	San Blas	2.75		37	1998	200 m
	44°N	Jabuka	6.4		55	2000	100 m
Mediterraneo	38	Sicilia	9.0	231	45	1988	500 m
	37	España	33.2		63	1991	
	36	Cypre	10.4		64	1988	
	33	Israel	7.3	8.7	65	88-89	
Atlantico	37.2°S	Tristan da Cunha	0.319	0.813	58	1984	900 m
Sur	37.2	Inaccesible	0.559	2.3	72	84-90	900 m
	41.2	Gough	0.019		84	1984	7,630 m
	54°S	Bird	0.017	2.49	74	90-01	291 m
Oceano	54	Georgia del Sur	0.36		80	1993	200 m
Sur	57	Candlemas	0.008	0.026	85	1997	1,000 m
	57.4	Saunders	0.285		30	1997	200 m
	54	Bouvet	0.077		40	1997	24,300 m
	60.5	Signy	0.012	0.224	82	90-01	200 m
	62	Livingstone	0.019	0.304	86	84-98	13,986 m
	63	Ardley	0.006		40	1996	12,500 m

En zonas de la costa industrializada de Gran Bretaña, se han registrado valores de 75.000 partículas plásticas por metro cuadrado en sedimentos bénticos. Se ha confirmado que alrededor del 15% de las 280 especies de aves marinas que existen en el mundo han ingerido plástico, así como también 4 de las 7 especies de tortugas marinas (Figura 1). También se han encontrado plásticos en el estómago de cachalotes pigmeos (*Kogiabreviceps*), delfín de hocico estrecho (*Stenobredanensis*), ballenatos de Cuvier (*Ziphiuscavirostris*) y manatí antillano (*Trichechusmanatus*) (11).



**Figura 1:** a) animal muerto a consecuencia del consumo de plástico [http://efectowhopper.blogspot.com/2013/05/el-futuro-de-los-residuos-de-plastico\\_18.html](http://efectowhopper.blogspot.com/2013/05/el-futuro-de-los-residuos-de-plastico_18.html). b) estómago de tortuga marina y sus contenidos. <http://www.seaturtle.org/imagelib/?photo=6865>

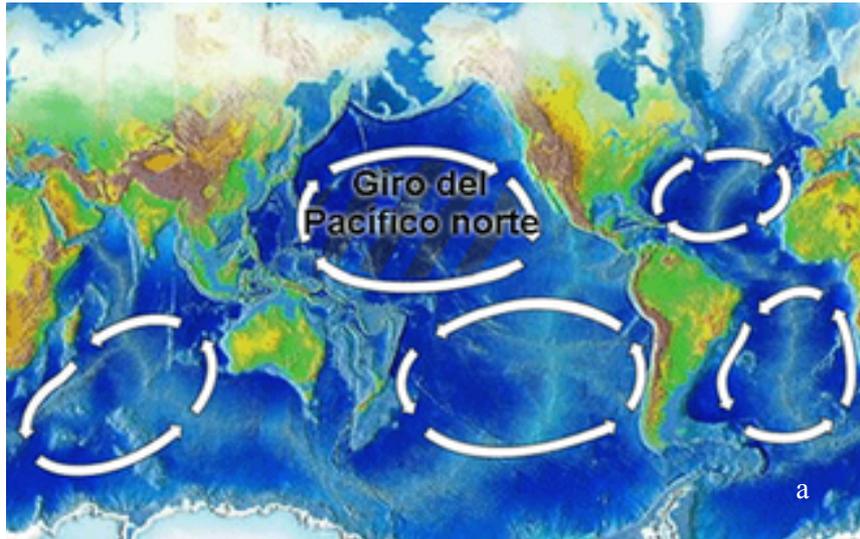
Casi cualquier objeto más grande de 20 mm que se haya hecho de plástico se encuentra todavía en los océanos. Una de las piezas más importantes son las redes fantasmas. Una red fantasma es una red de pesca abandonada o perdida, que viaja con las corrientes atrapando continuamente animales y desechos marinos. Pueden atrapar hasta 6 toneladas de desechos y son generalmente muy grandes y pesadas para ser removidas del océano (4). Estas redes fantasmas y objetos de plástico se encuentran ya sea flotando

por el océano a la deriva o atrapados en zonas particulares ya que están sujetos a la acción de fuerzas naturales (Figura 2).



**Figura 2:** Tortuga marina enredada en una red fantasma. <http://econews.com.au/news-to-sustain-our-world/marine-life-in-constant-threat-from-sea-debris/>

Las corrientes marinas generan parches de basura flotante. Los giros del Pacífico Norte central, un área de alta presión atmosférica con una corriente horaria arrastra a los desechos a un área central donde el viento y las corrientes se desvanecen, generando la acumulación de los mismos. Este giro ha sido ampliamente estudiado para hacer muestreo e investigación de desechos plásticos. La abundancia de partículas plásticas en el área fue de 334,27 partículas por  $\text{km}^2$  con una masa de 5,11  $\text{g}/\text{km}^2$ . El giro del Pacífico Norte es uno de los 5 giros presentes en la Tierra (Figura 3) (4).



**Figura 3:** a) Giros de las corrientes marinas extraído de la página web [http://es.m.wikipedia.org/wiki/Sopa\\_de\\_plástico](http://es.m.wikipedia.org/wiki/Sopa_de_plástico). b) Basura acumulada en el giro del pacífico norte <http://www.marineinsight.com/marine/environment/what-is-the-pacific-ocean-garbage-patch/>.

Al menos 267 especies marinas alrededor del mundo se ven afectadas por el plástico. En las costas de Nueva Zelanda se estima que 1,478 focas y leones marinos mueren anualmente enredados. Pero el envenenamiento, enredo y asfixia a gran escala de la biota salvaje no es el único problema generado por los plásticos que se encuentran desperdigados por el mundo (figura 4a). La extensión global y los niveles de colonización de los desechos marinos representan claramente una oportunidad sin precedentes para la dispersión

de organismos marinos (figura 4b). La introducción de animales no nativos a nuevos ambientes es una de las mayores causas de pérdida de especies (12%). Los organismos invaden nuevos ecosistemas generando un cambio en la composición de especies (4).



**Figura 4** a) Efectos de los restos plásticos en la biota salvaje . <http://www.diveleisure.co.uk/blog/index.php/ocean-pollution-and-marine-mammals/> b) Restos de plástico colonizado por animales que pueden desplazarse hacia otros medios <http://churchandstate.org.uk/2013/01/life-on-the-brink-environmentalists-confront-overpopulation-iv/>

Los plásticos se consideran bioquímicamente inertes, pero la gran mayoría de ellos no se encuentran puros. Hay gran variedad de químicos que contribuyen a que los plásticos adquieran ciertas propiedades. Estos aditivos son generalmente de pequeño peso molecular y muchas veces no se encuentran unidos al polímero que integran. Mayoritariamente son lipofílicos,

penetran en las membranas celulares y causan efectos tóxicos. Algunos causan efectos carcinogénicos o reproductivos, son disruptores del sistema endocrino y causan efectos neurotóxicos en ciertos mamíferos y organismos acuáticos, como ser el caso de los retardadores de flamas con bromo (4).

Además de todo lo anteriormente mencionado, los plásticos que se encuentran flotando en el mar no solo contienen los aditivos, también contienen químicos adsorbidos de los alrededores. La superficie hidrofóbica de los plásticos tiene afinidad con varios contaminantes de esta naturaleza que se acumulan dentro y sobre los desechos plásticos. Dado que los pequeños fragmentos de plástico son fácilmente ingeribles, constituyen una vía de entrada de químicos a los organismos (4)(figura 1 y 5). Esto no solo afecta a las poblaciones marinas sino que directamente tiene un efecto nocivo en una de las mayores fuentes de alimento que tiene el ser humano (figura 5).



**Figura 5:** Contenido estomacal de un pez <http://nuevamisraaalmar.blogspot.com/2009/01/250000-millones-de-fragmentos-de.html>

Teniendo en cuenta estos datos, sumado a la contaminación que generan día a día los productos derivados del petróleo es que se pone énfasis en productos que provengan de recursos renovables y que sean ambientalmente más amigables. De esta iniciativa nacen los bioplásticos.

### **Bioplásticos:**

En los últimos años ha aumentado la conciencia ecológica permitiendo el desarrollo y la investigación en productos que sean más amigables para el medio ambiente y que tengan menos impacto ambiental.

Los bioplásticos son materiales con propiedades variadas, algunas similares a las de los plásticos derivados del petróleo pero que a su vez poseen la ventaja de ser biodegradables.

La Sociedad Americana de Testeo de Materiales (ASTM) y la Organización Estándar (ISO) han definido a los plásticos biodegradables como aquellos que sufren un cambio significativo en su estructura química bajo condiciones ambientales específicas (7).

El término biodegradable significa capaz de sufrir descomposición en dióxido de carbono, metano, agua, compuestos inorgánicos y biomasa (figura 7). Los productos finales dependerán del tipo de microorganismo , así como también de las condiciones ambientales como ser aerobias o anaerobias, pH, etc. (12).

Los bioplásticos pueden clasificarse de varias formas, una de las cuales es de acuerdo a su proceso de síntesis:

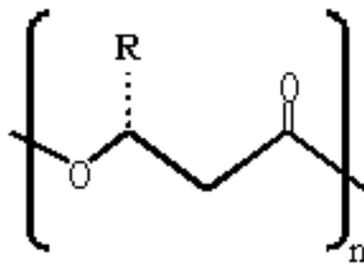
- 1) polímeros sintetizados a partir de biomasa, como ser agro polímeros de recursos agrarios (ejemplo: almidón o celulosa).
- 2) Polímeros obtenidos por producción microbiana como los Polihidroxicanoatos (PHAs).
- 3) Polímeros convencional y químicamente sintetizados de monómeros obtenidos de recursos agrarios (ejemplo el ácido poliláctico, PLA).
- 4) Polímeros obtenidos de recursos fósiles (12).

Dentro de estas clasificaciones nos vamos a centrar en los polímeros obtenidos por producción microbiana, particularmente en los PHAs.

### PHAs:

En los años 70 hubo una crisis mundial de petróleo, en la que el precio del combustible fósil se elevó. En ese contexto, las investigaciones alrededor de los PHA florecieron y la empresa ICI desarrolló un proceso para producir a escala industrial un bioplástico que se comercializó bajo el nombre de "Biopol"(10). En este momento las investigaciones relacionadas con el aumento de producción de estos y otros biopolímeros siguen en marcha con el fin de aumentar la productividad a gran escala y maximizar su producción con el menor costo posible.

Los PHA son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente, como se puede observar en la figura 6 (10).



**Figura 6:** Estructura general de los polihidroxiácidos (10).

Los PHAs son una familia de poliésteres con diversas estructuras y son los únicos bioplásticos completamente sintetizados por microorganismos. La gran mayoría son producidos por microorganismos procariontes, incluyendo bacteria y archaea, aunque hubieron reportes de PHA producidos por plantas transgénicas (13). Se conocen más de 100 plásticos biodegradables que pertenecen a la familia de los PHAs (14).

Están generalmente clasificados en 2 grupos: PHAs de cadena corta y PHAs de cadena mediana, dependiendo del número de carbonos en las unidades que lo componen. Los PHAs de cadena corta contienen 4 o 5 carbonos en sus unidades repetidas, mientras que los de cadena mediana tienen 6 o más (12).

Más de 90 géneros de microorganismos son capaces de producirlos y catabolizarlos, incluyendo aerobios y anaerobios dentro de los cuales se encuentran las bacterias fotosintéticas, archaeas y eucariotas simples (15). Es debido a esto que los PHA tienen la ventaja de ser producidos a partir de recursos renovables. Las funciones del PHA están relacionadas con el almacenamiento de carbono y energía así como la supervivencia en condiciones de estrés ambiental (13). Se depositan intracelularmente en formas de cuerpos de inclusión y pueden llegar a representar más del 90% del peso seco celular. En la naturaleza los microorganismos son capaces de degradar los PHAs mediante la acción de PHA depolimerasas y PHA hidrolasas extracelulares, hasta CO<sub>2</sub> y agua (10). La acumulación intracelular de polímeros se considera como una estrategia para incrementar la supervivencia de los microorganismos en un ambiente fluctuante (16). Pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía para el enquistamiento y la esporulación, para la degradación de compuestos tóxicos y como fuente de poder reductor. A su vez, son completamente degradados por las bacterias que los producen y también por otras bacterias, hongos y algas (10).

Las bacterias productoras de PHAs pueden ser divididas en dos grupos de acuerdo a las condiciones necesarias para la producción. El primer grupo de bacterias requiere la limitación de un nutriente esencial como ser N, P, Mg, K, O o S para la síntesis eficiente de PHA con una fuente de carbono en exceso. El segundo grupo, no requiere limitación de nutrientes para generar PHA ya que acumulan el polímero durante la fase exponencial de crecimiento (17).

Estos polímeros van a exhibir diferentes propiedades fisicoquímicas dependiendo de la composición de sus monómeros, que está relacionada directamente con la naturaleza de la fuente de carbono utilizada así como también el microorganismo productor (7).

Se conocen aproximadamente 150 constituyentes de PHAs, esta gran variedad de monómeros provee un amplio espectro de polímeros con diversas propiedades físicas y mecánicas, desde un polímero duro cristalino a goma elástica (6).

Los PHAs son atractivos sustitutos para los plásticos convencionales dado que pueden ser completamente biodegradados bajo diversas condiciones ambientales por una gran cantidad de microorganismos en un período de aproximadamente 1 año (6). Tienen gran versatilidad de usos posibles gracias a su amplia gama de propiedades. Los polímeros de PHA y especialmente algunos de sus co-polímeros son candidatos prometedores como biomateriales aptos para ingeniería en tejidos. Ya ha sido descrito que el PHA es compatible con células de mamífero dado que es reabsorbido lentamente por el organismo ya que puede ser hidrolizado a metabolitos secundarios (7).

Durante más de 20 años el PHA ha sido utilizado para la realización de diversos artefactos como por ejemplo suturas, sujetadores de suturas, dispositivos de reparación de meniscos, remaches, tachuelas, grampas, tornillos (incluyendo tornillos de interferencia), placas óseas, y sistemas relacionados, mechas quirúrgicas, parches de reparación, parches cardiovasculares, clavos ortopédicos (incluyendo material de relleno óseo), barras de adhesión, dispositivos para reparación/regeneración de tejido, dispositivos para reparación del cartílago auricular, guías de nervios, dispositivos de reparación de defectos del atrio, parches pericárdicos, agentes de relleno o aumento de volumen, válvulas para venas, andamios para médula ósea, dispositivos de regeneración de meniscos, injertos de ligamentos y tendones, implantes de células oculares, jaulas de fusión espinal, sustitutos de piel, etc. (13).

Dentro de los usos potenciales del PHA también fue evaluada su utilidad como biocombustibles e incluso como drogas (13).

En contrapartida a la gran cantidad de ventajas que posee, la producción a escala industrial de PHAs tiene tres limitaciones importantes. La primera supone las condiciones de crecimiento especiales requeridas para la síntesis (usualmente condiciones de nutrientes desbalanceadas que causan crecimiento más lento). La segunda, la dificultad que conlleva encontrar

precursores de bajo costo. La tercera, el alto costo de la recuperación del material (15). Alrededor del 50% del costo de producción de los PHAs está dado por el costo de la fuente de carbono (8,17 ).

Es por esta razón que actualmente muchos laboratorios dedican sus recursos a la investigación para solucionar algunas de estas importantes trabas para la utilización de PHA a mayor escala. Dentro de la gran familia de los PHAs, el PHB es de los más estudiados.

### Degradación de bioplásticos:

La habilidad para degradar PHAs ha sido evidenciada en una amplia variedad de bacterias y hongos (18). Estos microorganismos se encuentran en ambientes naturales variados. Dependiendo de cada ambiente considerado, el tiempo de degradación del material va a variar considerablemente. A modo de ejemplo, sabemos que la tasa de degradación del P(3HB) varía en el orden de unos pocos meses (en aguas residuales anaeróbicas) hasta años (en agua de mar) (8).



**Figura 7:** botella de biopolímero durante decompostaje. <http://tecnologiadelosplasticos.blogspot.com/2012/10/polihidroxicanoatos-pha.html>

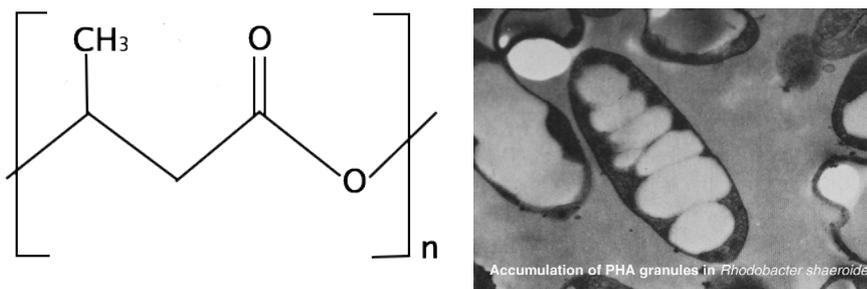
## PHBs:

El PHB fue el primer PHA descubierto (10). De todos los PHAs que se conocen, el PHB es el producido por la mayor cantidad de bacterias (figura 8),(19). Es sintetizado en forma de gránulos intracelulares y en algunos casos es utilizado como fuente de energía para la esporulación (8).

Además de sus funciones como fuente de carbono y energía, estos biopoliésteres pueden servir como un sumidero de electrones y tienen impacto en la formación de biofilms (20).

Actualmente, el PHB es producido a escala industrial por bacterias Gram-negativas como *Cupriavidus neactor*, *Alcaligenes latus* y *Escherichia coli* recombinante. El PHB aislado de organismos Gram-negativos contiene en la membrana externa lipopolisacáridos endotóxicos que son pirógenos y se conoce co-purifican con los PHAs. La presencia de los mismos induce una fuerte reacción inmunitaria y es por este motivo indeseable para aplicaciones biomédicas (19).

El procesamiento de PHB en artículos de comercio no requiere nuevas inversiones en tecnología, el equipo existente que fue desarrollado originalmente para el procesamiento del polietileno y polipropileno puede ser usado (21).



**Figura 8** : a) Estructura molecular del PHB <http://www.intechopen.com/books/polymer-science/polymers-and-the-environment> b) Acumulación de PHB en *Rhodobacter shaeroides* <http://www.biotechnologyforums.com/thread-2280.html>

Hay un gran número de empresas productoras de PHB distribuidas en el mundo y todas ellas se ven enfrentadas con la misma dificultad: los altos costos de producción. La fuente de carbono representa la mayor parte de los costos totales de producción, por lo cual muchos estudios son dedicados a encontrar una fuente de carbono más barata (22).

### Sustratos utilizados para producción de PHAs:

Hay un amplio rango de sustratos para la producción de PHA dependiendo del microorganismo productor utilizado. A su vez puede variar el tipo de PHA producido y el rendimiento del mismo de acuerdo a las condiciones utilizadas de producción. Como se puede observar en la tabla 2, los sustratos de producción de PHA pueden ser variados y a su vez un mismo microorganismo cultivado con diferentes sustratos puede variar su porcentaje de rendimiento de PHA.

**Tabla 2:** Producción de PHA por diferentes bacterias a partir de distintas fuentes de carbono (56).

Microorganismo	Fuente de carbono	PHA	% de contenido
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Gluconato	PHB	46-85
	Propionato	PHB	26-36
	Octanoato	PHB	38-45
<i>Bacillus megaterium</i> QMB1551	Glucosa	PHB	20
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinante	Melaza	PHB	65
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB1267	Fructosa/metanol	PHB	30
<i>M. extorquens</i> (ATCC55366)	Metanol	PHB	40-46
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Euphorbia y aceite de ricino	PHA	20-30
<i>P. denitrificans</i>	Metanol	P(3HV)	0.02
	Pentanol	P(3HV)	55
<i>P. oleovorans</i>	Gluconato	PHB	1.1-5.0
	Octanoato	PHB	50-68
<i>P. putida</i> GPp104	Octanoato	PHB	14-22
<i>P. putida</i>	aceite de palma kernel	PHA	37
	Acido laurico	PHA	25
	Acido miristico	PHA	28
	Acido oleico	PHA	19
<i>P. putida</i> BM01	Acido 11fenoxiundecanoico	5POHV	15-35
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glucosa	PHB	40

\*PHB-acido polihidroxibutirico, P(3HV)- acido polihidroxivaleratico, 5POHV- poli-3-hidroxi-5-fenilvalerato.

Sin embargo no todas estas bacterias son utilizadas a escala industrial. De acuerdo a investigaciones realizadas las mejores productoras son elegidas de acuerdo al menor costo asociado. Dado que el costo de producción deviene en gran parte del costo derivado de la fuente de carbono a utilizar es que se realiza énfasis en el estudio de la producción de PHA a partir de sustratos que sean derivados de otras industrias.

Este es el caso por ejemplo del glicerol, producto derivado de la industria del biodiesel. El glicerol puede sustituir carbohidratos tradicionales como ser sucrosa, glucosa y almidón en algunos procesos de fermentación industrial (23).

E.J. Borman y M. Roth, 1999 realizaron estudios de cultivos de *Methylobacterium rhodesianum* y *Ralstonia eutropha* con el fin de obtener PHA utilizando un medio con glicerol como fuente de carbono y hidrolizados de caseína como fuente de nitrógeno. La primera cepa acumuló un promedio de 39% de PHB durante 92 horas de cultivo en matraz y un 50% en 45 horas en fermentador. La segunda cepa rindió un 47% de PHB durante 67 horas de cultivo utilizando peptona de caseína y 65% de PHB en 45 horas utilizando aminoácidos en el medio (24).

G. Mothes et al, 2007 utilizó bacterias *Paracoccus denitrificans* y *Cupriavidus necator* JMP 134 que acumulan PHB a partir de glicerol puro hasta un 70% de peso seco celular. Cuando se utilizó glicerol crudo con un contenido de NaCl de 5.5 % se observó una disminución de 48% en el contenido celular seco de PHB. Además se redujo el coeficiente de rendimiento de PHB debido a la osmoregulación. El efecto del glicerol contaminado con  $K_2SO_4$  fue menor (25).

Joao M.B.T et al, 2009 utilizó *Cupriavidus necator* para producción de PHB con glicerol crudo como fuente de carbono y se comparó su rendimiento con glicerol comercial. Cuando se utilizó glicerol comercial se obtuvo un contenido de PHB de 62% mientras que este porcentaje disminuyó a un 38% al utilizar el glicerol crudo (26).

Para el caso particular de *Bacillus sp.* también hubieron casos en los que se utilizó Glicerol como fuente de carbono. S. Vishnuvardhan Reddy et al, 2009 realizó cultivos con una cepa de *Bacillus megaterium* OU303A con glicerol como fuente de carbono obteniendo un máximo de 62,43% de PHB (27).

### **Biocombustibles:**

El término biocombustibles se refiere a combustibles sólidos, líquidos o gaseosos que son producidos predominantemente a partir de materia prima renovable (28).

Los combustibles basados en petróleo son reservas limitadas concentradas en ciertas regiones del mundo. El incremento dramático en el precio del petróleo, la naturaleza finita de los combustibles de origen fósil, el incremento en la conciencia ecológica especialmente relacionado con la emisión de gases invernadero y consideraciones en la salud están orientando a la búsqueda de nuevas fuentes de energía alternativas para los vehículos a motor. Hay dos biocombustibles que pueden reemplazar la gasolina y el diesel, estos son bioetanol y biodiesel (29).

### **Biodiesel:**

El biodiesel se refiere al equivalente del diesel derivado de materias primas biológicas y se obtiene a partir de un proceso de transesterificación. Es una alternativa ambientalmente amigable que puede ser utilizada en cualquier motor diesel sin modificación alguna (29).

Químicamente, el biodiesel se define como los monoalquil esteres de largas cadenas de ácidos grasos derivados de biolípidos renovables. Se produce típicamente mediante la reacción de una grasa animal o un aceite vegetal con metanol o etanol en presencia de un catalizador para producir (m)etilesteres y glicerol (30).

En Uruguay existen varias plantas productoras de biodiesel. Una de ellas fue fomentada por la intendencia municipal de Paysandú y elabora Biodiesel a

partir de aceite de girasol obtenido de las propias plantaciones de dicho departamento. La segunda planta está instalada en Montevideo pero solo elabora Biodiesel a partir de aceites de fritura usados. La tercera llamada Ecodiesel esta ubicada en Montevideo y tiene capacidades de producción de más de 3.000.000 litros mensuales con materias primas obtenidas de sebo vacuno proveniente de la faena (31).

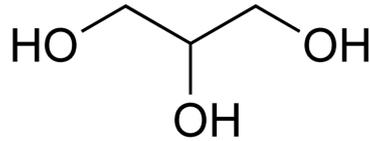
La cuarta planta se llama ALUR S.A., fué fundada el 12 de junio del 2013 y produce unas 50.000 Toneladas al año de biodiesel que son suministradas a ANCAP, permitiendo una mezcla del 7% con el gasoil que se comercializa en el país. La producción y entrega de biodiesel se hace en el marco de un contrato de suministro, que se extiende hasta el 2026 (32).

A su vez existe una ley de agrocombustibles, la ley 18.195 que tiene como objetivo la regularización y el fomento de la producción de biodiesel. Asimismo, tiene por objeto reducir las emisiones de gases de efecto invernadero en los términos del Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático, aprobados por la Ley N° 17.279, de 23 de noviembre de 2000, contribuyendo al desarrollo sostenible del país (33).

Gracias a todo lo anteriormente mencionado es que en el Uruguay de hoy es una Buena alternativa utilizar el glicerol excedente de una industria que se encuentra creciendo día a día como fuente de carbono para un emprendimiento de producción.

### **Glicerol:**

El glicerol es un líquido viscoso incoloro, inodoro, ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, alimenticia, de cuidado personal y otros. Es dulce y tiene baja toxicidad (34). Es un producto secundario de la industria del biodiesel, por lo tanto tiene un valor relativo bajo debido a la presencia de impurezas (como metanol, sales y ácidos grasos) (6).



**Figura 9:** estructura molecular del glicerol. <http://theuniversalmatrix.com/pt-br/artigos/?tag=glicerol>

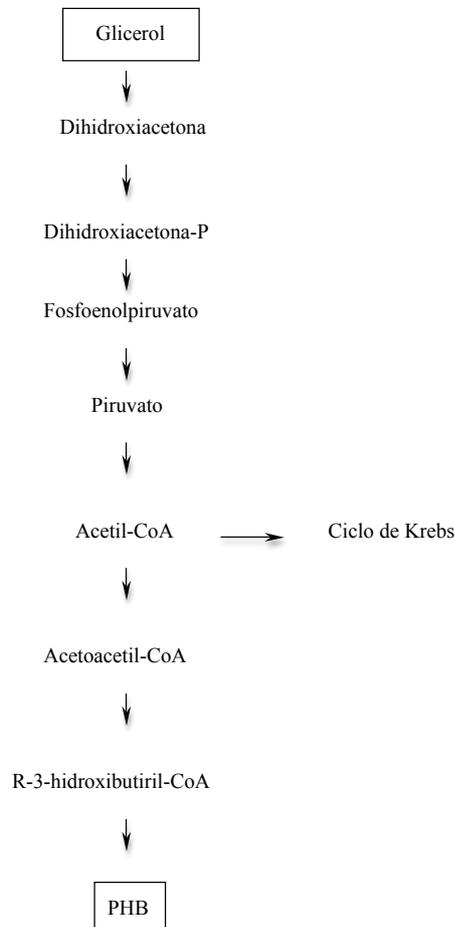
El glicerol corresponde a un polihidroxiálcohol, aunque desde el punto de vista nutricional es considerado un carbohidrato. Esta diferencia de clasificación deriva en una discusión dado que el glicerol no afecta los niveles de glucosa o insulina en sangre en humanos, como un carbohidrato normal por lo cual muchos sostienen que debería ser considerado como una fuente de energía simple (34). Sin embargo puede sustituir a los carbohidratos tradicionales tales como sucrosa, glucosa y almidón en algunos procesos de fermentación industriales. Como otras moléculas sin carga pequeñas, el glicerol puede atravesar la membrana citoplasmática por difusión pasiva (6). También hay una proteína integral de membrana que facilita su difusión, llamada GlpF (35).

Una vez que se encuentra dentro de la célula, sufre una serie de transformaciones enzimáticas que lo convierten luego de una serie de pasos en acetil-CoA a partir del cual puede seguir la ruta del Ciclo de Krebs o seguir sufriendo modificaciones sucesivas hasta transformarse en PHB (figura 10).

El glicerol crudo es refinado por productores a gran escala de biodiesel por medio de procesos tradicionales de separación utilizados para la remoción de impurezas. Algunos de estos procesos de refinado incluyen filtración, adiciones químicas y destilación fraccionada en vacío. Estos procesos tienen un costo asociado (22).

Hay algunos usos del glicerol que requieren que el mismo se encuentre más procesado como por ejemplo el que se utiliza para las industrias alimentaria,

cosmética y drogas dado que es importante que se encuentre lo más puro posible.



**Figura 10:** Ruta metabólica a partir de glicerol como fuente de carbono hasta llegar a PHB (23).

La composición del glicerol crudo obtenido depende generalmente de la materia prima utilizada para su fabricación, los procesos de transesterificación (vía catalítica) y la tecnología de recuperación empleada (22). A su vez, distintas muestras de glicerol obtenido de una misma planta de producción de biodiesel exhiben distintos niveles de contenido de metanol en muestras tomadas en dos días diferentes, lo cual quiere decir que es un parámetro ampliamente variable (34). A parte de la variación del contenido de metanol el glicerol obtenido puede contener hasta 6-8% de sales inorgánicas dependiendo del el catalizador utilizado para la industria del biodiesel (34).

Esto puede hacer que requiera un análisis rutinario previo a la utilización para fermentación a gran escala dado que estos valores pueden llegar a influir la tasa de crecimiento del microorganismo a utilizar, aunque hay evidencia de que el tratamiento de biodiesel utilizado para la obtención del glicerol no tendría influencia sobre el crecimiento celular y el consumo de sustrato (36).

Gracias a todas las ventajas que exhibe, particularmente su bajo costo dado que es un subproducto obtenido de la industria del biodiesel, es que se eligió como fuente de carbono para la realización de este trabajo.

### **Microorganismos productores de PHA:**

Como se menciona anteriormente cuando se habla de la tabla 2, hay una gran variedad de microorganismos productores de PHA como por ejemplo *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus megaterium*, *Klebsiella aerogenes*, *Methylobacterium rhodesianum*, *M. Exorquens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. denitrificans*, *P. oleovorans*, *P. putida* y *Sphaerotilus natans*, entre otros.

Dentro de los microorganismos más utilizados se encuentran los del género *Bacillus sp.* Muchas cepas del género *Bacillus* fueron estudiadas, para la producción de PHB, encontrándose que *Bacillus megaterium* demostró el máximo crecimiento llegando a 0,21 g/L y una productividad en porcentaje del 48,13 % (8). El mayor nivel de acumulación de PHB se observó en un medio con peptona como fuente de nitrógeno en *Bacillus subtilis* 25 (78,96 %) y *B. megaterium* 12 (77,00 %) (37). Esta es la mayor acumulación alcanzada en el género *Bacillus*.

### ***Bacillus sp:***

Las células del género *Bacillus* tienen forma de bastón, que pueden encontrarse solas o formando cadenas de longitudes considerables. Pueden ser Gram-positivas o Gram-negativas. Los bastones pueden tener los bordes redondeados o cuadrados. Su tamaño varía considerablemente. Pueden ser aerobios o anaerobios facultativos (38).

Este género se caracteriza por la formación de endoesporas, que pueden tener formas variadas. Los *Bacillus* han sido caracterizados en tres grupos morfológicos de acuerdo a sus esporas. El grupo I tiene esporas elipsoidales que no causan ensanchamiento de la célula vegetativa. El grupo II tiene esporas elipsoidales que causan un aumento del tamaño de la célula vegetativa. El grupo número III tiene esporas esféricas que aumentan el tamaño de la célula vegetativa (38).

Las endoesporas formadas difieren con las células vegetativas en muchos aspectos como refractilidad óptica, ultraestructura, composición química y resistencia a stress químico o físico que pueden conducir rápidamente a la muerte de las células vegetativas. El grado de resistencia de las endoesporas depende en gran parte de las condiciones ambientales en las cuales fueron formadas. Los microorganismos del género *Bacillus* no forman endoesporas en todas las condiciones de cultivo. Los factores que afectan a la formación de esporas incluyen la temperatura de crecimiento, el pH del medio, la aireación del cultivo, la presencia de minerales, la presencia de ciertos compuestos con carbono o nitrógeno y la concentración de la fuente de carbono o nitrógeno (38).

Las especies de *Bacillus* son consideradas atractivas industrialmente por una gran variedad de razones, incluyendo su alta tasa de crecimiento que hace a los tiempos de los ciclos de fermentación más cortos, su capacidad de secreción de proteínas al medio extracelular y su estatus de GRAS (generalmente considerados como seguros) (39). A su vez, distintas especies de *Bacillus* han resultado ser buenas productoras de PHB, siendo capaces de utilizar para ello diferentes fuentes de carbono (Tabla 3).

Fue reportado que una alta proporción en el medio de cultivo de carbono-nitrógeno o carbono-fósforo con bajo porcentaje de oxígeno incrementa la producción de PHB en otros sistemas bacterianos pero desencadena esporulación cuando es aplicado en *Bacillus sp.* (19). Valappil et al, 2007 Reportó que una alta proporción en el medio de cultivo decarbono-nitrógeno o carbono-fósforo con bajo porcentaje de oxígeno incrementa la producción de PHB en otros sistemas bacterianos pero desencadena esporulación cuando es aplicado en *Bacillus sp.* (19).

**Tabla 3:** Porcentaje de producción de PHB por distintos tipos de *Bacillus* utilizando diferentes fuentes de carbono.

<b>Cepa <i>Bacillus</i></b>	<b>Fuente de C</b>	<b>% PHB</b>	<b>Fuente</b>
cereus CFR06	almidón	48	37
megaterium OU303A	glicerol	62,43	38
megaterium OU303A	glucosa	58,63	38
sphaericus NCIM5149	polvo de semilla de jaca	19	8
subtilis 25	proteasa peptona	78,69	21
megaterium 12	proteasa peptona	77	21
cereus SPV	glucosa	38	23

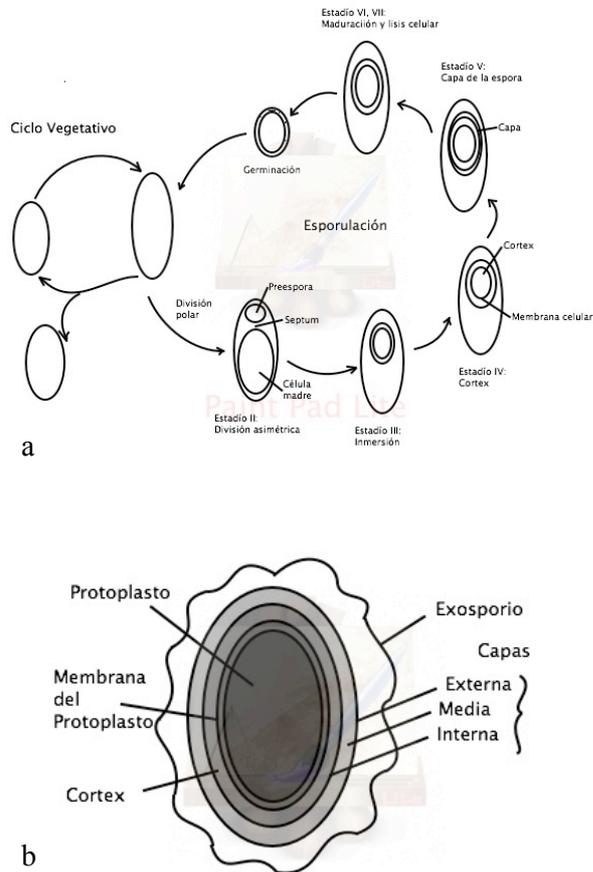
### **Esporulación:**

Los PHA pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía para el enquistamiento y la esporulación, para la degradación de compuestos tóxicos y como fuente de poder reductor (10). Es por eso que es importante entender este fenómeno.

La esporulación es un fenómeno mediante el cual una célula vegetativa desarrolla una estructura resistente a condiciones físicas adversas, que luego puede volver a resultar en una célula vegetativa activa cuando es puesta en contacto nuevamente en un medio favorable. Es característico de ciertos géneros bacterianos como por ejemplo *Clostridium* y *Bacillus* (38).

Consiste en la formación de una célula metabólicamente dormante conocida con el nombre de endoespora. La esporulación comienza con una separación asimétrica en la cual la célula es dividida en dos compartimentos conocidos como célula madre y preespora. Cada compartimento tiene una copia completa del genoma con expresión diferencial requerida para la correcta formación de la endoespora. La división asimétrica prosigue con la inmersión de la preespora en la célula madre. La preespora es luego cubierta por dos membranas (interna y externa) entre las cuales ocurre la síntesis de peptidoglicano. Luego se depositan proteínas de la capa que protegen la espora limitando permeabilidad y confiriendo resistencia a la lisozima. El estadio final de la esporulación es la lisis de la célula madre que libera a la

espora madura (40). Finalmente las esporas de algunas especies están cubiertas por exoesporio. Las esporas bacterianas pueden soportar pH extremos, temperatura, desecación, humedad y radiación que pueden rápidamente matar a la célula vegetativa (41).



**Figura 11:** a) Ciclo de la esporulación con los distintos estadios. b) Sección de una espora de *Bacillus*

Hay determinados factores que influyen en la formación de esporas. La temperatura de incubación es uno de los cuales afecta la velocidad con la cual se forman las esporas y sus propiedades. Condiciona también el crecimiento bacteriano, por lo tanto la cantidad de esporas que se va a obtener. El bajo pH puede impedir la formación de esporas, así como también la deficiencia en ciertos iones metálicos. También es importante el equilibrio carbono/nitrógeno ya que puede determinar o no la formación de esporas (42).

No se conoce con certeza cuál es la señal que induce a las células a esporular, pero es ampliamente aceptado que una deficiencia en los nutrientes en el medio puede desencadenar la esporulación. Además de esto, pueden existir otros mecanismos implicados como por ejemplo el Quorumsensing.

Quorumsensing (QS) se refiere a los sistemas de comunicación entre células que son utilizados por una gran variedad de microorganismos para censar su densidad celular. Este mecanismo está basado en la producción, secreción y detección de pequeñas moléculas señal cuya concentración se correlaciona a la abundancia de microorganismos que la secretan en las cercanías. Este mecanismo lleva a que, cuando pasa determinado umbral, los microorganismos sufren cambios coordinados en su perfil de expresión génica (43). Esto puede desencadenar la esporulación cada vez que el cultivo alcanza cierta densidad celular determinada, sin importar la composición del medio de cultivo ni las condiciones físicas mencionadas anteriormente.

**Objetivo general del trabajo:**

Estudio de la producción de polihidroxicanoatos (PHA) por parte de *Bacillus sp.* aislado por el Departamento de Bioingeniería de un efluente lácteo.

**Objetivos específicos:**

- Estudio del crecimiento del *Bacillus sp.* con diferentes sustratos.
- Optimización del medio de cultivo para el crecimiento de *Bacillus sp.*
- Optimización de la producción de PHB mediante la regulación de la relación C/N.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo:

La cepa de *Bacillus sp.* utilizada fue aislada por el Departamento de Bioingeniería de la Facultad de Ingeniería en el año 2002. El stock de *Bacillus sp.* se preservó en medio de cultivo TSB con 0,5mL de glicerol 20% congelado a -80°C en crioviales. La cepa se descongeló en placas de caldo nutritivo con agar y se realizó un resembrado cada 48 horas. La temperatura de crecimiento utilizada fue 35°C.

### Medio de cultivo base:

El medio de cultivo base utilizado fue: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4.45 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g/L, citrato de amonio y hierro (III) 0.06 g/L, CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01 g/L y 1 ml/L de metales traza. La fuente de carbono fue variando de acuerdo a los ensayos a realizar.

### Tinciones:

Se realizaron verificación de tinciones el seguimiento de los cultivos realizados a lo largo del trabajo. La tinción de Negro Sudán tiñe PHA y permite observar los acúmulos intracelulares que el microorganismo del polímero. El método de Schaeffer tiñe específicamente las esporas de verde y se utilizó para seguir la esporulación. Los microorganismos *Ralstonia eutropha* DSM 545 y *Bacillus megaterium* son los microorganismos de referencia para cada estructura de interés a observar. *Ralstonia eutropha* DSM 545 es un microorganismo productor de PHA por lo cual es el control

positivo para la tinción con Negro Sudán. Este microorganismo no esporula por lo tanto a su vez también constituye control negativo para el método de Shaeffer. *Bacillus megaterium* es el control negativo para la tinción de Negro Sudán dado que no es productor de PHA y es control positivo del método de Shaeffer ya que es un microorganismo que esporula.

Las técnicas de tinción Azul Nilo y Rojo Nilo se utilizan para visualizar en placa el contenido de PHA. Se baña la placa con el colorante y luego se observa con una lámpara UV a 254 nm. A modo de control se realizó tinción de cristal violeta (descripción de métodos de tinción y protocolos experimentales en anexo).

### **Seguimiento del trabajo:**

Las diferentes técnicas de tinción de frotis que se usaron a lo largo del trabajo fueron: tinción de Gram, Negro Sudán y método de Schaeffer. La tinción de Gram indica la diferencia entre microorganismos Gram positivos o Gram negativos y se utilizó a lo largo de todo el trabajo para verificar que el cultivo no estuviera contaminado.

En los casos de cultivo en placa, además de los frotis se realizó a cada placa un baño con azul Nilo y Rojo Nilo.

### **Evaluación de sustratos en placas de Petri:**

Se realizaron diferentes medios para verificar el crecimiento de *Bacillus sp.* Se utilizó el medio de cultivo base con diferentes fuentes de carbono: fructosa, glucosa, lactosa, glicerol, suero de leche y suero de leche ultrafiltrado. La concentración utilizada de fuentes de carbono fue 5 g/L. A su vez se realizaron medios con suero de leche y suero de leche ultrafiltrado

adicionados con 0,5 g/L de extracto de levadura. El glicerol utilizado para la realización de los medios fue glicerol para análisis Merck.

#### **Cultivo en placas con diferentes concentraciones de glicerol:**

Se realizaron cultivos de medio base en placas con agar y medio de cultivo base para verificar la posibilidad de crecimiento del microorganismo a diferentes concentraciones de glicerol. Las concentraciones de glicerol utilizadas son 3, 5, 10, 20 y 30 g/L.

#### **Cultivo en matraz:**

Se realizaron cultivos en escala de matraces de 2 L con medio líquido (300 mL) con diferentes concentraciones de glicerol: 1, 5, 10, 20 y 30 g/L. Los cultivos fueron incubados en agitador orbital a 250 rpm a una temperatura de 35°C durante 50 horas. Se tomaron muestras a intervalos de tiempo regulares para determinación de biomasa y sustrato remanente. El volumen total de las muestras tomadas no superó el 10% del medio total inicial.

#### **Inhibición de la esporulación:**

Se realizaron cultivos a escala de matraces de 2L con medio líquido base con 5 g/L de glicerol, adicionando respectivamente: 2M y  $1,3 \times 10^{-3}$  M EDTA, pH 7 y pH 5,5. Los cultivos fueron incubados en agitador orbital a 250 rpm a una temperatura de 35°C. Las muestras fueron tomadas a las 0, 26 y 44 horas.

## **Relación C/N:**

Se ensayaron las relaciones 2, 5, 11 y 17 por duplicado, dejando la concentración de la fuente de carbono constante (cálculos en anexo 4). Los cultivos fueron realizados en matraces de 2 L con medio líquido (300mL), se incubaron en agitador orbital a 250 rpm a una temperatura de 35°C. Las muestras fueron extraídas a intervalos regulares de tiempo, determinándose la concentración de biomasa y la concentración de amonio glicerol remanente y PHA.

## **Estudio de la influencia del extracto de levadura y el glicerol en la producción de PHA**

Se utilizó para la realización de este trabajo un diseño experimental que corresponde a un planeamiento factorial fraccionario con punto central. El mismo se realizó en una base de 7 matraces, uno de los cuales (el punto central) se realiza por triplicado para luego a partir del mismo calcular el error promedio para los matraces restantes. Este diseño nos permite alcanzar un buen estimativo de los errores en todo el experimento tomando como referencia los errores obtenidos en el punto central de las variables elegidas. El objetivo de la utilización del mismo es la reducción considerable de las réplicas de matraces a utilizar. Esta técnica puede ser utilizada solamente en variables cuantitativas, dado que para las variables cualitativas es imposible fijar un punto central, que va a ser la referencia del trabajo con respecto a el resto de los valores a considerar (44).

Se evaluaron las relaciones de glicerol: 5, 17,5 y 30 g/L (Tablas 1 y 2). Se adicionó a diferentes matraces extracto de levadura: 0,04, 0,52 y 1 g/L (Tablas 4 y 5). Los cultivos fueron realizados en matraces de 2 L en medio líquido (300 mL). Los cultivos fueron incubados en agitador orbital a 250 rpm a una temperatura de 35°C. Las muestras fueron extraídas a las 10, 16, y 28

horas respectivamente. Se les realizaron seguimiento de biomasa y amonio, PHA y sustrato remanente.

**Tabla 4:** Concentración en g/L de glicerol y extracto de levadura a utilizar en los diferentes matraces

	-1	0	1
Glicerol (g/L)	5	17,5	30
Extracto de levadura	0,04	0,52	1

El matraz -1 corresponde a 5g/L de glicerol, o 0,04 g/L de extracto de levadura. El matraz 0 corresponde a 17,5g/L de glicerol, o 0,52 g/L de extracto de levadura. El matraz 1 corresponde a 30g/L de glicerol, o 1g/L de extracto de levadura.

**Tabla 5:** Los matraces se encuentran enumerados del 1 al 7. A cada uno de ellos se le adjudicó una concentración de glicerol y extracto de levadura de acuerdo a lo enumerado en la tabla 4.

Matraces	1	2	3	4	5	6	7
Glicerol	-1	-1	1	1	0	0	0
Extracto	-1	1	-1	1	0	0	0

## **Procedimientos analíticos**

### **Cuantificación de Biomasa:**

La cuantificación de biomasa se realizó mediante la utilización de un espectrofotómetro. La espectrofotometría es el conjunto de procedimientos que utilizan la luz para medir concentraciones. Se hace incidir luz con determinada longitud de onda sobre una muestra y se mide la absorbancia o densidad óptica. Es un parámetro importante dado que es directamente proporcional a la concentración de la especie que absorbe la luz en la muestra siempre y cuando la medida caiga dentro del rango de linealidad (45).

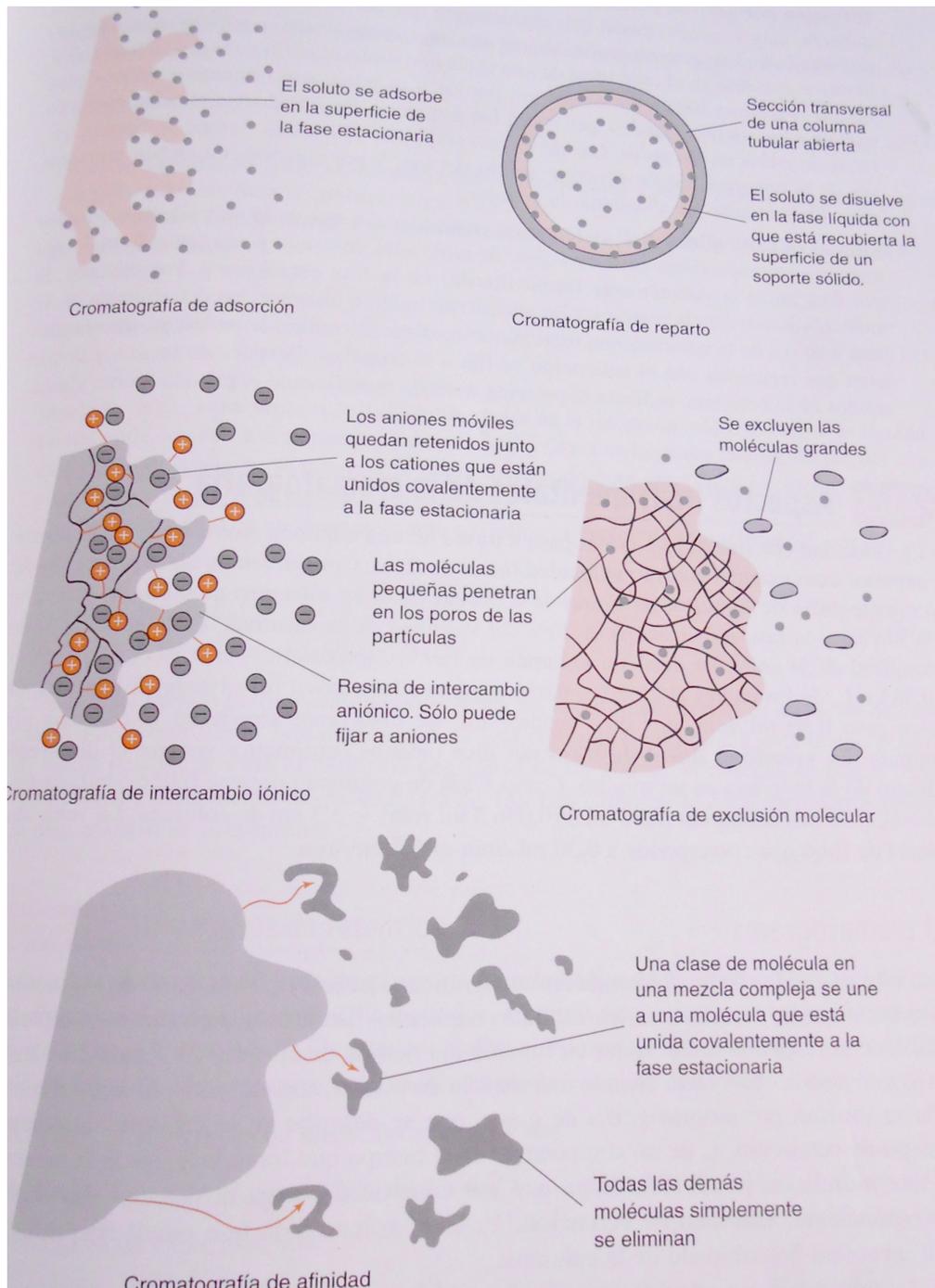
A los efectos de cuantificar la biomasa se realizó una curva de calibración relacionando las medidas de absorbancia obtenidas a un peso seco determinado. Luego se llevó a cabo el seguimiento del crecimiento del microorganismo mediante medidas de absorbancia en espectrofotómetro a 600 nm (protocolo experimental en anexo).

### **Cromatografía:**

La cromatografía es un método analítico que permite la separación de sustancias, así como también la identificación y determinación de componentes en mezclas complejas. Consiste en transportar la mezcla a separar en una fase móvil a través de una fase estacionaria. La separación de los componentes se basa en las diferentes velocidades de migración de los distintos componentes de la muestra (46).

Los mecanismos cromatográficos se caracterizan en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria. De esta forma se puede encontrar cromatografía de adsorción, de reparto, de intercambio iónico, de

exclusión molecular y de afinidad. Se puede observar un esquema de las mismas en la figura 12.



**Figura 12:** Principales tipos de cromatografía (45).

### **Cuantificación de glicerol:**

La concentración de glicerol se determinó mediante HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento. Es una técnica de separación cromatográfica de alto rendimiento que sucede en fase líquida. Una muestra se separa en sus componentes constitutivos mediante una distribución entre una fase móvil y una estacionaria. Utiliza columnas de partículas pequeñas a través de la cual se impulsa a circular la fase líquida con altas presiones. La separación se da de acuerdo a las constantes de reparto que presenta el analito entre la fase móvil y la estacionaria (47).

La pre columna utilizada fue KS-G y la columna KS-801 Shodex ambas para cuantificación de carbohidratos.

Las muestras a ser analizadas en el HPLC fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos (Protocolo experimental en anexo 3).

### **Cuantificación de PHA:**

Se realizaron ensayos de gravimetría para determinar cantidad de PHB. Posteriormente, esta tarea fue realizada mediante cromatografía de gas (GC, protocolos experimentales en anexo 3).

El análisis gravimétrico se basa en la medida de la masa de un producto mediante la cual se calcula la cantidad de analito que hay en una muestra. En este caso el analito, que es la especie a analizar corresponde a PHA (45).

La cromatografía gaseosa es una forma de cromatografía de partición en la cual la fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido. La muestra se inyecta en una fase gaseosa donde se volatiliza y traspasa a la fase líquida. Los componentes de la muestra quedan retenidos durante distinta

cantidad de tiempo en la fase móvil y estacionaria, dependiendo de sus afinidades relativas por estas fases. Los picos son detectados mediante la conversión de la concentración del componente en una señal eléctrica que se amplifica para cuantificar y monitorear el proceso de separación (48).

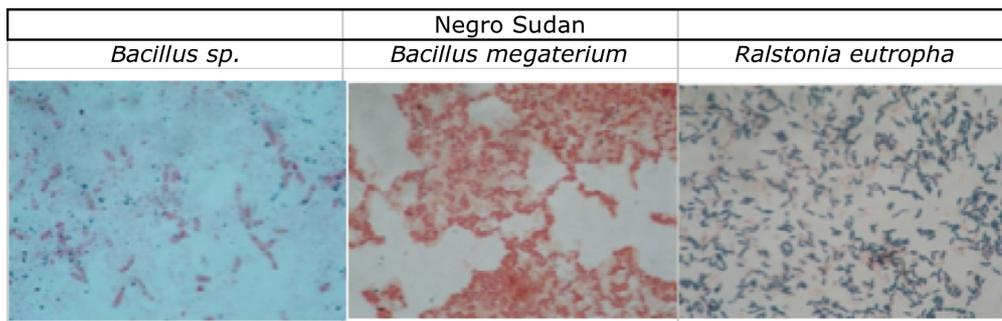
Se usó el cromatógrafo Shimadzu GC 14B, columna Agilent DB-wax de 30m, 0.25mm diámetro interno, 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de film. El gas carrier es  $\text{H}_2$ , la rampa de temperatura es: 80°C por 2 minutos, aumenta a 35°C/min hasta 160°C y se mantiene por 5 minutos, y aumenta a 35°C/min hasta 220°C por 2 minutos;  $T_{\text{detector}}=200^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{inyección}}=250^\circ\text{C}$  y volumen de inyección 1 $\mu\text{L}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Tinciones:

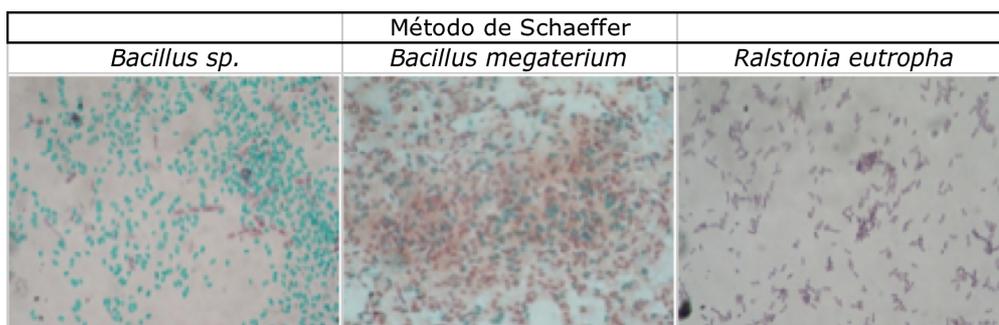
Se realizaron tinciones de Gram, Negro Sudán y método de Schaeffer para verificar la efectividad de los colorantes y del procedimiento aplicado que asegure la adecuada tinción de las estructuras celulares. Se utilizó *Ralstonia eutropha* DSM 545 y *Bacillus megaterium* como cepas de referencia. Se realizó una tinción de cada uno de estos microorganismos con las tinciones mencionadas. El objetivo de estos ensayos fue comparar la forma en la que se tiñen las estructuras en los microorganismos de referencia en comparación con la del microorganismo en estudio. El Negro Sudán es la tinción comúnmente utilizada para observar al microscopio óptico la presencia de lípidos, en este caso PHA. Los gránulos intracelulares que corresponden a PHA se ven teñidos de negro mientras que el resto de la célula se puede ver con una tinción rosada que corresponde al colorante para generar contraste (safranina). Cuando se compara el preparado realizado con el microorganismo de referencia y el de estudio, al observar estructuras coloreadas con la tinción de Negro Sudán se puede asegurar que se trata de PHA. Este también es el caso de la tinción con el método de Shaeffer que es especializada para detectar esporas. La tinción con el método de Shaeffer tiñe de verde las esporas y para generar contraste se utiliza el colorante fucsina, que deja a las células con un tono fucsia (49).

*Ralstonia eutropha* acumula gránulos intracelulares de PHA mientras que *Bacillus megaterium* no lo hace. Para la tinción con método de Schaeffer se espera que *Bacillus megaterium* y *Bacillus sp.* evidencien presencia de esporas, mientras que no es el caso para *Ralstonia eutropha* dado que este microorganismo no esporula. La tinción de cristal violeta ha sido realizada a modo de control para verificar morfología (49).



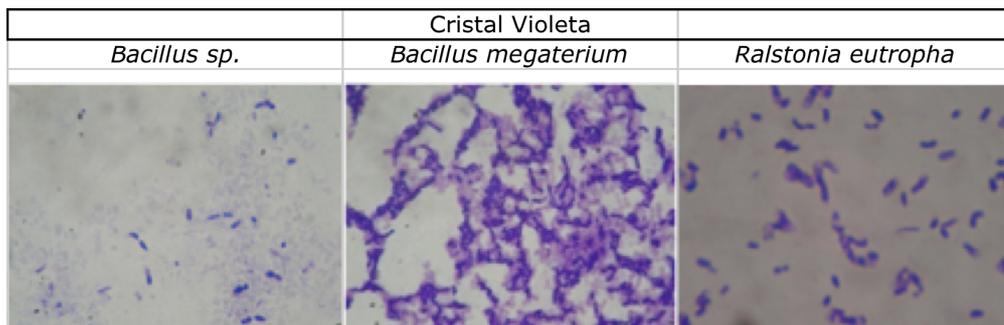
**Figura 13:** Fotografías tomadas de preparados de *Bacillus sp.*, *Bacillus megaterium* y *Ralstonia eutropha* teñidas con tinción de Negro Sudan, para observar presencia de PHA.

Como se observa en la figura 13 la tinción de *Bacillus megaterium* con Negro Sudán no reveló presencia de PHA. En el interior de algunas células no se tiñó con safranina, por lo que posiblemente corresponda a esporas. En el caso de *Bacillus sp.* cuando se observó la tinción de *Ralstonia eutropha* con Negro Sudán se evidenciaron células que presentaron inclusiones de PHA y otras que no. En *Bacillus sp.* con tinción de Negro Sudán aparecen estructuras sin coloración que corresponden posiblemente a esporas. La falta de coloración se presenta con una morfología característica de las esporas. Se observó presencia de gránulos negros intracelulares en toda la preparación celular que corresponden a gránulos de PHA. Las células vegetativas quedaron teñidas con safranina.



**Figura 14:** Fotografías tomadas de preparados de *Bacillus sp.*, *Bacillus megaterium* y *Ralstonia eutropha* teñidas con técnica de tinción con método de Schaeffer, para visualizar esporas.

En la figura 14 se exponen las fotografías que corresponden a la tinción con método de Schaeffer. En *Bacillus sp* y *Bacillus megaterium* se reveló la presencia de esporas intra celulares y esporas dispersas en el medio teñidas de color verde. Cuando se realizó con *Ralstonia eutropha* se pudo observar las células teñidas y presencia de PHA incoloro con esta tinción. La tinción con método de Schaeffer en este caso no reveló presencia de esporas.



**Figura 15:** Fotografías tomadas de preparados de *Bacillus sp*, *Bacillus megaterium* y *Ralstonia eutropha* teñidas con técnica de tinción Cristal Violeta.

Para la tinción de *Bacillus sp.* con Cristal violeta, en la figura 15 se puede observar las células vegetativas y las esporas que aparecen de forma translúcida. Cuando la tinción se realizó en *Bacillus megaterium* se pudo apreciar las células vegetativas con y sin esporas.

Se dedujo de los resultados obtenidos que las técnicas de tinción específicas en ningún caso se revelaron tinción cruzada de estructuras celulares.

## **Evaluación de sustratos en placas de Petri:**

Se realizaron cultivos con diferentes medios para verificar el crecimiento y producción de PHA del *Bacillus sp.* Las fuentes de carbono ensayadas fueron fructosa, glucosa, lactosa y glicerol. A su vez se realizaron otros medios con suero de leche y suero de leche ultra filtrado (adicionado y carente de extracto de levadura). Todas las fuentes de carbono fueron utilizadas en una concentración de 5 g/L. Como control se realizó un medio sin fuente de carbono.

Se observó crecimiento en las placas con fructosa, glucosa y glicerol como fuente de carbono. El crecimiento obtenido en placa de lactosa no fue significativo, comparado con el blanco de crecimiento sin fuente de carbono, por lo cual no se puede afirmar que *Bacillus sp.* consume lactosa en el medio realizado. Esto indicaría que *Bacillus sp.* no es portador del gen de la beta galactosidasa por lo cual no sería capaz de descomponer la lactosa en azúcares más simples para su utilización.

*Bacillus sp.* creció a partir de suero de leche desproteinizado , sin embargo no hubo crecimiento en el medio con lactosa como fuente de carbono. Esto indica la presencia de otra fuente de carbono en el medio. El tamaño del poro de la membrana utilizada para la remoción de proteínas del suero fue de 10KDa. *Bacillus sp.* pudo haber utilizado las proteínas que fueron capaces de atravesar el filtro como fuente de carbono. A su vez también existe la posibilidad de que proteínas con mayor tamaño que se encontraran en un estado desnaturalizado hayan sido capaces de atravesar la membrana. El medio utilizado contenía 0,06 g/L de citrato, un compuesto que podría haber sido utilizado por *Bacillus sp.* como fuente de carbono adicional, como sucede en *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis* (50).

Se realizó la tinción con Rojo Nilo en las placas de medio con fructosa, glucosa y glicerol como fuente de carbono. A su vez se realizaron otros cultivos con medios con suero de leche y suero de leche ultra filtrado

(adicionado y carente de extracto de levadura) donde hubo crecimiento. Se observó fluorescencia emitida, lo cual evidencia presencia de PHA en las colonias de *Bacillus sp.* Las tinciones de los frotis con Negro Sudán resultaron positivas en todos los casos. Los cultivos en placa con la tinción con baño de Azul Nilo no revelaron presencia de PHA en las colonias de la placa. Esto puede deberse a un deterioro del colorante por exposición a la luz del cromóforo.

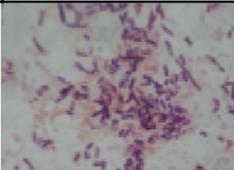
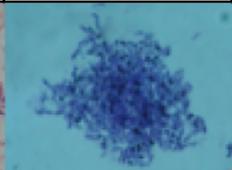
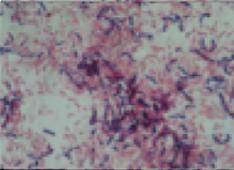
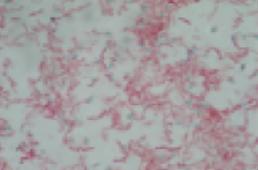
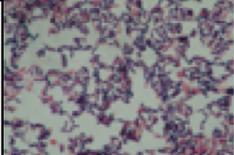
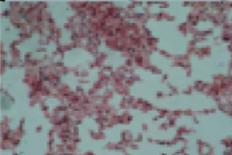
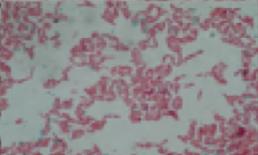
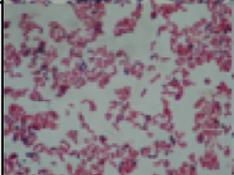
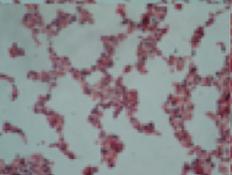
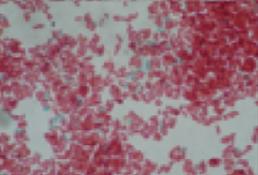
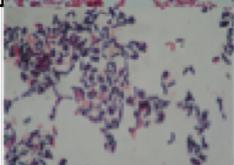
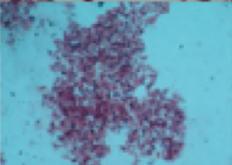
Considerando los resultados obtenidos bajo los distintos medios se observó que *Bacillus sp.* es productor de PHA a partir de fructosa, glucosa y glicerol como fuentes de carbono. *Bacillus sp.* creció con glicerol como fuente de carbono inclusive en ausencia de extracto de levadura. Se decidió realizar ensayos para hacer estudios más profundos, teniendo en cuenta que es de los sustratos más baratos a disposición.

### Cultivo en placas con diferentes concentraciones de glicerol:

Con el fin de estudiar el comportamiento de *Bacillus* sp frente al glicerol como fuente de carbono y energía se eligió un rango de concentraciones de glicerol entre 3 y 30 g/L. Se cultivó *Bacillus* sp. en placas con medio de cultivo base utilizando diferentes concentraciones de glicerol: 3 ,5 ,10 , 20 y 30 g/L . Se observó crecimiento en todas las placas y acumulación de PHA, verificado con tinción de Negro Sudán en un período de 48-72 horas.

En la tabla 6 se puede observar las tinciones obtenidas de los preparados realizados a partir de cada placa con las diferentes concentraciones de glicerol utilizadas y las distintas técnicas de tinción. Los cultivos fueron realizados en placas e incubados en estufa a 35°C.

**Tabla 6:** Frotis obtenidos con las distintas técnicas de tinción en diferentes concentraciones de glicerol.

Glicerol g/L	Gram	Negro Sudan	Shaeffer
3			
5			
10			
20			
30			

Se pudo observar que no hubo diferencias de índole morfológica a nivel de los frotis realizados a diferentes concentraciones de glicerol. No se observaron diferencias de producción de PHA o esporulación. La tinción de Negro Sudán reveló la presencia de inclusiones características que corresponden a la acumulación de PHA.

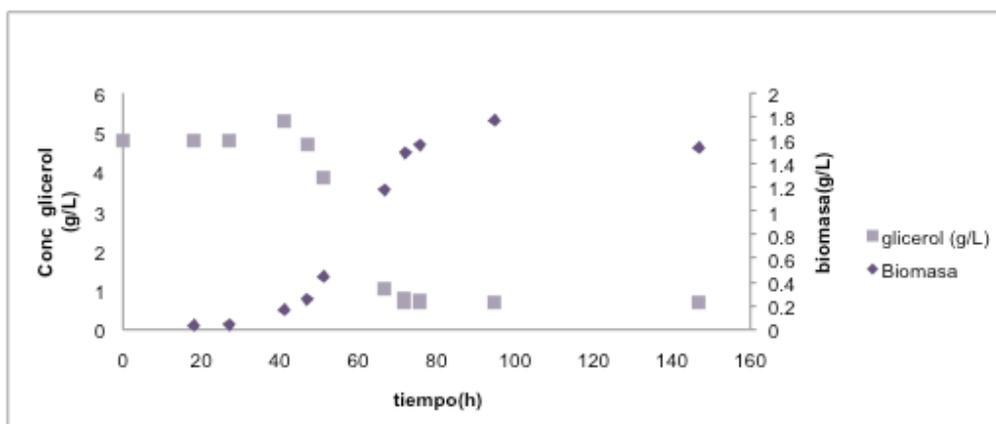
Se puede observar que en los frotis correspondientes a las tinciones de Gram hay algunas células que no consiguieron retener el colorante. Esto se debe a que a medida que el cultivo envejece, pierde la capacidad de la retención del mismo.

Dado que no se encontró ninguna diferencia visible en ningún parámetro concluimos que *Bacillus sp.* es capaz de crecer incluso en presencia de altas concentraciones de glicerol. A su vez *Bacillus sp.* acumula PHA en todas las concentraciones testeadas.

## Cultivo en matraz:

### Cuantificación del crecimiento con consumo de glicerol:

Se realizó un ensayo con una concentración de glicerol de 5 g/L para evaluar el consumo de glicerol y crecimiento de biomasa. En la figura 16 aparece la gráfica que ilustra la concentración de biomasa graficada en función del tiempo y la concentración de glicerol remanente.



**Figura 16:** Curva de crecimiento de *Bacillus sp.* Biomasa en función de tiempo y consumo de glicerol en función de tiempo.

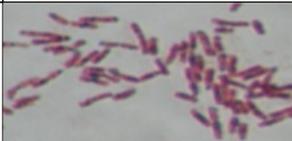
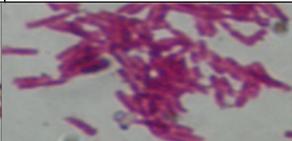
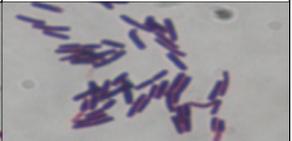
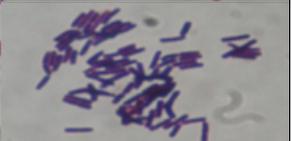
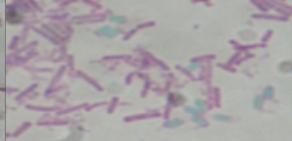
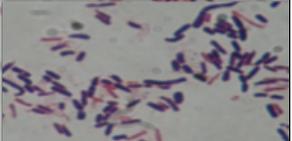
Se puede observar claramente como a medida que aumentó la biomasa consecuentemente disminuyó la concentración de glicerol en el medio. La cantidad de glicerol que se consumió fue 4,1 g/L aproximadamente, un 85% del valor inicial lo cual produjo 1,8 g/L de biomasa.

### Crecimiento con distintas concentraciones de glicerol:

Se realizó un ensayo a escala de matraces con concentraciones de glicerol de 1, 5, 10, 20 y 30 g/L. El objetivo fue observar la cantidad de biomasa producida de *Bacillus sp.* a partir de las distintas concentraciones así como también la concentración de glicerol consumida.

Podemos observar en las imágenes obtenidas que se encuentran en las tablas 7, 8, 9, 10 y 11 con diferentes concentraciones de glicerol que no hay diferencias significativas a nivel de morfología y presencia de esporas en los cultivos. Esto concuerda con los ensayos en placa, confirmando la capacidad de *Bacillus sp* para crecer en todo el rango de concentraciones de glicerol testeadas. Se observó en todos los casos esporulación a lo largo de todo el tiempo de cultivo.

**Tabla 7:** Foto de preparados de las distintas muestras obtenidas para el medio con 1 g/L de glicerol con tinción de Negro Sudan, método de Schaeffer y Gram.

1	Negro Sudan	Schaeffer	Gram
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
Muestra 4			

**Tabla 8:** Foto de preparados de las distintas muestras obtenidas para el medio con 5 g/L de glicerol con tinción de Negro Sudan, método de Schaeffer y Gram.

5	Negro Sudan	Shaeffer	Gram
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
Muestra 4			

**Tabla 9:** Foto de preparados de las distintas muestras obtenidas para el medio con 10 g/L de glicerol con tinción de Negro Sudan, método de Schaeffer y Gram.

10	Negro Sudan	Shaeffer	Gram
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
Muestra 4			

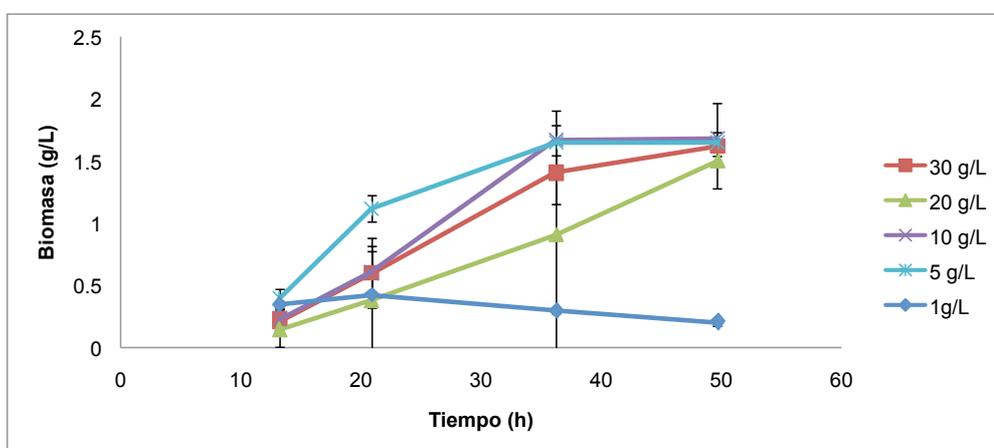
**Tabla 10:** Foto de preparados de las distintas muestras obtenidas para el medio con 20 g/L de glicerol con tinción de Negro Sudan, método de Schaeffer y Gram.

20	Negro Sudan	Shaeffer	Gram
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
Muestra 4			

**Tabla 11:** Foto de preparados de las distintas muestras obtenidas para el medio con 30 g/L de glicerol con tinción de Negro Sudan, método de Schaeffer y Gram.

30	Negro Sudan	Shaeffer	Gram
Muestra 1			
Muestra 2			
Muestra 3			
Muestra 4			

En la figura 17 se puede observar que cuando la concentración inicial de glicerol fue de 1g/L, se obtuvo menor crecimiento. Hubo un leve aumento de la biomasa a las 20 horas de cultivo llegando a un máximo de 0,4 g/L. El crecimiento observado, está de acuerdo con la disminución del glicerol a las 20 horas, llegando a una concentración próxima al límite inferior de cuantificación del método a partir de ese tiempo, como se muestra en la figura 18. El glicerol fue el sustrato limitante para el crecimiento de *Bacillus sp* en esta condición.

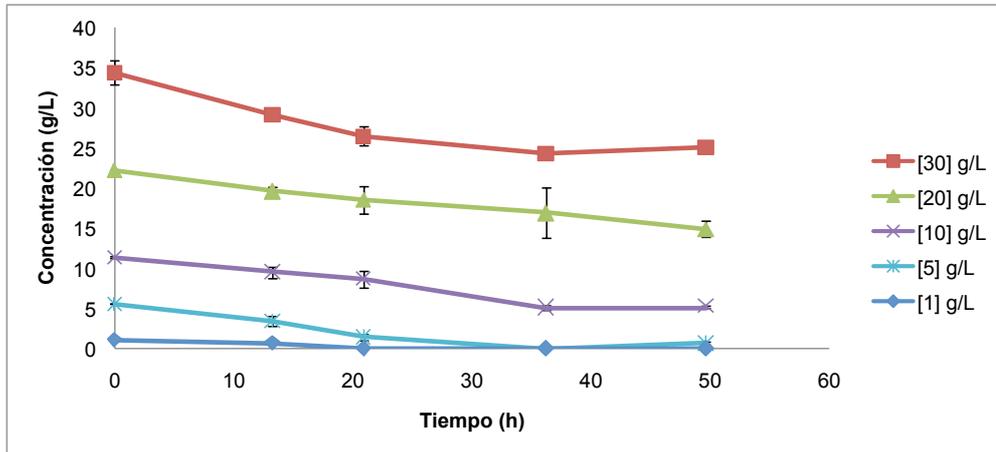


**Figura 17:** Concentración de biomasa en función de tiempo de los matraces cuyos medios se encuentran realizados con diferentes concentraciones de glicerol (1, 5, 10, 20 y 30 g/L).

Para el ensayo con una concentración inicial de 5 g/L de glicerol, se alcanzó a las 36 horas un crecimiento de 1,6 g/L de biomasa que coincidió con una concentración de glicerol remanente próxima al límite de detección del método de cuantificación.

En los ensayos a concentraciones de 10, 20 y 30 g/L, se observó una velocidad de crecimiento menor, dado que a las 20 horas se obtuvieron concentraciones de biomasa menores que para el caso de 5 g/L de glicerol. A partir de las 36 horas no se observaron diferencias significativas, salvo para el caso de 20 g/L de glicerol que alcanzó el nivel de biomasa máxima a

las 50 horas de cultivo. En la Figura 18, se observa que para las concentraciones iniciales de glicerol mencionadas, siempre existió glicerol residual, registrándose un consumo de 5, 7 y 10 g/L de glicerol (figura 18).



**Figura 18:** Disminución de la concentración de glicerol remanente en los diferentes medios con distintas concentraciones de glicerol en función de tiempo (en horas).

Los rendimientos de producción de biomasa en función del glicerol consumido ( $Y_{x/s}$ ) para cada uno de los ensayos, se presentaron en la tabla 12. El mayor rendimiento de biomasa (0,25 g biomasa/g glicerol) se obtuvo para la concentración 5 g/L de glicerol en el medio de cultivo.

**Tabla 12:** Rendimientos de producción de biomasa en función del glicerol consumido.

Glicerol (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)
1	0.09
5	0.25
10	0.23
20	0.18
30	0.15

En este grupo de ensayos no se observó una inhibición del crecimiento al aumentar la concentración de glicerol inicial. Debido a que la fuente de carbono estuvo en exceso en los ensayos con concentraciones superiores a 5 g/L, el crecimiento obtenido podría estar limitado por algún otro nutriente que no se encuentre en la cantidad suficiente en el medio definido presentado en la sección anterior. El medio formulado fue un medio base, por lo que para lograr mayores rendimientos se debe identificar el compuesto limitante para suplementarlo. Otra opción a considerar es la utilización de medios complejos (19, 51 y 52 ).

Dado que se observaron diferentes consumos de glicerol para los ensayos de 10, 20 y 30 g/L, y se obtuvo una concentración de biomasa similar, se podría inferir que el flujo de carbono se dirige por vías metabólicas que no implican la producción de biomasa. Como se puede ver en la figura 10, el glicerol luego que es convertido a Acetil coenzima A puede ya sea seguir su camino para transformarse en PHA o entrar en el ciclo de Krebs.

Para estudiar la acumulación de PHA por parte del *Bacillus* sp, se tomó la concentración de 5 g/L de glicerol, ya que a dicha concentración se obtuvo el mayor  $Y_{x/s}$ . Esto se refleja en una menor cantidad de sustrato utilizada para producir una cantidad de biomasa similar. A su vez esta condición genera una menor cantidad de sustrato remanente. De esta forma se aprovecha de forma más eficiente el glicerol del medio.

## **Inhibición de la esporulación:**

Uno de los problemas más importantes fue la esporulación de *Bacillus sp.* Se observó que con todas las concentraciones de glicerol utilizadas hubo esporulación, como se puede ver en las tablas 7, 8, 9, 10 y 11. Esta situación resultó en la búsqueda de distintas estrategias para poder alcanzar una disminución de la esporulación. La solución de este problema podría repercutir en un aumento de la acumulación de PHA ya que está ampliamente estudiado que la energía almacenada en forma de gránulos de PHB puede ser utilizada también para esporulación (10).

P. Sanchez Franco y B. Regueiro, 1964 realizaron estudios sobre la esporulación en *Bacillus subtilis* en los que se ha visto que el pH y la presencia de EDTA afectan la esporulación. El pH no tendría un impacto importante en el crecimiento vegetativo pero podría llegar a impedir la formación de esporas. La deficiencia en ciertos iones metálicos si bien podría limitar la esporulación también podría tener un efecto en el crecimiento (42). S. P. Valappil et al, 2007 ha reportado que condiciones de bajo pH inhiben la utilización del polímero así como la esporulación en *Bacillus cereus* T, posiblemente debido a la inhibición de la despolimerización, previniendo de esta forma la degradación del PHA generado (19).

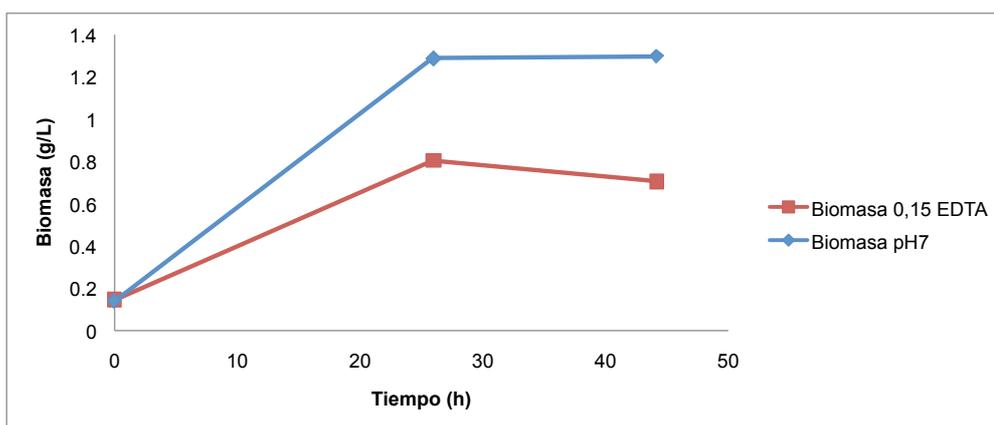
Se realizaron diferentes ensayos variando el pH entre 7 y 5,5. A su vez se realizaron ensayos con concentraciones de EDTA 2M y  $1,3 \times 10^{-3}$  M.

En el cultivo adicionado con EDTA 2M se obtuvo escaso crecimiento, por lo que se determinó que dicha concentración fue inhibitoria. Dado que el EDTA es un agente quelante, podría estar interfiriendo con la absorción por parte del microorganismo de algún metal traza, necesario para el crecimiento y óptimo desarrollo del mismo (42). Observaciones al microscopio de preparados realizados con tinción de Gram y Negro Sudan revelaron una estructura celular deteriorada que se vió reflejada en un menor tamaño

celular y distinta forma del *Bacillus sp.* Los preparados con el método de Schaeffer no revelaron presencia de esporas.

Para el pH 5,5 también se obtuvo escaso crecimiento, aunque los preparados al microscopio revelaron una estructura celular similar a la obtenida a pH 7. Los preparados se caracterizaron por una mayor intensidad de coloración, lo que puede deberse a una mejor retención del colorante en la pared celular.

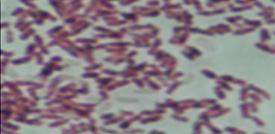
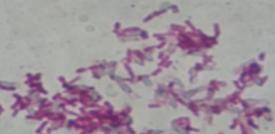
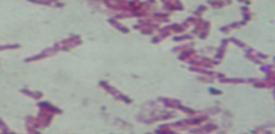
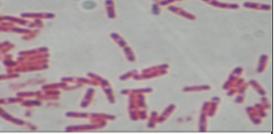
Se obtuvo un máximo de biomasa de 0,8 g/L en el medio con  $1,3 \times 10^{-3}$  EDTA a las 26 horas, y en el caso del control realizado a pH 7 se obtuvo un máximo de 1,2 g/L de biomasa entre las 26 y 44 horas (figura 18).



**Fig 19:** Concentración de biomasa en función de tiempo a pH7 (control, color azul) y  $0,15 \times 10^{-3}$  M EDTA (rojo).

En la tabla 13, se puede observar los preparados obtenidos con las distintas tinciones utilizadas en los distintos casos. Todas las condiciones probadas resultaron en una disminución de la esporulación que fue observada en los preparados obtenidos con las tinciones correspondientes. En todas las condiciones se obtuvo acumulación del polímero por parte del *Bacillus sp.*

**Tabla 13:** Fotos de los preparados realizados con distintas tinciones aplicadas de las condiciones testeadas: pH7 (control); pH5,5 ; EDTA 0,15 y EDTA 1,3.

	Negro Sudan	Shaeffer	Gram
pH 7			S/F
pH 5,5			
EDTA 0,15			S/F
EDTA 1,3	S/F	S/F	

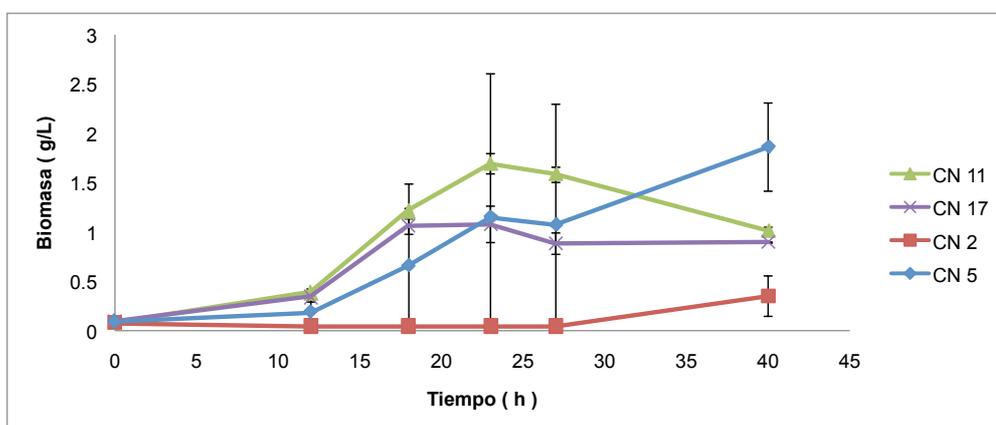
Mona K. Gouda et al y P. Sanchez Franco y B. Regueiro realizaron estudios en *Bacillus sp.* en los cuales reportaron que los valores de pH fluctuantes no generan un efecto notorio en el crecimiento ni producción de PHAs (16,42). A diferencia de los resultados presentados en estos estudios, el pH utilizado resultó inhibitorio para el crecimiento en *Bacillus sp.* dado que no generó una biomasa considerable.

Los resultados obtenidos no permiten la aplicación a futuro de las condiciones utilizadas. Esto se debe a que el crecimiento alcanzado con las condiciones que inhiben la esporulación del cultivo no permitieron una concentración de biomasa mayor a 0,8 g/L en comparación a los 1,2 g/L obtenidos en el control.

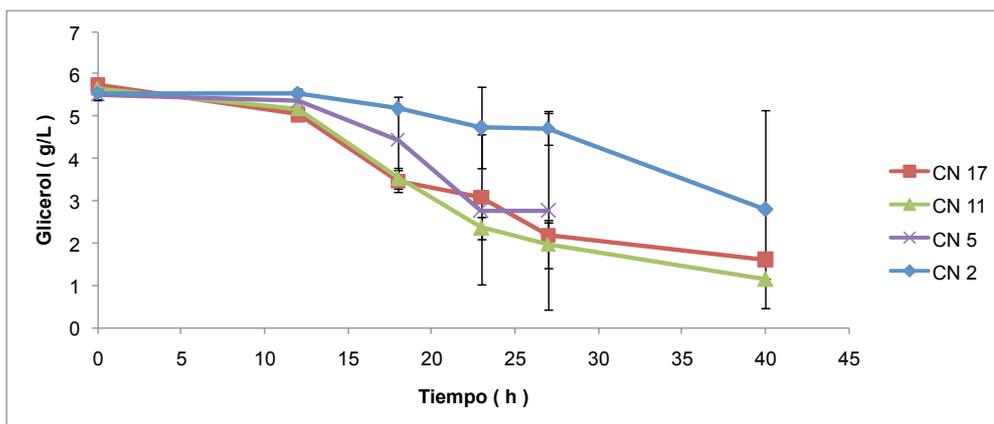
## Relación C/N:

Varios trabajos con bacterias del género *Bacillus* han reportado la importancia de la relación C/N en la capacidad de acumular PHA ( 21 y 52 ). Se ensayaron las relaciones C/N: 2, 5, 11 y 17 para evaluar la influencia en la generación de biomasa y acumulación de PHA para el *Bacillus sp.*,

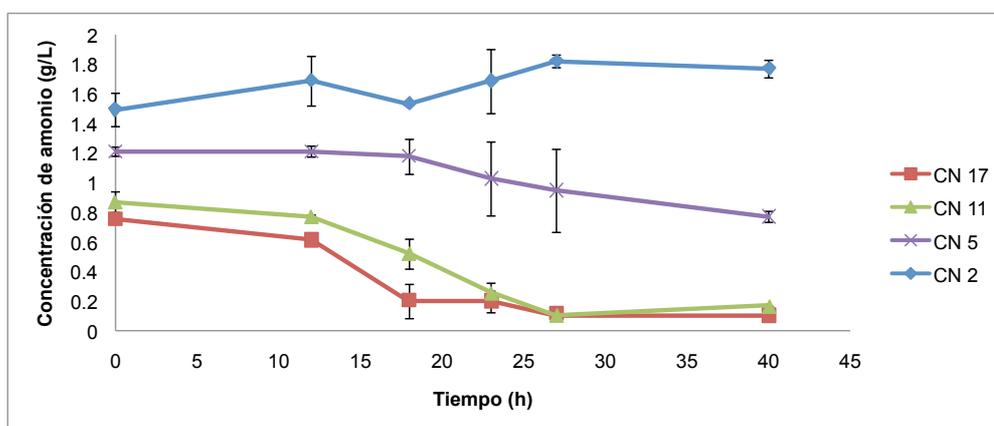
En las Figuras 20, 21 y 22 se presentan la biomasa producida para cada relación C/N, el consumo de glicerol y el amonio remanente.



**Figura 20:** Curva de crecimiento del *Bacillus sp.* para las distintas relaciones C/N.



**Figura 21:** Consumo de glicerol en función de tiempo para las distintas relaciones C/N.



**Figura 22:** Variación de la concentración de amonio en el medio para las distintas concentraciones C/N.

A la relación C/N 2 le corresponde la mayor concentración de amonio inicial. El crecimiento obtenido fue menor al registrado en los ensayos anteriores. Esto no se explica por limitación de nutrientes dado que el N se encontraba en exceso y el resto de los componentes se mantuvieron en las concentraciones especificadas. La concentración mínima inhibitoria de crecimiento de fuente de nitrógeno depende del origen de la fuente y de cada microorganismo. La inhibición por sulfato de amonio ya ha sido reportada con anterioridad en *Bacillus. sp.* Sabra *et. al*, 2008 reportó que concentraciones de amonio mayores a 0,4 g/L inhiben el crecimiento y

puede ser responsable del comienzo de la fase estacionaria de *Bacillus megaterium* (54). Las concentraciones utilizadas se encontraron en el rango entre 0,8 y 1,5 g/L aproximadamente por lo cual se puede considerar que podría ser inhibitoria explicando de esta forma el comportamiento observado.

Al aumentar la relación C/N a un valor de 5, es decir disminuir la concentración de N con respecto al C, se obtuvo la máxima cantidad de biomasa formada, llegando a valores de 2,2 g/L, con una remoción del 83% del glicerol (figura 21). El consumo de amonio se midió a las 40 horas y fue de aproximadamente 0,45 g/L, que corresponde a un 37%.

En las figuras 20 y 22, se observa que las relaciones de C/N 11 y 17, presentaron un comportamiento similar en lo que respecta a la formación de biomasa y el consumo de amonio. En ambos casos se llegó a una concentración de biomasa máxima a las 20 horas de cultivo, con valores de 1,7 y 1,1 g/L, para C/N 11 y 17 respectivamente. A dichos tiempos también se observó la máxima remoción de amonio, permaneciendo la concentración residual sin variación hasta el final del tiempo de cultivo. El consumo máximo de amonio fue de 0,7 g/L y 0,65 g/L respectivamente. Al aumentar la relación C/N, la cantidad de N agregado es menor. La cantidad de carbono y amonio consumido es muy similar, lo que hace suponer un cambio en la composición celular o en el metabolismo del microorganismo dado que las biomásas obtenidas difieren en 0,6 g/L.

La fuente de nitrógeno se comportó como sustrato limitante para las relaciones C/N 11 y 17. En el caso de la relación C/N 2, el sulfato de amonio pudo haber actuado como inhibidor del crecimiento. La relación C/N que permitió alcanzar una mayor concentración de biomasa fue la de 5 g/L .

En lo que respecta a la producción de PHA, se observó que los valores obtenidos por cromatografía gaseosa fueron muy bajos, encontrándose por encima del nivel de detección pero por debajo del nivel de cuantificación.

En todos los preparados realizados en los cultivos se verificó presencia de PHA con tinción de Negro Sudán. Debido a la baja proporción de PHA, no fue posible una cuantificación certera. El mayor porcentaje de acumulación de PHA se determinó en la relación C/N 5, siendo de 5 % masa/masa con respecto a la biomasa seca. Las relaciones de C/N menores, producen incluso menor acumulación de PHA.

A lo largo de todos los cultivos se verificó presencia de esporas mediante la tinción de frotis con el método de Schaeffer. Wu et al, 2001 (55), mostró que a diferencia de los cultivos estándar para la producción de PHA con altas relaciones C/N (por ejemplo *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida*, etc.), en *Bacillus* sp. es difícil promover la acumulación de PHA, dado que esas situaciones inducen la esporulación.

Por todo lo anteriormente mencionado, la concentración de PHA producida por esta bacteria, bajo las condiciones estudiadas fue muy reducida. Se debe seguir estudiando otras condiciones que afectan el crecimiento y acumulación de PHA si hay interés en trabajar con este microorganismo.

## Estudio de la influencia del extracto de levadura y el glicerol en la producción de PHA

Se utilizó un diseño experimental factorial  $2^2$  con punto central con el objetivo determinar la influencia del extracto de levadura y el glicerol en la producción de PHA por parte de *Bacillus sp.* Este diseño consistió en el estudio de 2 variables: concentración de glicerol y extracto de levadura. Estas variables fueron estudiadas en dos niveles, 5 y 30 g/L para glicerol y 0,04 y 1 g/L para extracto de levadura, como se puede observar en la tabla 14. El punto central del diseño experimental corresponde a 17,5 g/L de glicerol y 0,52 g/L para el extracto de levadura y se hizo por triplicado. La realización del triplicado en el punto central permite estimar el error en dicha condición para luego extrapolarlo a las restantes condiciones del diseño.

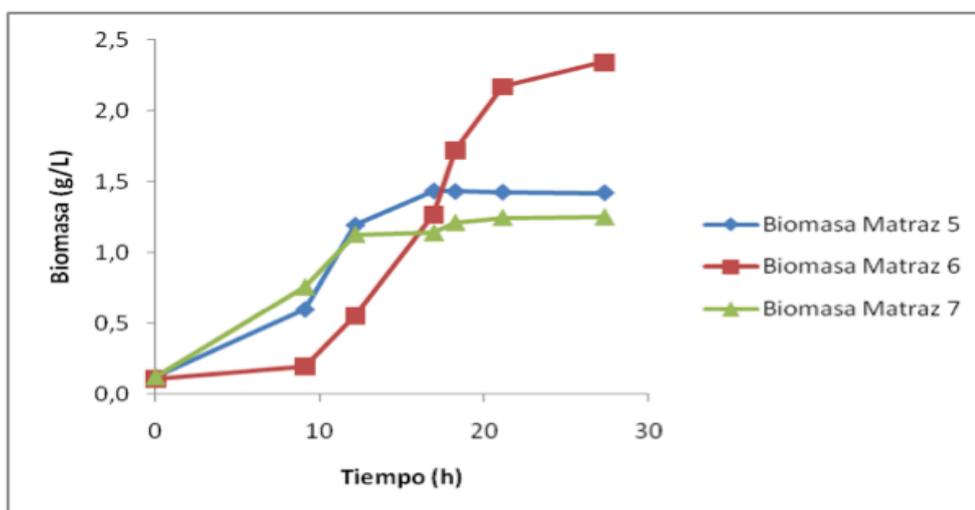
**Tabla 14:** Valores máximos obtenidos de biomasa para cada condición.

Matraz	Diseño		Glicerol	Levadura	valor max biom
1	-1	-1	5	0,04	0,74
2	-1	1	5	1	2,06
3	1	-1	30	0,04	0,88
4	1	1	30	1	1,66
5	0	0	17,5	0,52	1,42
6	0	0	17,5	0,52	2,34
7	0	0	17,5	0,52	1,25

\*Los datos de glicerol, Levadura y biomasa se encuentran en g/L.

En la tabla 14 se pueden observar los valores máximos de biomasa obtenidos para los distintos matraces. Los valores varían desde 0,74 g/L para el matraz 1 hasta 2,34 g/L para el matraz 6. Los valores mínimos (matraz 1 y 3) corresponden ambos para los matraces cuya cantidad de levadura en el medio de cultivo es menor (0,04 g/L).

En la figura 23 se puede observar los resultados que corresponden al triplicado del punto central. La biomasa obtenida en matraces 5 y 7 siguen la misma tendencia, mientras que en el matraz 6 llega a valores más elevados. Debido a la dispersión obtenida en los valores de biomasa el análisis estadístico de los mismos no conduce a un ajuste del modelo estadísticamente significativo.



**Figura 23:** Curvas de crecimiento obtenidas por absorbancia para 17,5 g/L de glicerol y 0,52 g/L de extracto de levadura por triplicado.

Al comparar los resultados obtenidos en ensayos anteriores, en los cuales se utiliza 5 g/L de glicerol como fuente de carbono y se realizan en ausencia total de extracto de levadura, se puede observar que no hay gran diferencia entre las biomasa máximas obtenidas (tabla 15).

**Tabla 15:** Rendimientos obtenidos de biomasa con distintas concentraciones de glicerol y extracto de levadura.

E. Levadura (g/L)	Glicerol (g/L)	Biomasa máx. (g/L)
0,04	5	0,74
0,04	30	0,88
0	5	1,60
0	30	1,60

Para el caso del glicerol en la tabla 15 se puede observar que no hay una diferencia importante entre el matraz de 5 g/L y el de 30 g/L. Si se compara estos resultados con ensayos anteriores, se podría inferir que la adición de pequeñas cantidades de levadura al medio no favorecen la formación de biomasa, dado que en ausencia de extracto de levadura las biomásas alcanzadas son mayores. Esta comparación resulta en un replanteo de la necesidad de adicionar el extracto de levadura al medio dado que no repercute en ningún beneficio directo con respecto a la biomasa.

El análisis estadístico del diseño experimental para la respuesta biomasa determina que el modelo empleado no es estadísticamente significativo y no representa la relación entre los factores evaluados (glicerol y extracto de levadura) y la respuesta evaluada (biomasa).

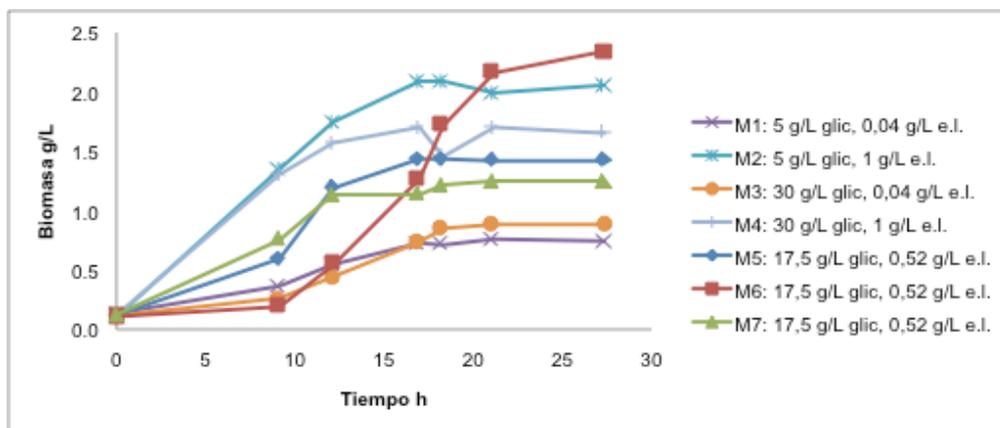
Los resultados del porcentaje de PHA fueron tomados a las 12 horas de cultivo debido a que la biomasa alcanzada antes de las 12 horas resulta insuficiente y luego de las mismas el cultivo entra en fase estacionaria. Los valores se presentan en la tabla 16 y alcanzan un máximo de 4,8%. El contenido de PHA de los matraces 1 y 3 se encuentran por debajo del límite de determinación del equipo.

**Tabla 16:** Resultados por matraz del porcentaje obtenido de PHB a las 12 horas.

<b>Matraz</b>	<b>Biomasa (g/L)</b>	<b>% PHB</b>	<b>Glicerol (g/L)</b>	<b>Levadura (g/L)</b>
1	0,54	0	5	0,04
2	1,74	4,8	5	1
3	0,44	0	30	0,04
4	1,57	3,3	30	1
5	1,19	2,7	17,5	0,52
6	0,56	3,1	17,5	0,52
7	1,13	3,6	17,5	0,52

En la figura 24 se observa la tendencia de las curvas de crecimiento obtenidas para cada matraz, ilustrando lo anteriormente discutido para la tabla 16.

Se realizó un análisis de significancia estadística sobre los valores obtenidos para el porcentaje de PHA a las 12 horas de cultivo (tabla 16). El análisis estadístico se basa en un modelo lineal de la forma  $ax+by+cxy+d=\%PHA$  en el cual la variable  $x$  corresponde a los valores de glicerol codificados en tabla (0, 1 y -1) y los valores de  $y$  corresponden al extracto de levadura reducidos a sus valores codificados en tabla.



**Figura 24:** Biomasa generada en las diferentes concentraciones testeadas.

Análisis de los efectos:

Se realiza mediante el Test t-student, los efectos se consideran estadísticamente significativos para un nivel de confianza de 95% (p 0,05). Los resultados del análisis se presentan en la tabla 17. El efecto de la concentración de glicerol y efecto de interacción entre concentración de glicerol y extracto de levadura no son estadísticamente significativos (P> 0,05) y no inciden sobre la respuesta (% PHA). De esta forma el porcentaje de PHA obtenido es independiente de la concentración de glicerol en el rango de concentraciones evaluado. El efecto de la concentración de levadura es estadísticamente significativo (p<0,05) siendo la incidencia sobre respuesta positiva. A mayor concentración de extracto de levadura (dentro del rango evaluado) se obtiene un mayor porcentaje de acumulación de PHA.

El efecto de curvatura no es significativo estadísticamente por lo que no existen mínimos o máximos significativos dentro de los límites evaluados y la relación entre la variable y respuesta es de tipo lineal. Modelo obtenido: %PHB= 4,05 x Conc Lev (codificada) + 2,025.

**Tabla 17:** Análisis de los efectos.

	Effect	Std.Err.	t(3)	p
<b>Mean/Interc.</b>	2,500000	0,345894	7,227642	0,005462
<b>(1)Glicerol</b>	-0,750000	0,915150	-0,819538	0,472527
<b>(2)Levadura</b>	4,050000	0,915150	4,425503	0,021429
<b>1 by 2</b>	-0,750000	0,915150	-0,819538	0,472527

\* La columna de efectos corresponde a los coeficientes de la ecuación del modelo: ax+by+cxy+d=%PHA. El efecto de interacción corresponde al término xy que tiene en cuenta el efecto conjunto del glicerol y el extracto de levadura. El término independiente corresponde a la media.

### Análisis de varianza:

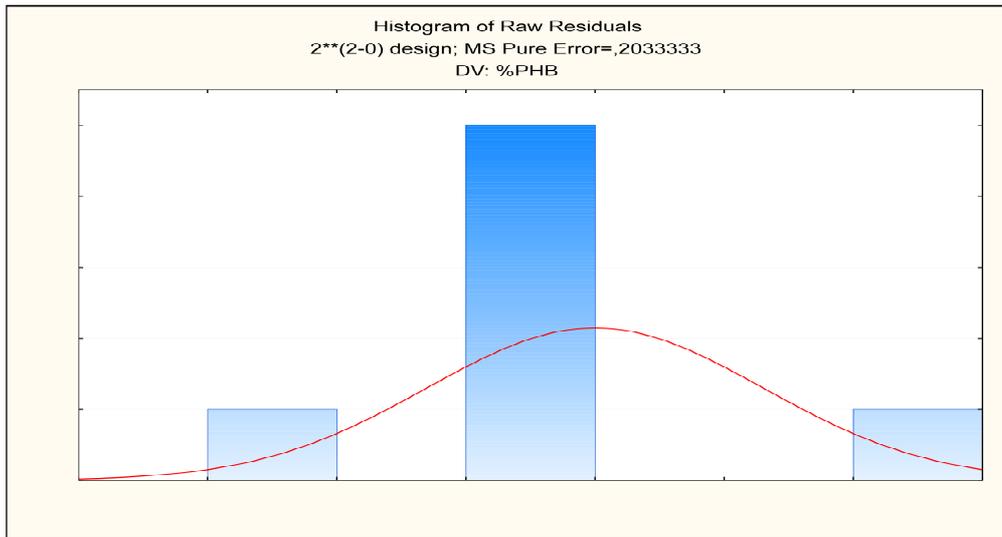
Se realiza mediante el test de Fisher y corresponde al análisis del modelo. Se puede observar los resultados del análisis en la tabla 17. Este análisis brinda información acerca de cuán estadísticamente significativo es el modelo planteado. Al observar los valores de p para el extracto de levadura se puede deducir que esta variable es la única con significancia sobre la producción de PHA.

**Tabla 18:** ANOVA ,análisis de varianza.

	SS	df	MS	F	p
(1)Glicerol	0,56250	1	0,56250	0,67164	0,472527
(2)Levadura	16,40250	1	16,40250	19,58507	0,021429
1 by 2	0,56250	1	0,56250	0,67164	0,472527
Error	2,51250	3	0,83750		
Total SS	20,04000	6			

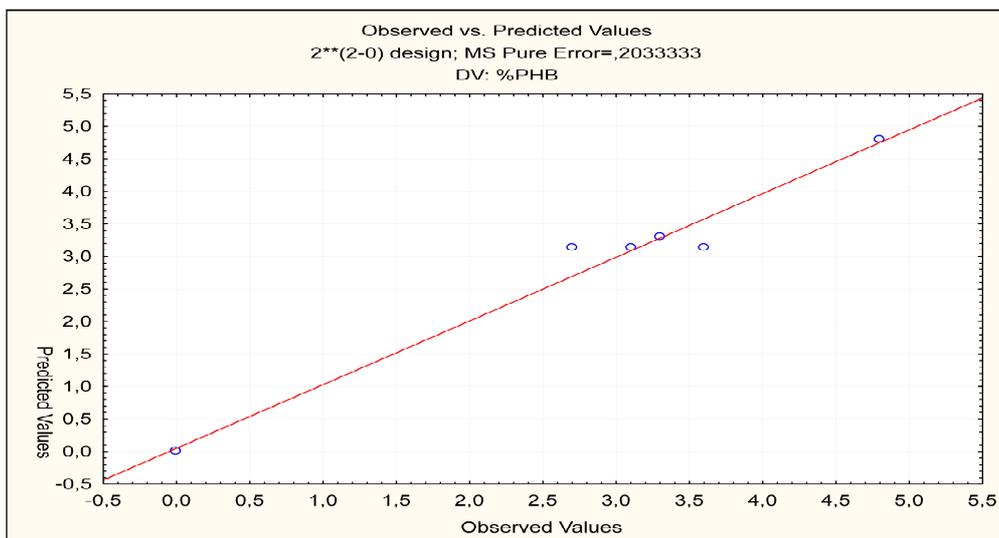
### Análisis de residuos:

Los residuos son la diferencia entre el valor observado y el valor que da el modelo. En el histograma que aparece en la figura 25 se puede observar que los residuos tienen una distribución normal que corresponden a una distribución de Gauss, lo cual valida el modelo.



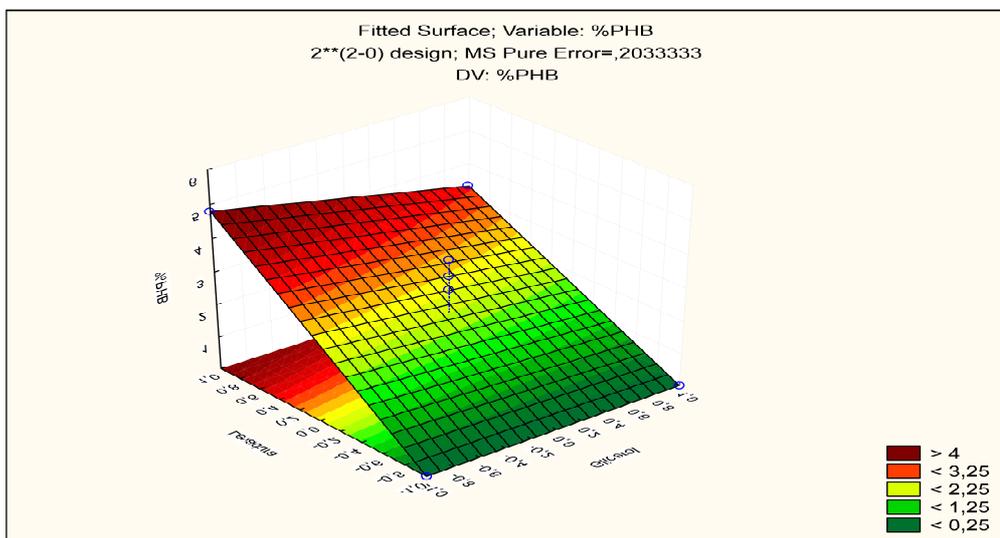
**Figura 25:** Histograma de la distribución de los datos obtenidos.

En la figura 26 se puede observar la grafica de los valores predichos por el modelo contra los valores obtenidos. El ajuste de la recta presentó un  $R^2$  de 0,97, ajustando a una recta la relación entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo.



**Figura 26:** Valores predichos por el modelo en función de los valores observados.

En la figura 27 se esquematiza en 3D la correlación PHA, levadura y glicerol. Los círculos corresponden a las observaciones realizadas. Es una proyección del programa entre -1 y 1 que corresponde a los valores asignados a las variables observadas. Se puede observar en el diagrama que independientemente del nivel de glicerol se mantiene el mismo valor. En este caso un valor determinado tiene su correspondencia con un color dado. A medida que va aumentando varía un poco pero se puede concluir que es estadísticamente independiente de la concentración de glicerol.



**Figura 27:** Gráfico de correlación PHA-Levadura-Glicerol.

## CONCLUSIONES

Se considera que *Bacillus sp.* es productor de PHA pudiendo utilizar para ello distintas fuentes de carbono como ser suero de leche con extracto de levadura, suero de leche desproteínizado con y sin extracto de levadura, fructosa, glucosa y glicerol.

Se probó que el microorganismo es capaz de crecer a partir de glicerol como fuente de carbono. Se observó que no hubo diferencias a nivel de crecimiento, producción de PHA o esporulación en los preparados realizados en placa con diferentes concentraciones de glicerol.

Se realizaron cultivos líquidos a diferentes concentraciones de glicerol. El mayor rendimiento de biomasa fue 0,25 g/g y se obtuvo para la concentración 5 g/L de glicerol en el medio de cultivo líquido.

En todas las condiciones probadas para disminuir la esporulación se obtuvo acumulación del polímero por parte del *Bacillus sp.* pero escasa producción de biomasa. Se puede realizar en un futuro un ensayo con ácido alfa picolínico, un agente anti esporogénico cuya actividad se cree que esté relacionada al ciclo de los ácidos tricarbónicos, el cual se requiere para la esporulación pero no para el crecimiento como otra alternativa (53).

El mayor porcentaje de acumulación de PHA se determinó en la relación CN 5, siendo de 5 %. Las relaciones de CN menores, producen incluso menor acumulación de PHA. Debido a la baja proporción de PHA, no fue posible una cuantificación certera.

La producción de PHA es independiente de la concentración utilizada de glicerol y dependiente del extracto de levadura.

La concentración de PHA producida por esta bacteria, bajo las condiciones estudiadas es muy reducida, por lo que se debe seguir estudiando otras condiciones que afectan el crecimiento y acumulación de PHA.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Enhanced production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from beechwood xylan by recombinant *Escherichia coli*. Lucia Salamanca-Cardona & Christopher S. Ashe & Arthur J. Stipanovic & Christopher T. Nomura. Appl Microbiol Biotechnol. November 2013.
2. Secretion of polyhydroxybutyrate in *Escherichia coli* using a synthetic biological engineering approach. Asif Rahman, Elisabeth Linton, Alex D Hatch, Ronald C Sims and Charles D Miller. Rahman et al. Journal of Biological Engineering 2013, 7:24 <http://www.jbioleng.org/content/7/1/24>.
3. Polymers of 3-hydroxyacids in plants. Enea Rezzonico, Laurence Moire & Yves Poirier. Institut d'Écologie, Laboratoire de Biotechnologie Végétale, Université de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland. Phytochemistry Reviews 1: 87–92, 2002.
4. Plastics in the Marine Environment : The dark side of the modern gift. Jort Hammer, Michiel H.S. Kraak and John R. Parsons. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 220.
5. Plastic materials. Bert Björkner, Ann Pontén, Erik Zimerson, Malin Frick. Chapter 34.
6. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glicerol. João M.B.T. Cavalheiro, M. Catarina M. D. de Almeida, Christian Grandfils, M. M. R. da Fonseca. Process Biochemistry 44 (2009) 509-515.

7. Rediscovering Biopolimers. S. A. Rivas, M. Bassas Gália. Environmental Microbiology Laboratory, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, DOI 10.1007/978-3-540-77587-4\_220, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010.

8. Polyhydroxybutyrate Production using Agro-industrial Residue as Substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM 5149. Nisha V. Ramadas, Sudheer Kumar Singh, Carlos Ricardo Soccol and Ashok Pandey. Brazilian Archives of Biology and Technology Vol. 52, n. 1:pp.17-23, January-February 2009.

9. Degradation of Polyactic Acid (PLA) Plastic in Costa Rican Soil and Iowa State University Compost Rows. Kai-Lai G. Ho, Anthony L. Pometto III, Arnoldo Gadea-Rivas, Jorge A. Briceño y Augusto Rojas. Journal of Environmental Polymer Degradation, Vol. 7, N° 4, 1999.

10. Bioplásticos: una alternativa ecológica. Alejandra de Almeida, Jimena A. Ruiz, Nancy I. López y M. Julia Pettinari. Revista química Viva, Número 3, Año 3, Septiembre 2004.

11. The sinking ark: pollution and the World wide loss of biodiversity. Jeffrey A. McNeely. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Ave du Mont-Blanc, 1196 Gland, Switzerland. Biodiversity and Conservation 1,2-18(1992).

12. Biodegradable polimers. Luc Avérous and Eric Pollet. Chapter 2.

13. Plastics Completley Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. Guo-Qiang Chen. Department of Biological Sciences and Biotechnology,

Tsinghua University, Beijing, 100084, China. Microbiology Monographs, Vol. 14, DOI 10.1007/978-3-642-03287\_5\_2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010.

14. Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) and its Regulation in Bacteria. Yu. A. Trotsenko and L.L. Belova. Skryab in Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, pr. Naki 5, Pushchino, Moscow Oblast, 142290 Russia. Microbiology, Vol. 69. N° 6, 2000. Pp. 635-645.

15. Bioplastics from microorganisms. José M. Luengo, Belén García, Angel Sandoval, Germán Naharro, y elías Olivera. Current opinion in Microbiology 2003, 6:251-260.

16. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Mona K. Gouda, Azza E. Swellam, Sanaa H. Omar.. Microbiol. Res. (2001) 156, 201-207.

17. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Sang Yup Lee. Tibtech November 1996 (vol 14).

18. Degradation of microbial polyester Poly(3-hydroxybutyrate) in environmental samples and in culture. Anupam Manna & A.K. Paul. Microbiology Laboratory, Department of Botany, University of Calcutta, 35, Ballygunge Circular Road, Calcutta 700019, India. Biodegradation 11: 323-329, 2000.

19. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. S. P. Valappil, S. K. Misra, A. R. Boccaccini, T. Keshavarz, C. Bucke and I. Roy. *Journal of Biotechnology* 132 (2007) 251-258.
20. Statistical media optimization for growth and PHB production from methanol by a methylotropic bacterium. Zahra b: Mokhtari-Hosseini.
21. Computer simulated fed-batch cultivation for production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen. Shilpi Khanna, A. K. Srivastava. *Biochemical Engineering Journal* 27 (2006) 197-203.
22. Design and analysis of Poly-3-hydroxybutyrate production processes from crude glycerol. Jhon A. Posada, Javier M. Naranjo, Jimmy A. López, Juan C. Higueta, Carlos A. Cardona. *Process Biochemistry* 46 (2011) 310-317.
23. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Gervasio Paulo da Silva, Matthias Mack and Jonas Contreiro. *Biotechnology Advances* 27 (2009) 30-39.
24. The production of polyhydroxybutyrate by *Methylobacterium rhodesianum* and *Ralstonia eutropha* in media containing glycerol and casein hydrolysates. E.J. Borman and M. Roth. *Biotechnology letters* 21:1059-1063, 1999.
25. Production of PHB from Crude Glycerol .G. Mothes, C. Schnorpfeil and J.-U. Ackermann *Issue Engineering in Life Sciences Engineering in Life Sciences Volume 7, Issue 5, pages 475–479, October, 2007.*

26. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupreavidus* reactor using waste glycerol. Joao M.B.T. Cavaleiro, M. Catarina M.D de Almeida, Christian Grandfils, M.M.R. de Fonseca. Volume 44, issue 5, Pages 509-515, May 2009.
27. Production of PHB and P (3HB-co-3HV) biopolymers by *Bacillus megaterium* strain OU303A isolated from municipal sewage sludge. S. Vishnuvardhan Reddy, M. Thirumala, S. K. Mahmood .World Journal of Microbiology and Biotechnology ,March 2009, Volume 25, Issue 3, pp 391-397.
28. Progress and recent trends in biofuels. Prog Energy Combust Sci 33:1–18. Demirbas, A. 2007a.
29. Ayhan Demirbas : Biofuels Securing the Planet's Future Energy Needs 2009 Springer-Verlag London Limited.
30. Demirbas, A. 2002. Diesel fuel from vegetable oil via transesterification and soap pyrolysis. Energy Sources 24:835–841.
31. Información sobre biodiesel Uruguay. [http://www.biodiesel-uruguay.com/biodiesel\\_en\\_uruguay.php](http://www.biodiesel-uruguay.com/biodiesel_en_uruguay.php)
32. Alur alcoholes del Uruguay. <http://www.alur.com.uy/biodiesel.html>

33. Alur Alcoholes del Uruguay <http://www.alur.com.uy/ley18195.html>
34. Crude Glycerol potencial described. Mohan Dasari. Feedstuffs vol. 79 N°43, October 15, 2007.
35. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. Gervasio Paulo da Silva, Matthias Mack and Jonas Contreiro. *Biotechnology Advances* 27 (2009) 30-39.
36. Strategies of biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate) supplemented with biodiesel obtained from rice bran oil. L. P. Mazur, D. D. Da Silva, V. H. Grigull, M. C. F. Garcia, T. O. Magalhães, T. M. Wagner, S. Einloft, J. Dullius, A. L. Schneider, A. P. T. Pezzin. *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 583-587.
37. Effect of carbon and nitrogen o sources and incubation times on Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) sínthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. Z. NurYüksekdog, BelmaAslim, YavuzBeyalti, Nazime Mercan. *African Journal ofBiotechnology* Vol. 3 (1), pp. 63-66, January 2004.
38. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2. Peter H. A. Sneath, Nicholas S. Mair, M. Elisabeth Sharpe, John G. Holt.
39. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Marcus Schallmeyer, Ajay Singh and Owen P. Ward. NRC: Research Press Website at <http://cjm.nrc.ca> in 14 January 2004.

40. Buchanan, C. E., A. O. Henriques, and P. J. Piggot. 1994. Cell wall changes during bacterial endospore formation, p. 167-186. In J.-M. Ghuysen and R. Hakenbeck (ed.), *Bacterial Cell Wall*. Elsevier Science Publishers, New York, NY. 9. Foster, S. J. 1994. The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacteria. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Suppl.* 76:25S-39S.

41. Foster, S. J., and K. Johnstone. 1990. Pulling the trigger: the mechanism of bacterial spore germination. *Mol Microbiol* 4:137-141.

42. Estudios sobre la esporulación del *Bacillus subtilis* por P. Sanchez Franco y B. Regueiro. Instituto Jaime Ferran de Microbiología sección de Santiago de Compostela. *Microbiol. España*,17(1964),79.

43. Applications of quórum sensing in biotechnology. Swati Choudhary, Claudia Schmidt-Dannert. *Appl Microbiol Biotechnol* (2010) 86:1267-1279.

44. Quimiometria II: planillas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. Rinaldo F. Teófilo e Márcia M. C. Ferreira. *Quim. Nova*, Vol. 29, Nº. 2.338-350,2006.

45. Análisis Químico Cuantitativo. Daniel C. Harris. Editorial Reverté S.A. 2001.

46. Fundamentos de Química analítica. Douglas A. Skoog, Donald M. West, F. James Holler y Stanley R. Crouch.

47. Modern HPLC for practicing scientists. Michael W. Dong .Winley Interscience,2006.
48. Gas Chromatography and Lipids. William W. Christie, James Hutton Institute (and Mylnefield Lipid Analysis), Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), Scotland, 2011.
49. Microbes in action, Harry W. Seeley, JR, Paul J. Vandemark, John J. Lee (1991).
50. Bergey's manual of systematic bacteriology, volumen 2. Peter H.A.Sneath, Nicholas S. Mair, M. Elisabeth Sharpe and John G. Holt (1986).
51. Production of polyhydroxyalkanoate from Storch by the native isolate *Bacillus cereus* CFR06. Prakash M. Halami. World J Microbiol Biotechnol (2008) 24:805-812.
52. Polyhydroxybutyrate Production using Agro-industrial Residue as Substrate by *Bacillus sphaericus* NCIM5149 Nisha V Ramadas, Sudheer Kumar Singh, Carlos Ricardo Soccol and Ashok Pandey:. Braz. Arch. Biol. Technol. V.52 n.1:pp.17-23, Jan/Feb 2009.
53. Biochemistry of sporulation, II Enzymatic changes Turing sporulation of *Bacillus cereus*. Richard S. Hanson, V. R. Srinivasan and H. Orin Halvorson.

54. Improving feeding strategies for maximizing polyhydroxybutyrate yield by *Bacillus megaterium* .W, Sabra y D.M. Abou-Zeid, Research Journal of Microbiology (2008), 3 (5), 308-318.

55. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus sp.* JMa5 cultivated in molasses media Wu Q, Huang H, Hu G, Chen J, Ho K P and Chen G Q, Antonie van Leeuwenhoek 80:111–118 (2001).

56. Polyhidroxialcanohates: an overview.C.S.K. Reddy, R. Ghai, Rashimi, V.C. Kalia. Bioresource Technology 87 (2003)137-146.

## **ANEXO**

### **Anexo 1: Materiales y métodos**

#### **Preparación del medio de cultivo:**

El medio de cultivo se autoclavó en matraces de 2 L durante 15 minutos a Presión 1 Atm. Luego los materiales se mantuvieron guardados durante 2 días en estufa a 37°C para verificar esterilización total del mismo antes de realizar las experiencias.

### **Anexo 2: Técnicas de tinción utilizadas:**

#### **Tinción de Gram:**

1. Secar el frotis del cultivo a temperatura ambiente o utilizando un mechero.
2. Fijar la muestra con calor (flameado 3 veces aprox.)
3. Agregar cristal violeta y esperar 1 minuto. Todas las células gram positivas se tiñen de color azul-púrpura.
4. Enjuagar con agua.
5. Agregar lugol y esperar 1 minuto.
6. Enjuagar con agua.
7. Agregar alcohol y esperar 30 segundos.
8. Enjuagar con agua.
9. Agregar safranina y esperar 1 minuto. Esto dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.

La observación al microscopio óptico se realiza a 100x con aceite de inmersión.

### **Tinción con método de Shaeffer o Verde Malaquita:**

1. Preparar un frotis del cultivo
2. Colocar el portaobjeto sobre baño de agua hirviendo en una rejilla para tinciones
3. Cubrir el frotis con trozos de papel filtro y mojarlo con solución de verde malaquita; calentar durante 5 minutos.
4. Lavar suavemente con agua
5. Colorear con fucsina durante 1 minuto.
6. Lavar con agua y secar.
7. Observar con objetivo de inmersión.

Las esporas se ven de color verde y las células vegetativas de color fucsia.

### **Tinción Baño PHB con Azul Nilo en placa**

Las colonias de cultivos en placas, son bañadas con una solución al 0.1 % de azul nilo en acetona. La presencia de PHAs se revela (coloración naranja) a una longitud de onda de 300 nm en transiluminador.

### **Tinción con Negro Sudán**

Cubrir el frotis con gotas de solución Negro Sudán B (300 mg de Negro Sudan B en 100 mL de Etanol 70%) y dejar durante 15 minutos. (\*).

Se escurre el exceso de colorante y se seca al aire. Decolorar con agua y secar al aire (\*\*).

Contrastar con Safranina (solución acuosa al 0,5%) durante 10 segundos. Lavar con agua y secar al aire .

Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

Los gránulos de PHB se tiñen de azul oscuro y el resto de la célula de color rosado.

(\*)Nota: Tiempo necesario para que el etanol se evapore.

(\*\*)Nota: Si no hay presencia de PHB el frotis se decolora totalmente, en caso contrario se mantiene el color oscuro

### **Anexo 3: TÉCNICAS UTILIZADAS:**

#### **Determinación de PHB por Gravimetría:**

1. Secar filtros (0.8 $\mu$ m) en estufa a 60°.
2. Colocar los filtros en desecador y dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
3. Pesar los filtros en balanza analítica (repeticiones hasta alcanzar peso constante, P1).
4. Colocar 4mL la muestra en los tubos de centrifuga. Evitar que la biomasa sedimente.
5. Centrifugar a 5000g durante 10 minutos a 4°C.
6. Descartar sobrenadante.
7. Agregar a los tubos que contienen la biomasa 4mL de SDS (sodio dodecil sulfato) 1,5% w/v pH10. Aplicar vortex hasta resuspender la biomasa.
8. Incubar a baño de agua a 35°C durante 1 hora.
9. La mezcla se centrifuga a 5000g durante 10 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante.
10. Agregar 4mL de agua destilada, aplicar vortex hasta resuspender el pellet.
11. Centrifugar (5000g durante 10 minutos a 4°C ), descartar el sobrenadante.
12. Agregar 4 mL de solución alcalina (pH=13) de hipoclorito de sodio comercial (5.64% w/v).
13. Centrifugar (5000g durante 10 minutos a 4°C ), descartar el sobrenadante.

14. Lavar con agua destilada y centrifugar.
15. Descartar sobrenadante.
16. Resuspender el pellet con agua destilada y filtrar a vacío en los filtros previamente pesados.
17. Secar los filtros en estufa a 60°C durante 24 horas o hasta peso constante.
18. Retirar de la estufa y dejar enfriar en desecador hasta temperatura ambiente (mínimo 1 hora).
19. Pesar (P2)

Realizar las determinaciones por triplicado

$$\text{Conc.PHB(g/L)} = \frac{(P2 - P1)}{V}$$

V toma de muestra

Pretratamiento de muestras para determinación de PHB por gravimetría:

Las muestras se tratan por 15 minutos a 85°C para desnaturalizar el material genético, proteínas y la enzima PHB depolimeraza.

El sedimento (PHB+biomasa) se recolectan por centrifugación 12000 rpm por 20 min. Se mantiene a 4°C.

#### **Procesamiento muestras HPLC:**

1. Centrifugar las muestras y quedarse con el sobrenadante.
2. Realizar la dilución correspondiente según el rango de linealidad del glicerol con agua miliQ (dilución utilizada 1/10).
3. Filtrar muestras.

#### Anexo 4: RELACION C/N:

En el siguiente apartado se encuentran los cálculos matemáticos realizados para los estudios de relación Carbono-Nitrógeno.

$$m/M=n^{\circ} \text{ moles}$$

$$\text{PM Glicerol} = 92,1$$

Concentración de glicerol a utilizar: [5]g/L

$$5\text{g/L} \div 92,19 = 0,05424 \times 3 = 0,163 \text{ moles de C/L}$$

$$\text{PM } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 132,14$$

Para 1g/L de Nitrógeno:

$$1 \text{ g/L} \div 132,14 = 7,57 \times 10^{-3} \text{ moles} \times 2 = 0,0514 \text{ moles N/L}$$

-----

$$\text{C/N} = 0,163 \div 0,0514 = 3,17$$

$$0,163/2 = x = 0,0815 \text{ moles N/L}$$

$$0,0815/2 = 0,04075 \text{ moles /L de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$$

$$m(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = n^{\circ} \text{ moles} \times \text{PM} = 0,04075 \times 132,14 = 5,385\text{g de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$$

-----

$$\text{C/N} = 0,163 \div 0,0326 = 5$$

$$0,163/5 = x = 0,0326 \text{ moles N/L}$$

$$0,0326/2 = 0,0181 \text{ moles /L de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$$

$$m(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = n^\circ \text{ moles} \times \text{PM} = 0,0181 \times 132,14 = 2,3917\text{g de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$$

-----

$$\text{C/N} = 0,163 \% \times 17$$

$$0,163/17 = x = 9,58 \times 10^{-3} \text{ moles N/L}$$

$$9,58 \times 10^{-3} / 2 = 4,8 \times 10^{-3} \text{ moles /L de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$$

$$m(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = n^\circ \text{ moles} \times \text{PM} = 4,8 \times 10^{-3} \times 132,14 = 0,6335\text{g de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$$

#### **Anexo 5: Medio modificado.**

Se realizó fermentación a escala de matraces con el medio base utilizando suero de leche como fuente de carbono con una concentración de 5g/L de lactosa. Los matraces utilizados fueron de 2 L con un contenido de medio de cultivo de 300 mL. Fueron incubados en agitador orbital a 250 rpm y 35° C. Las muestras fueron tomadas a intervalos regulares de tiempo

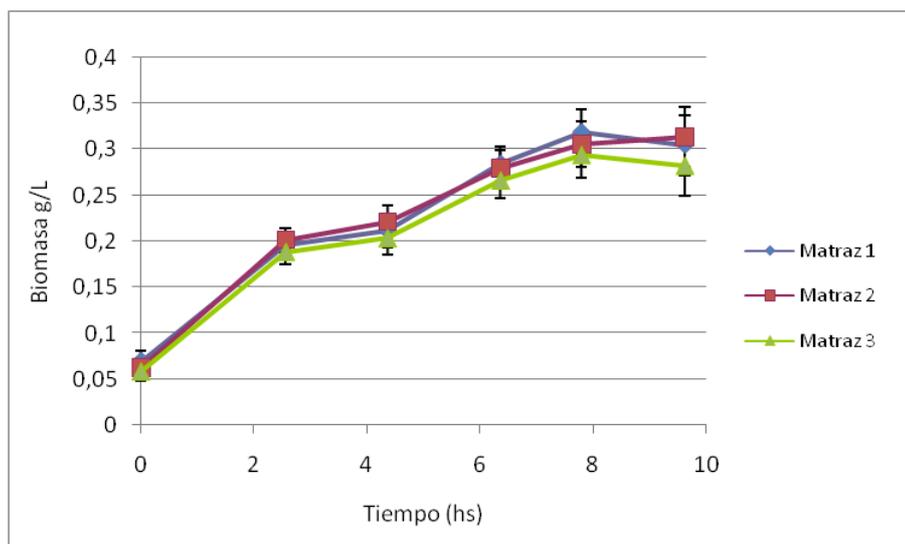
#### **Cultivo en matraz con medio modificado:**

Dado que el crecimiento demostrado en placa para los distintos medios de carbono utilizados dio cualitativamente parecido, se eligió el suero de leche para la realización del experimento a escala de matraces ya que es el que precisa menor cantidad de procesamiento antes de su utilización, lo cual reduce el costo de producción significativamente.

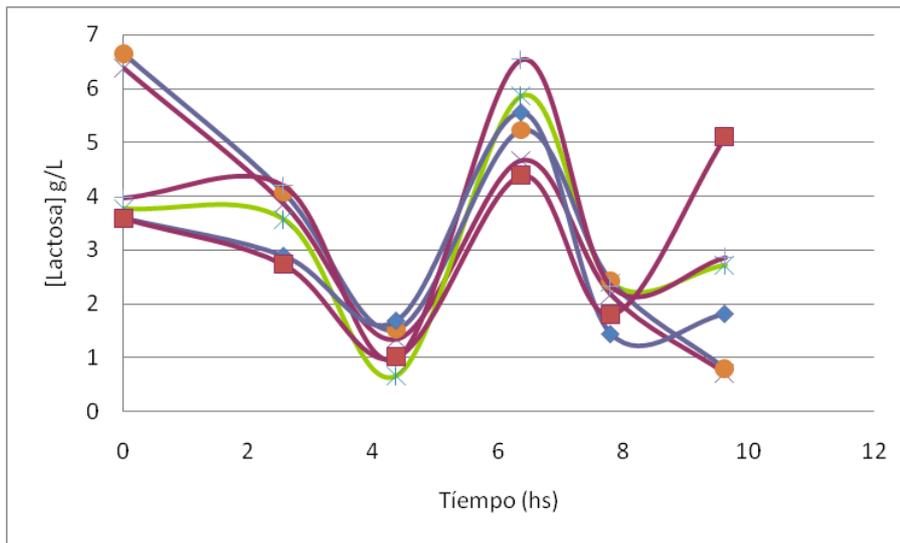
Los resultados obtenidos no fueron alentadores comparados con el crecimiento obtenido cuando se trabajó con glicerol como fuente de carbono. La biomasa obtenida fue considerablemente menor con un gran porcentaje

de esporulación, alcanzando un valor máximo de 0,3 g/L en las muestras por triplicado (figura 28).

Los resultados obtenidos del estudio del consumo de sustrato dieron similares con los diferentes métodos utilizados, pero su interpretación es arriesgada ya que exhiben un aumento y disminución de la concentración de lactosa en el medio (figura 29).



**Figura 28:** Curva de crecimiento por triplicado de *Bacillus sp.* Realizada con suero de leche como fuente de carbono adicionado con extracto de levadura.



**Figura 29:** Conjunción de los datos obtenidos correspondiente a azúcares reductores remanentes en el medio obtenidos con 2 técnicas diferentes: HPLC y DNS.

A continuación se encuentran los datos completos correspondientes a las tablas 17 y 18 que se encuentran en resultados y discusión, páginas 61 y 62.

**Tabla 19:** Versión completa del análisis de los efectos.

Effect Estimates: Var.:%PHB; R-sqr=.97971; Adj.:.93912 (Spreadsheet7) 2**(2-0) design; MS Pure Error=.2033333 DV: %PHB										
	Effect	Std.Err.	t(2)	p	-95,%	+95,%	Coeff.	Std.Err.	-95,%	+95,%
Mean/Interc.	2,025000	0,225462	8,98154	0,012171	1,05491	2,995087	2,025000	0,225462	1,05491	2,995087
Curvatr.	2,216667	0,688799	3,21816	0,084499	-0,74700	5,180331	1,108333	0,344400	-0,37350	2,590165
(1)Glicerol	-0,750000	0,450925	-1,66325	0,238163	-2,69017	1,190174	-0,375000	0,225462	-1,34509	0,595087
(2)Levadura	4,050000	0,450925	8,98154	0,012171	2,10983	5,990174	2,025000	0,225462	1,05491	2,995087
1 by 2	-0,750000	0,450925	-1,66325	0,238163	-2,69017	1,190174	-0,375000	0,225462	-1,34509	0,595087

**Tabla 20:** Tambla correspondiente al análisis ANOVA completo.

	SS	df	MS	F	p
Curvatr.	2,10583	1	2,10583	10,35656	0,084499
(1)Glicerol	0,56250	1	0,56250	2,76639	0,238163
(2)Levadura	16,40250	1	16,40250	80,66803	0,012171
1 by 2	0,56250	1	0,56250	2,76639	0,238163
Pure Error	0,40667	2	0,20333		
Total SS	20,04000	6			