

ESTUDIO DE BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS CON POTENCIAL
PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs EN RELACIÓN AL TIPO DE GEN *phaC*

MARÍA ISABEL GÓMEZ PERDOMO
MARCELA CONCHA OBANDO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2012

ESTUDIO DE BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS CON POTENCIAL
PARA LA PRODUCCIÓN DE PHAs EN RELACIÓN AL TIPO DE GEN *phaC*

MARÍA ISABEL GÓMEZ PERDOMO
MARCELA CONCHA OBANDO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de biólogo

Dolly Margot Revelo Romo
Bióloga Universidad de Nariño
MSc. en Ciencias Microbiológicas Universidad Nacional

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2012

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1^o del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

DOLLY MARGOT REVELO ROMO

Director

EDITH MARIELA BURBANO ROSERO

Jurado

DANIEL BRAVO BENAVIDES

Jurado

San Juan de Pasto, Mayo de 2012

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la oportunidad de existir, por brindarnos la sensible tarea de apasionarnos con este proyecto y sobre todo por la fuerza para atravesar cada obstáculo y de su mano terminar orgullosamente esta labor.

A mis padres Duarte Lidoro Concha y Clara Elisa Obando, sabiendo que no existirá una forma de agradecer una vida de sacrificio y esfuerzo, quiero que sientan que el objetivo logrado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlo fue su apoyo, sus calurosos consejos y sus incontables suspiros que dieron vuelo a mis sueños. A mi hermana Paola Concha por brindarme sus palabras de fortaleza y mostrarme con su ejemplar pasión por la ciencia cuán lejos puedo llegar. A mi hermana Jenny Concha por recorrer este camino como el reflejo imponente de mis sueños y satisfacciones.

Un agradecimiento profundo y sentido a mis padres Mauro Gómez y Myriam Perdomo porque sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo este largo proceso, por su ejemplo de lucha y honestidad, por su paciencia, inteligencia y generosidad. A mi hermano Diego Mauricio por ser un ejemplo de valentía, capacidad y superación.

A nuestra asesora, guía y amiga MSc. Dolly Margoth Revelo por enseñarnos que a través de la delicadeza, el cariño, la disciplina, la persistencia y la integridad, las metas se hacen sueños, pasiones y placeres, se quebrantan las caídas y de estas germinan gratas satisfacciones, victorias inmateriales y valores inalterables.

Al Dr. Pablo Fernández Izquierdo, decano de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y director del grupo de investigación de Biotecnología Microbiana, quien ha sido un compañero siempre generoso y dispuesto como pocos, que compartió conocimientos y experiencias de tipo profesional y personal que fueron de incalculable valor.

A la Dra. Edith Mariela Burbano Rosero, por su paciencia, disponibilidad y generosidad para compartir su valiosa experiencia, apoyándonos de manera sincera e incondicional más allá de lo profesional, gracias a su incomparable calidad de maestra y amiga ha sido capaz de motivarnos en este apasionante camino de conocimiento.

Al Dr. Daniel Bravo por su valioso tiempo y sus competitivos aportes que generaron apreciables logros.

A todas aquellas personas que hicieron parte de este proyecto, gracias a su apoyo que nos permitió culminar con un proceso de formación y aprendizaje: a los biólogos Guido Villota y Carolina Obando, al químico David Arturo, al ingeniero Roberto García, a Iván Ramírez, Julio Sousa y Cesar Paz.

A nuestros profesores a largo de la carrera, los cuales transmitieron sus conocimientos con la profunda paciencia, disponibilidad, experiencias y amor por la ciencia.

A nuestros amigos y compañeros Karen Suarez, Claudia Sánchez, Eliana Revelo, Gabriela Dorado, Sandra Narváez, Jurany Astorquiza, Mónica Martínez, Carolina Guerrero, Diana Betancourt, Cesar Paz, Juan Montenegro, Mario Suarez, Vanessa Pérez, Jenny Concha, Mario Álvarez, José Solís y Lilith: ha sido un camino extenso y duro en el que, algunas veces, la fijación por lograr tus objetivos te hace olvidar la importancia del contacto humano, sin embargo, durante este tiempo, buenos y malos momentos, ayudaron a fortalecer nuestro carácter, nos brindaron una perspectiva de este camino mucho más amplia llena de sonrisas, de gratos momentos e inolvidables experiencias cargadas de una autentica alegría y de una verdadera amistad.

Gracias principalmente a COLCIENCIAS (Proyecto código 110445221299) y a la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI), Universidad de Nariño por el apoyo para realizar esta investigación.

Con el más sincero agradecimiento a Dios, a nuestras familias, a nuestra asesora y amigos por permitirnos entender que el verdadero conocimiento se encuentra en la inquietud íntima y en el encuentro ermitaño de la inocencia con el saber que brida la naturaleza.

CONGRESOS Y PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

XLV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. Armenia (Octubre 5 al 8 de 2010). Ponencia presentada por las estudiantes del programa de Biología: Marcela Concha Obando y María Isabel Gómez: VARIACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA HIDROCARBUROCLÁSTICA PROVENIENTE DE LA ENSENADA DE TUMACO-NARIÑO, BAJO UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN CONTINUA. María Isabel Gómez, Marcela Concha Obando, Daniel Bravo, Guido Villota, Dolly Margo Revelo, Pablo Fernández Izquierdo. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas /ISSN: 0120-4173. Ed: Asociación Colombiana De Ciencias Biológicas, v. 22, fasc.1, p.148 - 148, 2010.

Invitación de la Editorial internacional de textos científicos, "Editorial Académica Española", para la publicación como libro especializado de alta calidad del trabajo: VARIACIÓN DE LA COMUNIDAD BACTERIANA HIDROCARBUROCLÁSTICA PROVENIENTE DE LA ENSENADA DE TUMACO-NARIÑO, BAJO UN SISTEMA DE FERMENTACIÓN CONTINUA".

V SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOFABRICAS, I CONGRESO INTERNACIONAL DE FLUJO REACTIVOS. Medellín (Agosto 30 al 31 de 2011). Ponencia presentada por las estudiantes del programa de Biología: Marcela Concha Obando y María Isabel Gómez: CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL GEN RIBOSOMAL ADN 16S DE BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS OBTENIDAS EN UN AMBIENTE DE MICROCOSMOS. María Isabel Gómez, Marcela Concha Obando, Daniel Bravo, Dolly Margo Revelo, Pablo Fernández Izquierdo. ISBN de las memorias: 978 958 761 023-9.

II CONGRESO IBEROAMERICANO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD. Manizales (Septiembre 21 al 23 de 2011). Ponencia presentada por las estudiantes del programa de Biología: Marcela Concha Obando y María Isabel Gómez: NOVEDOSOS GÉNEROS BACTERIANOS HIDROCARBUROCLÁSTICOS MARINOS OBTENIDOS EN LA BAHÍA DE TUMACO, NARIÑO. Marcela Concha Obando, María Isabel Gómez Daniel Bravo, Dolly Margo Revelo, Pablo Fernández Izquierdo ISBN de las memorias: 978-958-57073-0-6.

Artículo científico preseleccionado en el V SIMPOSIO INTERNACIONAL DE BIOFABRICAS, I CONGRESO INTERNACIONAL DE FLUJO REACTIVOS para la publicación en la revista DYNA (A1). Artículo sometido a la revista DYNA en Noviembre 30 de 2011, CHARACTERIZATION OF HYDROCARBONOCLASTIC MARINE BACTERIA USING THE 16S rRNA GENE. A CASE OF MICROCOSM STUDY. Dolly Revelo Romo, María Isabel Gómez Perdomo, Marcela Concha Obando, Daniel Bravo, Pablo Fernández.

Artículo científico en evaluación. "PHA SYNTHASE GENES IN OIL-DEGRADING MARINE BACTERIA FROM COLOMBIAN PACIFIC COAST" Autores: Dolly Margot Revelo Romo, María Isabel Gómez Perdomo, Johana Marcela Concha Obando, Daniel Bravo, Pablo Fernández Izquierdo.

RESUMEN

En la costa Pacífica Colombiana, la bahía del municipio de Tumaco–Nariño ha estado expuesta a frecuentes impactos por derrames de petróleo, lo que genera en el ecosistema marino un exceso en la fuente de carbono respecto a otros nutrientes esenciales. Dicho ambiente es propicio para el aislamiento de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs). En esta investigación se obtuvieron 53 aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos a partir de 3 Biorreactores de flujo Ascendente (BFAs) con un sistema de cultivo continuo. Los microcosmos fueron inoculados con muestras de agua proveniente de la bahía de Tumaco, aportando resultados para el aislamiento y análisis de la comunidad bacteriana hidrocarburoclástica. Los ensayos con tinciones sudan negro B y fluorescencia con rojo Nilo de los aislamientos permitieron la evaluación de 18 cepas potencialmente acumuladoras de PHAs. Mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA se identificaron taxonómicamente 6 géneros, como son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Stenotrophomonas*, *Alcanivorax* y el género *Haererehalobacter* nunca antes reportado como bacteria hidrocarburoclástica. Posteriormente mediante PCR fue posible amplificar los genes que codifican para la PHA sintasa clase I, clase II (*phaC1* y *phaC2*) y clase IV (*phaC*). Se extrajo polímero PHA en seis cepas bacterianas representantes de cada género a partir de cultivos batch con n-octano como única fuente de carbono. Los cromatogramas de gases (GC) junto con la diferenciación del tipo de gen *phaC* permitieron hacer inferencia sobre el tipo de polímeros PHAs novedosos en bacterias marinas provenientes de la bahía de Tumaco. En la cepa *Alcanivorax* sp. 337 con PHA sintasa clase II se detectó el compuesto 1,6-Dimetilhexanodiato como un precursor de un polihidroxicanoato de cadena media, el 6-hidrohexanoato.

ABSTRACT

The bay of Tumaco, Nariño as part of the Colombian Pacific coast has been exposed to frequent impacts from oil spills increasing the carbon sources compared to other essential nutrients in the marine ecosystem. That particular environment to result in favorable conditions to isolate polyhydroxyalkanoates (PHAs) producer bacteria. In this research were obtained 53 hydrocarbonoclastic bacterial isolates using three upstream flow bioreactors (UFBs) with continuous culture system. Those, the microcosmos were inoculated with water samples from the coast of Tumaco. Then the isolates were used to analyse the ecology of the hydrocarbonoclastic bacterial community. Besides, sudan black B staining and red Nilo fluorescence were carried out and 18 PHAs producer strains were selected. Six bacterial genera were identified taxonomically by partial sequencing of 16S rRNA gene. These genera belong to *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Stenotrophomonas*, *Alcanivorax* and *Haererehalobacter* that never before was reported as hydrocarbonoclastic bacteria. Subsequently using PCR was possible to amplify the genes coding for PHA synthase class I, class II (*phaC1* and *phaC2*) and class IV (*phaC*). For all six strains identified it was possible to extract PHAs and identify the polymer. The GC chromatograms as well as the type of *phaC* amplicons have shown the potential of production of novel polymers using marine hydrocarbonoclastic bacteria isolated from the coast of Tumaco, Colombia. The strain *Alcanivorax* sp. 337 with PHA synthase class II produce 1,6-Dimethylhexanodiato compound as precursor of 6-hydrohexanoato as medium chain PHA.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. OBJETIVOS.....	5
5. MARCO TEÓRICO.....	6
5.1 BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS ACUMULADORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs).....	6
5.1.1 Bacterias acumuladoras de PHAs a partir de hidrocarburos.....	9
5.2 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE FRAGMENTOS DEL GEN 16S rRNA.....	10
5.3 SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) EN BACTERIAS.....	11
5.3.1 Detección y cuantificación de PHA.....	12
5.3.2 Bacterias productoras de PHA.....	13
5.3.3 Genes que codifican para las enzimas del metabolismo de PHAs.....	13
5.3.4 PHA Sintetas.....	14
5.3.5 Rutas Metabólicas para la síntesis de PHAs.....	16
6. METODOLOGÍA.....	19
6.1 SELECCIÓN DE BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS PROVENIENTES DE LA BAHIA DE TUMACO-NARIÑO ACUMULADORAS DE PHAs.....	19
6.1.1 Área de estudio y toma de muestras.....	19
6.1.2 Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	20
6.1.3 Preservación de las bacterias seleccionadas.....	21
6.1.4 Evaluación de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos acumuladores de PHAs.....	21
6.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS HIDROCARBUROCLÁSTICOS Y DETECCIÓN DEL GEN <i>phaC</i>	22
6.3 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO PRODUCIDO.....	26

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
7.1 BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS PROVENIENTES DE LA ENSENADA DE TUMACO-NARIÑO.....	29
7.1.1 Características de las zonas de muestreo.....	29
7.1.2 Aislamientos bacterianos degradadores de hidrocarburos provenientes de la bahía de Tumaco-Nariño.....	31
Riqueza de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos en los tiempos de fermentación de los tres BFAs.....	34
Distribución de abundancias relativas de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos en los tiempos de fermentación en los tres BFAs.....	37
7.1.3 Evaluación de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos acumuladores de PHAs.....	40
7.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS SELECCIONADOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN PARCIAL DEL GEN 16S rRNA.....	42
7.2.1 Detección de un fragmento del gen 16S rRNA de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos.....	42
7.2.2 Análisis de secuencias de los fragmentos del gen 16S rRNA de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos.....	45
7.3 DETECCIÓN DEL GEN phaC EN LAS CEPAS BACTERIANAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS.....	55
7.3.1 Detección del gen phaC empleando primers generales.....	55
7.3.2 Diferenciación del tipo de gen phaC empleando primers específicos.....	63
7.4 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO PRODUCIDO POR BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	72
CONCLUSIONES	82
APORTES.....	83
PERSPECTIVAS.....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	86
ANEXOS.....	107

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Clases de sintasas de poliéster (Rehm, 2003), modificada en esta investigación.
- Tabla 2. Rutas de biosíntesis para polihidroxicanoatos (PHAs) y enzimas involucradas. Chen (2010).
- Tabla 3. Componentes de PCR para la amplificación de fragmentos de los genes que codifican para la enzima PHA sintasa (Revelo *et al.*, 2007)
- Tabla 4. Diferencias en la riqueza de los aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis. Datos obtenidos en los cinco tiempos (480 h de fermentación) muestreados en los tres BFAs.
- Tabla 5. Reacción a tinciones lipofílicas para los aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos.
- Tabla 6. Similitud de las secuencias de un fragmento del gen 16S rRNA de los aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos acumuladores de compuestos lipídicos. Se muestran los mejores porcentajes de similitud obtenidos con las secuencias de las bases de datos (GenBank y RDP).
- Tabla 7 Número de acceso en el GenBank de secuencias parciales del gen 16S rRNA de bacterias marinas hidrocarburoclásticas.
- Tabla 8. Blast obtenido con las secuencias parciales de genes *phaC* de las cepas bacterianas hidrocarburoclásticas: los fragmentos del gen fueron obtenidos por PCR con primers generales G-D/G-1R y PCR semi-nested con los primers generales G-D/G-2R.
- Tabla 9. Blast obtenido con secuencias parciales del gen *phaC* de las 18 cepas bacterianas hidrocarburoclásticas. Los fragmentos de los genes fueron obtenidos por PCR con los primers específicos de Revelo (2012) para el gen *phaC* que codifica para la PHA sintasa IV; E2-D/E2-R y E1-D/E1-R (Revelo *et al.*, 2007) para el gen *phaC* II.
- Tabla 10. Clase de PHA sintasa según el tipo de gen *phaC* determinado en las cepas bacterianas hidrocarburoclásticas y reacción a colorantes para lípidos neutros.
- Tabla 11. Formación de biomasa y producción de PHAs bajo fermentación batch para las cepas bacterianas.
- Tabla 12. Porcentaje de PHAs acumulado en las cepas bacterianas hidrocarburoclásticas en relación al tipo de gen *phaC* y a la afinidad por colorantes de lípidos neutros.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vía metabólica para la degradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno (Widdel y Rabus, 2001).

Figura 2. Vías bajas para la degradación de compuestos aromáticos (Suarez, 1993).

Figura 3. Organización de los genes que codifican para las diferentes PHA sintasas. *phaC/C1/C2*, genes que codifican para la PHA sintasa; *phaE*, codifica para la subunidad de PHA sintasa; *phaA*, codifica para la - cetotiolasa; *phaB*, codifica para la acetoacetyl-CoA reductasa; *phaR*, para una proteína reguladora; ORF, marco abierto de lectura con función desconocida; *phaZ*, para la PHA depolimerasa; *phaD*, marco abierto de lectura con función desconocida; *phaP*, para la fasinasa (Revelo, 2005 modificado de Rehm, 2003).

Figura 4. Rutas metabólicas de biosíntesis de PHA (Chen, 2010).

Figura 5. Mapa de la bahía de Tumaco-Nariño, ubicación 10 puntos de muestro. Fuente: <http://www.cccp.org.co>.

Figura 6. Diseño Biorreactor de Flujo Ascendente (BFA) (Fuente: esta investigación).

Figura 7. Puntos de muestreo sobre la bahía de Tumaco-Nariño. A) Estero el Pajal (puntos de muestreo 1 - 4); B) Estación de servicio (EDS) Mobil del Litoral (punto 6); C) EDS La Bombita (punto 7); D) EDS Isla Dorada (punto 8); E) Sector Gabarra ECOPEPETROL (punto 9) (Fuente: esta investigación).

Figura 8. Representación esquemática BFA. Diseño 3D BFA (AUTOCAD). (Fuente: esta investigación).

Figura 9. Montaje final tres BFAs. (Fuente: esta investigación).

Figura 10. Riqueza de aislamientos bacterianos para los tres BFAs en los cinco tiempos de muestreo correspondientes a 20 días de fermentación (480 h).

Figura 11. Riqueza específica evaluada con los estimadores Cole y Sobs para los tres BFAs

Figura 12. Curvas de distribución de abundancias relativas de los cinco tiempos de muestreo correspondientes a 20 días de fermentación (480 h).

Figura 13. Muestras de dos tipos de preservación de aislamientos bacterianos. A) Crioviales con 250 μ L de glicerol al 30% y 750 μ L de solución salina al 0.85% con inóculo de la cepa bacteriana; B) Viales inclinados con Agar Brito modificado en su fuente de carbono con n-octano al 1%. (Fuente: esta investigación).

Figura 14. Reacción a los tintes lipofílicos. A) Tinción Sudán Negro en el aislamiento 333(1); B) Tinción de Nilo rojo, fluorescencia a 340 nm de luz UV aislamiento 333(1); C)

Tinción Sudán Negro en el aislamiento 329A; D) Tinción de Nilo Rojo, fluorescencia a 340 nm de luz UV aislamiento 329A. (Fuente: esta investigación).

Figura 15. Tamaño esperado del fragmento del gen 16S rRNA a amplificar con los iniciadores A y J en *Escherichia coli*, Número de acceso GenBank TW14359.

Figura 16. Amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S rRNA con los primers A y J. A) Líneas: L, marcador de tamaño molecular ADN *Hind*III; 1 a 6, *E. coli* BUN001; (-), control de reactivos. B) Líneas: L: marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV; (-), control de reactivos; 1 a 3, *E. coli* BUN001.

Figura 17. Amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S rRNA con los primers A y J. A) Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III. (+), *E. coli* BUN001. (+), *P. aeruginosa* BUN010. 1, 333(1). 2, 333(2). 3, 329A. 4, 329B. 5, 337. 6, 338B. 7, 353B. 8, 371A. L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III. (-), control de reactivos. B). L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III; 1, 371B. 2, 377C. 3, 380.4, 387. 5, 393. 6, 394. 7, 396. 8,400. 9, 405. 10, FER1. (+), *E. coli* BUN001. (+), *P. aeruginosa* BUN010. (-), control de reactivos. C). Líneas: L, marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV. 1, 337. 2, 400. 3, 329A. 4, 329B. 5, 333(1). 6, 338B. 7, 371B. 8, 405. (-), control de reactivos. (+), *E. coli* BUN001. (+), *P. aeruginosa* BUN010.

Figura 18. Región de 50 pb a 60 pb sobre la secuencia parcial del gen 16S rRNA del aislamiento bacteriano 400 con primer J (reverso). El cromatograma fue visualizado con el programa Chromas Lite versión 2.01.

Figura 19. Arbol filogenético de bacterias hidrocarburoclásticas obtenidas en esta investigación con base en el análisis de las secuencias parciales del gen 16S rRNA. Grupos externos, *Thermogladius shockii* y *Aquifex pyrophilus*.

Figura 20. Procedencia de las 18 cepas bacterianas hidrocarburoclásticas en los tres BFAs.

Figura 21. Amplificación por PCR semi-nested de un fragmento del gen *phaC* con los primers generales. Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III; 1-4, *P. aeruginosa* BUN010 (primers G-D/G-1R); (-), control de reactivos; 5-8, *P. aeruginosa* BUN010 (primers G-D/G-2R); (-), control de reactivos; L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III.

Figura 22. Límite de detección por PCR con el par de primers G-D/G-1R y DNA template preparado de *P. aeruginosa* BUN010. Líneas: 1, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III; 2, 0.5 µL; 3, 1.0 µL; 4, 1.5 µL; 5, 2.0 µL; 6, 2.5 µL; 7, 3.0 µL; 8, 3.5 µL; 9, 4.0 µL; 10, 4.5 µL; 11, 5.0 µL; 12, control de reactivos; 13, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III.

Figura 23. Amplificación por PCR semi-nested de un fragmento del gen *phaC* con los primers G-D y G-2R. A) Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III; 1, *Halomonas* sp. 405; 2, *Halomonas* sp. 394; 3, *Bacillus* sp. 377C; 4, *Bacillus* sp. 371A; 5, *Pseudomonas* sp. 333(1); 6, *Haererehalobacter* sp. 338B; 7, *Bacillus* sp. 329A; (+), *P. aeruginosa* BUN010 (*phaC*+); (-), *E. coli* BUN001 (Control negativo); (-), control de

reactivos. B) Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA HindIII; 1, *Bacillus* sp. 329B; 2, *Pseudomonas* sp. 393; 3, *Stenotrophomonas* sp. 371B; 4, *Bacillus* sp. 387; 5, *Haererehalobacter* sp. 396; 6, *Bacillus* sp. 353B; 7, *Alcanivorax* sp. 337; 8, *Alcanivorax* sp. 400; 9, *Pseudomonas* sp. 333(2); 10, *Pseudomonas* sp. 380; 10, *Bacillus* sp. FER1; (+), *P. aeruginosa* BUN010 (*phaC*+); (-), *E. coli* BUN001 (Control negativo); (-), control de reactivos.

Figura 24. Amplificación por PCR semi-nested de un fragmento del gen *phaC* con los primers G-D y G-2R. A) Líneas: 1, marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV; 2, *Bacillus* sp. 329A; 3, *Bacillus* sp. 329B; 4, *Pseudomonas* sp. 333(1); 5, *Pseudomonas* sp. 333(2); 6, *Alcanivorax* sp. 337; 7, *Haererehalobacter* sp. 338B; 8, *Bacillus* sp. 353B; 9, *Bacillus* sp. 371A; 10, *Stenotrophomonas* sp. 371B; 11, *P. aeruginosa* BUN010 (*phaC*+); 12, *E. coli* BUN001 (Control negativo); 13. marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV. B) Líneas: 1, marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV; 2, *Bacillus* sp. 377C; 3, *Pseudomonas* sp. 380; 4, *Bacillus* sp. 387; 5, *Pseudomonas* sp. 393; 6, *Halomonas* sp. 394; 7, *Haererehalobacter* sp. 396; 8, *Alcanivorax* sp. 400; 9, *Halomonas* sp. 405; 10, *Bacillus* sp. FER1; 11, *P. aeruginosa* BUN010 (*phaC*+); 12, *E. coli* BUN001 (Control negativo); 13. marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV.

Figura 25. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *phaC1* con los primers E1-D y E1-R. Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA HindIII; 1, *Haererehalobacter* sp. 338B; 2, *Pseudomonas* sp. 393; 3, *Alcanivorax* sp. 337; 4, *Alcanivorax* sp. 400; 5, *Pseudomonas* sp. 380; 6, *Haererehalobacter* sp. 396; 7, *Halomonas* sp. 405; 8, *Halomonas* sp. 394; (-), control de reactivos.

Figura 26. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *phaC2* con los primers E2-D y E2-R. Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA HindIII; 1, *Pseudomonas* sp. 333(1); 2, *Pseudomonas* sp. 333(2); 3, *Haererehalobacter* sp. 338B; 4, *Pseudomonas* sp. 380; 5, *Pseudomonas* sp. 393; 6, *Haererehalobacter* sp. 396; 7, *Alcanivorax* sp. 337; 8, *Alcanivorax* sp. 400; (-), control de reactivos.

Figura 27. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *phaC* que codifica para la PHA sintasa clase IV con primers de Revelo (2012). Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA HindIII; 1, *Bacillus* sp. 329A; 2, *Bacillus* sp. 329B; 3, *Bacillus* sp. 353B; 4, *Bacillus* sp. 371A; 5, *Bacillus* sp. 377C; 6, *Bacillus* sp. 387; 7, *Bacillus* sp. FER1; (-), control de reactivos.

Figura 28. Dendrograma de similitud de bacterias hidrocarburoclásticas con base en el análisis de las secuencias de fragmentos del gen *phaC* obtenidos con primers específicos (Revelo *et al.*, 2007; Revelo, 2012).

Figura 29. Dendrograma de similitud de las bacterias marinas hidrocarburoclásticas con relación al tipo de gen *phaC*. se empleó la estrategia de agrupamiento UPGMA y el índice de similitud DICE.

Figura 30. Ensayos de fermentación batch para la extracción de PHAs a partir de n-octano. (Fuente: esta investigación).

Figura 31. Productos ensayo de extracción de PHAs a partir de n-octano. De derecha a izquierda: *Bacillus* sp. 329B, *Pseudomonas* sp. 333(1), *Haererehalobacter* sp. 338B,

Stenotrophomonas sp. 371B, *Halomonas* sp. 405, *Alcanivorax* sp. 337. (Fuente: esta investigación).

Figura 32. Perfil cromatográfico de la cepa *Alcanivorax* sp. 337. Columna RTX-5(30 m) *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV).

Figura 33. Espectro de masas correspondiente al compuesto 1,6- Dimetilhexanodioato detectado en el extracto de *Alcanivorax* sp. 337.

Figura 34. Ruta metabólica hipotética de degradación n-octano para producir mcl-PHAs por *Alcanivorax* sp. 337.

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Dendrograma generado por el programa PAST. Indica el agrupamiento de los aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos según sus características macroscópicas y microscópicas.

Anexo B. Características microscópicas y macroscópicas de los 53 aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos diferenciables obtenidos en sistemas de cultivo continuo realizados en BFAs.

Anexo C. Riqueza de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos diferenciables provenientes de los BFAs.

Anexo D. Abundancias de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos diferenciables provenientes de los BFAs (medida como UFC/mL de dilución serial).

Anexo E. Características microscópicas y macroscópicas de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos acumuladores de PHAs.

Anexo F. Cromatogramas obtenidos al aplicar la técnica de cromatografía de gases (GC). A) Perfil cromatográfico de *Pseudomonas* sp. 333(1); B) Perfil cromatográfico de *Bacillus* sp. 329B. C). Perfil cromatográfico de *Haererehalobacter* sp. 338B; D) Perfil cromatográfico de *Stenotrophomonas* sp. 371B; E) Perfil cromatográfico de *Halomonas* sp. 405; F) Perfil cromatográfico de *Alcanivorax* sp. 337.

GLOSARIO

Hidrocarburos: compuestos orgánicos resultantes de la combinación del carbono con el hidrógeno, son en gran parte apolares y exigen baja reactividad química a temperatura ambiente. Las diferencias en sus reactividades se determinan principalmente por la ocurrencia tipo y arreglos de enlaces insaturados, además esto sirve para la clasificación de acuerdo a sus características en cuatro grupos: los alcanos (hidrocarburos saturados), alquenos, alquinos e hidrocarburos aromáticos.

Bacterias Hidrocarburoclásticas: Comunidad microbiana con capacidad metabólica para degradar petróleo e hidrocarburos derivados de petróleo.

HAT's: hidrocarburos aromáticos totales.

Monooxigenas: enzimas dependientes del oxígeno que incorporan un grupo hidroxilo en sustratos de muchas rutas metabólicas, entre ellas las implicadas en la degradación de hidrocarburos. Por ejemplo, estas enzimas transfieren un solo átomo de la molécula de oxígeno y transforman el alcano en alcohol primario oxidando al grupo metil terminal o pueden ser utilizadas en las vías bioquímicas llamadas vías altas o periféricas que consisten en modificar los diferentes anillos aromáticos absorbidos en protocatechuate y catechol.

PHA: Polihidroxicanoato. Son poliésteres lineales producidos naturalmente por fermentación bacteriana a partir de fuentes de carbono relacionadas y no relacionadas.

PHA sintasa: enzima que polimeriza los monómeros de PHAs. Es codificada por genes *phaC* ubicados en el operon de biosíntesis de PHAs.

mcl-PHAs: polihidroxicanoatos de cadena media, los cuales contienen monómeros de 6-14 átomos de carbono.

scl-PHAs: polihidroxicanoatos de cadena corta, los cuales contienen monómeros de 3 - 5 átomos de carbono.

Homopolímero: PHAs que contienen un solo tipo de hidroxicanoato como unidad de monómero.

Copolímero: PHAs que tienen más de un tipo de hidroxicanoatos como unidades del monómero.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa; técnica de biología molecular, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de este fragmento original, o template.

PCR semi-nested: se realizan dos PCR consecutivas, en la primera se utilizan un par de primers llamados externos; en la segunda se usan cebadores complementarios a secuencias de ADN contenidas en los fragmentos que se amplificaron en la primera PCR (un primer interno y un primer externo) que flanquean una región que es la que queremos

amplificar. La idea que persigue esta técnica es que los productos de la primera amplificación son un molde ideal para la segunda amplificación, mucho mejor que el ADN genómico original.

Primer: partidor, cebador o primer; oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región complementaria al DNA template, que se desea amplificar y propician el inicio de la reacción de elongación por la Taq DNA polimerasa.

rDNA: ácido desoxirribonucleico ribosómico; secuencia de DNA contenida en los cromosomas del núcleo que codifica para el rRNA.

rRNA: ácido ribonucleico ribosómico; es el tipo de RNA mas abundante en las células y forma parte de los ribosomas que se encargan de la síntesis de proteínas según la secuencia de nucleótidos del RNA mensajero.

UFC: unidades formadoras de colonias, es el número mínimo de células separables sobre la superficie o dentro de un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia visible. Las UFC se miden como UFC/mL.

CG: cromatografía de gases; técnica cromatográfica que permite la separación de compuestos orgánicos e inorgánicos térmicamente estables y volátiles.

CG-MS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas; técnica para separar, identificar y cuantificar componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas.

Biorreactor: recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo.

BFA: Biorreactor de flujo ascendente; sistema de cultivo continuo.

EDS: estación de servicio; Bencinera, gasolinera o servicentro, punto de venta de combustible y lubricantes para vehículos de motor.

Dendrograma: es la representación gráfica que mejor ayuda a interpretar el resultado de un análisis cluster.

HPLC: carácter que expresa el máximo grado de pureza de cualquier reactivo.

Gen 16S rRNA: es un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o DNA ribosómico 16S rRNA (16S DNA) incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano, útil para la detección de bacterias el cual proporciona información útil y rápida sobre su identificación y filogenia mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de de secuencias bacterianas.

Gen *phaC*: gen que codifica la enzima PHA sintasa.

Género: categoría taxonómica que se ubica entre la familia y la especie.

NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica.

GenBank: base de datos de secuencias genéticas del NIH (Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos), una colección de disponibilidad pública de secuencias de DNA.

RDP: Proyecto de Base de datos Ribosomal; base de datos que proporciona datos herramientas y servicios relacionados con las secuencias de ARN ribosomal a la comunidad investigadora.

BLAST: The Basic Local Alignment Search Tool; es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local ya sea de DNA, RNA o de proteínas, basado en un algoritmo heurístico que encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema.

TAGs: triacilglicerolos. Son lípidos que consisten en una molécula de glicerol que se triesterifica; su principal función es la reserva de energía. Son moléculas totalmente hidrófobas por tener los hidroxilos del glicerol y los carboxilos de los ácidos grasos formando enlaces éster.

WEs: ésteres céricos. Son ésteres de un ácido y un alcohol de cadena larga, estos aceites tienen propiedades similares a los triglicéridos pero no son digeribles, se encuentran en algunas bacterias como Acinetobacter en las cuales son usados como reserva de energía.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de ecosistemas marinos por derrames de petróleo es uno de los problemas de polución con mayor efecto negativo sobre los procesos bióticos y abióticos (Alonso y López, 2002). En la costa pacífica Colombiana existen zonas afectadas por la contaminación con hidrocarburos como es el caso de la bahía del municipio de Tumaco–Nariño, uno de los más grandes puertos con actividades petroleras y con frecuentes reportes de derrame (Garay-Tinoco *et al.*, 2006). Los derrames de petróleo implican cambios drásticos en el ecosistema, tales como mayores aportes de materia que modifican las fuentes nutricionales para toda la biota. En el caso de los microorganismos la fuente de carbono incrementa considerablemente respecto a otros nutrientes esenciales (Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Dalal *et al.*, 2010). Este fenómeno o desbalance nutricional proporciona un ambiente propicio para el desarrollo de comunidades microbianas acumuladoras de compuestos lipídicos tales como los polihidroxicanoatos (PHAs), o polímeros biodegradables como respuesta al estímulo exógeno.

La síntesis de PHAs en procariotes se realiza por diferentes vías metabólicas, pero en todas, la enzima clave que polimeriza los monómeros de PHAs es la enzima PHA sintasa. Dicha enzima es codificada por el gen *phaC* que ha sido clasificado en diferentes clases en función del sustrato y su estructura. Rehm, (2003) plantea que de acuerdo al tipo de gen *phaC* se espera un tipo de polímero ya sea de cadena corta (scl-PHAs) o de cadena media (mcl-PHAs). Hay que tener en cuenta la versatilidad de la enzima por el sustrato que conduce a algunas excepciones (Steinbüchel y Lütke-Eversloh, 2003). El tipo de gen y el tipo de sustrato están determinando las propiedades materiales o físicas de los PHAs sintetizados (termoplásticos, elastómeros, etc.) y a su vez las posibles aplicaciones industriales y biotecnológicas (Tian *et al.*, 2009).

Existen informes sobre la acumulación de PHAs a partir de hidrocarburos en bacterias del suelo (Dalal *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 2010) y de bacterias marinas que acumulan PHAs a partir de fuentes de carbono sencillas (Chien *et al.*, 2007; Jamil y Ahmed, 2008; Prabhu *et al.*, 2010; Imhoff *et al.*, 2011). Pero son pocos los estudios reportados acerca de bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos capaces de acumular PHAs. La mayoría se limitan a las cepas *Alcanivorax borkunmensis* (Sabirova *et al.*, 2006b; Kalscheuer *et al.*, 2007), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Alcanivorax jadensis* T9, *Thalassolituus oleivorans* reconocidas por acumular compuestos lipídicos como los PHAs, triacilgliceroles (TAGs) y ésteres céricos (WEs) bajo condiciones desbalanceadas de crecimiento (Manilla-Pérez *et al.*, 2010), sin embargo, hasta la actual revisión de literatura (2012) no se han realizado estudios en Colombia que vinculen el tipo de gen *phaC* con el tipo de polímero producido en bacterias marinas hidrocarburoclásticas.

En la presente investigación se evaluó el potencial para la producción de PHAs en relación al tipo de gen *phaC* en bacterias marinas hidrocarburoclásticas. Esto fue posible a partir de la obtención de bacterias marinas hidrocarburoclásticas aisladas de la ensenada de Tumaco-Nariño; la evaluación de su capacidad para acumular PHAs empleando tinciones con sudan negro B y fluorescencia con rojo Nilo. La caracterización mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA de las bacterias marinas hidrocarburoclásticas y la amplificación del gen *phaC* así como el análisis del PHA producido permitió dar a conocer por primera vez el ecotipo microbiano en la región.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El petróleo constituye una fuente de energía de vital importancia en la sociedad actual; la explotación de este combustible natural implica el vertido voluntario o involuntario de sus productos de refinación a agua, suelo y aire; estos productos son mezclas de varios hidrocarburos y otros compuestos cuyas propiedades físicas y químicas son muy variadas, hecho que determina su comportamiento e impacto en los elementos ambientales cuando ocurre un derrame (Braibant, 2004). La contaminación por hidrocarburos del petróleo es una problemática de carácter mundial y de amplia distribución geográfica, ya que independiente de la zona afectada (lagos, suelos, zonas freáticas, ríos y playas). Los hidrocarburos tienen como destino final los ecosistemas marinos amenazando el equilibrio de sus componentes (Shahidul y Tanaka, 2004).

En la costa pacífica Colombiana existen zonas afectadas por la contaminación con hidrocarburos como es el caso de la bahía del municipio de Tumaco – Nariño, uno de los más grandes puertos con actividades petroleras (Garay-Tinoco *et al.*, 2006) y con frecuentes reportes de derrame, situación que provoca cambios en el nicho de varios sistemas biológicos. Para los microorganismos representa un exceso en la fuente de carbono respecto a otros nutrientes esenciales (Wälterman y Steinbüchel, 2005; Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Dalal *et al.*, 2010), haciendo de este ambiente un lugar propicio para el aislamiento de bacterias productoras de polímeros biodegradables y biocompatibles como son los PHAs a partir de la degradación de hidrocarburos. Las bacterias que acumulan PHAs emplean diferentes vías metabólicas que tienen una enzima en común, la PHA sintasa, codificada por el gen *phaC*, esta enzima cataliza la polimerización de los monómeros de PHAs y puede ser de clase I, II, III ó IV (Rehm, 2003). La caracterización del gen *phaC* permite aproximarse al conocimiento del tipo de polímero que podría acumular el microorganismo y por lo tanto, de sus propiedades físico-químicas fundamentales (Solaiman *et al.*, 2002; Revelo *et al.*, 2007; Jahns y Rehm, 2009; López-Cortés *et al.*, 2010).

En Colombia no se han realizado estudios sobre el tipo de gen *phaC* presente en bacterias marinas hidrocarburoclásticas y tampoco es claro el tipo de polímero que acumularían a partir de sustratos hidrocarburoclásticos, situación que se debe estudiar porque la enzima PHA sintasa actúa dependiendo del sustrato que utilice como fuente de carbono (Antonio *et al.*, 2000). Partiendo de esta situación se hace preciso caracterizar el tipo de gen *phaC* y el tipo de polímero acumulado en las bacterias marinas aisladas de la ensenada de Tumaco-Nariño, con futura utilidad en la recuperación de ecosistemas contaminados y la producción de polímeros novedosos.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la relación entre el tipo de gen *phaC* y el potencial de producción de PHAs en bacterias marinas hidrocarburoclásticas aisladas en Tumaco, Colombia?

3. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto corresponde al desarrollo del primer objetivo específico del macro-proyecto financiado por COLCIENCIAS (Código: 110445221299) titulado “Degradación de hidrocarburos por bacterias marinas productoras de bioplástico aisladas de la ensenada de Tumaco, Nariño”

En la actualidad los derrames de petróleo se han constituido como un problema ambiental preocupante. La bahía del municipio de Tumaco – Nariño, es un importante puerto Colombiano, expuesto a un alto riesgo de contaminación por hidrocarburos derivados del petróleo, debido al tráfico de buques petroleros, la existencia de oleoductos y el constante transporte de embarcaciones menores (Garay-Tinoco *et al.*, 2006). Las múltiples estrategias de acción para la recuperación del ambiente dependen en última instancia de la degradación microbiana, destacándose la importancia del estudio de las bacterias provenientes de los sitios contaminados.

La ensenada de Tumaco afectada por derrames de hidrocarburos proporciona un ambiente para la bioprospección de bacterias hidrocarburoclásticas que pueden presentar una mejor adaptación a los contaminantes de la zona, a diferencia de aislamientos foráneos. De hecho, este medio es ideal para la proliferación de bacterias que pueden utilizar como fuente de carbono hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) (Ni Chadhain *et al.*, 2006) e hidrocarburos alifáticos, ambos compuestos derivados del petróleo, para acumular polímeros de reserva de carbono y energía como los polihidroxialcanoatos (PHAs) (Sabirova *et al.*, 2006a). Los PHAs son poliésteres que se depositan intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión y tienen propiedades biodegradables y biocompatibles, por lo cual se incluyen en los procesos biotecnológicos de interés mundial (Madison y Huisman, 1999).

Las bacterias productoras de PHAs, presentan varias enzimas para la síntesis de polímero. Entre ellas, la PHA sintasa codificada por el gen *phaC* que determina el tipo de polímero ya sea de cadena corta (scl-PHAs) o de cadena media (mcl-PHAs), con diferentes propiedades materiales (termoplásticos, elastómeros, etc.) (Reddy *et al.*, 2003). La caracterización del gen *phaC* se ha empleado básicamente para seleccionar bacterias que acumulan PHAs (Sheu *et al.*, 2000; Solaiman *et al.*, 2002; Shamala *et al.*, 2003; Revelo *et al.*, 2007), dada la falta de especificidad de las tinciones sobre el polímero que suelen conducir a falsos positivos. En Colombia no se han realizado estudios que proporcionen información sobre la síntesis de PHAs frente a sustratos complejos como son los hidrocarburos, por lo tanto, es necesario aportar al conocimiento del proceso sobre la degradación de hidrocarburos y acumulación de PHAs en relación al tipo de gen *phaC* presente en bacterias marinas nativas, para futuras aplicaciones en la obtención de polímeros novedosos y estrategias de biorremediación.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el potencial para la producción de PHAs en relación al tipo de gen *phaC* en bacterias marinas hidrocarburoclásticas.

Objetivos específicos

- Seleccionar bacterias marinas hidrocarburoclásticas provenientes de la bahía de Tumaco Nariño acumuladoras de PHAs.
- Identificar los aislamientos bacterianos seleccionados mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA.
- Amplificar el gen *phaC* en las bacterias seleccionadas.
- Caracterizar el polímero producido por bacterias marinas hidrocarburoclásticas mediante cromatografía de gases.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS ACUMULADORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs).

El petróleo es un combustible natural compuesto de varios tipos de hidrocarburos, formados por cadenas de átomos de carbono largas o cortas y que pueden adoptar diferentes estructuras. Los hidrocarburos del petróleo pueden dividirse en cuatro categorías: hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfaltenos (Canals, 2005; Suárez, 2008). Los hidrocarburos pueden ordenarse de mayor a menor biodegradabilidad así: alcanos lineales, alcanos ramificados, aromáticos ligeros, alcanos cíclicos, aromáticos pesados y compuestos polares (Braibant, 2004).

Generalmente la fracción de hidrocarburos saturados y aromáticos que representa entre 70 y 97% de los hidrocarburos del petróleo es degradable, mientras los asfaltenos y las resinas son esencialmente inertes (Braibant, 2004). Los compuestos aromáticos y poliaromáticos se caracterizan por sus productos de degradación intermediarios muy contaminantes y cancerígenos (Cutz y Rendón, 2007). Los efectos del petróleo sobre los ecosistemas marinos dependen de factores como: tipo de petróleo (crudo o refinado), cantidad, distancia del sitio contaminado con la playa, época del año, condiciones atmosféricas, temperatura media del agua y corrientes oceánicas (Hidalgo, 2009).

El petróleo o cualquier tipo de hidrocarburos impide la entrada de luz que obstaculiza el importante proceso de fotosíntesis del plancton y el intercambio gaseoso, dando comienzo a la solubilización de los compuestos y afección en los ecosistemas marinos produciendo muerte de los organismos por asfixia, por envenenamiento, destrucción de los organismos jóvenes o recién nacidos, disminución de la resistencia o aumento de infecciones en las especies, especialmente avifauna, efectos negativos sobre la reproducción y propagación a la fauna y flora marina, destrucción de las fuentes alimenticias de las especies superiores y la incorporación de carcinógenos en la cadena alimenticia (Alonso y López, 2002; Hidalgo, 2009).

La biodegradación microbiana del petróleo se lleva a cabo por acción de vías metabólicas de los microorganismos por las cuales las sustancias tóxicas son transformadas en productos no tóxicos (Núñez *et al.*, 2002). Los microorganismos pueden degradar compuestos alifáticos (alcanos, alquenos y alquinos), oxidando el último carbono de la molécula para generar un hidrocarburo con un grupo alcohol con ayuda de las monooxigenasas. Mediante otras enzimas este grupo se oxida hasta grupo aldehído y finalmente a un grupo carboxílico, de esta forma se obtiene una molécula similar a un ácido graso y puede ser degradado a acetil-CoA por β -oxidación. La oxidación puede darse en carbonos no terminales dando lugar a dos ácidos grasos que se procesarán por β -oxidación (Widdel y Rabus, 2001) (Figura 1).

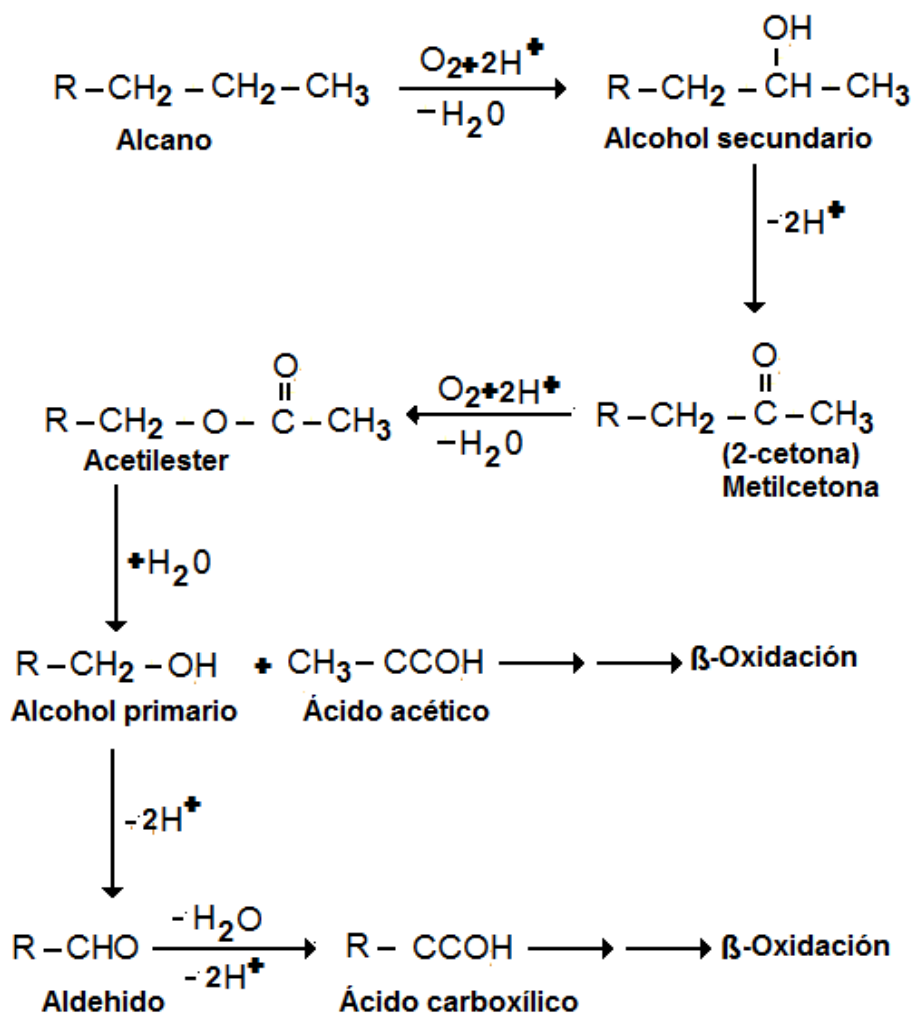


Figura 1. Vía metabólica para la degradación de hidrocarburos alifáticos en presencia de oxígeno (Widdel y Rabus, 2001).

La remoción de los compuestos aromáticos puede llevarse a cabo por bacterias que contienen mono o di-oxigenasas, utilizando el oxígeno para la activación y ruptura del anillo aromático y también como aceptor final de los electrones para la oxidación completa de estos compuestos, ésta ruta metabólica comprende las *vías altas o periféricas*, que consisten en modificar los anillos aromáticos en protocatecuato y catecol y *las vías bajas* donde a partir de estas dos moléculas se puede llevar a cabo el rompimiento del anillo mediante enzimas específicas (Morlett *et al.*, 2009) (Figura 2).

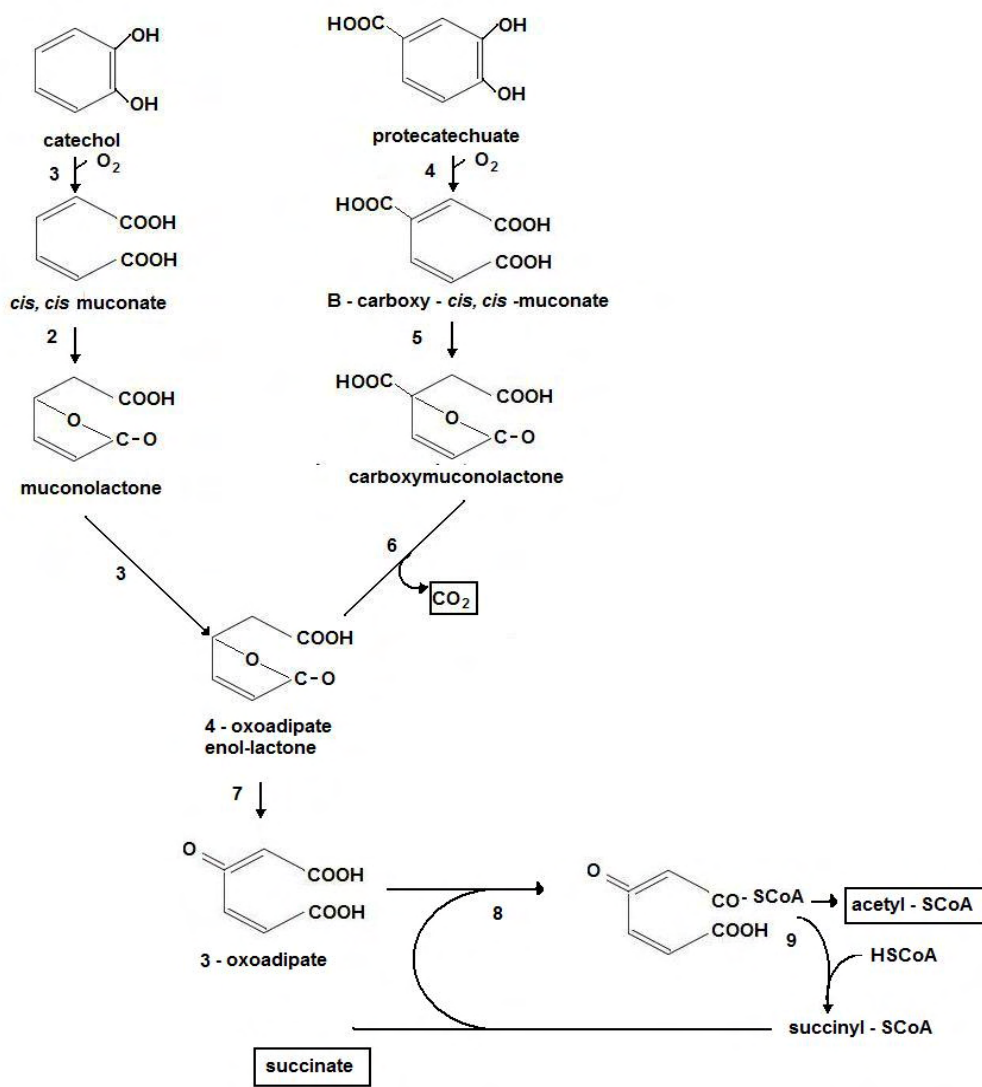


Figura 2. Vías bajas para la degradación de compuestos aromáticos (Suarez, 1993).

Algunas bacterias marinas poseen la capacidad de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono y son la mejor opción para usarse en los derrames de petróleo en zonas costeras (Cabranes *et al.*, 2006; Narváez-Flórez *et al.*, 2008; Pucci *et al.*, 2010). Los hidrocarburos derivados del petróleo son fuente de carbono primaria para las bacterias hidrocarburoclásticas obligadas (solo hidrocarburos) y facultativas (hidrocarburos y otras fuentes de carbono) (Golyshin *et al.*, 2002; Muyzer *et al.*, 2008); entre las hidrocarburoclásticas facultativas más reconocidas se destacan bacterias pertenecientes a géneros como *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas*, *Halomonas*, *Pseudomonas* (Harayama *et al.*, 2004), *Bacillus*, *Klebsiella*, *Chromobacterium*, *Flavimonas*, entre otros (Narváez-Flórez *et al.*, 2008; Chikere *et al.*, 2009). Como hidrocarburoclásticas obligadas se reconocen bacterias de los géneros *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Oleiphilus*, *Oleispira* y *Planococcus* (Harayama *et al.*, 2004).

Los esfuerzos por aislar microorganismos nativos a partir de sustratos de hidrocarburos, han permitido obtener nuevos grupos taxonómicos, fisiológicamente novedosos entre ellas están, las bacterias hidrocarburoclásticas obligadas, que han sido reconocidas por su función en la remoción de hidrocarburos provenientes de aguas marinas contaminadas (Yakimov *et al.*, 2007), constituyéndose en candidatos ideales para estrategias de biorremediación (Ron y Rosenberg, 2002), puesto que la reintroducción de microorganismos nativos aislados de un medio contaminado con petróleo, parece ser el método de biorremediación más efectivo (Samanez, 2008).

La biorremediación emplea organismos vivos (plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente) como un sistema para neutralizar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos (compuestos inorgánicos como CO₂, agua y formas inorgánicas de N, P y S) (Volke y Velasco, 2003; Benavides *et al.*, 2006). Puede ser aplicada “in situ” o “ex situ”. “In situ” se refieren a las que se aplican en el área a tratar, mientras que en las “ex situ” los productos son aplicados al material contaminado donde pueda ser tratado. Además la biorremediación aplica técnicas de bioestimulación (adición de nutrientes, sustratos o tensoactivos que estimulen el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos) y de bioaumentación (uso de enzimas o cultivos de microorganismos con alta capacidad de degradar el compuesto contaminante no deseado hasta sus moléculas básicas) (Núñez *et al.*, 2002; Benavides *et al.*, 2006).

5.1.1 Bacterias acumuladoras de PHAs a partir de hidrocarburos. Algunas cepas productoras de PHA a partir de sedimentos marinos se agrupan en géneros como *Beneckeia* y *Vibrio* (Oliver y Colwell, 1973; Baumann *et al.*, 1971), otras bacterias son *Rhodococcus ruber* (Alvarez *et al.*, 1997), *Vibrio* spp. (Arun *et al.*, 2009; Chien *et al.*, 2007), *Halomonas profundus* sp. nov., (Simon-Colin *et al.*, 2008), *H. hydrothermalis* (Shrivastav *et al.*, 2011; Shrivastav *et al.*, 2010), *Saccharophagus degradans* (González-García *et al.*, 2008), *S. degradans* 2-40 (Zhang *et al.*, 2011), *Photobacterium leiognathi*, *V. harveyi* (Boyandin *et al.*, 2008), *Pseudomonas aeruginosa* CMG607w (Jamil y Ahmed, 2008), *Bacillus cereus*, *B. mycoides* (Arun *et al.*, 2009), *B. megaterium* (Prabhu *et al.*, 2010), *B. megaterium* SRKP-3 (Pandian *et al.*, 2010) y *Pseudoalteromonas* sp. SM9913 (Wang *et al.*, 2010). Recientemente, los tapetes microbianos han sido considerados como los sistemas más diversos para la producción de PHAs (Rothermich *et al.*, 2000), los aislamientos bacterianos acumuladores de PHAs provenientes de tapetes marinos contaminados pertenecen a los generos *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Paracoccus* y *Micrococcus* (López-Cortés *et al.*, 2008).

Para las bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos, la contaminación con petróleo constituye una condición temporal de exceso de carbón acoplado a una limitada disponibilidad de nitrógeno que le permite a la bacteria acumular compuestos de almacenamiento como los TAGs, WEs y PHAs (Sabirova *et al.*, 2006a; Manilla-Pérez *et al.*, 2010), sin embargo son pocos los estudios reportados acerca de bacterias marinas capaces de acumular PHAs a partir de hidrocarburos, tales como *Alcanivorax borkunmensis* capaz de degradar hidrocarburos de ambientes contaminados con petróleo (Kalscheuer *et al.*, 2007) y también de biotransformarlos eficientemente en PHAs extracelulares para usos biotecnológicos (Prieto, 2007); *A. borkunmensis* SK2, reveló la superproducción y localización extracelular de PHAs en estado mutante (Sabirova *et al.*,

2006a) y algunas bacterias como *M. hydrocarbonoclasticus*, *A. jadensis* T9, *Thalassolituus oleivorans* reconocidas por acumular compuestos lipídicos como los PHAs, triacilgliceroles (TAGs) y ésteres céricos (WEs) bajo condiciones desbalanceadas de crecimiento (Manilla-Pérez *et al.*, 2010).

En cuanto a los genes implicados en la producción de PHAs se han descrito algunos en microorganismos marinos como *Saccharophagus degradans* (Kalia *et al.*, 2003), *A. borkumensis* cepa SK2, (*phaC1* y *phaC2*) (Sabirova *et al.*, 2006a), *Pseudomonas* spp. relacionada con *P. stutzeri* (clase II) (Revelo *et al.*, 2007), *Paracoccus seriniphilus* (clase I) (López-Cortés *et al.*, 2010). Un estudio demostró que haloarchaea, bacteria y arqueas comparten las afiliaciones genéticas mas cercanas entre las PHA sintasas, proliferando en los hábitats de origen marino, además se demostró que la PHA sintasa de haloarchaea pertenecen a la clase III y la PHA sintasa de dos bacterias halofílicas, *Chromohalobacter salexigens* y *Halophila halorhodospira*, se relacionaron con la clase I (Quillaguamán *et al.*, 2010). Hasta la revisión actual de literatura, en Colombia no se han realizado investigaciones sobre bacterias marinas hidrocarburoclásticas acumuladoras de PHAs.

5.2 CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS MEDIANTE SECUENCIACIÓN PARCIAL DEL GEN 16S rRNA.

Actualmente se encuentran disponibles herramientas para la caracterización e identificación de especies, tales como el uso de marcadores moleculares entre los cuales esta la secuenciación del gen 16S rRNA (Muyzer *et al.*, 1993). El 16S rRNA es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 pb, codificado por el gen *rrs*, también denominado DNA ribosomal 16S (16S rDNA) (Rodicio y Mendoza, 2004). En particular, los genes 16S rRNA se han convertido en el estándar para la determinación de relaciones filogenéticas, la evaluación de la diversidad en el medio ambiente, la detección y cuantificación de poblaciones específicas (Acinas *et al.*, 2004).

Woese en 1987 considero la secuenciación parcial del gen 16S rRNA como instrumento de identificación parcial de bacterias ya que esta macromolécula presenta una serie de características que fueron consideradas para usarlo como cronómetro molecular definitivo (Olsen y Woese, 1993). Durante las últimas dos décadas los microbiólogos se han basado principalmente en las secuencias del gen 16S rRNA para la identificación y clasificación de las bacterias; el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA se utiliza en dos aplicaciones principales: la identificación y clasificación de cultivos puros y la estimación de la diversidad bacteriana en las muestras ambientales (Dorigo *et al.*, 2005; Rajendhran y Gunasekara, 2011).

Según Rodicio y Mendoza (2004), 16S rRNA es una molécula conservada en todas las bacterias y que constituye por tanto una diana universal; su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios, estos cambios ocurren de manera suficientemente lenta lo cual aporta información acerca de todos los procariotas a lo largo de la escala evolutiva; su tamaño (1500 pb) minimiza las fluctuaciones

estadísticas que se produzcan en la secuencia y la conservación en estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso, además por la facilidad de secuenciar los 16S rRNA existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento tales como: NCBI (National Center for Biotechnology Information) y RDP (Ribosomal Database Project). La secuenciación parcial del gen ARNr 16S, es una herramienta molecular que permite aproximarse a la determinación del género de una bacteria, su precisión depende de las regiones del gen amplificadas y del tamaño del fragmento amplificado.

5.3 SÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) EN BACTERIAS.

Entre las principales sustancias lipofílicas acumuladas por las bacterias en condiciones de crecimiento desequilibrado están los triacilgliceroles (TAGs), los ésteres céricos (WEs) y los polihidroxicanoatos (PHAs) (Manilla-Pérez *et al.*, 2010). Los PHAs son poliésteres de hidroxialcanoatos y se acumulan en forma de gránulos en el citoplasma de muchos géneros bacterianos como compuestos de almacenamiento de carbono y energía (Steinbüchel, 1991; Steinbüchel y Valentin, 1995). Los granulos de PHAs tienen tamaños que oscilan entre 0,2 y 0,5 μm y un número aproximado de 8 a 10 gránulos por célula que varía dependiendo de la especie, el contenido de PHAs en las células generalmente no es muy alto y dependiendo de las cepas bacterianas, es de 2 a 10% del peso de la masa celular seca y puede alcanzar hasta 90% si el crecimiento bacteriano se limita por el agotamiento de los componentes nutricionales esenciales (Du *et al.*, 2001; Ojumo *et al.*, 2004).

En la mayoría de las bacterias los PHAs son sintetizados bajo condiciones desfavorables de crecimiento tales como limitación de nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno, y en presencia de exceso de una fuente de carbono (Madison y Huisman, 1999). Las propiedades materiales de los PHAs, los hacen similares a los plásticos y elastómeros convencionales derivados de petroquímicos, con la propiedad de que son degradados a agua y dióxido de carbono por microorganismos en varios ambientes tales como, suelo, lagos y mares (Ojumo *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2004).

La composición monomérica del biopolímero, depende de la fuente de carbono, de la enzima PHA sintasa y de las vías metabólicas en cada célula (Anderson y Dawes, 1990; Rehm, 2003; Aldor y Keasling, 2003). Los PHAs pueden ser sintetizados con diversos monómeros consistentes en longitudes de cadena de carbono que van desde 3 a 14 (Gao *et al.*, 2011). Los PHAs suelen dividirse en dos grupos dependiendo del número de átomos de carbono de los monómeros: PHAs de cadena corta (scl-PHAs) de 3-5 átomos de carbono y PHAs de cadena media (mcl-PHAs) de 6-14 átomos de carbono (Rehm, 2003).

Actualmente los PHAs dependiendo del tipo de monómero, pueden ser homopolímeros, los cuales contienen un solo tipo de hidroxialcanoato como unidad de monómero, por ejemplo P(3HB) poli(3-hidroxi butirato), P(3HHx) poli(3hidroxi hexanoato), o puede ser un heteropolímero (copolímero) que tiene más de un tipo de hidroxialcanoato como unidades

de monómero, por ejemplo el P3(HB-co-3HV) poli(3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato), 3HHx-co-3HO Poli (3-hidroxi hexanoato-co-3hidroxi octanoato) y P (3HB-co-3HHx) Poli (3-hidroxi butirato-co-3hidroxi hexanoato) (Rai *et al.*, 2011).

Se ha descrito recientemente copolímeros en bloques que consisten en cadenas de polímeros que contienen dos o más regiones de un único polímero unidos covalentemente, estas unidades enantioméricas capturan las propiedades de cada bloque que pueden generar mejores propiedades de PHAs. Las estructuras de bloque de copolímeros incluyen A-B Dibloque, A-B-C Tribloque o (AB)_n múltiples bloques repetitivos (Gao *et al.*, 2011). La síntesis bacteriana de copolímeros en bloque de PHAs es poco común, algunos estudios como el de Pederson y colaboradores (2006) reportan la formación por *Ralstonia eutropha* de un copolímero en bloque de PHB-*b*-PHBV, Li y colaboradores (2011) evaluaron la capacidad de producción de PHB-*b*-PHVHHp, un copolímero en bloque producido por una cepa recombinante de *Pseudomonas putida*. Existen dos grandes grupos de sustratos utilizados en la biosíntesis de estos polímeros: los sustratos relacionados y los sustratos no relacionados; la síntesis a partir de sustratos relacionados se denomina de esta forma ya que la composición del polímero producido refleja claramente el sustrato proporcionado por tanto, en los últimos años se ha observado un aumento significativo en el empleo de fuentes de carbono simples y de bajo costo para la producción de polímeros biodegradables con estructura diferente de la fuente de carbono empleada (Rocha, 2007).

5.3.1 Detección y cuantificación de PHA. La detección de gránulos de polímero intracelular se hace mediante el uso de tinciones de espectro lipofílico: negro Sudán, azul de Nilo A y rojo de Nilo (Schlegel *et al.*, 1970; Ostle y Holt, 1982; Kranz *et al.*, 1997; Spiekermann *et al.*, 1999), sin embargo estas han sido consideradas como técnicas inespecíficas porque no permiten diferenciar entre PHAs, TAGs, WEs y otros lípidos neutros (Kalscheuer *et al.*, 2007), por esta razón se han propuesto recientemente el uso combinado de técnicas colorimétricas con herramientas moleculares (Sheu *et al.*, 2000; Solaiman *et al.*, 2000; Shamala *et al.*, 2003; Revelo *et al.*, 2007).

Para la caracterización de PHAs se han empleado técnicas como la cromatografía de gases, que utiliza como patrón interno ácido benzoico, el cual establece tiempos de retención determinados para cada uno de los tipos de estructuras y cantidad de carbonos presentes en ellas (Braunegg *et al.*, 1998). Para esta cuantificación es necesario extraer los PHAs de las células y despolimerizarlos mediante métodos como metanólisis o propanólisis para formar metil-ésteres y propil-ésteres respectivamente; la cuantificación de PHAs también se realiza mediante análisis espectroscópico de Resonancia Magnética Nuclear con C¹³ (C¹³-NMR) (Dai *et al.*, 2008).

5.3.2 Bacterias productoras de PHA. Se puede presentar los microorganismos acumuladores de PHAs agrupados con base en la producción de PHAs de cadena corta o de cadena media (Tian *et al.*, 2000). Para el primer caso, sobresalen *R. eutropha*, *Caulobacter crescentus*, *Azorhizobium culinodans*, *Rhizobium etli*, *Sinorhizobium meliloti*, *Paracoccus denitrificans*, *Methylobacterium extorquens*, *Zooglea ramigera*, *Aeromonas punctata*, *Gordonia rubripertinctus*, *Delftia acidovorans*, *Allochromatium vinosum*, *Thiocystis violacea*, *T. pfenningii* y *Synechocystis* sp. (Rehm, 2003), *Bacillus* sp., (McCool

y Cannon, 2001), *Bradyrhizobium lupini* (Bravo y Fernández, 2005), entre otras; Algunas de las bacterias que producen PHAs de cadena media pertenecen a géneros como *Pseudomonas* (Rehm, 2003) y a especies como, *Burkholderia caryophylli* (Hang *et al.*, 2002), *Burkholderia* sp. IBUN S1602 (Revelo *et al.*, 2007) y *A. burkomensis* (Sabirova *et al.*, 2006a).

Las bacterias gram positivas principalmente de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, han sido ampliamente utilizadas en la industria, sin embargo, estos microorganismos aún no han sido explorados para la producción de polímeros biodegradables; otros géneros de bacterias Gram positivas productoras de PHAs son *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* (Valappil *et al.*, 2007).

5.3.3 Genes que codifican para las enzimas del metabolismo de PHAs. Los genes que codifican para las enzimas PHA sintasas y otras proteínas relacionadas con el metabolismo de PHAs, están agrupados en el cromosoma bacteriano (Rehm, 2003) (Figura 3). *R. eutropha* poseen el gen *phaC* de clase I. El operón *phaCAB* tiene los genes *phaC*, que codifica para la enzima PHA sintasa, *phaA* (-cetotiolasa) y *phaB* (acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH) (Antonio *et al.*, 2000). Las *Pseudomonas* que acumulan mcl-PHAs, poseen dos genes *phaC* (*phaC1* y *phaC2*) los cuales codifican PHA sintasas de clase II y están separados por el gen *phaZ* que codifica para la enzima PHA depolimerasa; además contienen el gen *phaD* (codifica para una proteína estructural que estabiliza los gránulos de PHA) seguido por los genes *phal* y *phaF* que codifican proteínas estructurales y reguladoras (Rehm, 2003).

En las bacterias que poseen PHA sintasas de clase III, los genes *phaC* y *phaE* están directamente enlazados en sus genomas y posiblemente constituyen un operón; en *Chromatium vinosum*, *phaA* y *phaB* están localizados en dirección opuesta a *phaC* y *phaE* (Müh *et al.*, 1999; Liebergesell *et al.*, 2000). Los genes para la PHA sintasa clase IV, se encuentran en bacterias pertenecientes al género *Bacillus* y presentan los genes *phaR* y *phaC*, los cuales están separados por *phaB* (McCool y Cannon, 2001).

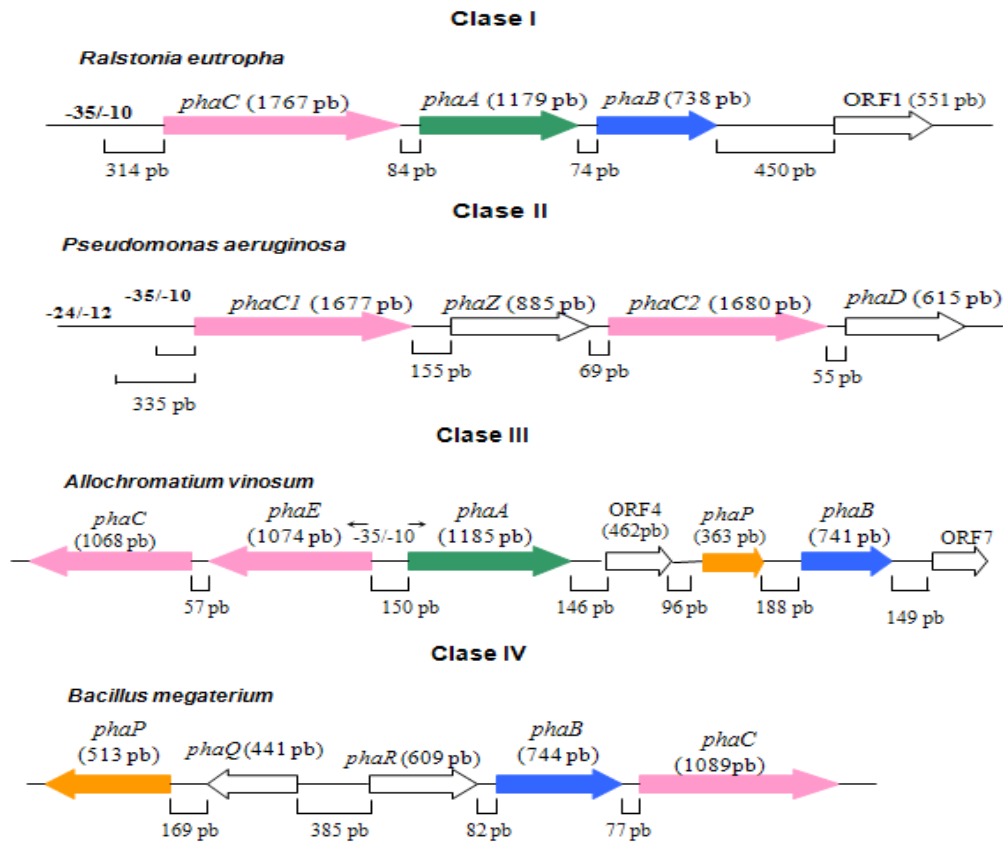



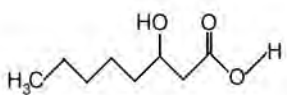
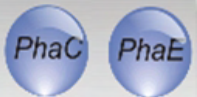
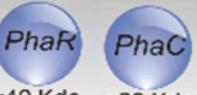
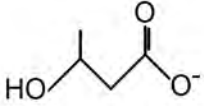

Figura 3. Organización de los genes que codifican para las diferentes PHA sintasas. *phaC/C1/C2*, genes que codifican para la PHA sintasa; *phaE*, codifica para la subunidad de PHA sintasa; *phaA*, codifica para la - cetotiolasa; *phaB*, codifica para la acetoacetyl-CoA reductasa; *phaR*, para una proteína reguladora; ORF, marco abierto de lectura con función desconocida; *phaZ*, para la PHA depolimerasa; *phaD*, marco abierto de lectura con función desconocida; *phaP*, para la fasina (Revelo, 2005 modificado de Rehm, 2003 Revelo, 2005).

5.3.4 PHA Sintasas. Las PHA sintasas son las enzimas claves de la biosíntesis de PHA y catalizan la conversión estereo-selectiva de sustratos (R)-3-hidroxiacil-CoA a PHAs. Según Rehm (2003) las PHA sintasas se clasifican en cuatro clases con base en la estructura primaria de aminoácidos, la especificidad de sustrato y la composición de la subunidad (Tabla 1). Las PHA sintasas Clase I (*R. eutropha*), compuestas por un solo tipo de subunidad, son preferencialmente activas hacia tioésteres CoA de varios 3-hidroxiacanoatos de cadena corta, que comprenden de tres a cinco átomos de carbono. Las PHA sintasas Clase II (*Pseudomonas aeruginosa*), compuestas por un solo tipo de subunidad, son preferencialmente activas hacia tioésteres CoA de varios 3-hidroxiacanoatos de cadena mediana, que comprendan al menos cinco átomos de carbono, incorporan preferencialmente ácidos grasos 3- hidroxide de cadena media (C6-C14) dentro de los PHAs y el producto resultante es un polímero semejante al látex.

Las PHA sintasas Clase III (*Allochrochromatium vinosum*), comprenden enzimas conformadas por dos diferentes tipos de subunidades, cada una aproximadamente de 40 KDa, La subunidad PhaC, que exhibe una similitud de su secuencia aminoacídica de 21-28 % a las PHA sintasas de clase I y II; y la subunidad PhaE, que no muestra similitud con las PHA sintasas. Estas PHA sintasas prefieren tioésteres CoA de 3-hidroxicanoatos de cadena corta.

Las PHA sintasas Clase IV (*B. megaterium*) se parecen a las PHA sintasas de clase III, pero PhaE es reemplazada por PhaR (McCool y Cannon, 2001). Las PHA sintasas novedosas descubiertas en el género *Bacillus* tienen la habilidad de incorporar tanto scl-PHA como mcl-PHA, indicando que el género puede ser un productor potencial de PHAs novedosos con diferentes rangos de composiciones monoméricas, además la cepa *Bacillus* sp. INT005 presentó la habilidad de producir poli(3-hidroxi butirato), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato), poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato), poli(3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) y poli(3-hidroxi butirato-co-6-hidroxi hexanoato-co-3-hidroxi hexanoato) a partir de fuentes de carbono apropiadas (Tajima *et al.*, 2003). Además las bacterias de este género están asociadas con la acumulación de copolímeros a partir de una sola fuente de carbono (Valappil *et al.*, 2007)

Tabla 1. Clases de sintasas de poliéster*

clase	Subunidad (origen del prototipo)	Especies representativa [Substrato]	posibles bloques constructos incorporados en el PHA
II	 ≈60-75 Kda Huisman y colaboradores (1991)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [Tioésteres CoA de ácidos grasos (R)-3-hidroxi (6-14 C)]	 3-hidroxi octanoato
III	 ≈40 Kda ≈40 Kda Liebergesell y Steinbüchel, (1992)	<i>Allochrochromatium vinosum</i> [Tioésteres de CoA de (R)-3-hidroxi ácidos grasos (3-5 C)]	
IV	 ≈40 Kda ≈22 Kda McCool y Cannon (2001)	<i>Bacillus megaterium</i> [3HA _{SCL} -CoA]	 3-Hidroxi butirato
I	 ≈60-73 Kda Peoples y Sinskey (1989)	<i>Ralstonia eutropha</i> [Tioésteres de (R)-3-hidroxi -CoA]	

* Fuente: Rehm (2003) modificada en esta investigación.

Cabe destacar que para los diferentes tipos de PHA sintasa existen algunas excepciones que muestran una amplia especificidad de la enzima por el sustrato, por ejemplo, la PHA sintasa de *Thiocapsa pfennigii* (Clase III), tiene una amplia especificidad por sustratos de cadena corta y de cadena mediana (Liebergesell *et al.*, 2000); la PHA sintasa de *Aeromonas punctata* (clase I), sintetiza el copolímero P(3HB-co-HH) (poli (3-hidroxibutirato-co-3 hidroxihexanoato) (Rehm, 2003).

5.3.5 Rutas Metabólicas para la síntesis de PHAs. Se conocen más de 5 vías metabólicas que llevan a la síntesis de PHAs. En la Figura 4 (Chen, 2010) se relacionan las más importantes. Estas rutas muestran las enzimas y genes involucrados en la biosíntesis de PHAs. La biosíntesis de PHA ha sido bien estudiada en los últimos años. El acetil-CoA es el componente clave para suplir el 3--hidroxialcanoil-CoA de diferentes longitudes como sustratos para las PHA sintasas de diversas especificidades. Además el 3--hidroxialcanoil-CoA también puede ser suministrado a partir de la b-oxidación de ácidos grasos de diferentes longitudes de cadena. Algunos genes codificando varias enzimas están directa o indirectamente involucrados en la síntesis de PHA (Tabla 2).

Hasta ahora, la biosíntesis de PHA se puede resumir en ocho vías metabólicas (Figura 4, Tabla 2). La primera vía consiste en las tres principales enzimas b-cetotiolasa, dependiente de NADPH, acetoacetil-CoA reductasa y PHA sintasa codificada por los genes *phaA*, *PhaB* y *PhaC*, respectivamente. *Ralstonia eutropha* es el representante de esta vía. Una vía asociada implicada en la degradación de PHA catalizada por la PHA despolimerasa, dímero hidrolasa, 3-hidroxibutirato deshidrogenasa y acetoacetil CoA-sintasa ayuda a regular la síntesis y degradación de PHA. La vía asociada se encontró en las cepas de *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas stutzeri*, *R. eutropha* y *Pseudomonas oleovorans* (Sudesh *et al.*, 2000).

La segunda vía de síntesis de PHA (vía II) se relaciona con la absorción de ácidos grasos por microorganismos. Después de la b-oxidación del ácido graso, la acil-CoA entra en el proceso de síntesis de monómeros de PHA. Las enzimas, incluyendo 3-cetoacil-CoA reductasa, epimerasa, (R)-enoil-CoA hidratasa /enoil-CoA hidratasa I, acil-CoA oxidasa (putativa) y enoil-CoA hidratasa I (putativa) se comprobó que estaban involucradas en el suministro del precursor 3-hidroxiacil-CoA para la síntesis de PHA. *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa* y *A. hydrophila* son capaces de utilizar la vía II para sintetizar mcl-PHA o copolímeros de (R)-3-hidroxibutirato (R3HB) y (R)-3-hidroxihexanoato (PHBHHx).

La Ruta III involucra a la 3-hidroxiacil-ACP-CoA transferasa (PhaG) y malonil-CoA-ACP transacilasa (FabD), las cuales ayudan a proporcionar 3-hidroxiacil-ACP para formar el monómero de PHA 3-hidroxiacil-CoA, que conduce a la formación de PHA bajo la acción de la PHA sintasa (Sudesh *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2005; Taguchi *et al.*, 1999). La ruta IV utiliza el NADH dependiente acetoacetil-CoA reductasa para oxidar (S)-(+)-3-hidroxibutiril-CoA. Una alta proporción de NADPH a NADP + podría favorecer la reducción de acetoacetil-CoA para la síntesis de poli [(R)-3-hidroxibutirato] (PHB). La ruta V utiliza la succinil semialdehído deshidrogenasa (SucD), 4-hidroxibutirato deshidrogenasa (4hbD) y 4-hidroxibutirato-CoA: CoA transferasa (OrfZ) para sintetizar 4-hidroxibutiril-CoA y formar 4-hidroxibutirato que contiene el PHA. Esta vía se reportó en *Clostridium kluyveri* (Valentín y Dennis, 1997). La ruta VI emplea la lactonasa putativa y la sintetasa de

hidroxiacil-CoA para transformar el 4,5-alkanolactone en 4,5-hidroxiacil-CoA para la síntesis de PHA (Valentín y Steinbüchel 1995).

La ruta VII esta basada en alcohol deshidrogenasa putativa la cual se ha encontrado en *A. hydrophila* 4AK4. En la vía VII, el 1,4-butanodiol se oxida a 4-hidroxiacetato y luego a 4-hidroxiacetil-CoA por el 4-hidroxiacetato contenido en la síntesis de PHA (Xie y Chen, 2008). La ruta VIII convierte el 6-hidroxihexanoato en 6-hidroxihexanoato conteniendo PHA bajo las acciones de las ocho enzimas (Tabla 2).

Tabla 2. Rutas de biosíntesis para polihidroxiacanoatos (PHAs) y enzimas involucradas*

Número	Vía	Abreviación	Enzima
1	Vía 1	PhaA	-cetotilasa
2		PhaB	NADPH dependiente de Acetoacetil-CoA reductasa.
3		PhaC	PHA sintasa
4	Vía asociada	PhaZ	PHA depolimerasa
5			Dimer hidrolasa
6			(R)-3-Hidroxiacetato deshidrogenasa
7			Acetoacetil-CoA sintetasa
8	Vía 2		3-Cetoacil-CoA reductasa
9		FabG	Epimerasa
10			(R)-Enoil-CoA hidratasa/enoil-CoA hidratasa I
11		PhaJ	Acil-CoA oxidasa, putativa
12			Enoil-CoA hidratasa, putativa
13	Vía 3		3-Hidroxiacil –ACP-CoA transferasa malonil - CoA-ACP transacilasa
14	Vía 4	PhaG FabD	NADH dependiente de acetoacetil-CoA reductasa
15			Succínico semialdehído deshidrogenasa
16	Vía 5	SucD	4-Hidroxiacetato deshidrogenasa
17		4hbD	4-Hidroxiacetato-CoA:CoA transferasa
18	Vía 6	OrfZ	Lactonasa, putativa
19			Hidroxiacil-CoA sintasa, putativa
20	Vía 7		Alcohol deshidrogenasa, putativa
21	Vía 8		Ciclohexanol deshidrogenasa
22		ChnA	Ciclohexanona monooxigenasas
23		ChnB	Caprolactano hidrolasa
24		ChnC	6-Hidroxihexanoato deshidrogenasa
25		ChnD	6-Oxohexanoato deshidrogenasa
26		ChnE	Semialdehido deshidrogenasa, putativa
27			6-Hidroxihexanoato deshidrogenasa, putativa
28			Hidroxiacil-CoA sintasa, putativa

*Fuente: Chen (2010).

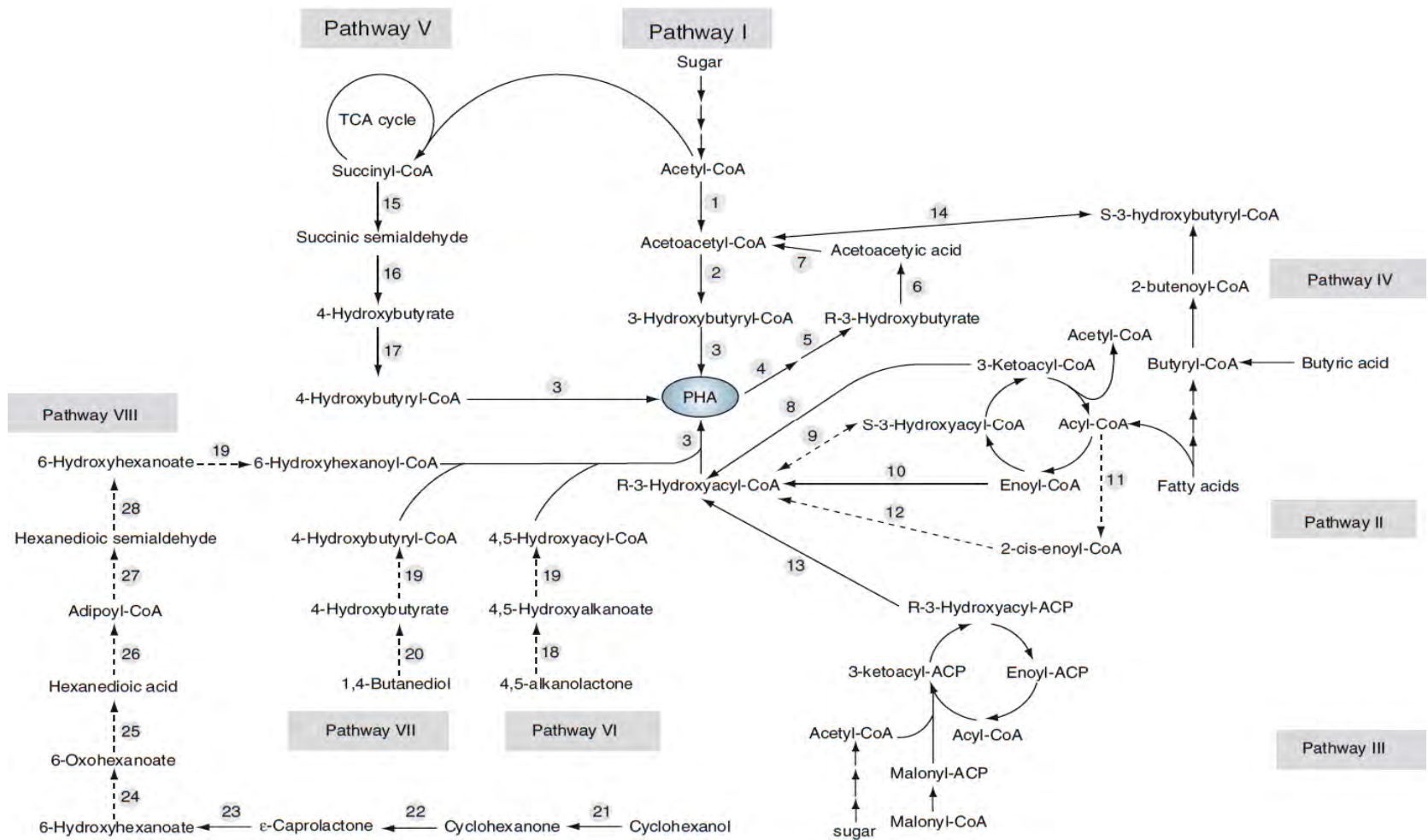


Figura 4. Rutas metabólicas de biosíntesis de PHA (Chen, 2010).

6. METODOLOGÍA

6.1 SELECCIÓN DE BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS PROVENIENTES DE LA BAHÍA DE TUMACO-NARIÑO ACUMULADORAS DE PHAs

6.1.1 Área de estudio y toma de muestras. La bahía de Tumaco está localizada en el extremo sur del litoral Pacífico del departamento de Nariño, entre las latitudes $01^{\circ} 37'$ y $02^{\circ} 09' 30''$ y longitudes $79^{\circ} 01'$ y $78^{\circ} 26'$; en esta zona se establecieron 10 puntos de muestreo localizados en las siguientes áreas: Estero el Pajal (puntos 1, 2, 3 y 4) latitud $1^{\circ} 48' 43''$ - longitud $78^{\circ} 47' 26''$, Puente el Pindo (punto 5) latitud $1^{\circ} 48' 93''$ - longitud $78^{\circ} 46' 50''$, Estación de servicio (EDS) Mobil del Litoral (punto 6) latitud $1^{\circ} 48' 30''$ - longitud $78^{\circ} 78' 49''$, EDS La Bombita (punto 7) latitud $1^{\circ} 48' 30''$ - longitud $78^{\circ} 78' 49''$, EDS Isla Dorada (punto 8) latitud $1^{\circ} 48' 30''$ - longitud $78^{\circ} 78' 49''$, EDS Romero y Burgos (punto 9) latitud $01^{\circ} 48' 12''$ - longitud $78^{\circ} 04'$ aproximadamente y Muelle Sociedad Portuaria sector Gabarra ECOPEPETROL (punto 10) latitud $01^{\circ} 53' 00''$ - longitud $78^{\circ} 48' 35''$ (Figura 5).

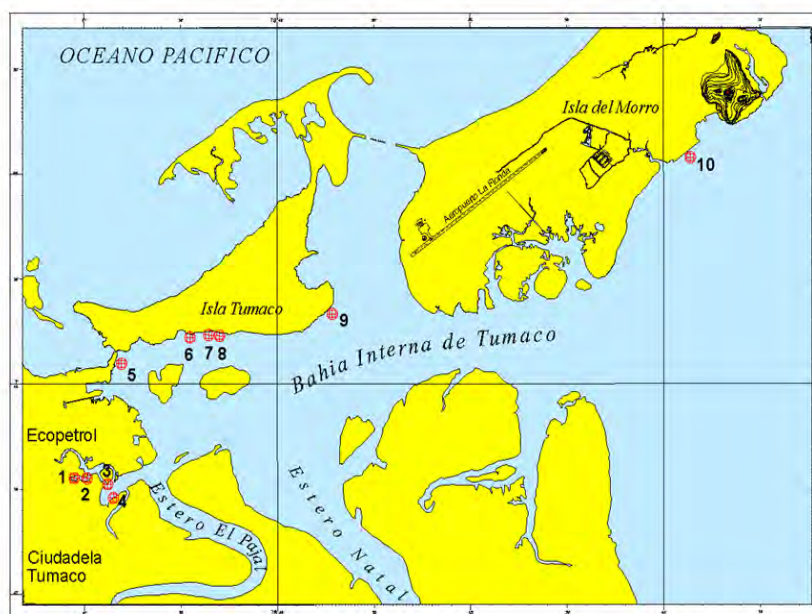


Figura 5. Mapa de la bahía de Tumaco-Nariño, ubicación 10 puntos de muestreo. Fuente: <http://www.cccp.org.co>.

Con el fin de obtener muestras compuestas y asegurar una adecuada representatividad, cada punto de muestreo se subdividió en 5 parcelas preferenciales (Humboldt, 2003). En cada uno de estos puntos se colectaron muestras de agua superficial con ayuda de botellas oceanográficas Ninsky, entre los 125 y 465 cm respectivamente (disco Secchi) y se depositaron en frascos plásticos estériles de 1 litro de capacidad. Todas las muestras fueron debidamente marcadas y guardadas en neveras de icopor con hielo para ser transportadas antes de 24 horas hasta el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la

Universidad de Nariño. En total se obtuvo 1 muestra compuesta de agua por cada punto de muestreo (10 muestras en total).

6.1.2 Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos. Con el fin de obtener una amplia gama de bacterias degradadoras de hidrocarburos se realizaron ensayos de enriquecimiento en sistemas de cultivo continuos desarrollados en un Biorreactor de Flujo Ascendente (BFA). El biorreactor consistió en un cilindro de 4 pulgadas de diámetro interno, una altura nominal de 1,20 m, en la base del biorreactor se localiza la columna de flujo ascendente, el sistema estuvo dotado de una bomba de aproximadamente 45 W de potencia que permitió la elevación de 1,80 m, con un diámetro de salida y caudal proporcional al sistema integral, la bomba se encontraba sumergida dentro del tanque de reserva del liquido, donde por medio de válvulas reguladoras se controló el afluente y efluente del sistema; manteniendo así, un flujo de retención de liquido en el sistema por cinco días. El sistema de BFA estuvo dotado de tres sitios de muestreo a diferentes niveles de altura y aireadores de doble salida, que se insertaron desde la parte superior hasta la columna central, los BFAs estuvieron fijados a la pared mediante ángulos de aluminio de 1 x 1 cm (Figura 6).

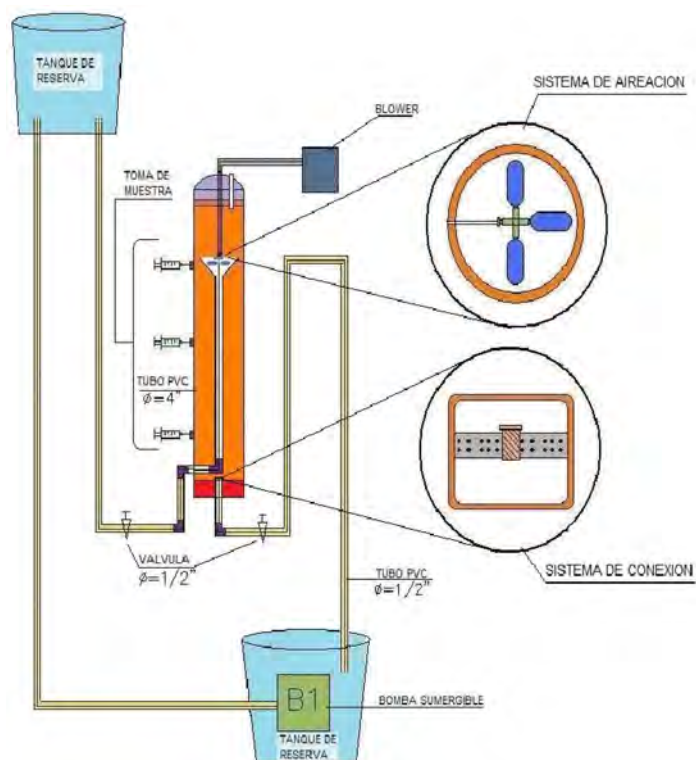


Figura 6. Diseño Biorreactor de Flujo Ascendente (BFA) (Fuente: esta investigación).

El medio de cultivo que se utilizó en los BFAs, estuvo basado en el medio propuesto por Brito y colaboradores (2006), modificado en su fuente de carbono y su composición básica de sales, el medio contenía por litro de agua de mar: NH_4Cl_2 (0,27 g), K_2HPO_4

(0,25 g) y como única fuente de carbono y energía, petróleo (Ecopetrol – Putumayo) (1 mL/L). El inóculo para los BFAs, fueron muestras de agua proveniente de diferentes puntos de la bahía de Tumaco - Nariño, que en la literatura se han reportado como áreas contaminadas por derrames de hidrocarburos de petróleo (Garay-Tinoco *et al.*, 2006). Cada BFA se inoculó al 10% con las muestras de agua de la siguiente manera, puntos 1, 2, 3 y 4 en el BFA1, puntos 5, 6 y 7 en el BFA2 y puntos 8, 9, 10 en el BFA3.

Cada 5 días, durante 20 días de fermentación se tomaron 5 mL de muestra de cada nivel de los BFAs, que se usaron para hacer diluciones seriadas hasta 10^{-3} y a partir de cada dilución se tomaron 1000 μ L para realizar por triplicado la siembra en placa. El medio de cultivo utilizado fue el propuesto por Brito y colaboradores (2006), modificado en su fuente de carbono con diesel y gasolina (1 mL/L de cada una) y su composición básica de sales; las placas se incubaron a 25°C y el crecimiento bacteriano se observó cada 24 horas. Además se realizó recuento de Unidades Formadoras de Colonia por mL (UFC/mL) para la dilución 10^{-3} , debido a que en esta dilución se obtuvieron colonias aisladas.

Los aislamientos bacterianos procedentes de este sistema de cultivo se diferenciaron por las características culturales macroscópicas y microscópicas. Con base en éstas características se realizaron análisis de similitud mediante el programa estadístico PAST (Hammer *et al.*, 2001), para obtener *clusters* donde se agruparon los aislamientos bacterianos según la similitud de sus características.

6.1.3 Preservación de las bacterias seleccionadas. Los aislamientos bacterianos obtenidos se repicaron para mantener su viabilidad y pureza mediante cultivos en tubos y placas con agar nutritivo y con agar Brito modificado en su fuente de carbono con diesel y gasolina (1 mL por litro de agua) (Brito *et al.*, 2006); posteriormente los aislamientos bacterianos cultivables se preservaron por cuatro métodos, cada uno por duplicado, (1) crioviales conteniendo 250 μ L de glicerol al 30% y 750 μ L de solución salina al 0,85% con el inóculo de la cepa bacteriana, los crioviales fueron almacenados a -20°C; (2) Crioviales conteniendo 250 μ L de glicerol al 30%, 500 μ L de solución salina al 0,85% con el inóculo de la cepa bacteriana y 250 μ L de caldo Brito modificado en su fuente de carbono con n-octano al 1%, los crioviales fueron almacenados a -20°C; (3) subcultivo con Agar Nutritivo inclinado en viales y tubos, almacenados a 18°C; (4) subcultivo con Agar Brito modificado en su fuente carbono con n-octano al 1% en viales y tubos almacenados a 18°C.

6.1.4 Evaluación de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos acumuladores de PHAs. Se sembraron los aislamientos bacterianos en un medio desbalanceado en las fuentes de carbono y nitrógeno, según Spiekermann y colaboradores (1999) y Fernández y colaboradores (2006), este medio de cultivo se preparó con glucosa (5 g), peptona bacteriológica (2,5 g), extracto de levadura (2,5 g) y agar (1,2 g), por litro de agua de mar, fue suplementado con rojo Nilo al 0,1%; posteriormente se realizó observación a 24, 48 y 72 horas con lámpara de luz UV (340 nm), las colonias que al someterse a la luz UV, presentaron una emisión de fluorescencia naranja se consideraron positivas para la acumulación de compuestos lipídicos como los PHAs (Spiekermann *et al.*, 1999; Ostle y Holt, 1982), por otra parte se realizaron las preparaciones bacterianas con tinción del colorante lipofílico negro de Sudán (Schlegel *et al.*, 1970), a partir de los mismo cultivos,

las placas que presentaron células con inclusiones o gránulos de coloración oscura se consideraron potenciales para la acumulación de PHA.

6.2 IDENTIFICACION DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS HIDROCARBUROCLÁSTICOS Y DETECCION DEL GEN *phaC*.

Para la optimización de las condiciones requeridas en los métodos moleculares y como control de estos procesos se emplearon las cepas de referencia *Escherichia coli* BUN001 (control *phaC* negativo) y *Pseudomonas aeruginosa* BUN010 (control *phaC* positivo) provenientes del cepario de microbiología de la Universidad de Nariño.

El DNA de las cepas de referencia y de los aislamientos bacterianos se obtuvo mediante el protocolo de lisado bacteriano propuesto por Revelo y colaboradores (2007) modificado a 15 minutos en el tiempo de ebullición, brevemente, las colonias aisladas de la bacteria crecida en medio sólido durante aproximadamente 24 horas, se resuspendieron en 100 μ L de agua ultrapura grado HPLC esterilizada hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7 A (600 nm), la suspensión celular se sometió a ebullición a 95°C por 15 minutos. La concentración de DNA para la amplificación de fragmentos del gen 16S rRNA y del gen *phaC* se determinó mediante las ecuaciones propuestas por Doggett y colaboradores (1992).

- a. (tamaño del genoma pb) (660 g/mol) / 6.02×10^{23} = g DNA / célula;
- b. (g DNA/ célula) (células /mL) = (g DNA / mL) (1×10^6 μ g / mL) = μ g DNA / mL.
- c. (μ g DNA/ mL) (equivalentes de genoma*) = μ g DNA / mL.

* Para determinar el número de genomas por célula, Doggett *et al.* (1992), asumen un genoma por célula en fase estacionaria; y en fase exponencial, cuando las células están creciendo y hay más de un genoma por célula, asume 2,5 equivalentes de genomas para bacterias (valor que fue asumido en esta investigación).

En las anteriores formulas se empleó el dato de $3,0 \times 10^9$ UFC/mL del estandar 10 de la escala de MacFarland, debido a que su densidad óptica fue aproximada a la densidad óptica del lisado bacteriano empleado para todas las reacciones de PCR.

Teniendo en cuenta el carácter degenerado de los primers para la amplificación de fragmentos del gen *phaC* se determinó el limite de detección mediante ensayos con diferentes volúmenes de reacción de DNA template para la PCR con los primers generales G-D/G-1R y la cepa *P. aeruginosa* BUN010 (control positivo).

Para la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA se siguió el protocolo descrito por Revelo y colaboradores (2007), brevemente: cada 25 μ L de reacción contenía: Buffer 1X (+KCl - MgCL₂)(FERMENTAS), dNTPs 0.18 mM, 0.3 μ de cada primer A (primer directo) y J (primer reverso); MgCL₂ 1,5 mM y 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa (FERMENTAS), se emplearon 2.5 μ L de DNA template y agua para completar 25 μ L de reacción, el programa consistió en: un ciclo de 2 minutos a 94°C; 25 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 50 segundos a 72°C y un ciclo de extensión de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 7 minutos a 72°C y una temperatura de incubación de 4°C. Los primers fueron propuestos por Keis y colaboradores (1995) y modificados en su extremo OH 3' por Montoya y colaboradores (2001): A (directo): 5'-GGAGCAAACAGGATTAGATACCC-3' y J (reverso): 5'-TTCTCCTAGGGCTACC TTGTTAC-3'.

Para la amplificación de un fragmento del gen *phaC* se siguió el protocolo desarrollado por Revelo y colaboradores (2007) (Tabla 3), para la PCR semi-nested se emplearon 5 μ L de amplificado de la reacción de PCR directa para amplificados negativos y 2 μ L para los amplificados positivos.

La amplificación de fragmentos de los genes que codifican para la enzima PHA sintasa clase II se realizó siguiendo el protocolo de Revelo y colaboradores (2007) descrito brevemente en la Tabla 3. La amplificación de los genes que codifican para la enzima PHA sintasa clase IV se realizó siguiendo el protocolo desarrollado por Revelo (2012). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador MULTIGEN GRADIENT de Labnet.

Tabla 3. Componentes de PCR para la amplificación de fragmentos de los genes que codifican para la enzima PHA sintasa (Revelo *et al.*, 2007)

Master Mix	PCR gen <i>phaC</i>		PCR semi-nested gen <i>phaC</i>		PCR gen <i>phaC1</i> (PHA sintasa II)		PCR gen <i>phaC2</i> (PHA sintasa II)	
	Conc. trabajo	Conc. final	Conc. Trabajo	Conc. final	Conc. trabajo	Conc. final	Conc. trabajo	Conc. Final
Buffer(1X [+(NH ₄) ₂ SO ₄] - MgCl ₂)(FERMENTAS)	10X	1X	10X	1X	10X	1X	10X	1X
dNTPs	10mM	0.2Mm	10mM	0.2Mm	10mM	0.2Mm	10mM	0.2Mm
Primer Directo	10µM	0.1 µM	10µM	0.1 µM	10µM	0.4 µM	10µM	0.4 µM
Primer Reverso	10µM	0.1 µM	10µM	0.1 µM	10µM	0.4 µM	10µM	0.4 µM
MgCl ₂	25mM	2.5mM	25mM	2.5mM	25mM	3.0 mM	25mM	3.0 mM
Taq Pol (FERMENTAS)	5U/µL	0.05 U/µL	5U/µL	0.05U/µL	5U/µL	0.05U/µL	5U/µL	0.05U/µL
DNA	-----	[] Lisado bacteriano	-----	-----	-----	[] Lisado bacteriano	-----	[] Lisado bacteriano
Agua(grado HPLC)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
DMSO	100%	3%	100%	3%	-----	-----	-----	-----
Secuencia de los primers	G-D(directo): 5'GTGCCGCC(GC)(CT)(AG)(G C)ATCAACAAGT3' G-1R(reverso): 5'GTTCCAG(AT)ACAG(GC)A(G T)(AG)TCGAA3'		G-D(directo): 5'GTGCCGCC(GC)(CT)(AG)(G C)ATCAACAAGT3' G-2R(reverso): 5'GTAGTTCCA(GC)A(CT)CAG GTCGTT3'		E1-D(directo): 5'GAGCGTCGTAGATGAGTA ACAAGAA 3' E1-R(reverso): 5'AGGTTGGCGCCGATGCC GTTGAA 3'		E2-D(directo): 5'TGCTGGCCTGGCGCATTCC CAA 3' E2-R(reverso): 5'AAGTGGTAGTAGAGGTTGCC 3'	
Programa de termociclado	1 ciclo de 10 minutos a 94°C, 2 minutos a 60°C, 2 minutos a 72°C; 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 45 segundos a 55.5°C, 1 minuto a 72°C; temperatura de extensión final de 5 minutos a 72°C y una temperatura de incubación a 4°C.		1 ciclo de 10 minutos a 94°C, 2 minutos a 60°C, 2 minutos a 72°C; 40 ciclos de 20 segundos a 94°C, 45 segundos a 55.5°C, 1 minuto a 72°C; temperatura de extensión final de 5 minutos a 72°C y una temperatura de incubación a 4°C.		1 Ciclo de 94°C por 5 minutos, 14 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos (disminuyendo 1°C por cada 2 ciclos) y 72°C por 1 minuto, 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, luego una temperatura de extensión final de 72°C por 5 minutos, seguida de una incubación final a 4°C.		1 Ciclo de 94°C por 5 minutos, 12 ciclos de 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos (disminuyendo 1.5°C por cada 2 ciclos) y 72°C por 1 minuto, 22 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57.5°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, luego una temperatura de extensión final de 72°C por 5 minutos, seguida de una incubación final a 4°C.	

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X, usando las condiciones de corrido propuestas por Revelo y colaboradores (2007), 60 voltios 73 miliamperios 37 vatios durante 2 horas. Como patrones de tamaño molecular se utilizaron, DNA del fago digerido con *HindIII* 0,2 µg/µL (Fermentas) e HyperLadder™ IV (Bioline). Estos marcadores se emplearon en los pozos de la siguiente manera: 1 µL de EZ-vision™ (Three DNA DYE and Buffer 6X Amresco), 4 µL TBE 1X, 2 µL de Buffer de Carga y 3 µL de marcador. En cuanto a los productos de PCR se cargaron en los pozos de la siguiente manera: 5 µL del producto de PCR, 1 µL de EZ-vision™ y 2 µL de Buffer de Carga. Los fragmentos de DNA amplificados se visualizaron en un digitalizador de imágenes marca DigDoc-Lt System- Benchtop 3UV™ digitaliser-Image analysis Software.

Para la caracterización parcial del gen 16S rRNA, los fragmentos amplificados se enviaron a la compañía MACROGEN (Corea) para su secuenciación, que se llevo a cabo por el método de Sanger usando terminadores BigDye, en condiciones cíclicas, las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo en un termociclador Engine Tetrad 2 (BIO-RAD), los productos se purificaron por precipitación etanólica y se inyectaron para electroforesis en un secuenciador automatizado ABI3730XL.

Las secuencias se editaron empleando herramientas bioinformáticas como los software Chromas Lite versión 2.01 (Technelysium Pty Ltd, EEUU) y BioEdit versión 7.0.8 (Hall, 1999). La búsqueda de similitud de las secuencias parciales se hizo por alineamientos con secuencias de la base de datos GenBank/EMBL/DDBJ empleando el algoritmo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (Altschul *et al.*, 1997) y Ribosomal Database Project – RDP empleando el algoritmo SeqMatch (http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp) (Cole *et al.*, 2009). Las secuencias parciales del gen 16S rRNA de los aislamientos bacterianos de este estudio fueron alineadas en el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). El árbol filogenético se construyó con el programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), empleando como estrategia de agrupamiento el algoritmo de Neighbor-Joining y usando como parámetro la distancia P y se sometió a la prueba de Felsenstein's Bootstrap (Revelo *et al.*, 2007), la cual proporciona una inferencia estadística en la filogenia.

Algunos de los productos de PCR correspondientes al fragmento del gen *phaC* amplificado con primers generales o específicos fueron enviados a secuenciación a la misma compañía anteriormente descrita. La búsqueda de similitud en la base de datos del GenBank permitió seleccionar aquellas secuencias del banco dentro de las cuales anillaron los primers, posteriormente empleando el programa MEGA 4.0 se alienaron las secuencias obtenidas de esta investigación con dichas secuencias descargadas del banco, para determinar la región amplificada sobre la secuencia descargada.

Las secuencias parciales del gen *phaC* obtenidas con primers específicos (Revelo *et al.*, 2007; Revelo, 2012), fueron alineadas con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) posteriormente se generó una matriz de distancia genética con la aplicación DNADist del programa BioEdit para ser procesada en el programa Past en la aplicación de clúster análisis y construir un dendrograma de similitud con algoritmo single linkaje y como medida de similaridad el índice de Bray Curtis.

Se generó una matriz de presencia ausencia del tipo de gen *phaC* diferenciado empleando los iniciadores específicos (Revelo *et al.*, 2007; Revelo, 2012) con el fin de construir un dendrograma de similitud empleando como estrategia de agrupamiento UPGMA usando el índice de similitud DICE en el programa NTSYS 2.1 (Rohlf, 2004).

6.3 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO PRODUCIDO.

Se llevaron a cabo ensayos de crecimiento con 18 cepas bacterianas, *Bacillus* sp. 329A, *Bacillus* sp. 329B, *Pseudomonas* sp. 333(1), *Pseudomonas* sp. 333(2), *Alcanivorax* sp. 337, *Haererehalobacter* sp. 338B, *Bacillus* sp. 353B, *Bacillus* sp. 371A, *Stenotrophomonas* sp. 371B, *Bacillus* sp. 377C, *Pseudomonas* sp. 380, *Pseudomonas* sp. 393, *Halomonas* sp. 394, *Haererehalobacter* sp. 396, *Alcanivorax* sp. 400, *Halomonas* sp. 405 y *Bacillus* sp. FER1 en caldo y agar Brito (Brito *et al.*, 2006) modificado conteniendo por litro, HN_4Cl_2 (0,27 g), K_2HPO_4 (0,25 g) y n-octano al 1% (10 mL) como única fuente de carbono y energía, durante 20 días de incubación a temperatura ambiente. El n-octano se utilizó debido a que los n-alcanos se han constituido como los hidrocarburos más abundantes en ecosistemas marinos contaminados por petróleo y son sustratos relacionados para la biosíntesis de PHA (Mobley, 1994). Las cepas bacterianas que presentaron mejor crecimiento después de los 25 días de incubación, se seleccionaron para fermentaciones y extracción de PHAs.

Para evaluar la producción de PHAs se realizaron ensayos de fermentación batch a escala de laboratorio durante 44 días a temperatura ambiente sin agitación; la unidad experimental fue un matraz de 500 mL con un volumen de trabajo de 250 mL y el respectivo inóculo. Para la fermentación se partió de un cultivo bacteriano puro de 24 horas de crecimiento en agar Nutritivo, el preinóculo se preparó a partir de dos pases sucesivos, los dos pases se ajustaron al 10% v/v, el medio utilizado para estos ensayos fue Brito y colaboradores (2006) modificado con n-octano al 1%, los ensayos se mantuvieron cerrados herméticamente debido a que el n-octano es considerado un compuesto orgánico volátil (COV) (Hernández *et al.*, 2003; Ni *et al.*, 2010).

Los parámetros analíticos fueron (1) la biomasa, mediante determinación de peso seco, brevemente, se tomaron 30 mL de muestra sometida a fermentación y se centrifugó a 7500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente. (2) PHAs, mediante la extracción del polímero siguiendo el protocolo de Fernández y colaboradores (2006) brevemente, se tomaron 30 mL de muestra, se centrifugaron a 7500 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en 1 mL de hipoclorito de sodio al 5% y EDTA 10 mM, posteriormente se llevó a baño maría por 1 hora y 15 minutos a 60°C, y se centrifugó a 7500 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizaron lavados sucesivos con 1 mL de agua destilada y estéril, 1 mL de acetona y 1 mL de metanol frío; después de cada lavado se realizaron centrifugaciones a 7500 rpm por 10 minutos y finalmente el pellet obtenido se llevo a secar hasta peso constante.

Los anteriores parámetros analíticos fueron medidos en tres diferentes tiempos de la fermentación: día 30(720 h), día 37 (888 h) y día 44 (1056), porque las cepas bacterianas de este estudio cultivadas en el medio Brito y colaboradores (2006) modificado con n-octano crecieron después de los 25 días de incubación, además este rango de tiempo ha sido evaluado para la degradación de hidrocarburos (Lizardi-Jiménez *et al.*, 2009). A partir de los datos obtenidos en los 3 tiempos de fermentación se seleccionaron las mejores muestras para llevar a cabo su posterior derivatización, mediante el protocolo descrito por Fernández y colaboradores (2006), las muestras escogidas fueron sometidas a un proceso de derivatización, se les adicionó cloroformo grado HPLC con el fin de que se solubilicen los gránulos de PHA, posteriormente se realizó una catálisis ácida con solución derivatizante metanol: ácido sulfúrico (85:15 v/v) que permitió esterificar el PHA, las muestras se calentaron para la completa degradación del exceso de reactivo y de sus productos secundarios de reacción, posteriormente se sometieron a enfriamiento y se les adicionó NaCl al 0,1% para evitar la formación de emulsiones y cloroformo hasta observar una separación de fases, finalmente se eliminó la fase acuosa (fase superior) y se adicionó sulfato de sodio anhídrido con el fin de deshidratarlas. Las muestras se modificaron en su estructura química por medio de este método analítico y fueron procesadas por medio del análisis de cromatografía de gases (GC)

Para verificar la presencia de PHAs 1,0 µL de cada muestra derivatizada se analizó en un cromatógrafo de gases (CG) marca Shimadzu GC-17^a versión 3 con puerto de inyección Split/Splitless según las condiciones establecidas por Fernández y colaboradores (2006), por tanto, las condiciones de análisis por cromatografía fueron: detector FID a 280°C, Split: 10:1, columna DB5 (30m x 0.25 mm de diámetro; 0,25 µm de espesor); el gas de arrastre Helio, 100 KPascales de Presión, velocidad lineal de 40 cm.seg-1; flujo interno de 1 mL.min-1; la temperatura del horno (rampa de temperatura) 60° (a 6°C.min-1 hasta 90°C (5 minutos), el tiempo total del análisis por GC fue de 15 minutos. La muestra de *Alcanivorax* sp. 337 se envió al laboratorio de cromatografía ASINAL LTDA, Bogotá – Colombia, debido a que es una novedosa bacteria hidrocarburoclástica obligada que utiliza frecuentemente alcanos como sustrato para su metabolismo del carbono (Sabirova *et al.*, 2006a), con el fin de analizar el extracto de PHAs, mediante un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), siguiendo las mismas condiciones previamente establecidas por Fernández y colaboradores (2006).

6.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó un análisis de la riqueza y distribución de abundancia relativa de la comunidad bacteriana de los BFAs, es importante destacar que para esto se emplearon los datos de los 53 aislamientos diferenciables, obtenidos a partir del dendrograma realizado en el programa PAST. La riqueza se determinó como el número de aislamientos diferenciables en cada reactor y tiempo de fermentación, la abundancia se determinó como el número de colonias por aislamiento, datos obtenidos a partir del recuento de unidades formadoras de colonia por 1000 µL (UFC/mL). Para conocer la riqueza específica en los BFAs se registró el número de aislamientos y se procesaron los datos en el software ESTIMATES Versión 8.2 (Colwell, 2009) usando los estimadores Coleman y Sobs.

A los datos obtenidos a partir del sistema de cultivo continuo (BFAs), se les verificó la normalidad mediante las pruebas (Shapiro - Wilk y Jarque - Bera) y posteriormente se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para analizar la variación de la riqueza a través de los tiempos utilizando el paquete estadístico PAST (Hammer *et al.*, 2001). Con el fin de tener un análisis uniforme de la distribución de abundancias relativas de los aislamientos bacterianos a través del tiempo de fermentación, los datos se representaron gráficamente usando la hoja de cálculo Microsoft Office Excel versión 2007. Además los datos obtenidos de los aislamientos bacterianos degradadores de hidrocarburos a partir de los BFAs se representaron en porcentajes.

Se verificó la normalidad de los datos obtenidos del peso de PHA de los ensayos de fermentación, posteriormente se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar si hay diferencias entre los pesos de PHAs extraídos a los diferentes tiempos de fermentación.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS PROVENIENTES DE LA ENSENADA DE TUMACO-NARIÑO.

7.1.1 Características de las zonas de muestreo. Las zonas muestreadas presentaron a simple vista grandes manchas de petróleo y aceites derivados de las estaciones de carga y bombeo de hidrocarburos, confirmando la presencia de vertimientos indiscriminados y derrames tal como se informa en la literatura (Garay-Tinoco *et al.*, 2006). Las muestras compuestas de agua se caracterizaron por presentar un olor particular a hidrocarburos derivados del petróleo. Detalladamente, en los puntos de muestreo correspondientes a la zona Estero el Pajal (puntos 1 - 4) (Figura 7 A) se pudo observar contaminación sobre la superficie del agua y olor característico a hidrocarburos, en esta zona se han reportado concentraciones consideradas muy altas en los sedimentos del Estero el Pajal, después del derrame de crudo de marzo del 2004, entre el 2005 y 2006, el Centro Control Contaminación del Pacífico (CCCP) evaluó los niveles de 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos en estaciones ubicadas en los esteros El Pajal y Candamo de la bahía de Tumaco. Durante el periodo de estudio, los niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos oscilaron entre no detectados y 232 ng/ g de sedimentos muestreados, reflejando una variabilidad asociada con la cercanía a la fuente de residuos de petróleo (Espinosa, 2010).

En el puente el Pindo, EDS Mobil el Litora y EDS La Bombita, zonas correspondientes a los puntos de muestreo 5 a 7 (Figura 7B y C) se observó un aspecto aceitoso en las aguas superficiales, que se asocia a contaminación con hidrocarburos, situación que probablemente se deba a la cercanía de las nueve estaciones de servicio de gasolina catalogadas como fuerte de contaminación (Marrugo, 1995). El efecto contaminante por residuos de hidrocarburos ha sido más apreciable en los sectores confinados de la bahía interna, específicamente en el sector El Pindo (punto 5), el cual ha sido considerado uno de los lugares más contaminados a lo largo de la costa Pacífica Colombiana (Casanova *et al.*, 1998), debido a que presenta la mayor concentración promedio histórica de hidrocarburos aromáticos totales (HAT's), con un valor de 3,12 µg/ g de sedimentos muestreados, esto puede asociarse con la capacidad de absorción y adsorción originada por el contenido de materia orgánica proveniente del aserrín depositado en los alrededores del sector y la sedimentación de material orgánico proveniente de los vertidos domésticos, que generan un medio excelente para la retención de estos contaminantes (Tejada *et al.*, 2003), además la concentración encontrada de hidrocarburos en sedimentos superan los niveles de referencia establecidos por algunas normas internacionales como las de la NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*) (Garay-Tinoco *et al.*, 2006; Espinosa, 2010).

Los puntos de muestreo correspondientes a Isla Dorada (punto 8) la bomba de Romero y Burgos (punto 9) y el muelle del sector Gabarra ECOPEPETROL (punto 10) (Figura 7 D y E), indicaron ser los más contaminados por hidrocarburos, se pudo observar la presencia de peces muertos en el área y un fuerte olor a contaminantes xenobióticos de origen petrolífero, esto puede explicarse debido a que el terminal de Ecopetrol recibe un

promedio de 800 000 barriles de petróleo al mes, además años atrás el área fue permanentemente receptora de la descarga de aguas de decantación que salían de las piscinas de oxidación del Terminal del Oleoducto Transandino de ECOPEPETROL S.A., en donde se vertían alrededor de 10.000 barriles/mes de aguas de desecho, por lo que este fue catalogado como lugar crítico (Marrugo, 1995) debido a la presencia de contaminación crónica por hidrocarburos (Casanova *et al.*, 2006).

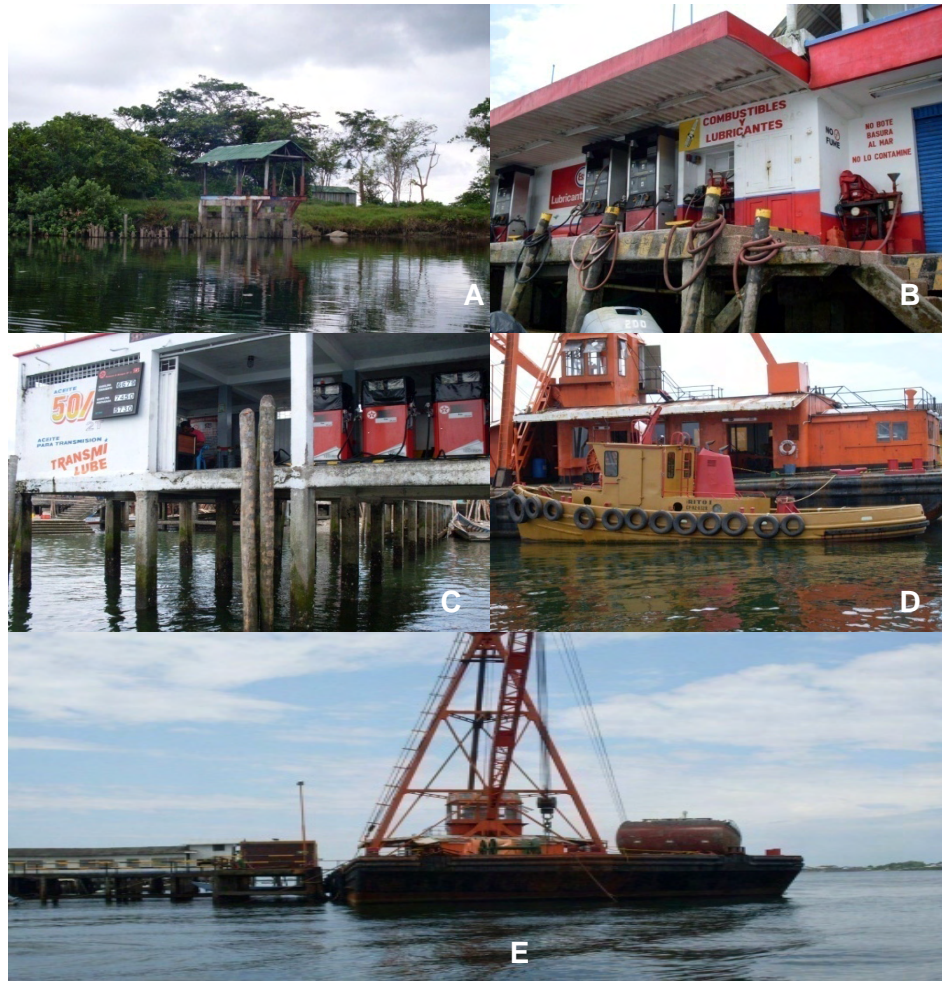


Figura 7. Puntos de muestreo sobre la bahía de Tumaco-Nariño. A) Estero el Pajal (puntos de muestreo 1 - 4); B) Estación de servicio (EDS) Mobil del Litoral (punto 6); C) EDS La Bombita (punto 7); D) EDS Isla Dorada (punto 8); E) Sector Gabarra ECOPEPETROL (punto 9) (Fuente: esta investigación).

Algunas condiciones evaluadas en las zonas, tales como la profundidad de muestreo indican la presencia de determinados grupos tróficos, las medidas de profundidad fueron en cada punto; 187 cm (1), 246 cm (2), 125 cm (3), 133 cm (4) 158 cm (5), 177 cm (6), 189 cm (7), 211 cm (8), 423 cm (9) y 465 cm (10). Los estudios relacionados con la determinación de la concentración y el aislamiento de bacterias heterótrofas a partir de muestras de origen marino establecen una estrecha relación con las características

tróficas de las áreas de muestreo (Miravet, 2003; Morales *et al.*, 2010). Así mismo una cantidad más elevada de microorganismos suelen encontrarse en la zona más superficial, disminuyendo al aumentar la profundidad, aunque en la interfase agua-sedimento se observa un incremento por la acumulación de una mayor cantidad de materia orgánica (Miravet, 2003).

Por otra parte, la temperatura medida a nivel superficial de los puntos de muestreo en el mes de Abril, se encuentra en un rango de 29,7°C – 31,4 °C. estos datos concuerdan con la descripción del comportamiento de la temperatura superficial en la bahía de Tumaco, para el segundo trimestre (Abril-Junio), cuando la acción del chorro de viento de Panamá desaparece y se presenta un calentamiento generalizado en toda la cuenca Pacífica Colombiana, lo cual se manifiesta con aguas más cálidas en relación a los otros trimestres del año (Garay-Tinoco *et al.*, 2006). Es importante tener en cuenta que la temperatura en las aguas fomenta la actividad metabólica y se refleja en una división celular más activa en los microorganismos (García-Tello, 1985) como es el caso de las bacterias hidrocarburoclásticas provenientes de la bahía de Tumaco. Algunos trabajos señalan que la temperatura óptima para que los microorganismos degraden el petróleo se encuentra en un intervalo entre 20 a 35°C (Van Hamme *et al.*, 2003; Bracho *et al.*, 2004). Esto es importante porque la temperatura ejerce una marcada influencia en la biodegradación del petróleo, por su efecto en la naturaleza física y composición química del mismo, en la velocidad de degradación del hidrocarburo por los microorganismos y sobre la composición de la comunidad microbiana (Atlas, 1981; Atlas y Bartha, 2002).

Las características descritas para ecosistemas marinos contaminados con petróleo, influyen sobre las comunidades microbianas las cuales tienden a ser dominadas por aquellos microorganismos capaces de utilizar o sobrevivir a estas condiciones (Pérez *et al.*, 2008; Pucci *et al.*, 2009), por ejemplo, se han aislado bacterias con capacidad de degradar petróleo, las cuales mostraron una alta eficiencia para la transformación del contenido de hidrocarburos aromáticos totales presentes en algunos puntos de la bahía de Tumaco (Guevara y Cardenas, 1999). En la presente investigación se comprobó que las zonas muestreadas presentaron características propicias para el aislamiento de las bacterias buscadas para este estudio, ya que son hábitats para bacterias degradadoras de hidrocarburos que enfrentan condiciones nutricionales desbalanceadas bajo las cuales pueden acumular compuestos lipídicos de almacenamiento de carbono y energía, tales como los PHAs (Manilla-Pérez *et al.*, 2010; Sabirova *et al.*, 2006a).

7.1.2 Aislamientos bacterianos degradadores de hidrocarburos provenientes de la bahía de Tumaco-Nariño. El diseño de microcosmos mediante tres reactores BFAs se utilizó para estudiar la diversidad microbiana de bacterias marinas hidrocarburoclásticas productoras de PHAs (Martínez-Alonso y Gaju, 2005). En los reactores BFAs se utilizó un sistema de cultivo continuo y se suministraron algunas condiciones para crear un microcosmos marino: agua marina como medio base, recirculación, oxigenación, temperatura ambiente y la adición de petróleo crudo (ECOPETROL-Putumayo) al 1% (Figura 8 y 9).



Figura 8. Representación esquemática 3D BFA (Autocad) (Fuente: esta investigación).



Figura 9. Montaje final tres BFAs. (Fuente: esta investigación).

De acuerdo con el análisis de agrupamiento de características microscópicas y macroscópicas de los aislamientos bacterianos en los tres BFAs realizado con el

programa PAST (Hammer *et al.*, 2001), se observaron 53 *clusters* (Anexo A), con base a este análisis fueron seleccionadas 53 colonias fenotípicamente diferentes (Anexo B).

De los 53 aislamientos bacterianos obtenidos en estos sistemas 41 (77,35%) fueron bacterias Gram negativas y 12 (22,64%) fueron bacterias Gram positivas. Los tres BFAs compartieron 18 aislamientos bacterianos (32,96%) y de cada BFA se obtuvieron: BFA1, 17 aislamientos bacterianos (32,07%); BFA2, 11 aislamientos bacterianos (20,74%) y BFA3, 7 aislamientos bacterianos (13,20%). Según Miravet. (2003) el número más elevado de microorganismos suele encontrarse en la zona más superficial, disminuyendo al aumentar la profundidad de agua, esto indica que se podría esperar mayor cantidad de aislamientos bacterianos al procesar las muestras correspondientes a los puntos 1 a 8 (BFA1 y BFA2), situación que se demostró con los resultados obtenidos, además el menor número de aislamientos bacterianos se encontró en el BFA3, reactor inoculado con las muestras 8 a 10 que presentaron profundidades mayores.

Se debe tener en cuenta que aquellas poblaciones bacterianas que son capaces de desarrollarse en medios de cultivo con diversos hidrocarburos como única fuente de carbono y energía se denominan “Degradadoras de hidrocarburos” o hidrocarburoclásticas (Chaillan *et al.*, 2004), las bacterias marinas de este estudio son catalogadas de la misma forma, principalmente por tres razones: (1) las bacterias fueron obtenidas a partir de muestras de agua marina con frecuentes reportes de contaminación por petróleo; (2) el microcosmo simuló condiciones como, temperatura ambiente, salinidad (representada por agua marina como base del medio) y petróleo crudo como única fuente de carbono en exceso, simulando un ecosistema impactado con petróleo; (3) las bacterias fueron aisladas en medios de cultivo selectivo propuesto por Brito y colaboradores (2006) modificado en su composición básica de sales y su fuente de carbono por diesel y gasolina.

La mayoría de bacterias obtenidas a partir de los BFAs fueron Gram negativas, este resultado es correspondiente con los primeros estudios de microorganismos de origen marino (Zobell y Upham, 1944), además algunas investigaciones han determinado que un alto porcentaje de las bacterias degradadoras de hidrocarburos se encuentran en este grupo (Fenical y Jensen, 1996; Ruberto *et al.*, 2003), debido a los lipopolisacáridos presentes en sus membranas que ayudan a la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos en sistemas acuosos y contribuyen al incremento en la superficie de ataque sobre el contaminante, para su posterior asimilación (Sikkema *et al.*, 1995; Van Hamme *et al.*, 2003).

Por otra parte se ha reportado que las bacterias gram positivas corresponden a menos del 10% del total de la población microbiana en el ecosistema marino (Sieburth, 1979), situación que puede dar respuesta al menor porcentaje de aislamientos bacterianos gram positivos (30,3%) de las 53 bacterias obtenidas en los BFAs; específicamente como se indica en el ítem de la caracterización parcial, de 18 bacterias hidrocarburoclásticas, 7 que corresponden al 38.8%, fueron gram positivas y pertenecieron al genero *Bacillus*.

Este porcentaje podría estar relacionado con la posibilidad que tienen estas bacterias de ser más fácilmente cultivables ya que poseen resistencia a los cambios ambientales, quizás relacionado con la composición de la pared celular, en particular por la estructura entrecruzada del peptidoglicano que le confiere resistencia mecánica, fortaleza, moldea la

forma celular y brinda una barrera para mantener la presión osmótica interna, dentro de estas bacterias se encuentran en un elevado porcentaje el grupo de las formadoras de esporas (Ej. Género *Bacillus*), que es una estructura de supervivencia en ambientes estresados (Morales, 2010).

A partir del sistema de cultivo continuo desarrollado en los BFAs se pudo obtener aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos, ya que estos simulaban a pequeña escala algunas de las condiciones presentes en los ambientes marinos tras ocurrir un derrame de petróleo o contaminación por sus derivados, este microcosmos permitió además obtener datos para el análisis frente a la posible fluctuación de las poblaciones bacterianas dentro del proceso de remoción de hidrocarburos que se describirá posteriormente. Cabe resaltar que en investigaciones como la de Ammann y colaboradores (1995) se demostró que el 96% de bacterias representantes de grupos microbianos versátiles en la biodegradación de hidrocarburos han sido aisladas en medios de cultivo líquidos, los cuales les proporcionan las condiciones necesarias para crecer y emulsificar hidrocarburos derivados del petróleo con mayor facilidad.

Dejonghe y colaboradores (2003) argumentan que en los ambientes marinos la gran mayoría de las bacterias (90-99%) son no cultivables, datos que se confirman con las investigaciones de Lugioyo, (2003) y Miravet, (2003), quienes plantean que la abundancia microbiana en ecosistemas marinos puede encontrarse en el orden de 10^9 y que el porcentaje de microorganismos cultivables es alrededor de 0,25% (10^6), teniendo en cuenta lo anterior se recomienda valorar aspectos tales como el método de aislamiento, medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación, entre muchos otros factores que podrían garantizar una mayor concentración de microorganismos en los microcosmos.

Teniendo en cuenta los datos de conteo directo y los UFCs/mL de agua marina en los reactores BFAs (Anexos C y D), se realizaron análisis de la variación de la riqueza y distribución de abundancias en los 5 tiempos de muestreo, durante una fermentación de 20 días. La riqueza se determinó como el número de aislamientos bacterianos obtenidos y la abundancia con base a las UFC/mL de cada aislamiento bacteriano diferenciable.

Riqueza de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos en los tiempos de fermentación de los tres BFAs. Teniendo en cuenta el número de aislamientos diferenciables encontrados en cada uno de los 5 tiempos de fermentación correspondientes a los días 1(24h), 5(120h), 10(240h), 15(360h) y 20 (480h), se obtuvo la riqueza total de los tres BFAs (sumatoria de aislamientos bacterianos de los tres BFAs) que se puede observar en la Figura 10.

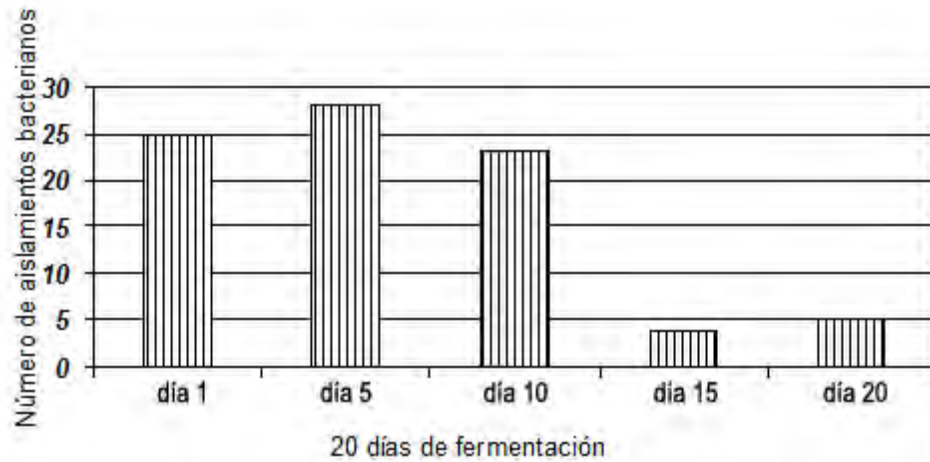


Figura 10. Riqueza de aislamientos bacterianos para los tres BFAs en los cinco tiempos de muestreo correspondientes a 20 días de fermentación (480 h).

La riqueza específica obtenida mediante el estimador de Coleman se obtuvo un valor de 45,76 y con el de Sobs un valor de 53, valor que estimó la riqueza real de aislamientos bacterianos obtenidos (Figura 11).

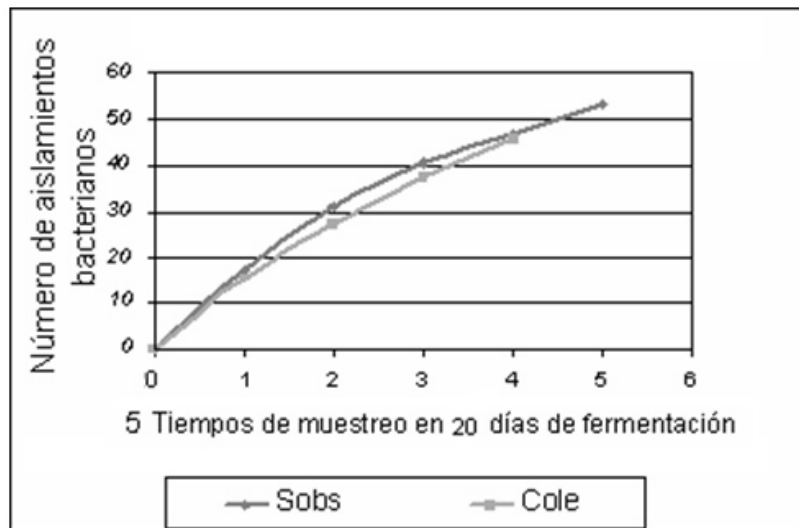


Figura 11. Riqueza específica evaluada con los estimadores Cole y Sobs para los tres BFAs.

Partiendo de los datos obtenidos de riqueza de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos diferenciables (Anexo C) se realizó el análisis de la variación de riqueza de la comunidad bacteriana de los tres BFAs en los días 1, 5, 10, 15 y 20 de muestreo, primero los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad mediante el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001) donde la prueba de Shapiro-Wilk arrojó un p(valor) de 0,2093 y Jarque-Bera un p(valor) 0,701, los valores obtenidos de las pruebas fueron superiores a 0,05, lo cual indicó que los datos no se ajustaron a una normalidad, por tanto

se analizaron por medio de una prueba no-paramétrica denominada Kruskal-Wallis (Tabla 4).

Tabla 4. Diferencias en la riqueza de los aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos mediante la prueba estadística Kruskal-Wallis. Datos obtenidos en los cinco tiempos (480 h de fermentación) muestreados en los tres BFAs.

	Tiempo 0 (24 h)	Tiempo 1 (120 h)	Tiempo 2 (240 h)	Tiempo 3 (360 h)	Tiempo 4 (480 h)
T0	0	0,3827	1	0,08086	0,08086
T1	1	0	1	0,08086	0,08086
T2	1	1	0	0,08086	0,08086
T3	0,8086	0,8086	0,8086	0	0,5127
T4	0,8086	0,8086	0,8086	1	0
				p(same)	0,032

A partir de los resultados de la Tabla 4, se pudo analizar la diferencia de riqueza a través de los 5 tiempos muestreados en los tres BFAs, la prueba de Kruskal-Wallis arrojó un p (valor) general de 0,032 inferior a 0,05, lo que demostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tiempos muestreados.

Detalladamente, entre los tiempos 0, 1 y 2 no hay diferencias estadísticamente significativa (p valor: 0,8086 superior a 0,05), por lo que se puede decir que la riqueza es similar y constante entre estos tiempos; mientras que los tiempos de muestreo 3 y 4 presentaron semejanza entre ellos (p valor: 0,08086) lo cual está determinando las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los tiempos anteriores, debido a que la riqueza de los aislamientos bacterianos disminuye de manera notable.

Para argumentar estos resultados se debe tener en cuenta que los tres BFAs simularon un ecosistema impactado con petróleo, por lo cual fue posible describir las relaciones de las poblaciones bacterianas asociadas a este tipo de ambiente cuando ocurre un episodio de contaminación, en este sentido se puede citar estudios como los realizados por Macnaughton y colaboradores (1999), donde se describe que durante los procesos de biorremediación los perfiles de biomasa bacteriana aumentan con el grado de contaminación por hidrocarburos, disminuyendo a medida que los contaminantes son degradados, las comunidades incapaces de metabolizar el contaminante como nutriente durante estos procesos desaparecen a menos que reciban los estímulos metabólicos apropiados.

Existen otras causantes de la disminución de la riqueza a través del tiempo, entre ellas la posibilidad que tienen las bacterias de producir metabolitos tóxicos que en las condiciones de recirculación de nutrientes y cultivo que les ofrecen los BFAs, sería un posible factor para el descenso de la riqueza microbiana, algunos de estos metabolitos tóxicos son los pigmentos con actividad antimicrobiana producidos por algunas especies de bacterias marinas pertenecientes al género *Pseudomonas* (Pellón *et al.*, 2001; Cetina *et al.*, 2010; León *et al.*, 2010).

Distribución de abundancias relativas de aislamientos bacterianos hidrocaburoclásticos en los tiempos de fermentación en los tres BFAs. La distribución de la abundancia (realizada con datos de abundancia Anexo D) de los aislamientos bacterianos hidrocaburoclásticos diferenciables en el tiempo 0 de fermentación evaluado, muestra un claro patrón donde la mayoría de los aislamientos presentes se encuentran poco abundantes, siendo tres los aislamientos con abundancia mayor de 500 colonias, en el caso de los tiempos 1 y 2 se presenta una disminución de los aislamientos pero sigue existiendo mayor cantidad de aislamientos bacterianos poco abundantes, por su parte los tiempos 3 y 4 a diferencia de los tiempos anteriores presentaron una disminución en el número de aislamientos donde la abundancia para estos aumento considerablemente (Figura 12).

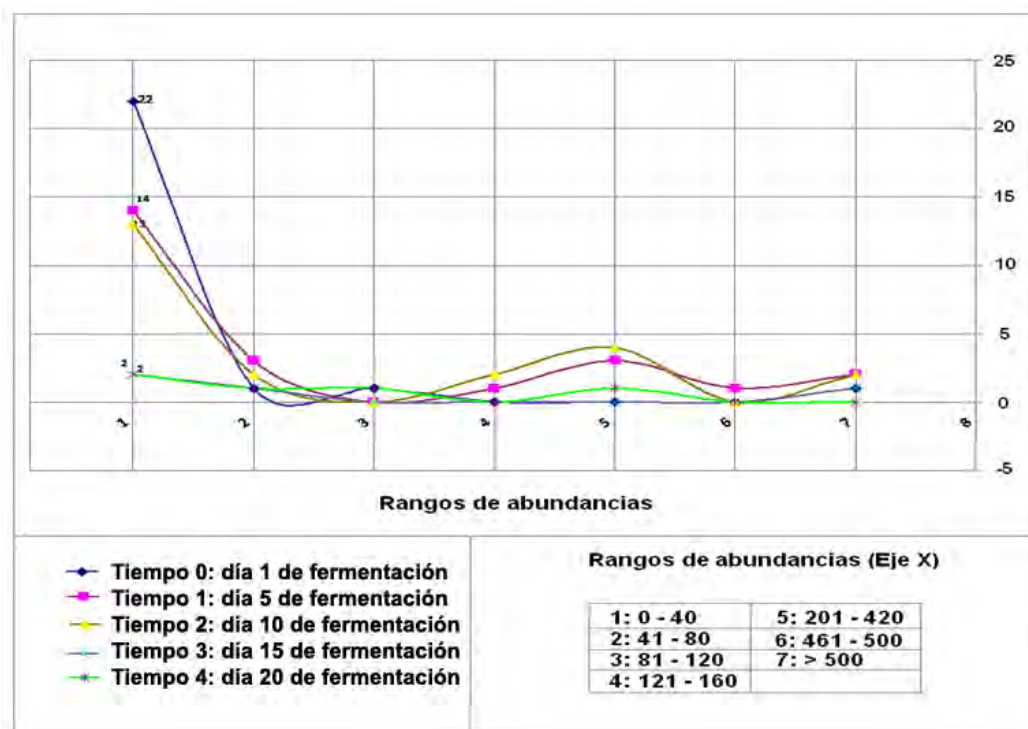


Figura 12. Curvas de distribución de abundancias relativas de los cinco tiempos de muestreo correspondientes a 20 días de fermentación (480 h).

Es importante destacar que en los últimos 2 tiempos de fermentación en los BFAs aparece la dominancia de unos pocos aislamientos bacterianos. Esto podría deberse a que los derrames de petróleo cambian la estructura de la comunidad de tal manera que los microorganismos capaces de digerir hidrocarburos serán dominantes (Bordenave *et al.*, 2007). De la misma manera Nkwelan y colaboradores (2008) concluyen que en un grupo de pocas bacterias fue observado un aumento de abundancias como respuesta a la contaminación del petróleo.

Según Lozada y colaboradores (2004), este comportamiento de las comunidades está relacionado con el desequilibrio de algún factor ambiental en particular, como determinante de la estructura de la comunidad bacteriana que corresponde a una de las

definiciones de estrés ambiental. Puede explicarse debido a que la comunidad bacteriana se especializa para la degradación de compuestos difícilmente biodegradables como es el caso del petróleo, a costa de un descenso en su diversidad que junto a la abundancia responde al grado de especialización que se da como resultado de mecanismos de sucesión ecológica en ambientes complejos, en estas condiciones se favorecen especies bacterianas que por su alta afinidad con los sustratos adoptan estrategias de máximo aprovechamiento de los recursos nutricionales (Lozada *et al.*, 2004).

En diversas investigaciones de bacterias degradadoras de hidrocarburos (Mackey y Hodgkinson, 1996; Bracho *et al.*, 2004; Yanine, 2010) se ha reportado actividad bacteriana específica para cada etapa del proceso de biodegradación. Kaplan y Kitts. (2004) evaluaron la sucesión bacteriana en una unidad de tratamiento de petróleo, observando que bacterias de filotipos específicos se asociaron con diferentes fases de la degradación de petróleo, informando un fuerte aumento en el conteo de placas durante las primeras tres semanas, que indicó un aumento de la biomasa asociada con esa primera etapa de la degradación de petróleo.

En la presente investigación los cambios de riqueza y los perfiles de distribución de abundancia de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos diferenciables en los tiempos evaluados indicaron que hay fases poco delimitadas pero que denotan la presencia de sucesiones bacterianas que pueden presentar preferencia por sustratos diferentes tal como lo demostraron Richard y Vogel, (1999) y que posiblemente están encargadas de metabolizar los múltiples componentes del petróleo, como hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos aromáticos, parafinas, entre otros, aportando cambios en la población bacteriana durante el proceso. Teniendo en cuenta que mediante los BFAs se obtuvieron datos cuantitativos, como la riqueza y la abundancia, que aportaron al conocimiento inicial de la estructura y composición de comunidades bacterianas hidrocarburoclásticas marinas procedentes de la bahía de Tumaco-Nariño, es conveniente que mediante el mismo sistema de microcosmos se evalúe la diversidad de bacterias cultivables y no cultivables en un periodo de tiempo mayor, empleando técnicas moleculares útiles para los análisis de ecología microbiana (Rajendhran y Gunasekara, 2011).

Los 53 aislamientos bacterianos obtenidos se repicaron para mantener su viabilidad y pureza mediante cultivos en tubos y placas con agar nutritivo y con agar Brito (Brito *et al.*, 2006) modificado en su fuente de carbono con diesel y gasolina (1 mL por litro de agua). Los cuales fueron conservados a temperatura ambiente y bajo condiciones de refrigeración. Sin embargo, 35 de los cultivos no fueron cultivables. Algunas las razones por las que las células mueren pueden ser numerosas, pero en todos los casos se basan en la química inherente de las células y su entorno (Ertola *et al.*, 1994).

Es importante destacar que la conservación de aislamientos bacterianos autóctonos se debe dirigir a mantener viables y estables fenotípica y genotípicamente los especímenes representativos con aplicabilidades concretas (Sánchez y Corrales, 2005); por lo tanto para los 18 aislamientos de este estudio que se lograron mantener cultivables, se realizó una prueba donde se reemplazaron los medios básicos de preservación por el medio de Brito y colaboradores (2006) modificado en su fuente de carbono con n-octano al 1%, debido a que las bacterias son consideradas degradadoras de hidrocarburos y crecieron satisfactoriamente, con base en esto fueron planteados 4 métodos de preservación

(Figura 13), la viabilidad de los métodos se evaluó en el transcurso de la investigación, donde los 18 aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos fueron con frecuencia activados satisfactoriamente en caldo nutritivo y subcultivados en placa. Los aislamientos bacterianos fueron entregados al Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Nariño usando los mismos métodos de preservación.

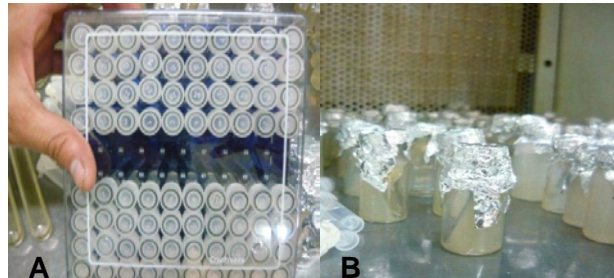


Figura 13. Muestras de dos tipos de preservación de aislamientos bacterianos. A) Crioviales con 250 μ L de glicerol al 30% y 750 μ L de solución salina al 0.85% con inóculo de la cepa bacteriana; B) Viales inclinados con Agar Brito modificado en su fuente de carbono con n-octano al 1%. (Fuente: esta investigación).

7.1.3 Evaluación de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos acumuladores de PHAs. Los 18 aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos fueron evaluados mediante la aplicación de dos tinciones útiles para la detección de compuestos lipofílicos como los gránulos intracelulares de PHAs. La primera tinción se hizo empleando rojo Nilo incorporado en un medio de cultivo desbalanceado en la fuente de carbono y nitrógeno según Spiekermann y colaboradores (1999) y Fernández y colaboradores (2006). Este colorante se fija a gránulos lipofílicos tales como PHAs y produce una fluorescencia naranja (Spiekermann *et al.*, 1999; Ostle y Holt, 1982) (Figura 14 B y D). La segunda tinción se realizó mediante preparaciones bacterianas con Sudán negro (Schlegel *et al.*, 1970). En los cultivos se observaron inclusiones celulares de color oscuro como respuesta a la presencia de gránulos lipofílicos (Figura 14 A y C). Estudios como los de Wei y colaboradores (2011) proponen la técnica de Sudán Negro como método directo para la detección de cepas potenciales para la acumulación de PHAs.

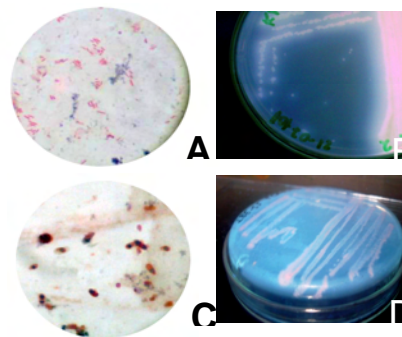


Figura 14. Reacción a los tintes lipofílicos. A) Tinción sudán negro en el aislamiento 333(1); B) Tinción de Nilo rojo, fluorescencia a 340 nm de luz UV aislamiento 333(1); C) Tinción sudán negro en el aislamiento 329A; D) Tinción de Nilo rojo, fluorescencia a 340 nm de luz UV aislamiento 329A. (Fuente: esta investigación).

Las tinciones lipofílicas en los 18 aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos presentaron falsos-positivos (Tabla 5), porque algunos aislamientos bacterianos no coincidieron en las dos pruebas, lo cual demuestra las desventajas de estos métodos fenotípicos (Sheu *et al.*, 2000; Shamala *et al.*, 2003). Este resultado requiere el uso de métodos genotípicos basados en la detección del gen *phaC* que puede dar información concerniente al tipo de enzima final en la formación de monómeros de PHAs.

Tabla 5. Reacción a tinciones lipofílicas para los aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos.

Aislamiento bacteriano	Colorantes para lípidos neutros						
	rojo Nilo				sudán negro		
	24h	48h	72h	Color	24h	48h	72h
329A	+	-	-	Rojo	+	-	-
329B	+	-	-	Rojo	-	+	-
333(1)	-	-	-	Rojo	+	+	-
333(2)	-	-	+	Rojo	-	-	-
337	-		+	Rojo	-	-	-
338B	-	+	-	Rojo	-	-	-
353B	+	-	-	Rojo-lila	-	+	-
371A	+	-	-	Rojo	+	-	-
371B	+	+	-	Rojo	+	+	-
377C	-	-	+	Rojo	-	-	+
380	-	-	+	Rojo	-	-	+
387	-	-	+	Amarillo	-	-	-
393	-	-	+	Rojo	-	-	-
394	-	+	+	Amarillo	-	+	-
396	-	+	+	Amarillo	-	+	-
400	-	+	+	Rojo	-	+	-
405	-	+	+	Rojo	-	-	+
FER1			+	Amarillo			+

Las metodologías empleadas para la bioprospección de microorganismos acumuladores de PHA han evolucionado desde los métodos de detección fenotípica hasta los métodos genotípicos. En un principio los microorganismos se seleccionaron por la detección presuntiva de los gránulos de PHA después de cultivar el microorganismo en medios selectivos, condiciones que induzcan la acumulación de PHAs, evaluando esta acumulación por medio de la tinción con Sudán Negro (De Lima *et al.*, 1999) y empleando la microscopía de fluorescencia mediante tinción con rojo Nilo (Wang y Bakken, 1998; Spiekermann *et al.*, 1999; Tajima *et al.*, 2003).

La detección de genes *phaC* en bacterias ha demostrado ser un instrumento para selección directa de bacterias de diferentes géneros que tienen el potencial para acumular PHAs, por esta razón se han planteado técnicas de detección genotípicas basadas en la metodología de PCR para la detección del gen *phaC* que codifica para la enzima PHA sintasa. Sheu y colaboradores (2000), seleccionaron bacterias con PHA sintasa de clase I y II. Solaiman y colaboradores (2000) y Revelo y colaboradores (2007) seleccionaron bacterias que albergan genes que codifican para PHA sintasas de clase I y II. Shamala y colaboradores (2003) reportaron una metodología para seleccionar bacterias con PHA sintasa de clase IV. Por lo tanto, en esta investigación se emplearon los métodos genotípicos propuestos por Revelo y colaboradores (2007), con el propósito de detectar el gen *phaC* en bacterias marinas hidrocarburoclásticas.

7.2 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS BACTERIANOS SELECCIONADOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN PARCIAL DEL GEN 16S rRNA.

7.2.1 Detección de un fragmento del gen 16S rRNA de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos. La identificación de los 18 aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos (Anexo E) se realizó mediante la amplificación y secuenciación parcial del gen 16S rRNA. Para esta investigación se determinaron los puntos de alineamiento empleando el programa BioEdit, con el fin de calcular el tamaño del fragmento obtenido con los iniciadores A y J sobre la secuencia de gen 16S rRNA de *Escherichia coli* descargada del GenBank (Número de acceso TW14359). En la Figura 15 muestra la ubicación de los primers A y J que indican el tamaño aproximado de los fragmentos a amplificar.

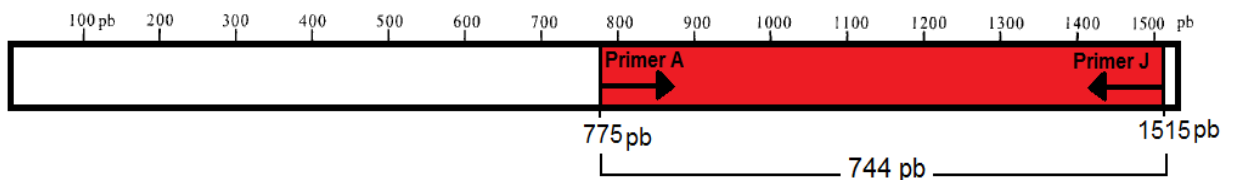


Figura 15. Tamaño esperado del fragmento del gen 16S rRNA a amplificar con los iniciadores A y J en *Escherichia coli* Número de acceso GenBank TW14359.

Inicialmente se llevaron a cabo ensayos preliminares con el fin de reproducir la metodología de Revelo y colaboradores (2007) con *Escherichia coli* BUN001, esta cepa se usó como control positivo para la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA, en este ensayo se obtuvo un fragmento correspondiente al tamaño esperado (Figura16).

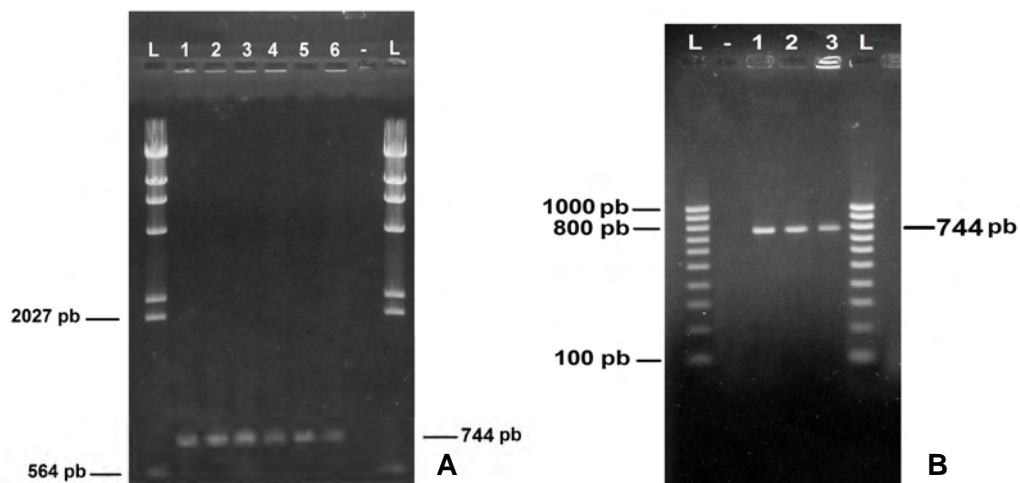


Figura 16. Amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S rRNA con los primers A y J. A) Líneas: L, marcador de tamaño molecular ADN *Hind*III; 1 a 6, *E. coli* BUN001; (-), control de reactivos. B) Líneas: L: marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV; (-), control de reactivos; 1 a 3, *E. coli* BUN001.

El DNA template para las reacciones de amplificación del gen 16S rRNA de los 18 aislamientos bacterianos, se obtuvo mediante lisado bacteriano con 7 colonias resuspendidas en 100 μ L de agua, aproximadamente su densidad óptica correspondió al tubo 10 de la escala de MacFarland y por tanto fueron empleadas 3×10^9 UFC/mL, este dato fue transformado a células viables/mL teniendo en cuenta que 1 colonia de aproximadamente 1 mm de diámetro corresponde a 1×10^7 células viables, valor descrito por Sheu *et al.* (2000), los datos se analizaron mediante las formulas de Doggett *et al.* (1992) con las cuales se determinó un valor 58,5 ng DNA/ μ L que correspondieron a 305,8 ng DNA en los 5 μ L que fueron empleados en las reacciones de PCR para la amplificación del gen. El desarrollo de las formulas se indica a continuación:

- $(744 \text{ pb}^1) (660 \text{ g/mol}) / 6,02 \times 10^{23} = 8,1 \times 10^{-19} \text{ g DNA / célula.}$
- $(8,1 \times 10^{-19} \text{ g DNA / célula}) (3 \times 10^{16} \text{ células / mL}) = (0,024 \text{ g DNA / mL}) (1 \times 10^6 \mu\text{g / mL}) = 24,47 \mu\text{g DNA / mL.}$
- $(24,47 \mu\text{g DNA / mL}) (2,5^2) = 61,17 \mu\text{g DNA / mL} (61,17 \text{ ng DNA/ } \mu\text{L}).$

¹ 744 pb corresponden al tamaño aproximado del fragmento del gen 16S rRNA amplificado con los primers A y J; calculado por el anillamiento de los primers sobre la secuencia de *Escherichia coli* Número de acceso GenBank TW14359.

² para determinar el número de genomas por célula, Doggett y colaboradores (1992), asumen un genoma por célula en fase estacionaria; y en fase exponencial, cuando las células están creciendo y hay más de un genoma por célula, asume 2,5 equivalentes de genomas para bacterias (valor que fue asumido en esta investigación).

Es importante destacar que el lisado bacteriano aportó DNA molde que permitió la amplificación de fragmentos de los genes estudiados en esta investigación. Es importante proponer futuros estudios que incluyan la estandarización de la concentración de DNA exacta empleada para las PCR para lograr la reproducibilidad de la técnica.

En este estudio se realizaron pruebas para la conservación del lisado bacteriano con el fin de obtener DNA para varios ensayos de PCR, se aplicaron cambios de temperatura de ebullición a congelación cada 15 minutos; por medio de este ensayo se logró conservar las muestras del lisado bacteriano, que permitieron la amplificación del gen de interés hasta 20 días después de realizar este proceso. La estandarización de esta metodología podría ser un importante aporte para el empleo de lisado bacteriano con mayor efectividad.

Con el mismo protocolo de Revelo y colaboradores (2007), se obtuvo amplificación del fragmento del gen 16S rRNA del tamaño esperado en los 18 aislamientos bacterianos con el par de primers A y J (Figura 17 A, B y C). Se utilizaron como controles las cepas *E. coli* BUN001 y *Pseudomonas aeruginosa* BUN010.

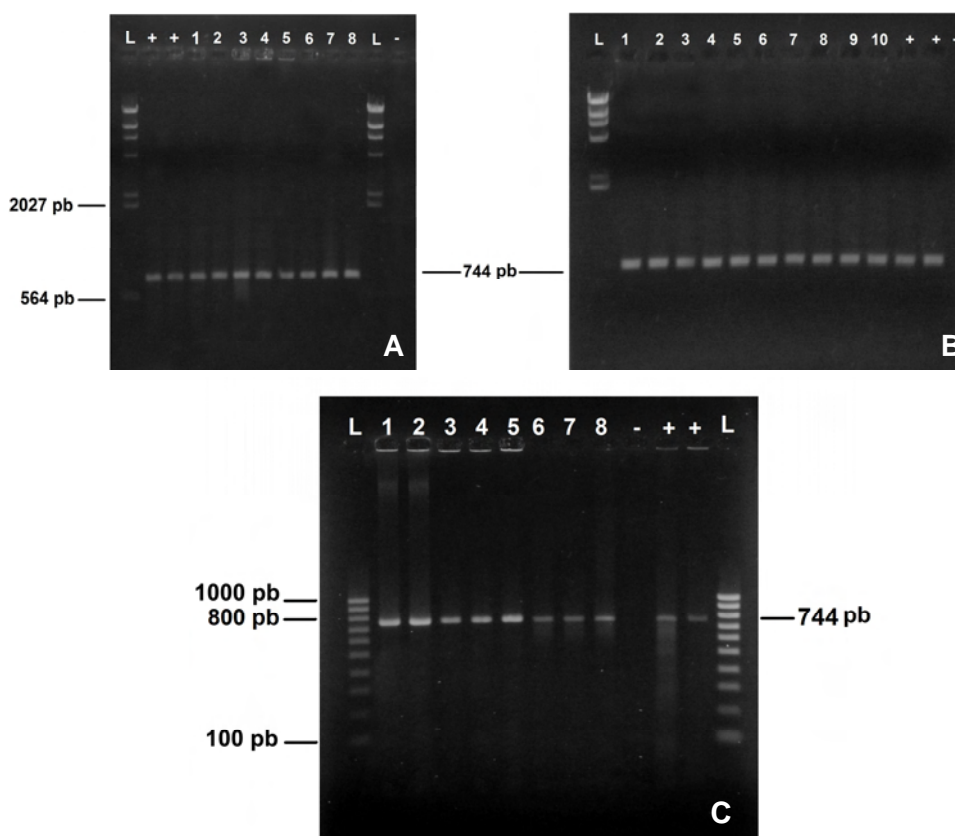


Figura 17. Amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S rRNA con los primers A y J. A) Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA HindIII. (+), *E. coli* BUN001. (+), *P. aeruginosa* BUN010. 1, 333(1). 2, 333(2). 3, 329A. 4, 329B. 5, 337. 6, 338B. 7, 353B. 8, 371A. L, marcador de tamaño molecular DNA HindIII. (-), control de reactivos. B). L, marcador de tamaño molecular DNA HindIII; 1, 371B. 2, 377C. 3, 380.4, 387. 5, 393. 6, 394. 7, 396. 8, 400. 9, 405. 10, FER1. (+), *E. coli* BUN001. (+), *P. aeruginosa* BUN010. (-), control de reactivos. C). Líneas: L, marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV. 1, 337. 2, 400. 3, 329A. 4, 329B. 5, 333(1). 6, 338B. 7, 371B. 8, 405. (-), control de reactivos. (+), *E. coli* BUN001. (+), *P. aeruginosa* BUN010.

7.2.2 Análisis de secuencias de los fragmentos del gen 16S rRNA de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos. Los 18 productos de PCR de los aislamientos bacterianos de esta investigación, fueron enviados a secuenciar por duplicado, es importante destacar que los amplificados se obtuvieron a partir de DNA template proveniente de lisado bacteriano en diferentes fechas (5 de mayo de 2011 y 19 de Julio de 2011), esto con el fin de confirmar los resultados de las secuencias parciales del gen 16S rRNA. La PCR empleada en esta investigación fue sensible y específica para la amplificación del gen 16S rRNA con DNA proveniente de lisado bacteriano, esta metodología ha sido estandarizada previamente por Revelo y colaboradores (2007) y se ha demostrado que la utilidad de colonias separadas obtenidas de muestras ambientales pueden ser directamente validadas por PCR sin necesidad de otros procedimientos de extracción de DNA cromosómicos (Sheu *et al.*, 2000).

Obtenidas las secuencias de los fragmentos del gen 16S rRNA de los 18 aislamientos bacterianos, se verificó su buena calidad mediante la visualización de los cromatogramas (Figura 18). Posteriormente se realizaron procesos de depuración bioinformática de las secuencias, estos procesos consistieron en la comprobación de cada uno de los picos de las bases nitrogenadas en los cromatogramas y el corte de las bases nitrogenadas no determinadas (N) presentes al inicio y final de la secuencia, por medio del programa BioEdit versión 7.0.8 (Hall, 1999). Finalmente se seleccionaron las secuencias parciales de mejor calidad correspondientes a las obtenidas con el primer J (5'-3'), con las que se realizó la búsqueda de similitud por alineamientos con secuencias de las bases de datos: GenBank/EMBL/DDBJ empleando el algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) y RDP (Ribosomal Data Project) empleando el algoritmo SeqMatch (Cole *et al.*, 2009). Este proceso se realizó dos veces con las secuencias de los 18 aislamientos bacterianos provenientes de cada fecha.

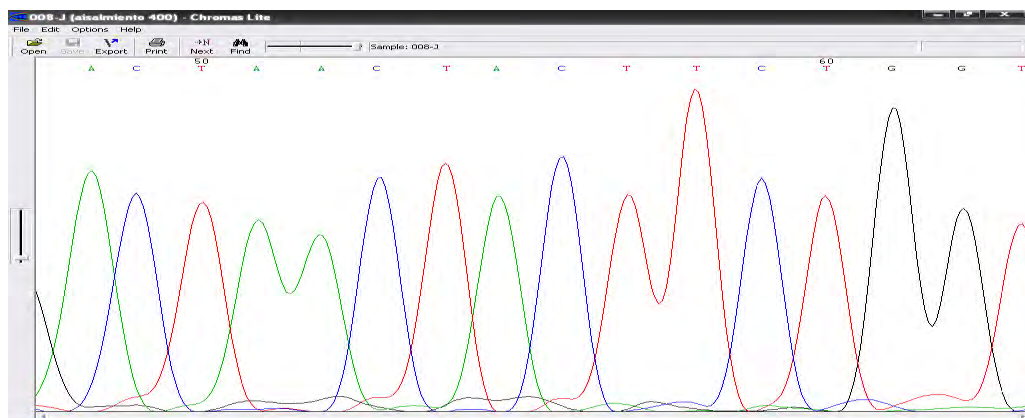


Figura 18. Región de 50 pb a 60 pb sobre la secuencia parcial del gen 16S rRNA del aislamiento bacteriano 400 con primer J (reverso). El cromatograma fue visualizado con el programa Chromas Lite versión 2.01.

Es importante destacar que las secuencias parciales del gen 16S rRNA de los aislamientos bacterianos coincidieron en los dos envíos de secuenciación, ratificando la pureza de los extractos brutos de ADN que fueron usados como template para PCR, la cual fue reproducible. La Tabla 6 muestra la caracterización parcial de los aislamientos bacterianos y sus respectivos porcentajes de similitud con secuencias de las dos bases de datos empleadas, que en todos los casos fueron superiores a 80%. Así mismo en la tabla 6 se describen los datos obtenidos de las secuencias del gen 16S rRNA para cada aislamiento bacteriano con mayor similitud en la base de datos.

Los primers empleados en esta investigación para amplificar fragmentos del gen 16S rRNA han permitido caracterizar bacterias gram negativas como gram positivas, incluyendo bacterias acumuladoras de PHAs en diversos estudios (Keis *et al.*, 1995; Montoya *et al.*, 2001; Revelo *et al.*, 2007). En esta investigación los primers A y J permitieron obtener fragmentos desde 603 a 777 pb aproximadamente, las secuencias de estos fragmentos fueron útiles para la caracterización de los aislamientos bacterianos hasta el nivel taxonómico de género.

Gran parte del éxito del gen 16S rRNA en los análisis filogenéticos se basa en la existencia de secuencias altamente conservadas (universales) lo que no resulta tan fiable para determinar la variabilidad en las secuencias y filiaciones a nivel de especie (Olmos, 1996), se ha informado que la identificación mediante este gen es parcial ya que implica que la secuencia de 16S rDNA no aportará siempre una identificación definitiva a nivel de especie (Patel, 2001); cabe resaltar que la presencia de regiones específicas o hipervariables (Neefs *et al.*, 1991) en el gen 16S rRNA permiten la identificación hasta género, sin embargo estas regiones hipervariables deben ser flanqueadas con varios pares de primers específicos y en taxonomía actualmente se recomienda emplear metodologías como la identificación polifásica que incluyan pruebas bioquímicas y utilice criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación con el fin de obtener una identificación precisa (Stackebrandt y Goebel, 1994).

Tabla 6. Similitud de las secuencias de un fragmento del gen 16S rRNA de los aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos acumuladores de compuestos lipídicos. Se muestran los mejores porcentajes de similitud obtenidos con las secuencias de las bases de datos (GenBank y RDP).

Aislamiento bacteriano	Tamaño fragmento amplificado (bp)	Bases de datos analizadas							Caracterización
		RDP			GenBank				
		Especies estrechamente relacionadas (Número de acceso)	Identidad (%)	unique common oligomer	Especies estrechamente relacionadas (Número de acceso)	Identidad (%)	Max Score	E-value	
329A	687	Unidentified low G+C Gram-positive bacterium RS21a. S000529157 (U31482) (<i>Bacillus simplex</i> S000941827) (AB363738)	100 99	0417 1394	<i>Bacillus simplex</i> (JF496381.1)	100	1262	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
329B	699	Unidentified low G+C Gram-positive bacterium RS21a. S000529157 (U31482) (<i>Bacillus simplex</i> S000323991) (AJ628743)	100 99	0417 1418	<i>Bacillus simplex</i> (GU969132.1)	100	1277	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
333(1)	677	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S000481205 (AY880029)	100	1413	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (JQ660238.1)	99	1225	0.0	<i>Pseudomonas</i> sp.
333(2)	681	<i>Pseudomonas stutzeri</i> S000892655 (EF633259)	99	0508	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (HQ848125.1)	99	1232	0.0	<i>Pseudomonas</i> sp.
337	675	<i>Alcanivorax</i> sp. S000383735 (AB055207)	99	1425	<i>Alcanivorax</i> sp. (DQ270741.1)	100	1221	0.0	<i>Alcanivorax</i> sp.
338B	688	<i>Haererehalobacter</i> sp. KY-VR2-2; S000870650 (AB305291)	91.4	1313	<i>Haererehalobacter</i> sp. (AB305291.1)	99	1197	0.0	<i>Haererehalobacter</i> sp.
353B	640	<i>Bacillus subtilis</i> S000995622 (EU368195)	100	0425	<i>Bacillus subtilis</i> (JN998727.1)	99	1125	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
371A	697	Unidentified low G+C Gram-positive bacterium RS21a. S000529157 (U31482) (<i>Bacillus simplex</i> S000323991) (AJ628743)	100 98	0417 1418	<i>Bacillus simplex</i> (GU188926.1)	100	1258	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
371B	603	<i>Stenotrophomonas</i> sp. KS-9. S000902040 (DQ847356)	88	0440	<i>Stenotrophomonas</i> sp. Enf29. (DQ339605.1)	96	1112	0.0	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
377C	693	Unidentified low G+C Gram-positive bacterium RS21a. S000529157 (U31482) (<i>Bacillus simplex</i> S000941827) (AB363738)	100 98	1418 1394	<i>Bacillus simplex</i> (JF496381.1)	99	1256	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
380	694	<i>Pseudomonas putida</i> S000588224 (DQ149223)	100	0587	<i>Pseudomonas putida</i> (HQ242743.1)	99	1256	0.0	<i>Pseudomonas</i> sp.
387	683	<i>Bacillus</i> sp. S000995646 (EU368219)	100	0424	<i>Bacillus firmus</i> (GQ281100.1)	99	1255	0.0	<i>Bacillus</i> sp.
393	689	Uncultured bacterium S001755232 (GQ921402) <i>Pseudomonas</i> sp. (S000653886) (DQ454135)	100 98	1407 0480	<i>Pseudomonas</i> sp. (HQ189532.1)	99	1255	0.0	<i>Pseudomonas</i> sp.
394	777	<i>Halomonas</i> sp. NIOB 793. S000968473 (EU283328)	86.5	1369	<i>Halomonas</i> sp. (JF979322.1)	97	1288	0.0	<i>Halomonas</i> sp.
396	674	<i>Haererehalobacter</i> sp. S000870650 (AB305291)	96	1313	<i>Haererehalobacter</i> sp. (AB305291.1)	99	1216	0.0	<i>Haererehalobacter</i> sp.
400	679	<i>Alcanivorax dieselolei</i> S000541017 (AY683531)	100	1403	<i>Alcanivorax dieselolei</i> (GU370129.1)	100	1253	0.0	<i>Alcanivorax</i> sp.
405	722	<i>Halomonas</i> sp. NIOB 793. S000968473 (EU283328)	82	1369	<i>Halomonas</i> sp. B-3044 (DQ270707.1)	89	1188	0.0	<i>Halomonas</i> sp.
FER1	667	<i>Bacillus subtilis</i> S000416009 (AB190126)	98	522	<i>Bacillus subtilis</i> (JQ308589.1)	99	1221	0.0	<i>Bacillus</i> sp.

Las secuencias parciales del gen 16S rRNA de los 18 aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos fueron depositadas en el GenBank/EMBL/DDBJ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabla 7), secuencias que quedan en una base de datos reconocida para posteriores análisis, por ejemplo con el siguiente link se accede a la secuencia de *Bacillus* sp. 329A <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/JN383422>.

Tabla 7. Número de acceso en el GenBank de secuencias parciales del gen 16S rRNA de bacterias marinas hidrocarburoclásticas.

Bacteria	Numero de acceso GenBank
<i>Bacillus</i> sp. 329A	JN383422
<i>Bacillus</i> sp. 329B	JN661566
<i>Pseudomonas</i> sp. 333(1)	JN383421
<i>Pseudomonas</i> sp. 333(2)	JN661567
<i>Alcanivorax</i> sp.337	JN661564
<i>Haererehalobacter</i> sp. 338B	JN383424
<i>Bacillus</i> sp. 353B	JN661559
<i>Bacillus</i> sp. 371A	JN383425
<i>Bacillus</i> sp. 377C	JN383423
<i>Pseudomonas</i> sp. 380	JN661560
<i>Bacillus</i> sp. 387	JN661563
<i>Pseudomonas</i> sp. 393	JN661561
<i>Haererehalobacter</i> sp. 396	JN661562
<i>Alcanivorax</i> sp. 400	JN661565
<i>Halomonas</i> sp. 405	JQ653248
<i>Halomonas</i> sp. 394	JQ653249
<i>Bacillus</i> sp. FER1	JQ653250
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 371B	JQ653247

Las cepas 333(1), 333(2), 380 y 393 presentaron similitud del 99% con especies del género *Pseudomonas*: 333(1) con *Pseudomonas aeruginosa*, 333(2) con *Pseudomonas stutzeri*, 380 con *Pseudomonas putida* y 393 con *Pseudomonas* sp. (Tabla 6). Las especies de *Pseudomonas* han sido ampliamente estudiadas como degradadoras de hidrocarburos, son conocidas por degradar petróleo crudo, diesel y una variedad de hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs); entre ellas, *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes* y *P. putida* se destacan por su eficiencia en biorremediación (Zhang *et al.*, 2005; Ting *et al.*, 2009; Ting *et al.*, 2010). Las bacterias del género *Pseudomonas* también tienen la capacidad de producir ramnolípidos biosurfactantes que están involucrados en la descontaminación de petróleo (Nelson *et al.*, 2002).

P. aeruginosa es uno de los aislamientos más frecuentes de ambientes impactados con hidrocarburos (Bartha, 1977), además es una de las bacterias más usadas en investigaciones de biorremediación y presenta varias vías metabólicas para metabolizar xenobióticos (Norman *et al.*, 2002; Das y Mukherjee, 2007). *P. putida* ha sido recientemente estudiada como la bacteria marina mejor capacitada para degradar hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) como el naftaleno (Abyar *et al.*, 2011).

Por otra parte es importante mencionar la degradación del dibenzotiofeno (DBT) que efectúan algunas cepas bacterianas tales como *Pseudomonas stutzeri* (Bracho *et al.*, 2007) debido a que en los últimos años este hidrocarburo se ha convertido en sustrato modelo para los estudios de degradación, persistencia y bioacumulación de compuestos heterocíclicos azufrados del petróleo en el ambiente.

Las cepas 329A, 329B, 353B, 371A, 377C, 387 y FER1 presentaron similitud entre 98 y 100% con especies del género *Bacillus*, principalmente 329A, 329B, 371A, 377C con *B. simplex*, 353B y FER1 con *B. subtilis* y 387 con *B. firmus*; las bacterias de este género son predominantes en zonas afectadas por hidrocarburos gracias a sus bajos requerimientos nutricionales (Cybulski *et al.*, 2003) probando ser uno de los géneros dominantes asociados con la degradación de hidrocarburos después de las pseudomonas (Queiroga *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007). Algunas bacterias del género *Bacillus* han sido estudiadas por su potencial para biorremediación en ambientes marinos (Chikere *et al.*, 2009). *B. simplex* y *B. firmus* son conocidos por la degradación de PAHs (Juhász y Naidu, 2000; Nair *et al.*, 2008) y *B. subtilis* por degradar hidrocarburos complejos y parafinas (El Naggar *et al.*, 2010) como también por producir ramnolipidos biosurfactantes (Nwaogu *et al.*, 2008).

La presencia de bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas* en nuestra investigación corresponde con los resultados obtenidos por Al-Saleh y colaboradores (2009), quienes demostraron que las bacterias cultivables degradadoras de petróleo pertenecen a 6 géneros de bacterias: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Kocuria* y *Micrococcus*.

Las cepas 338B y 396 fueron próximas a *Haererehalobacter* sp., 98% y 99% respectivamente en el blast realizado. La revisión de literatura reporta que existen escasos estudios sobre este género. Wang y colaboradores (2011), informan a *Haererehalobacter* sp. como una bacteria halofílica encontrada en algunos ecosistemas marinos con un óptimo crecimiento en un 15% de solución salina como fuente de minerales, sin embargo, aun no se han encontrado reportes de este género como bacterias marinas hidrocarburoclásticas, que pueden constituir para la costa Pacífica Colombiana el primer informe de este género como representativo de este grupo metabólico.

Las cepas 394 y 405 presentaron similitud del 97% y 89% con *Halomonas* sp. respectivamente. Melcher y colaboradores (2002) demostraron que bacterias del género *Halomonas* son capaces de degradar fluorantreno, pireno, criseno, benzo (a) pireno, y hexadecano como un alcano representativo, Calvo y colaboradores (2002) y Uad y colaboradores (2010) demostraron que estas bacterias producen exopolímeros que pueden emulsionar diferentes hidrocarburos. Se ha demostrado que en un microcosmos

cepas de *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Brevibacterium* han sido las bacterias marinas degradadoras de hidrocarburos más eficientes mientras que cepas de *Halomonas* producen la más alta cantidad de biopolímeros con actividad emulsionante (Uad *et al.*, 2010).

Las cepas 400 y 337 presentaron similitud del 100% con *Alcanivorax dieselolei* y *Alcanivorax sp.* respectivamente. Este género comprende diversas bacterias marinas degradadoras de petróleo que son denominadas bacterias hidrocarburoclásticas obligadas (OHCB), algunos autores han caracterizado hasta 250 bacterias de este género con base en las secuencias del gen 16S rRNA (Yakimov *et al.* 1998; Syutsubo *et al.*, 2001; Kasai *et al.*, 2002). Frecuentemente incluye especies como *A. borkumensis*, *A. jadensis*, *A. venustensis*, *A. dieselolei*, *A. balearicus* y actualmente *A. hongdengensis*, de las cuales todas han sido aisladas de ambientes marinos (Wu *et al.*, 2009), excepto *A. balearicus* la cual fue aislada de un lago salino subterráneo (Rivas *et al.*, 2007). Lai y colaboradores (2011) adelantaron un importante estudio taxonómico en el cual evalúan una nueva cepa bacteriana aislada de un consorcio degradador de pireno enriquecido con sedimentos del pacífico y la proponen como una nueva especie del género *Alcanivorax*, *A. pacificus sp. nov.*

Finalmente la cepa 371B presentó una similitud de 96% con *Stenotrophomonas sp.*, género conocido por su gran capacidad en la degradación de PAHs (Juhász *et al.*, 2000). Se han aislado y caracterizado de la cepa *Stenotrophomonas maltophila* algunas dioxigenasas para la degradación monocíclica de hidrocarburos, estas características las convierten en bacterias potenciales para la biorremediación de aguas y suelos contaminados con hidrocarburos (Guzik *et al.*, 2009). También se ha investigado la degradación de PAHs de alto peso molecular por la definición de un cocultivo de hongo-bacteria donde participa *Stenotrophomonas maltophila* y *Penicillium janthinellum* (Boonchan *et al.*, 2000).

La secuenciación de los fragmentos del gen 16S rRNA permitió caracterizar 18 aislamientos bacterianos marinos como pertenecientes a los géneros reconocidos en el campo de la degradación de hidrocarburos: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Halomonas* y *Alcanivorax* y al género *Haererehalobacter*, para el cual no se había reportado hasta ahora bacterias marinas hidrocarburoclásticas PHA positivas. Por lo tanto, este resultado se constituye en un importante informe de bacterias marinas hidrocarburoclásticas de la bahía de Tumaco - Nariño.

Con el propósito de mostrar las relaciones taxonómicas entre las 18 cepas bacterianas marinas hidrocarburoclásticas obtenidas en esta investigación, se elaboró un árbol filogenético con base en el análisis de las secuencias parciales del gen 16S rRNA y secuencias de referencia descargadas del GenBank (Figura 19). Se utilizaron dos *outgroups* que fueron útiles para la construcción del árbol filogenético, el primero representa un dominio diferente, *Thermogladius shockii* y el otro un Filum diferencial *Aquifex pyrophilus*.

A partir del árbol filogenético obtenido se puede observar que las bacterias marinas hidrocarburoclásticas de esta investigación, fueron agrupadas en 2 *clusters* con *bootstraps* de 100% y 100% de confiabilidad, correspondientes a los Filum Proteobacteria y Firmicutes respectivamente, se puede decir que la mayoría de aislamientos

pertenecieron principalmente a las Gamma-Proteobacterias (61,11%), seguida por Firmicutes (38,88%). En el Filum Firmicutes se agruparon todas las cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*, para estas bacterias es necesario realizar futuros estudios con el fin de concluir si las cepas corresponden a especies diferentes.

Todas las cepas bacterianas de los géneros *Halomonas*, *Haererehalobacter*, *Pseudomonas*, *Alcanivorax* y *Stenotrophomonas* obtenidas en esta investigación se agruparon en cuatro *clusters* pertenecientes al Filum Proteobacteria (clase gamma-Proteobacterias), que actualmente constituye el más grande y más diverso linaje filogenético. Se diferenciaron las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas*, las cuales se agruparon en un *cluster* con el 100% de confiabilidad. Las bacterias pertenecientes a los géneros *Halomonas* y *Haererehalobacter* formaron un *cluster* con un porcentaje de confiabilidad de 100% debido a que son géneros cercanos, dentro de este *cluster* se puede observar que las cepas pertenecientes al género *Haererehalobacter* se relacionan con un *bootstrap* de 62%, cabe resaltar que este es un género novedoso del cual hay poca información.

Las cepas bacterianas representantes del género *Alcanivorax* obtenidas en esta investigación se agruparon en un *cluster* con un 97% de confiabilidad con *A. borkumensis* (número de acceso AF062642.1), una especie estudiada por su capacidad para degradar hidrocarburos que además está relacionada con la producción de PHAs; en cuanto a *Stenotrophomonas* sp. 371B, presentó un *cluster* con una confiabilidad de 100% con *Stenotrophomonas maltophilia* (número de acceso HQ407233.1).

Los resultados de esta investigación se pueden comparar con los obtenidos en la investigación de Velmurugan y colaboradores (2011), quienes estudiaron 136 aislamientos bacterianos marinos, de los cuales 5 fueron identificados como miembros novedosos y los 131 aislamientos restantes fueron agrupados en Firmicutes, alpha-Proteobacteria, gamma-Proteobacteria, Gram positivas con alto contenido de G + C y Bacteroides. Es importante resaltar que en esta comunidad bacteriana obtenida a partir de sedimentos marinos, las gamma-Proteobacterias fueron altamente divergentes y se vieron representadas por los géneros: *Vibrio*, *Marinobacterium*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Oceanisphaera*, *Halomonas*, *Alteromonas*, *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, concluyendo que el 3.6% correspondió a aislamientos novedosos. En nuestra investigación, de las 18 cepas bacterianas el 11.1% correspondió a bacterias novedosas, pertenecientes al género *Haererehalobacter* y el 88,9% estuvo representado por bacterias pertenecientes a géneros ampliamente reconocidos como hidrocarburoclásticos.

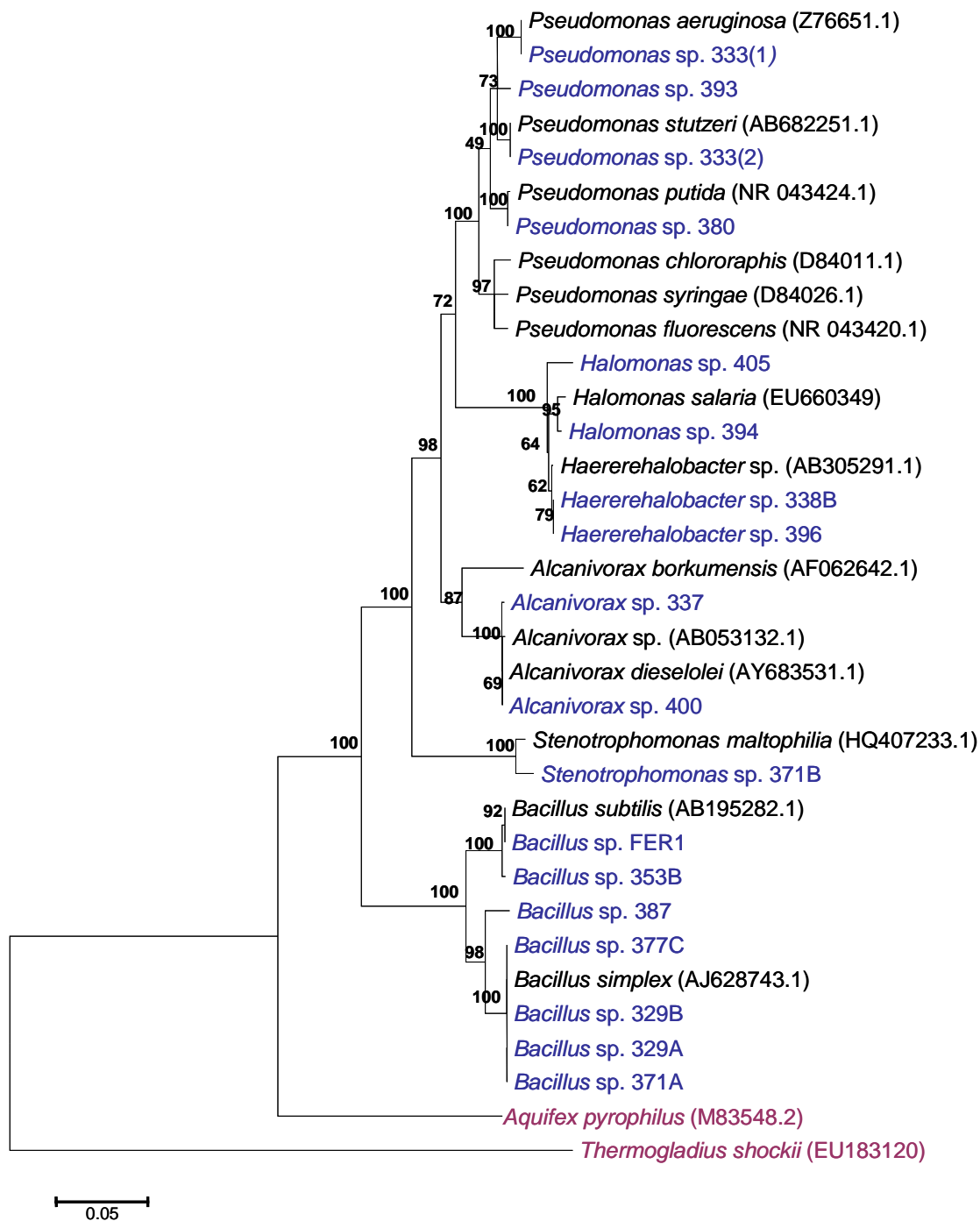


Figura 19. Arbol filogenético de bacterias hidrocarburoclásticas obtenidas en esta investigación con base en el análisis de las secuencias parciales del gen 16S rRNA. Grupos externos, *Thermogladius shockii* y *Aquifex pyrophilus*.

La Figura 20 presenta la procedencia de las cepas bacterianas obtenidas en este estudio, las cuales pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Alcanivorax*,

Haererehalobacter, *Halomonas* y *Stenotrophomonas*. Estos datos informan el momento en el que fueron aisladas, aportando una información general respecto al papel que desempeñan dentro del proceso de degradación de hidrocarburos en un microcosmos desarrollado en los reactores.

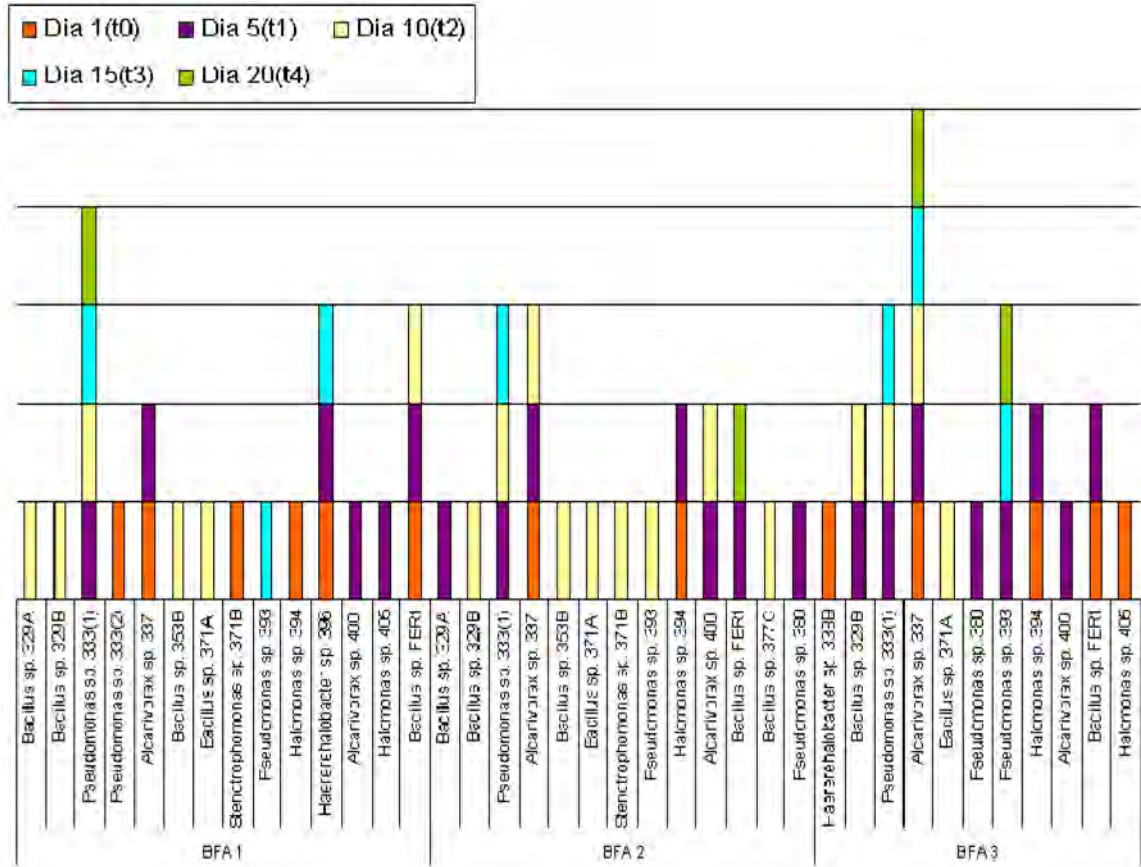


Figura 20. Procedencia de las 18 cepas bacterianas hidrocarburoclásticas en los tres BFAs.

Entre las bacterias identificadas obtenidas a partir de los BFAs (sistema de cultivo discontinuo), se destaca la presencia de bacterias del género *Alcanivorax* las cuales fueron abundantes a través de los 20 días (480 h) de fermentación y en los tres BFAs, posiblemente porque han sido consideradas dominantes en ambientes marinos con exceso de alcanos y resistentes a compuesto derivados del petróleo (Harayama *et al.*, 2004), Cappello y colaboradores (2007) reportó la dominancia de *Alcanivorax* en un estudio de microcosmos con petróleo durante 15 días; Rölin y colaboradores (2004) demostraron la importancia de la rápida proliferación de *Alcanivorax* en condiciones de campo, lo que sugiere que *Alcanivorax* spp. son la clave para la disipación de contaminación por hidrocarburos. Los anteriores estudios demuestran la alta capacidad de cepas de *Alcanivorax* para usar alcanos ramificados que es una de las razones por las cuales estas cepas predominan en ambientes marinos afectados por derrame de petróleo crudo.

Las especies del género *Pseudomonas* y *Bacillus* estuvieron presentes en los BFAs durante todo el tiempo de fermentación debido a que son bacterias reportadas como predominantes en ambientes contaminados, Nkwelan y colaboradores (2008) reportan los microorganismos presentes en suelos contaminados durante todo un diseño experimental en un estudio de diversidad, abundancia y sucesiones de microorganismos que utilizan hidrocarburos durante 90 días donde sobresalen especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Aspergillus*; Bordenave y colaboradores (2007) proponen que los principales representantes grupo Gamma proteobacteria como *Pseudomonas* y *Acinetobacter* fueron inicialmente dominantes en microcosmos contaminados durante 90 días, además Chikere y colaboradores (2009) reporta al género *Bacillus* como bacterias capaces de degradar hidrocarburo predominantes en muestras de agua marina.

Se destaca la presencia en los BFAs de las bacterias de los géneros *Halomonas* y *Haererehalobacter* en los días 1(24 h) y 5(120 h) de fermentación, lo cual podría estar relacionado a su carácter halofílico y la disponibilidad de sales y el agua marina en los tiempos iniciales de la fermentación, la presencia de bacterias del género *Halomonas* en los BFAs podría basarse en el hecho de que bacterias de este género han sido aisladas de ambientes marinos por ejemplo el mar de Ross, Antártica (Pepi *et al.*, 2005), han sido identificadas en poblaciones de ambientes hipersalinos (Piubeli *et al.*, 2012), y han sido clasificadas en grupos de bacterias degradadoras de petróleo (Nakamura *et al.*, 2007). Por su parte el género *Haererehalobacter* ha sido evaluado por su carácter moderadamente halofílico (Wang *et al.*, 2011), sin embargo, no se han encontrado reportes que propongan bacterias pertenecientes a este género como degradadoras de hidrocarburos, lo cual podría ser el primer informe de este tipo de metabolismo en bacterias pertenecientes a *Haererehalobacter* en la costa Pacífica Colombiana.

En los días 1 (24 h) y 5(120 h) de los BFAs 1 y 2 se identificó la cepa *Stenotrophomonas* sp. 371B, su presencia en los primeros tiempos puede deberse a que en estas primeras etapas de fermentación los BFAs le aportaron condiciones nutricionales semejantes a las de ambientes marinos de los cuales ha sido aislada frecuentemente (Romanenko *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2009). Además cabe resaltar que bacterias de este género también han sido encontradas como degradadoras de hidrocarburos en especial petróleo crudo (Verma *et al.*, 2011), sustrato que estuvo presente en mayor concentración dentro de los BFAs en las primeras etapas de muestreo.

Las bacterias hidrocarburoclásticas obtenidas de los BFAs fueron diversas a nivel de género, lo cual indica que el microcosmos proporcionó condiciones similares a un derrame de petróleo y permitió la obtención de bacterias en las cuales a futuro se podría evaluar otras capacidades metabólicas. Cabe resaltar que estas bacterias estuvieron presentes en diferentes momentos durante el proceso de fermentación continuo, información importante a la hora de utilizar estas bacterias para la formación de consorcios que podrían ser estudiados en procesos de biodegradación y biorremediación en ambientes marinos contaminados con petróleo.

7.3 DETECCIÓN DEL GEN *phaC* EN LAS CEPAS BACTERIANAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS.

La detección de los genes *phaC* en bacterias ha probado ser un instrumento importante para la selección de bacterias pertenecientes a diferentes géneros que tengan potencial para acumular PHAs (Revelo *et al.*, 2007; Shamala *et al.*, 2003; Sheu *et al.*, 2000; Solaiman *et al.*, 2000), estas técnicas son importantes debido a que las técnicas microscópicas como colorantes lipofílicos no son específicas (Kalscheuer *et al.*, 2007; Dalal *et al.*, 2010). La detección del gen *phaC* en los aislamientos bacterianos permitió determinar la presencia del gen *phaC* que junto con la identificación de las cepas por 16S rRNA ampliaría cierto conocimiento sobre las condiciones de cultivo apropiadas para la producción de PHAs y el tipo de sustrato más próximo a este metabolismo del carbono.

7.3.1 Detección del gen *phaC* empleando primers generales. La Figura 21 muestra la amplificación por PCR (G-D/G-1R) de un fragmento del gen *phaC* aproximado de 551 pb y por PCR semi-nested (G-D/G-2R) de un fragmento de aproximadamente 491 pb, correspondiente a un ensayo inicial con la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* BUN010.

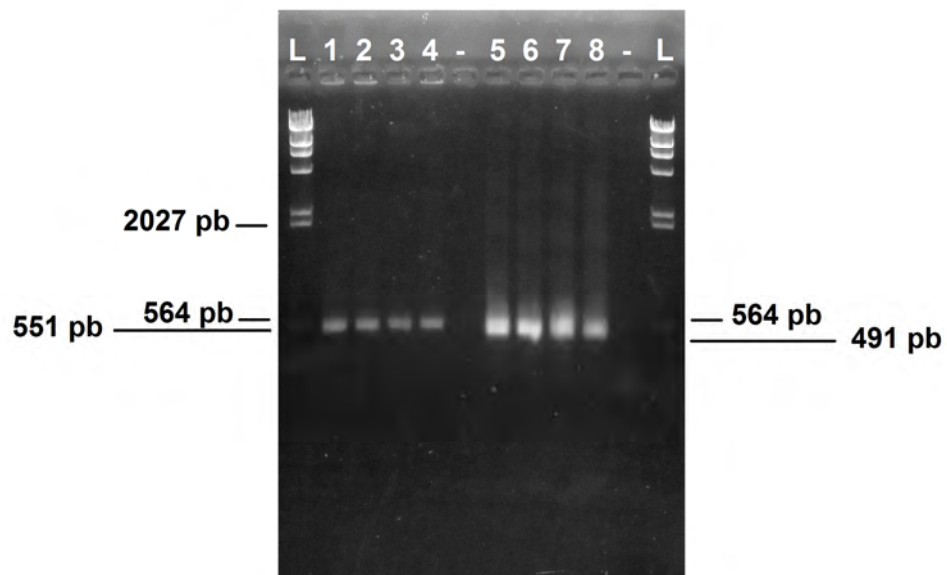


Figura 21. Amplificación por PCR semi-nested de un fragmento del gen *phaC* con los primers generales. Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III; 1-4, *P. aeruginosa* BUN010 (primers G-D/G-1R); (-), control de reactivos; 5-8, *P. aeruginosa* BUN010 (primers G-D/G-2R); (-), control de reactivos; L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III.

Para la cepa *P. aeruginosa* BUN010 se logró detectar el fragmento esperado del gen *phaC* con la PCR convencional y con la PCR semi-nested, además se realizó un ensayo con *E. coli* BUN001 como control negativo, en el cual como era esperado no se encontró amplificación debido a que esta cepa no tiene integrado naturalmente en su genoma el operón de biosíntesis para PHAs.

Una de las pruebas que valida una PCR, sobretodo en este caso que se trabaja con primers degenerados, es la prueba de sensibilidad que consiste en evaluar el límite de detección que se refiere a la cantidad mínima de células bacterianas requeridas para obtener amplificado (Revelo, 2005). En esta investigación se determinó que la mínima cantidad de lisado bacteriano que contiene el DNA template para las reacciones de PCR en la detección del gen *phaC* fue de aproximadamente 67,95 ng DNA calculados para 1,5 μ L (Figura 22, línea 4). En la reacciones de PCR se trabajo con un volumen de 2,5 μ L de lisado bacteriano que contendrían aproximadamente 113,26 ng DNA.

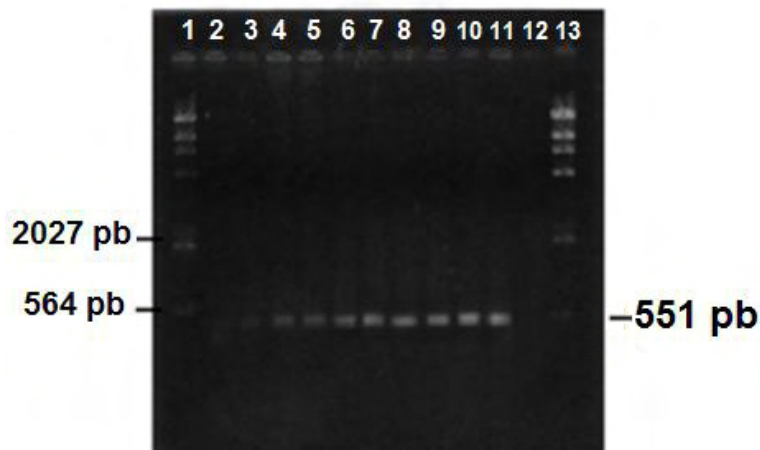


Figura 22. Límite de detección por PCR con el par de primers G-D/G-1R y DNA template preparado de *P. aeruginosa* BUN010. Líneas: 1, marcador de tamaño molecular DNA *HindIII*; 2, 0.5 μ L; 3, 1.0 μ L; 4, 1.5 μ L; 5, 2.0 μ L; 6, 2.5 μ L; 7, 3.0 μ L; 8, 3.5 μ L; 9, 4.0 μ L; 10, 4.5 μ L; 11, 5.0 μ L; 12, control de reactivos; 13, marcador de tamaño molecular DNA *HindIII*.

Se logró detectar el gen *phaC* por PCR (G-D/G-1R) para las cepas bacterianas: *Halomonas* sp. 394 y *Pseudomonas aeruginosa* 333(1) y se confirmó con PCR semi-nested (G-D/G-2R). Para el resto de cepas: *Bacillus* sp. 329A, *Bacillus* sp. 329B, *Pseudomonas* sp. 333(2), *Haererehalobacter* sp. 338B, *Bacillus* sp. 371A, *Stenotrophomonas* sp. 371B, *Bacillus* sp. 377C, *Halomonas* sp. 405, *Pseudomonas* sp. 393, *Haererehalobacter* sp. 396, *Pseudomonas* sp. 380, *Pseudomonas* sp. 387, *Bacillus* sp. 353B, *Alcanivorax* sp. 400, *Alcanivorax* sp. 337, *Bacillus* sp. FER1, el gen *phaC* no pudo ser detectado directamente usando los primers G-D y G-1R y la PCR semi-nested confirmó su presencia y que los descartó como falsos negativos (Figura 23 A y B).

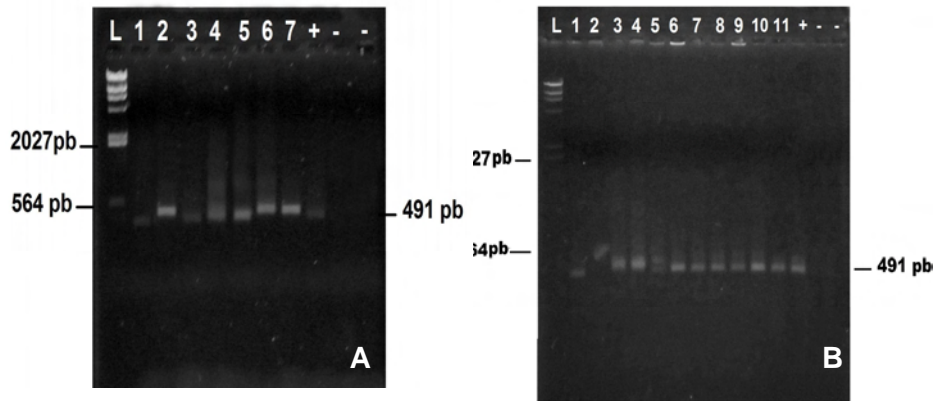


Figura 23. Amplificación por PCR semi-nested de un fragmento del gen *phaC* con los primers G-D y G-2R. A) Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III; 1, *Halomonas* sp. 405; 2, *Halomonas* sp. 394; 3, *Bacillus* sp. 377C; 4, *Bacillus* sp. 371A; 5, *Pseudomonas* sp. 333(1); 6, *Haererehalobacter* sp. 338B; 7, *Bacillus* sp. 329A; (+), *P. aeruginosa* BUN010 (*phaC*+); (-), *E. coli* BUN001 (Control negativo); (-), control de reactivos. B) Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III; 1, *Bacillus* sp. 329B; 2, *Pseudomonas* sp. 393; 3, *Stenotrophomonas* sp. 371B; 4, *Bacillus* sp. 387; 5, *Haererehalobacter* sp. 396; 6, *Bacillus* sp. 353B; 7, *Alcanivorax* sp. 337; 8, *Alcanivorax* sp. 400; 9, *Pseudomonas* sp. 333(2); 10, *Pseudomonas* sp. 380; 10, *Bacillus* sp. FER1; (+), *P. aeruginosa* BUN010 (*phaC*+); (-), *E. coli* BUN001 (Control negativo); (-), control de reactivos.

También se realizó un montaje con la escalera molecular HyperLadder™ IV de los fragmentos amplificados (Figura 24 A y B).

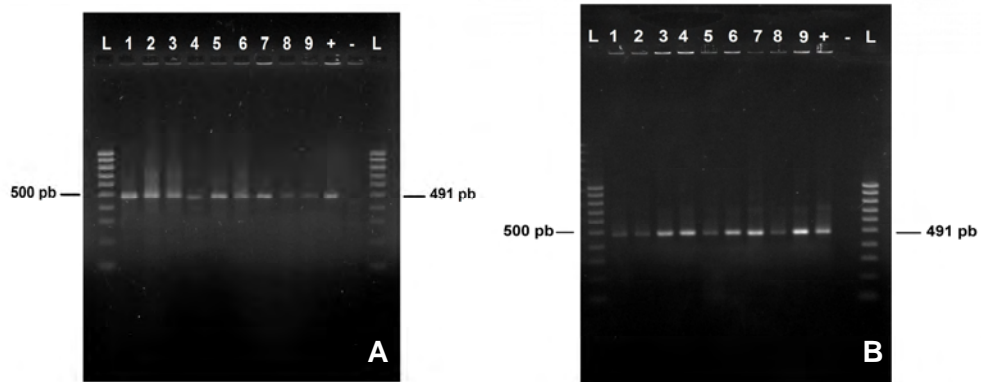


Figura 24. Amplificación por PCR semi-nested de un fragmento del gen *phaC* con los primers G-D y G-2R. A) Líneas: L, marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV; 1, *Bacillus* sp. 329A; 2, *Bacillus* sp. 329B; 3, *Pseudomonas* sp. 333(1); 4, *Pseudomonas* sp. 333(2); 5, *Alcanivorax* sp. 337; 6, *Haererehalobacter* sp. 338B; 7, *Bacillus* sp. 353B; 8, *Bacillus* sp. 371A; 9, *Stenotrophomonas* sp. 371B; (+), *P. aeruginosa* BUN010 (*phaC*+); (-), *E. coli* BUN001 (Control negativo). B) Líneas: L, marcador de tamaño molecular HyperLadder™ IV; 1, *Bacillus* sp. 377C; 2, *Pseudomonas* sp. 380; 3, *Bacillus* sp. 387; 4, *Pseudomonas* sp. 393; 5, *Halomonas* sp. 394; 6, *Haererehalobacter* sp. 396; 7, *Alcanivorax* sp. 400; 8, *Halomonas* sp. 405; 9, *Bacillus* sp. FER1; (+), *P. aeruginosa* BUN010 (*phaC*+); (-), *E. coli* BUN001 (Control negativo).

En este estudio se demostró la utilidad de los primers degenerados para la detección del gen *phaC*, en terminos generales el protocolo de Revelo y colaboradores (2007) usado en esta investigación permitió obtener fragmentos del tamaño esperado (Figuras 23 y 24) y por lo tanto, permitió cumplir con el objetivo de detectar el gen *phaC*. Es pertinente para futuras investigaciones que se lleven a cabo estudios de optimización donde se pueda establecer la concentración de DNA template que al provenir de lisado bacteriano tiene implícitas variaciones de concentración.

La PCR degenerada fue útil debido a que en lugar de usar primers específicos con una secuencia dada en una PCR convencional, en la reacción se usa una mezcla, con el objetivo de aumentar las posibilidades de anillamiento sobre diferentes secuencias relacionadas, debido a que en una determinada posición del oligonucleótido puede estar presente cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas por lo tanto, los primers degenerados tienen diferentes opciones a diferentes posiciones en la secuencia permitiendo el anillamiento y la amplificación de una variedad de secuencias relacionadas (Koelle, 1996)

Es claro que los primers degenerados G-D/G-2R permitieron detectar el gen *phaC*, debido a que son empleados en la técnica de PCR conocida como semi-nested, donde se realizaron dos PCR consecutivas, en la primera se utilizaron un par de primers llamados externos, en la segunda se uso un primer externo y uno complementario (primer interno) a secuencias de DNA contenidas en los fragmentos que se amplificaron en la primera PCR, la idea de esta técnica es que los productos de la primera amplificación son un template ideal para la segunda amplificación, mucho mejor que el DNA genómico original, es así como los fragmentos obtenidos mediante los primers G-D/G-2R se anillan al interior del primer fragmento amplificado con los primers G-D/G-1R mediante una reamplificación.

De esta manera se detecto el gen *phaC* en 18 cepas bacterianas marinas degradadoras de hidrocarburos empleando PCR convencional y semi-nested con primers degenerados propuestos por Revelo y colaboradores (2007), incluyendo géneros de bacterias Gram negativas y Gram positivas no considerados por Revelo y colaboradores (2007) en el diseño de los primers, tales como *Bacillus*, *Halomonas*, *Haererehalobacter*, *Stenotrophomonas* y *Alcanivorax*. Estas bacterias *phaC* positivas se constituyen como biofábricas para degradar hidrocarburos y acumular PHAs, ya que la presencia del gen junto al conocimiento del género bacteriano permite evaluar las condiciones de cultivo específicas para facilitar la expresión del gen y la producción de PHAs.

En esta investigación, *Pseudomonas* sp. 333(1), *Pseudomonas* sp. 380, *Pseudomonas* sp. 333(2) y *Pseudomonas* sp. 393, estrechamente relacionadas con especies de *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. stutzeri* y *Pseudomonas* sp. son bacterias *phaC* positivas. Tal como se ha demostrado en diferentes investigaciones como las de Madison y Huisman, (1999) las bacterias del género *Pseudomonas* acumulan PHAs principalmente mcl-PHAs; además Jamil y Ahmed, (2008) evaluaron la síntesis de mcl-PHAs a partir de varias fuentes de carbono en *P. aeruginosa* CMG607w aislada de sedimentos de la desembocadura del mar Árabe Lyary; Song y Yoon, (1996) informan que *P. putida* BM01 sintetizo dos novedosos copolímeros aromáticos a partir de octanoato dependiendo de la fuente de carbono, el tipo de gen *phaC* y la ruta metabólica involucrada; He y colaboradores (1998) estudiaron la producción de PHAs en *P. stutzeri* aislada de ambientes contaminados con aceites bajo diferentes condiciones de fuente de carbono, *P.*

stutzeri también ha sido reportada para sintetizar mcl- PHAs relacionada con fuentes de carbono como aceites y alcanos de C7 – C12 (Imamura *et al.*, 2001).

Es así como diferentes especies de *Pseudomonas*, se han utilizado para la producción de PHAs, hasta la fecha más de 150 unidades monoméricas de mcl-PHAs han sido producidas a partir de diversas fuentes de carbono (Kim *et al.*, 2007). Las fuentes de carbono estructuralmente relacionadas como alcanos, alquenos y aldehídos han sido evaluadas para producir sustratos precursores que presentan estructuras relacionadas con los componentes de los mcl-PHAs (Rai *et al.*, 2011) por ejemplo, cuando *P. oleovorans* se cultivó en hexano, se produjo un copolímero que contiene 83% en moles de Poli-3-hidroxihexanoato 3(HHX), 12% en moles de Poli-3-hidroxi octanoato P(3HO) y 4,9% en moles de Poli-3-hidroxi decanoato P(3HD) (Preusting *et al.*, 1990). Los mcl-PHAs y sus copolímeros son estructuralmente más diversos que los scl-PHAs y por lo tanto son cada vez más estudiados para aplicaciones biomédicas como los implantes biomédicos, ingeniería de tejidos y de liberación de fármacos (Rai *et al.*, 2011).

En esta investigación cepas bacterianas marinas degradadoras de petróleo pertenecientes al género *Bacillus* fueron aisladas a partir de los sistemas de cultivo continuo (BFAs), *Bacillus* sp. 329A, *Bacillus* sp. 371A, *Bacillus* sp. 377C, *Bacillus* sp. 353B, *Bacillus* sp. FER1, *Bacillus* sp. 387; estrechamente relacionadas con especies como *B. simplex*, *B. firmus*, *B. subtilis*, las cuales son cepas bacterianas *phaC* positivas y se constituyen como potenciales productoras de PHAs.

Las bacterias del género *Bacillus* parecen ser candidatas potenciales para la producción de polihidroxibutirato (PHB) debido a sus mejores rendimientos y condiciones de fermentación menos rigurosas (Thirumala *et al.*, 2010). Se ha informado sobre bacterias marinas pertenecientes al género *Bacillus* que acumulan PHB (López – Cortés *et al.*, 2008), *B. cereus*, *B. mycoides* (Arun *et al.*, 2009) y *B. megaterium* (Pandian *et al.*, 2010; Prabhu *et al.*, 2010). Pocos estudios han reportado acerca de la habilidad de acumulación de PHAs en *B. simplex* (Thirumala *et al.*, 2010) y existen pocos reportes de *Bacillus subtilis* como productor natural de PHAs (Singh *et al.*, 2009).

En este estudio se detectó la presencia del gen *phaC*, para las cepas *Halomonas* sp. 394 y *Halomonas* sp. 405, este resultado es un importante reporte acerca del gen *phaC* involucrado en la biosíntesis de PHA en especies de *Halomonas*, lo cual las constituye como candidatas potenciales para la producción de PHAs como ha sido reportado en la literatura (Quillaguamán *et al.*, 2010). Muchas cepas halofílicas acumulan PHAs y osmolitos bajo ciertas condiciones de cultivo, especies de la familia Halomonadaceae, son capaces de sintetizar PHAs en géneros tales como *Halomonas*, *Cobetia*, *Chromohalobacter* y *Kushneria*, algunas cepas de *Halomonas* son capaces de co-producir exopolisacáridos (EPS), *H. boliviensis* presenta la acumulación de PHAs con los más altos reportes hasta el momento, otras especies de *Halomonas* son capaces de producir PHA y osmolitos (Quillaguamán *et al.*, 2010). Entre las bacterias marinas del género *Halomonas* que han sido estudiadas por su habilidad para acumular PHAs están: *H. profundus* sp. nov. (Simon-Colin *et al.*, 2008) y *H. hydrothermalis* (Shrivastav *et al.* 2010).

Las cepas bacterianas *Alcanivorax* sp. 337 y *Alcanivorax* sp. 400 estrechamente relacionadas con *Alcanivorax* sp. y *A. dieselolei* respectivamente, pertenecen a aquellas bacterias marinas claves en la degradación de hidrocarburos, estas pueden incrementar en número dramáticamente después de un derrame de petróleo, convirtiéndose en los microorganismos más abundantes en aguas contaminadas (Harayama *et al.*, 1999). Según Steinbüchel (1991) la contaminación por hidrocarburos constituye una condición temporal de exceso de carbono junto con la limitación de nitrógeno, es decir una alta relación carbono/nitrógeno (C/N), lo cual según otros autores favorece la formación de PHAs, algunas bacterias del género *Alcanivorax* puedan sintetizar PHAs como estrategia para sobrevivir a periodos de contaminación por hidrocarburos (Steinbüchel, 1991; Sabirova *et al.*, 2006a).

Es importante resaltar una representante del género *Alcanivorax*, la cepa *A. borkumensis* SK2, la cual tiene enzimas asociadas para la síntesis y almacenamiento de PHAs en condiciones de exceso de carbono (Sabirova *et al.*, 2006b). Por otra parte *A. borkumensis* SK2 también ha sido evaluada para la producción de scl-PHAs y mcl-PHAs extracelulares en un mutante del gen “*tesB-Like*” que codifica para una novedosa tioesterasa específica de hidroxiacil-coenzima A (CoA) (Sabirova *et al.*, 2006b). Con esta investigación se aporta dos cepas de este género, *Alcanivorax* sp. 337 y *Alcanivorax* sp. 400 que a futuro pueden ser sometidas a estudios donde se intente mutar el gen “*tesB-Like*” para obtener polímero extracelular, lo que facilitaría la obtención de PHAs eliminando los costos de los procedimientos de extracción y purificación del polímero, además son cepas disponibles para evaluar la producción de PHAs a partir de diferentes hidrocarburos.

En este estudio se detectó el gen *phaC* en la cepa *Stenotrophomonas* sp. 371B lo cual la hace una candidata potencial para la producción de PHAs usando como fuente de carbono hidrocarburos derivados de petróleo. Con respecto al género son recientes los estudios encontrados en la producción de PHAs, por ejemplo el estudio de Singh y Parmar. (2011), donde hacen el primer reporte experimental de la síntesis de PHB de dos nuevas especies *Rahnella aquatilis* y *Stenotrophomonas maltophilia* (aislada de la arena de una playa). Sin embargo, ha sido previamente informada como una bacteria capaz de degradar polihidroxibutirato (Mergaert y Swings, 1996) y son predominantes degradadoras de mcl-PHA en el suelo (Kim *et al.*, 2007). Además *S. maltophilia* es una bacteria Gram negativa comúnmente encontrada en ambientes acuáticos (Ryan *et al.*, 2009), cuyo genoma fue secuenciado recientemente y ha revelado la presencia de todos los genes que codifican enzimas que participan en la vía sintética de PHB, 3-cetoacil-CoA tiolasa (PhaA, No de acceso. CAQ43773.1), acetoacil-CoA reductasa (PhaB, No de acceso. YP_001973050.1), putativa sintasa polihidroxialcanohatos (PHA sintasa) (PhaC, No de acceso. YP_001972712.1) y depolimerasa PHB (PhaZ, No de acceso. YP_001971328.1) (Crossman *et al.*, 2008).

En esta investigación exponemos la detección del gen *phaC* en las cepas bacterianas *Haererehalobacter* sp. 338B y *Haererehalobacter* sp. 396, este resultado puede ser el primer informe de genes *phaC* en bacterias de este género lo que permite deducir su potencial enzimático para la acumulación de PHAs empleando fuentes de carbono baratas como son las procedentes de ambientes contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Sin embargo se recomienda confirmar su identidad. Con respecto al género *Haererehalobacter* existen pocos estudios reportados en la literatura (Wang *et*

al., 2011). Además no ha sido discutido como un género de bacterias acumuladoras de PHAs ni han sido estudiados los genes involucrados en la biosíntesis de PHAs.

Los amplificadores de las cepas bacterianas *Pseudomonas* sp. 333(1) y *Halomonas* sp. 394 con los primers G-D/G-1R y los amplificadores de las cepas bacterianas *Pseudomonas* sp. 393, *Halomonas* sp. 394 y *Pseudomonas* sp. 380. con primers de PCR semi-nested G-D/G-2R fueron enviados para su secuenciación a la compañía MACROGEN (Corea), se debe tener en cuenta que las secuencias del fragmento de gen *phaC* fueron verificadas en su calidad mediante análisis visual de la secuencia en los cromatogramas además se les realizó los procesos de depuración descritos anteriormente.

Empleando los primers generales se obtuvieron secuencias de buena calidad, las cuales presentaron porcentajes de similitud mayores al 70% con respecto a secuencias de genes de PHA sintasas depositadas en la base de datos del GenBank, este resultado fue verificado mediante el alineamiento de las secuencias de esta investigación con regiones específicas de genes *phaC* de la base de datos (Tabla 8), corroborando la presencia del gen *phaC* en las bacterias hidrocarburoclásticas marinas de este estudio. Este resultado demuestra el potencial que tienen estas bacterias para acumular PHAs ya que tienen el gen *phaC* y por ende el operón de biosíntesis de PHAs.

Tabla 8. Blast obtenido con las secuencias parciales de genes *phaC* de las cepas bacterianas hidrocarburoclásticas: los fragmentos del gen fueron obtenidos por PCR con primers generales G-D/G-1R y PCR semi-nested con los primers generales G-D/G-2R.

Aislamiento bacteriano	Tamaño Fragmento amplificado (primers)	GenBank (NCBI)				
		Secuencias estrechamente relacionadas (Número de acceso)	Identidad (%)	Max Score	Total Score	Gen con el cual se alinea la secuencia
<i>Pseudomonas</i> sp. 333(1)	487 pb (G-D /G-1R)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> genes <i>phaC1</i> , <i>phaC2</i> y <i>phaD</i> (X66592.1)	94%	737	960	gen=" <i>phaC1</i> " CDS: 1266-2945
<i>Halomonas</i> sp. 394	503 pb (G-D /G-1R)	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>gl06</i> genes polihidroxicanoato sintasa 1 (<i>phaC1</i>), polihidroxicanoato depolimerasa (<i>phaZ</i>), y polihidroxicanoato sintasa 2 (<i>phaC2</i>), cds completos (FJ214729.2)	83%	497	776	gen=" <i>phaC2</i> " CDS: 3314-4996
<i>Pseudomonas</i> sp. 393	472 pb (G-D /G-2R)	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>gl06</i> genes polihidroxicanoato sintasa 1 (<i>phaC1</i>), polihidroxicanoato depolimerasa (<i>phaZ</i>), y polihidroxicanoato sintasa 2 (<i>phaC2</i>), cds completos (FJ214729.2)	71%	77.0	77.0	gen=" <i>phaC2</i> " CDS: 3314-4996
<i>Halomonas</i> sp. 405	480 pb (G-D/ G-2R)	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>gl06</i> genes polihidroxicanoato sintasa 1 (<i>phaC1</i>), polihidroxicanoato depolimerasa (<i>phaZ</i>), y polihidroxicanoato sintasa 2 (<i>phaC2</i>), cds completos (FJ214729.2)	82%	435	669	gen=" <i>phaC2</i> " CDS: 3314-4996
<i>Pseudomonas</i> sp. 380	478 pb (G-D/ G-2R)	<i>Pseudomonas putida</i> genes poli (3-hidroxicanoato) sintasa 1 (<i>phaC1</i>), poli (3-hidroxicanoato) depolimerasa (<i>phaZ</i>), poli (3-hidroxicanoato) sintasa 2 (<i>phaC2</i>), producción de PHA asociada a proteínas (<i>phaD</i>), granulos de PHA asociados a proteínas (<i>phaF</i>), y granulos de PHA asociados a proteínas (<i>phaI</i>), cds completos (AF150670.2)	86%	459	637	gen=" <i>phaC1</i> " CDS: 586- 2265

Las secuencias parciales del gen *phaC* de los 5 aislamientos bacterianos (Tabla 8) obtenidas con los primers G-D /G-1R y G-D /G-2R fueron depositadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los números de acceso son los siguientes: *Pseudomonas* sp. 333(1) gen (*phaC1*):JQ653251; *Halomonas* sp. 394 gen (*phaC2*): JQ653252; *Pseudomonas* sp. 393 gen (*phaC2*): JQ653253; *Halomonas* sp. 405 gen (*phaC2*): JQ653254; *Pseudomonas* sp. 380 gen (*phaC1*): JQ653255.

Mediante la secuenciación de los fragmentos obtenidos con los primers degenerados (Tabla 10) se puede concluir sobre el tipo de gen *phaC* presente en estas bacterias debido a que presenta una similitud con genes *phaC*, sin embargo en esta investigación se diferencio el tipo de gen para las 18 cepas bacterianas, empleando primers específicamente diseñados para las PHA sintasas clase I, II y IV.

7.3.2 Diferenciación del tipo de gen *phaC* empleando primers específicos. A partir del trabajo realizado con los primers específicos E1-D/E1-R (Revelo *et al.*, 2007), se pudo detectar un fragmento del gen *phaC1* que codifica para la enzima PHA sintasa clase II en las cepas bacteriana, *Halomonas* sp. 394, *Halomonas* sp. 405, *Pseudomonas* sp. 380, *Pseudomonas* sp. 393, *Haererehalobacter* sp. 338B y *Haererehalobacter* sp. 396 (Figura 25); también se logró detectar un fragmento del gen *phaC2* que codifica para la enzima PHA sintasa clase II, empleando los primers específicos E2-D/E2-R (Revelo *et al.*, 2007), en las cepas bacterianas *Alcanivorax* sp. 337, *Alcanivorax* sp. 400, *Pseudomonas* sp. 333(1), *Pseudomonas* sp. 333(2), *Pseudomonas* sp. 380, *Pseudomonas* sp. 393, *Haererehalobacter* sp. 338B y *Haererehalobacter* sp. 396 (Figura 26), la detección de estos genes indica que las cepas bacterianas tienen un operón de biosíntesis de PHAs de clase II.

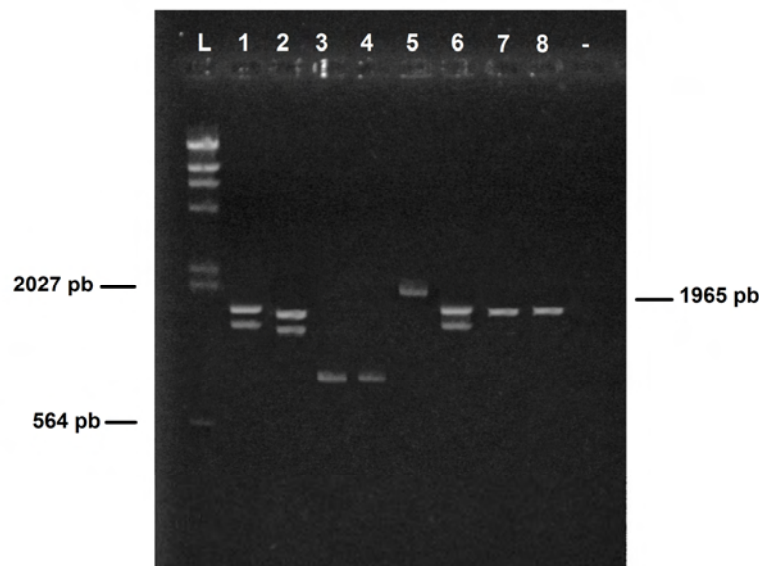


Figura 25. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *phaC1* con los primers E1-D y E1-R. Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA *HindIII*; 1, *Haererehalobacter* sp. 338B; 2, *Pseudomonas* sp. 393; 3, *Alcanivorax* sp. 337; 4, *Alcanivorax* sp. 400; 5, *Pseudomonas* sp. 380; 6, *Haererehalobacter* sp. 396; 7, *Halomonas* sp. 405; 8, *Halomonas* sp. 394; (-), control de reactivos.

Con los primers específicos E1-D y E1-R se detectó el fragmento del gen *phaC1* del tamaño esperado (1965 pb) en *Pseudomonas* sp. 380 (Figura 25, línea 5). mientras que para las demás cepas se amplificaron fragmentos de tamaño inferior al esperado (Figura 25). Los productos de PCR de *Halomonas* sp. 405, *Pseudomonas* sp. 380 y *Pseudomonas* sp. 393 (Figura 25, líneas 7, 5, 2 respectivamente) se secuenciaron en la compañía MACROGEN (Corea). El análisis de las secuencias obtenidas de *Halomonas* sp. 405 y *Pseudomonas* sp. 393 alinearon dentro del gen *phaC* del genoma de las bacterias *Xanthomonas axonopodis*, y *Pseudomonas fluorescens* respectivamente y la secuencia de *Pseudomonas* sp. 380 alineó con el gen *phaC1* en la región comprendida entre *phaC1* y *phaZ* de *Pseudomonas putida* (Tabla 10). Este resultado permite concluir que las cepas *Haererehalobacter* sp. 338B, *Pseudomonas* sp. 393, *Haererehalobacter* sp. 396, *Halomonas* sp. 405 y *Halomonas* sp. 394 tienen en gen *phaC1* (Figura 25, líneas 1, 2, 6, 7, 8 respectivamente).

Para las cepas *Alcanivorax* sp. 337 y *Alcanivorax* sp. 400 (Figura 25, líneas 3 y 4) se obtuvo un fragmento de tamaño inferior al esperado y al obtenido en las otras cepas bacterianas por lo tanto es pertinente realizar mas estudios para determinar si este fragmento obtenido permite la detección del gen *phaC1*. Cabe resaltar que para las cepas *Haererehalobacter* sp. 338B, *Pseudomonas* sp. 393, *Haererehalobacter* sp. 396 (Figura 25, líneas 1, 2, 6 respectivamente) se obtuvo una amplificación de doble banda que puede deberse a inespecificidades de la técnica de PCR touchdown empleada.

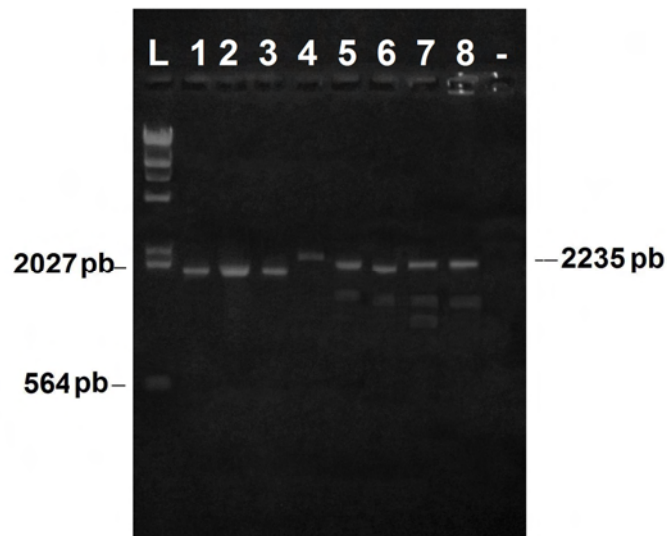


Figura 26. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *phaC2* con los primers E2-D y E2-R. Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA HindIII; 1, *Pseudomonas* sp. 333(1); 2, *Pseudomonas* sp. 333(2); 3, *Haererehalobacter* sp. 338B; 4, *Pseudomonas* sp. 380; 5, *Pseudomonas* sp. 393; 6, *Haererehalobacter* sp. 396; 7, *Alcanivorax* sp. 337; 8, *Alcanivorax* sp. 400; (-), control de reactivos.

Cómo se observa en la Figura 26, los fragmentos obtenidos fueron de tamaño cercano al esperado (2235 pb), lo cual nos permite concluir que el gen *phaC2* fue detectado en todas las cepas bacterianas evaluadas. Algunos productos de PCR se enviaron a secuenciación (MACROGEN) y el análisis de similitud de las secuencias obtenidas mostró que las secuencias parciales del gen *phaC2* de *Pseudomonas* sp. 380 y *Haererehalobacter* sp. 338B se alinearon dentro del gen *phaC2* del genoma de *Pseudomonas putida*, el fragmento de la cepa *Pseudomonas* sp. 333(1) se alineó con el gen *phaC2* de *Pseudomonas aeruginosa* y el fragmento del gen *phaC2* de *Haererehalobacter* sp. 396 se alineó con el gen *phaC* de *Halomonas elongata* (Tabla 10).

Se obtuvieron bandas inespecíficas en las cepas *Pseudomonas* sp. 393, *Haererehalobacter* sp. 396, *Alcanivorax* sp. 337 y *Alcanivorax* sp. 400 (Figura 26, líneas 5 – 8 respectivamente). Don y colaboradores (1991) dan a conocer que en la amplificación de genes sobre genomas complejos, algunos de los principales problemas que se presentan son las inespecificidades y la amplificación de productos de menor tamaño que suelen deberse al anillamiento inespecífico de uno o ambos primers sobre el DNA template. En esta investigación a pesar de utilizar el protocolo de touchdown PCR se presentaron bandas inespecíficas, las cuales no generaron interferencia en el proceso de secuenciación, sin embargo, es recomendable mejorar este proceso en futuros estudios con el fin de evitar al máximo la amplificación de productos inespecíficos. Además es importante mencionar que el tamaño del fragmento obtenido diferente al esperado para las cepas bacterianas de esta investigación se podría atribuir a que los genes *phaC* presentan algunas variaciones inherentes a la especie bacteriana (Rehm, 2003).

Los resultados obtenidos (Figuras 25 y 26) indican que las 18 cepas bacterianas presentan la organización del operón de PHA sintasa de clase II, debido a que los primers específicos diseñados por Revelo y colaboradores (2007) anillan sobre regiones específicas del operón de biosíntesis de PHAs de clase II que incluyen además de las regiones de los genes *phaC1* y *phaC2*, regiones de genes *phaZ* y *phaD*, por esta razón no es relevante que para algunas cepas bacterianas como *Halomonas* sp. 405 y *Halomonas* sp. 394 se haya detectado únicamente el gen *phaC1* y para las cepas *Pseudomonas* sp. 333(1), *Pseudomonas* sp. 333(2), *Alcanivorax* sp. 337 y *Alcanivorax* sp. 400 el gen *phaC2*. Estos resultados permiten concluir que estas cepas presentan la organización del operón de biosíntesis de PHAs clase II. Para las cepas *Pseudomonas* sp. 380, *Pseudomonas* sp. 393, *Haererehalobacter* sp. 396 y *Haererehalobacter* sp. 338B se logró detectar los dos tipos de gen *phaC1* y *phaC2* demostrándose igualmente la presencia del operón de biosíntesis de PHA sintasa clase II.

En el presente trabajo se logró detectar para las especies de *Pseudomonas* caracterizadas, los genes del sistema de PHA sintasa de clase II; este sistema ha sido clonado y caracterizado ampliamente en especies de dicho género (Zhang *et al.*, 2001). Por ejemplo; en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PTCC1310 fueron identificados y clonados los genes de *phaC1* y *phaC2*, genes de PHA sintasa clase II (Abedi *et al.*, 2007), también se ha trabajado con la cepa *Pseudomonas stutzeri* 1317 aislada de suelos contaminados con petróleo para la cual han sido detectados los genes de PHA sintasa nombrados como *phaC1Ps*, *phaC2Ps* y el gen *phaZPs* que codifica para la enzima PHA depolimerasa (Chen *et al.*, 2004). Además han sido identificados y caracterizados los genes *phaC1* y *phaC2* que se expresan para la producción mcl-3HA en *Pseudomonas* spp. incluyendo *Pseudomonas oleovorans* (Huisman *et al.*, 1991), *Pseudomonas* sp.

(Matsusaki *et al.*, 1998), *Pseudomonas Mendocina* (Hein *et al.*, 2002) y *Pseudomonas putida* (Ren *et al.*, 2005).

El gen *phaC2* conjuntamente con el *phaC1* fueron también detectados en las cepas *Alcanivorax* sp. 337 y *Alcanivorax* sp. 400, que coincide con investigaciones sobre una especie de este género, Kalscheuer y colaboradores (2007) mencionan que el genoma de la especie *A. borkumensis* se compone de dos genes expresados diferencialmente de una PHA sintasa putativa (*phaC1* y *phaC2*). Además Sabirova y colaboradores (2006a) reportan que *A. borkumensis* SK2 tiene las enzimas para la síntesis de polihidroxicanoatos en condiciones de exceso de carbono, uno de los dos genes *phaC* (*ABO_1418*) de la PHA sintasa de *A. borkumensis* SK2 se expresa solamente en las células cultivadas en alcano, mientras que el otro gen *phaC* (*ABO_2214*), no se expresa en niveles detectables en dichas células, además también es producido PHA en altas tasas de C/N en células que crecen en sustratos sin alcanos.

En *Halomonas* sp. 394 y *Halomonas* sp. 405, se detectó la presencia del gen *phaC1*, lo cual permite concluir que estas cepas bacterianas tienen la organización del operon de biosíntesis de PHA sintasa clase II, esto proporciona información importante ya que se han realizado diferentes estudios que demuestran la producción de scl-PHAs como el poli(-hidroxibutirato) (Quillaguamán *et al.*, 2007; Guzmán *et al.*, 2009) y la producción de copolímeros biodegradables como el hidroxibutirato-co-hidroxivalerato (PHB-co-PHV) (Kulkarni *et al.*, 2010), Aún hay escasa información sobre la genómica y los genes relacionados con la biosíntesis de PHAs a partir de las bacterias halofílicas (Cai *et al.*, 2011).

Cai y colaboradores (2011) revelan la presencia de los genes *phaC1*, *phaZ* y *phaC2* y otros genes relacionados con el metabolismo de PHAs en la bacteria *Halomonas* sp. TD01, en su estudio demuestran que las enzimas PHA sintasas caracterizadas son novedosas, especialmente la codificada por el gen *phaC1*, la secuencia de esta proteína compartió una significativa similitud con las enzimas de clase I, estos autores también demuestran que las PHA sintasas de esta cepa especialmente la *phaC1* fueron capaces de sintetizar PHB y concluyen que esto concuerda con las características de las PHA sintasas de clase I.

Como resultado relevante, también sobresale la detección de los genes *phaC1* y *phaC2* que codifican para la PHA sintasa clase II en las cepas bacterianas *Haererehalobacter* sp. 338B y *Haererehalobacter* sp. 396. Hasta la actualidad del género *Haererehalobacter* no se conoce información en cuanto a los genes involucrados en la biosíntesis de PHAs. Con base en la investigación desarrollada por Cai y colaboradores (2011) es recomendable que las bacterias marinas halófilas como las obtenidas en esta investigación, *Halomonas* sp. 394, *Halomonas* sp. 405, *Haererehalobacter* sp. 338B y *Haererehalobacter* sp. 396, sean estudiadas con mayor detalle. Es importante destacar que se entregan al cepario de la universidad de Nariño 10 cepas bacterianas marinas caracterizadas en su género y en el tipo de operón de biosíntesis de PHAs clase II.

Las cepas de este estudio pertenecen a géneros como *Pseudomonas*, *Alcanivorax*, *Halomonas* y *Haererehalobacter*, los últimos tres son novedosos en sus características para la síntesis de PHAs ya que aún es reciente la investigación en cuanto a sus operones de biosíntesis de PHAs, el comportamiento enzimático de la PHA sintasa II

(genes *phaC1* y *phaC2*) y el uso de fuentes de carbono tales como los hidrocarburos derivados del petróleo.

Para 7 cepas bacterianas *Bacillus* sp. 329A, *Bacillus* sp. 329B, *Bacillus* sp. 353B, *Bacillus* sp. 371A, *Bacillus* sp. 377C, *Bacillus* sp. 387 y *Bacillus* sp. FER1, se detectó previamente el gen *phaC* con los primers generales propuestos por Revelo y colaboradores (2007), sin embargo, para confirmar la clase IV de este gen mostrada en literatura para especies del género *Bacillus* (McCool y Cannon, 2001; Satoh *et al.*, 2002), se emplearon los primers y condiciones propuestas por Revelo (2012) facilitados por sus autores para esta investigación. A partir de esto se logró amplificar un fragmento del gen *phaC* de aproximadamente 590 pb que codifica para la PHA sintasa clase IV para las siete cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus*. Se puede observar la amplificación de bandas inespecíficas (Figura 27, líneas 5, 6 y 7). La aparición de dichas bandas pudo verse influida por la calidad y concentración del DNA bacterial, por las secuencias particulares de los genes que se amplificaron (que contienen bases G y C) y por las combinaciones de oligonucleótidos usadas (Rychlik, 1995). Además es importante tener en cuenta que al no estar estandarizada la concentración de DNA template para las PCR puede influir en la concentración de MgCl₂ y Taq-DNA Polimerasa, en especial la concentración de MgCl, en el master mix, ejerce un profundo efecto en la especificidad y el producto de la amplificación (Saiki, 1992; Williams *et al.*, 1993). Los iones Mg²⁺ forman un complejo soluble con los dNTPs que es esencial para su incorporación durante la reacción de amplificación; además estimulan la actividad de la polimerasa, incrementando la temperatura media (T_m) de la interacción entre la doble cadena de DNA y los oligonucleótidos (Newton y Graham, 1994).

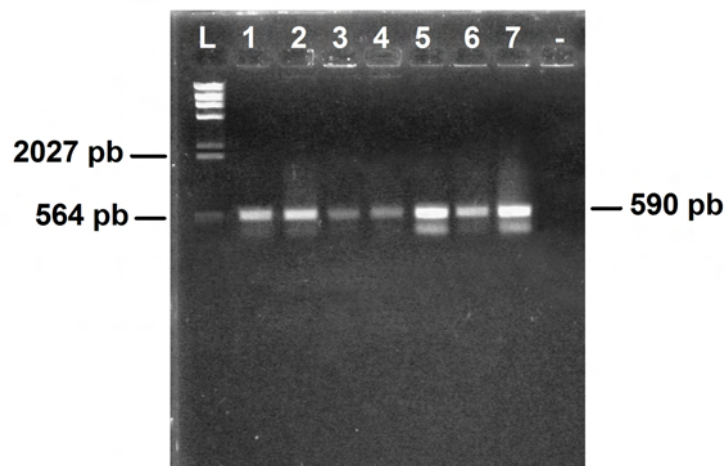


Figura 27. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *phaC* que codifica para la PHA sintasa clase IV con primers de Revelo (2012). Líneas: L, marcador de tamaño molecular DNA *Hind*III; 1, *Bacillus* sp. 329A; 2, *Bacillus* sp. 329B; 3, *Bacillus* sp. 353B; 4, *Bacillus* sp. 371A; 5, *Bacillus* sp. 377C; 6, *Bacillus* sp. 387; 7, *Bacillus* sp. FER1; (-), control de reactivos.

Mccol y Cannon, (1999), informaron acerca de proteínas asociadas a cuerpos de inclusión de PHA de *Bacillus megaterium*, la clonación y análisis de cada una de sus regiones

codificantes; posteriormente McCool y Cannon, (2001) proporcionaron resultados consistentes sobre la PHA sintasa de *B. megaterium*, la cual fue significativamente diferente de todas las sintasas conocidas y fue la primera PHA sintasa del género *Bacillus* que se estudió a nivel molecular, esta posee dos subunidades (*PhaC* y *PhaR*), que actúan sobre tioésteres CoA de 3 hidroxialcanoatos de cadena corta como varios (R) 3-hidroxi ácidos grasos que comprenden entre 3 a 5 átomos de carbono (Rehm, 2003).

Además, Satoh y colaboradores (2002) informaron de la clonación y el análisis de los genes de biosíntesis de PHA en *Bacillus* sp. INT005, que fue aislado de un yacimiento de gas y tuvo la capacidad de acumular PHA, esta bacteria puede sintetizar copolímeros y terpolímeros que contenían diversas unidades de monómero, tales como 3-hidroxi butirato (3HB), 4-hidroxi butirato, 3-hidroxi valerato, 3-hidroxi hexanoato y 6-hidroxi hexanoato a partir de fuentes de carbono adecuadas (glucosa y alcanoato como única fuente de carbono). Además demostraron que la PHA sintasa de *Bacillus* sp. INTO05 estaba compuesta de dos subunidades *PhaCBsp* y *PhaRBsp*, presentando termoestabilidad moderada y alta estabilidad. Hasta la actual revisión de literatura no existen informes sobre la caracterización o detección de los genes *phaC* en *B. subtilis* y *B. simplex*, especies de las bases de datos con las cuáles las bacterias *Bacillus* sp. 329A, *Bacillus* sp. 329B, *Bacillus* sp. 353B, *Bacillus* sp. 371A, *Bacillus* sp. 377C, *Bacillus* sp. 387 y *Bacillus* sp. FER1, mostraron mayor similitud.

Es importante destacar que se entregan al cepario de la universidad de Nariño 7 cepas bacterianas marinas hidrocarburoclásticas pertenecientes al género *Bacillus* que presentan el tipo de gen que codifica para la PHA sintasa clase IV, las cuales pueden ser objeto de futuras investigaciones en cuanto a la obtención de polímeros novedosos como copolímeros de mejores propiedades industriales, sin necesidad de recibir fuentes de carbono diferentes (Valappil *et al.*, 2007).

En esta investigación los productos de PCR de las cepas bacterianas *Bacillus* sp. 329A, *Bacillus* sp. 329B y *Bacillus* sp. 353B, obtenidos empleando los primers para la detección del gen *phaC* que codifica para la PHA sintasa clase IV, fueron secuenciados en la compañía MACROGEN (Corea). El análisis de las secuencias obtenidas y su alineamiento con las secuencias con mayor identidad, indicaron que los fragmentos del gen *phaC* que codifica para la PHA sintasa IV de *Bacillus* sp. 329A y *Bacillus* sp. 329B se alinearon con secuencias específicas del gen *phaC* de *Bacillus* sp. E13 y el fragmento de *Bacillus* sp. 353B se alineó con una región del genoma de *Bacillus subtilis* BSn5 (Tabla 9).

Tabla 9. Blast obtenido con secuencias parciales del gen *phaC* de las 18 cepas bacterianas hidrocarburoclásticas. Los fragmentos de los genes fueron obtenidos por PCR con los primers específicos de Revelo (2012) para el gen *phaC* que codifica para la PHA sintasa IV; E2-D/E2-R y E1-D/E1-R (Revelo *et al.*, 2007) para el gen *phaC* II.

Aislamiento bacteriano	Tamaño de fragmento amplificado (primers)	GenBank (NCBI)				Gen <i>phaC</i> con el cual se alinea
		Primer hit identificado (Número de acceso)	Max Score	Total Score	identidad (%)	
<i>Bacillus</i> sp. 329A	503 (FDM /RDM2)	<i>Bacillus</i> sp. E13 PhaC (J436020.1)	590	590	89%	gen= <i>phaC</i> CDS: 1- 603
<i>Bacillus</i> sp. 329B	588 (FDM /RDM2)	<i>Bacillus</i> sp. E13 PhaC (J436020.1)	590	590	89%	gen = <i>phaC</i> CDS: 1- 603
<i>Bacillus</i> sp. 353B	673 (FDM /RDM2)	<i>Bacillus subtilis</i> BSn5 genoma completo (CP002468.1)	439	489	97%	Fragmento del genoma
<i>Pseudomonas</i> sp. 333(1)	692 (E2-D/E2-R)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> M18, genoma completo (CP002496.1)	659	702	97%	gen= <i>phaC2</i> CDS: 5751821-5753503
<i>Pseudomonas</i> sp. 380	1158 (E2-D/E2-R)	<i>Pseudomonas putida</i> poly(3-hydroxyalkanoate) synthase 1 (<i>phaC1</i>), poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase (<i>phaZ</i>), poly(3-hydroxyalkanoate) synthase 2 (<i>phaC2</i>) (AF150670.2)	1370	1452	93%	gen= <i>phaC2</i> CDS: 3220-4902
<i>Haererehalobacter</i> sp. 338B	1222 (E2-D/E2-R)	<i>Pseudomonas putida</i> poly(3-hydroxyalkanoate) synthase 1 (<i>phaC1</i>), poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase (<i>phaZ</i>), poly(3-hydroxyalkanoate) synthase 2 (AF150670.2)	1315	1411	92%	gen= <i>phaC2</i> CDS: 3220-4902
<i>Haererehalobacter</i> sp. 396	1104 (E2-D/E2-R)	<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581, complete genome (FN869568.1)	266	511	92%	gen= <i>phaC</i> CDS: 2827089-2828924
<i>Pseudomonas</i> sp. 380	1248 (E1-D/E1-R)	<i>Pseudomonas putida</i> poly(3-hydroxyalkanoate) synthase 1 (<i>phaC1</i>), poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase (<i>phaZ</i>), poly(3-hydroxyalkanoate) synthase 2 (<i>phaC2</i>) (AF150670.2)	1404	2153	100%	Gen= <i>phaC1</i> (<i>phaC1</i> - <i>phaZ</i>) CDS: 586-3177
<i>Pseudomonas</i> sp. 393	1295 (E1-D/E1-R)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25 genoma completo (AM181176.4)	208	445	93%	gen= <i>phaC</i> CDS: 433537-435219
<i>Halomonas</i> sp. 405	1016 (E1-D/E1-R)	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri str. 306, genoma completo (AE008923.1)	500	500	73%	gen= <i>phaC</i> CDS: 549410-549784

Las 10 secuencias parciales de los genes *phaC* obtenidas a partir de fragmentos amplificados con los primers específicos (Tabla 9) fueron depositados en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), el cual proporcionó los siguientes números de acceso: *Bacillus* sp. 329A gen (*phaC*): JQ653256; *Bacillus* sp. 329B gen (*phaC*): JQ653257; *Bacillus* sp. 353B gen (*phaC*): JQ653258; *Pseudomonas* sp. 380 gen (*phaC2*): JQ653259; *Halomonas* sp. 405 gen (*phaC*): JQ653260; *Pseudomonas* sp. 333(1) gen (*phaC2*): JQ653261; *Haererehalobacter* sp. 338B gen (*phaC2*): JQ653262; *Haererehalobacter* sp. 396 gen (*phaC*): JQ653263; *Pseudomonas* sp. 380 gen (*phaC1*): JQ653264; *Pseudomonas* sp. 393 gen (*phaC*): JQ653265.

En este estudio la cepa bacteriana *Stenotrophomonas* sp. 317B no amplificó los genes *phaC1*, *phaC2* del sistema de PHA sintasa clase II, ni el gen *phaC* del sistema de PHA sintasa clase IV; sin embargo, se pudo detectar el gen *phaC* por medio de los primers generales G-D/G-2R de Revelo y colaboradores (2007), por lo que se puede concluir que esta bacteria presenta la PHA sintasa clase I, debido a que estos primers fueron diseñados con un carácter degenerado para detectar genes *phaC* que codifican para las PHA sintasas I y II.

Crossman y colaboradores (2008) estudiaron una sintasa putativa de polihidroxialcanoatos (PHA sintasa) (*PhaC*, No de acceso. YP_001972712.1) en *Stenotrophomonas maltophilia* K279 y Singh y Parmar, (2011) reportaron la secuencia genómica de *Stenotrophomonas maltophilia*, demostrando la presencia de genes *PhaA/B/C/Z* involucrados en el metabolismo de producción PHB, esta organización es correspondiente con el operón de biosíntesis de clase I descrito por Rehm, (2003), estos estudios respaldan los resultados obtenidos en esta investigación, donde la cepa *Stenotrophomonas* sp. 371B corresponde a un interesante informe, por lo tanto sería importante una caracterización más detallada de esta cepa bacteriana y del polímero que produce.

En síntesis se obtuvieron cepas bacterianas marinas hidrocarburoclásticas con 3 de las 4 clases de PHA sintasas descritas hasta el momento (Rehm, 2003); 10 cepas bacterianas presentaron la PHA sintasa clase II, 7 cepas bacterianas con la PHA sintasa clase IV y 1 cepa bacteriana PHA sintasa clase I (Tabla 10). Es importante aclarar que la PHA sintasa clase III no fue objeto de este estudio debido a que ha sido evaluada ampliamente en cianobacterias para las cuáles no empleamos métodos de aislamiento.

Tabla 10. Clase de PHA sintasa según el tipo de gen *phaC* determinado en las cepas bacterianas hidrocarburoclásticas y reaccion a colorantes para lípidos neutros.

Bacterias hidrocarburoclásticas	Colorantes para lípidos neutros						<i>phaC</i> Generales (PHA sintasa clase I y clase II *)	PHA sintasa clase II		PHA sintasa Clase IV (gen <i>phaC</i>)	Clase de PHA sintasa
	rojo Nilo			sudan negro				gen <i>phaC1</i>	gen <i>phaC2</i>		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h					
<i>Bacillus</i> sp. 329A	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	Clase IV
<i>Bacillus</i> sp. 329B	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	Clase IV
<i>Pseudomonas</i> sp. 333(1)	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	Clase II
<i>Pseudomonas</i> sp. 333(2)	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	Clase II
<i>Alcanivorax</i> sp. 337	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	Clase II
<i>Haererehalobacter</i> sp. 338B	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	Clase II
<i>Bacillus</i> sp. 353B	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	Clase IV
<i>Bacillus</i> sp. 371A	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	Clase IV
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 371B	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	Clase I
<i>Bacillus</i> sp. 377C	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	Clase IV
<i>Pseudomonas</i> sp. 380	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	Clase II
<i>Bacillus</i> sp. 387	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	Clase IV
<i>Pseudomonas</i> sp. 393	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	Clase II
<i>Halomonas</i> sp. 394	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	Clase II
<i>Haererehalobacter</i> sp. 396	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	Clase II
<i>Alcanivorax</i> sp. 400	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	Clase II
<i>Halomonas</i> sp. 405	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	Clase II
<i>Bacillus</i> sp. FER1	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	Clase IV

*Primers generales propuestos por Revelo y colaboradores (2007) para amplificar ambos tipos de genes *phaC*, sin embargo, debido a su carácter degenerado también se logró detectar en bacterias con PHA sintasa de clase IV (*Bacillus*).

Las 10 secuencias de los fragmentos de genes que codifican para las PHA sintasas obtenidos con los primers específicos (Revelo *et al.*, 2007; Revelo, 2012) fueron alineadas con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) posteriormente se generó una matriz de distancia genética con la aplicación DNADist del programa BioEdit para ser procesada en el programa Past en la aplicación de clúster análisis y se construyó un dendrograma de similitud (Figura 28) usando el algoritmo single linkaje y como medida de similaridad el índice de Bray Curtis, esto permitió ver la alta similaridad genética entre las secuencias de los genes *phaC* obtenidas con los primers específicos, debido a que el agrupamiento arrojo un coeficiente de correlacion de 0,75.

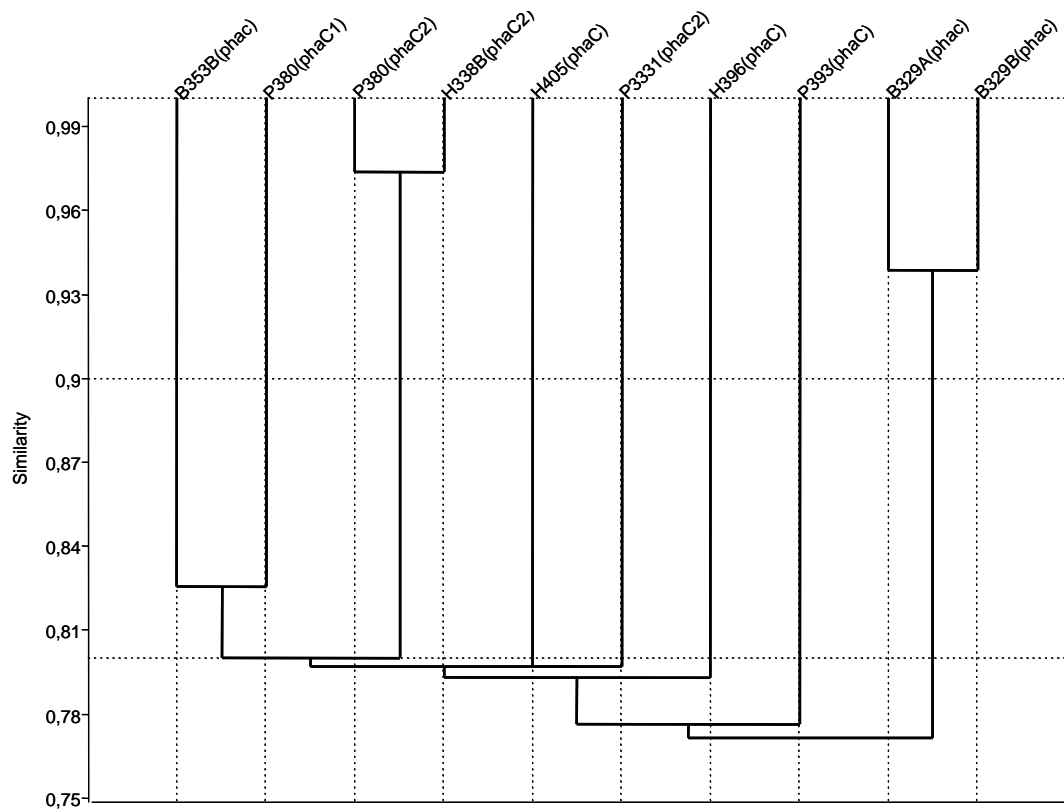


Figura 28. Dendrograma de similitud de bacterias hidrocarburoclásticas con base en el análisis de las secuencias de fragmentos del gen *phaC* obtenidos con primers específicos (Revelo *et al.*, 2007; Revelo, 2012). Construido bajo el algoritmo de single linkaje y como medida de similaridad el índice de Bray Curtis.

En el dendrograma realizado con las secuencias de genes *phaC* amplificados usando primers específicos, se puede observar que las secuencias de los genes que codifican para la PHA sintasa tipo II y tipo IV fueron agrupadas en este dendrograma, esto se puede deber a que los genes que codifican para las PHA sintasas presentan regiones altamente conservadas.

Con el fin de representar con mayor claridad los resultados del tipo de gen *phaC* presente en las 18 cepas marinas hidrocarburoclásticas se construyó otro dendrograma de similitud empleando una matriz de presencia ausencia con ayuda del programa NTSYS 2.1 (Figura 29).

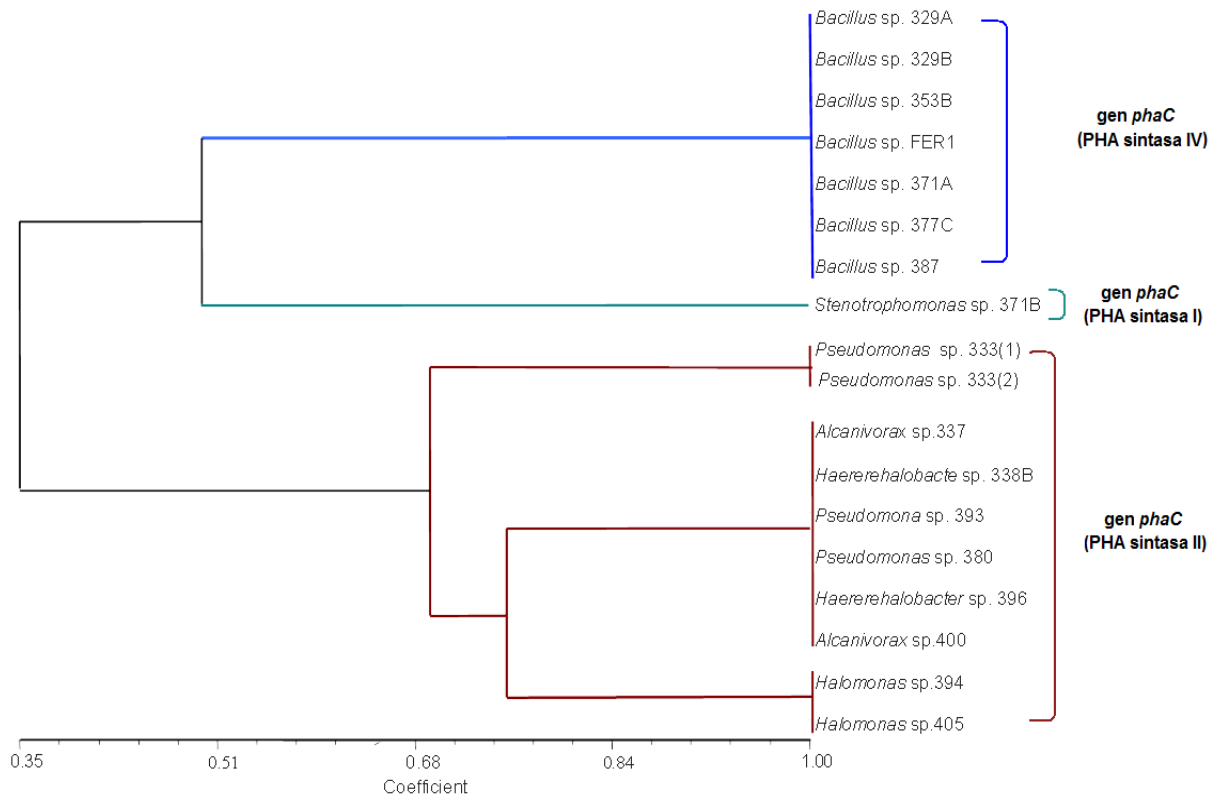


Figura 29. Dendrograma de similitud de las bacterias marinas hidrocarburoclásticas con relación al tipo de gen *phaC*. Se empleó la estrategia de agrupamiento UPGMA y el índice de similitud DICE.

En la Figura 29 se puede observar el agrupamiento de las bacterias marinas hidrocarburoclásticas de esta investigación en tres *clusters* diferenciados, en este se puede ver que los aislamientos se agrupan dependiendo del tipo de gen *phaC*. En el primer *cluster* (color azul) se observa las bacterias pertenecientes la género *Bacillus* en las cuales se amplificó con iniciadores específicos (Revelo, 2012) el gen *phaC* que codifica para la PHA sintasa clase IV; se puede observar un segundo *cluster* (color café) el cual agrupo los géneros bacterianos a los cuales se les logró detectar con iniciadores específicos (E1-D/E1-R y E2-D/E2-R de Revelo y colaboradores 2007) los genes que codifican para la PHA sintasa clase II (*phaC1* y *phaC2*).

Se puede observar un *cluster* (color verde) el cual diferencia a la bacteria *Stenotrophomonas* sp. 371B de los anteriores *clusters* debido a que a esta cepa se le detectó el gen *phaC* con iniciadores generales (G-D/G-1R/G-2R) y no amplifico con los iniciadores específicos. De esta manera se pudo inferir que esta bacteria podría presentar el gen *phaC* que codifica para la PHA sintasa I debido a que los primeros generales fueron diseñados en base a secuencias de genes que codifican para la PHA sintasa I y II, además algunas investigaciones reportan que bacterias pertenecientes a este género presentan el operón de biosíntesis PHA sintasa I (Crossman et al., 2008; Singh y Pharrmar, 2011). Es recomendable el diseño y aplicación de primers específicos para la confirmación del tipo de gen *phaC* en *Stenotrophomonas* sp. 371B.

Los resultados obtenidos de la detección y la diferenciación de las clases de PHA sintasas se pueden argumentar debido que se empleo primers específicos diseñados particularmente para este fin, lo que aseguro que los fragmentos obtenidos correspondían a secuencias de genes *phaC*, también cabe resaltar que se proporcionó condiciones semejantes para los cultivos bacterianos, se verifico las características microscópicas y macroscópicas de las cepas utilizadas y se manejaron las mismas condiciones de lisado bacteriano con el fin de obtener ADN template que permita la reproducibilidad de la técnica de PCR, las cuales fueron realizadas por triplicado obteniéndose resultados semejantes para cada ensayo, además algunos de los fragmentos obtenidos fueron enviados a secuenciar, obteniendo resultados no contemplados dentro de los objetivos que permitieron verificar las secuencias de genes *phaC* (ó la presencia del gen *phaC* en) de las bacterias de estudio.

7.4 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO PRODUCIDO POR BACTERIAS MARINAS HIDROCARBUROCLÁSTICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES

Con el propósito de cumplir con el último objetivo de esta investigación se escogió una cepa bacteriana representante de cada género que presentó colonias visibles después de 25 días de incubación en agar Brito (Brito *et al.*, 2006) modificado con n-octano. Se escogió cepas que presentaran las 3 clases de PHA sintasa detectadas en esta investigación. Las cepas corresponden a *Bacillus* sp. 329B, *Pseudomonas* sp. 333(1), *Haererehalobacter* sp. 338B, *Stenotrophomonas* sp. 371B, *Halomonas* sp. 405 y *Alcanivorax* sp. 337, con las que se llevaron a cabo los ensayos de fermentación batch con el fin de extraer PHAs y obtener un perfil cromatográfico que verifique la detección del polímero acumulado.

La Figura 30 muestra el montaje de una fermentación batch para las 6 cepas bacterianas, empleada porque es el sistema de cultivo más común por su funcionalidad a escala de laboratorio y se considera un sistema cerrado donde los nutrientes se agotan porque son consumidos por los microorganismos.

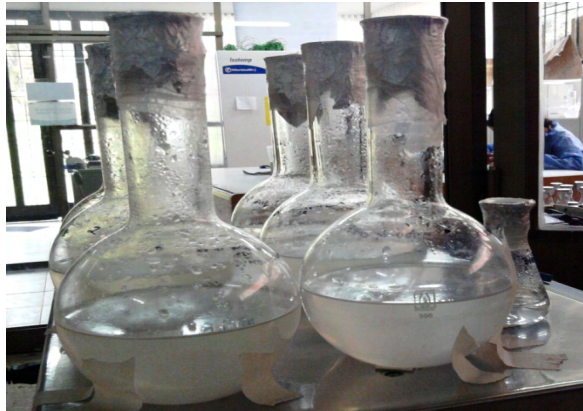


Figura 30. Ensayos de fermentación batch para la extracción de PHAs a partir de n-octano. (Fuente: esta investigación).

Se realizaron ensayos de extracción de PHAs en las 6 cepas bacterianas a los 20 días de cultivo, sin embargo, se obtuvieron resultados negativos, por esta razón la producción de PHAs se evaluó a los 30 días (720 h), 37 días (888 h) y 44 días (1056 h) de fermentación obteniéndose un precipitado blanco correspondiente al PHA (Figura 31).

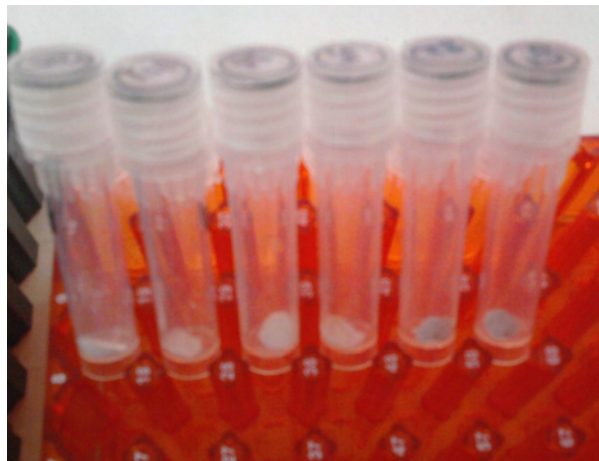


Figura 31. Productos ensayo de extracción de PHAs a partir de n-octano. De derecha a izquierda: *Bacillus* sp. 329B, *Pseudomonas* sp. 333(1), *Haererehalobacter* sp. 338B, *Stenotrophomonas* sp. 371B, *Halomonas* sp. 405, *Alcanivorax* sp. 337. (Fuente: esta investigación).

A las 720, 888 y 1056 horas de fermentación se registraron los datos de peso de biomasa celular y peso de PHAs (Tabla 11) que permitieron obtener información inicial de los ensayos de extracción.

Tabla 11. Formación de biomasa y producción de PHAs bajo fermentación batch para las cepas bacterianas.

Cepa bacteriana	Gen <i>phaC</i> amplificado	Clase de PHA sintasa	30 días (720 h) de fermentación		37 días (888 h) de fermentación		44 días (1056 h) de fermentación	
			Peso de Biomasa (g/L)	Peso de PHAs (g/L)	Peso de Biomasa (g/L)	Peso de PHAs (g/L)	Peso de Biomasa (g/L)	Peso de PHAs (g/L)
<i>Pseudomonas</i> sp. 333(1)	<i>phaC</i> II (E2-D/E2-R)	Clase II	1,16	0,06	2,80	0,16	1,16	0,10
<i>Bacillus</i> sp. 329B	<i>phaC</i> IV (Revelo, 2012)	Clase IV	1,2	0,06	1,80	0,13	0,86	0,03
<i>Halomonas</i> sp. 405	<i>phaC</i> I (E1-D/ E1-R)	Clase II	1,06	0,26	2,70	0,53	0,9	0,13
<i>Haererehalobacter</i> sp. 338B	<i>phaC</i> I y II (E1-D/ E1-R; E2-D/E2-R)	Clase II	0,93	0,03	0,90	0,06	1,3	0,06
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 371B	<i>phaC</i> (G-D/G-2R)	Clase I	0,9	0,1	1,76	0,16	0,76	0,06
<i>Alcanivorax</i> sp. 337	<i>phaC</i> I y II (E1-D/ E1-R; E2-D/E2-R)	Clase II	1,06	0,13	0,73	0,20	1,76	0,03

En esta investigación se determinó la biomasa entendida como peso seco celular de las 6 cepas bacterianas en los 3 muestreos durante el proceso de fermentación (Tabla 11), debido a que el polímero acumulado está relacionado con la biomasa (Khiyami *et al.*, 2011) y esta se utiliza para conocer el contenido de PHAs en las células.

Debido a que las muestras de PHAs obtenidas a partir de los 3 ensayos de extracción no presentaron diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Kruskal-Wallis, con un p (valor) superior a 0,05, se procedió a derivatizar las muestras obtenidas a las 888 horas de fermentación, donde se encontraron los pesos de PHA superiores, con el fin de obtener resultados parciales a cerca del polímero obtenido de cada uno de los 6 géneros bacterianos de este estudio. Después de 37 días (888 h) de fermentación se determinó que el peso de PHAs acumulado en las cepas bacterianas evaluadas estuvo entre los 0,06 y 0,53 g/L (Tabla 11). El porcentaje de PHAs contenidos en la biomasa obtenida en la fermentación estuvo entre 27,39 y 5,71% (Tabla 12).

Tabla 12. Porcentaje de PHAs acumulado en las cepas bacterianas hidrocarburi-clásticas en relación al tipo de gen *phaC* y a la afinidad por colorantes de lípidos neutros.

Cepa bacteriana	Gen <i>phaC</i> amplificado	Clase de PHA sintasa	Colorantes para lípidos neutros						Porcentaje de PHA contenido (%)
			rojo Nilo			sudan negro			
			24h	48h	72h	24h	48h	72h	
<i>Pseudomonas</i> sp. 333(1)	<i>phaC</i> II (E2-D/E2-R)	Clase II	-	-	-	+	+	-	5,71
<i>Bacillus</i> sp. 329B	<i>phaC</i> (Revelo, 2012)	Clase IV	+	-	-	-	+	-	7,22
<i>Halomonas</i> sp. 405	<i>phaC</i> I (E1-D/ E1-R)	Clase II	-	+	+	-	-	+	19,6
<i>Haererehalobacter</i> sp. 338B	<i>phaC</i> I y II (E1-D/ E1-R; E2-D/E2-R)	Clase II	-	+	-	-	-	-	6,66
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 371B	<i>phaC</i> (G-D/G-2R)	Clase I	+	+	-	+	+	-	9,9
<i>Alcanivorax</i> sp. 337	<i>phaC</i> I y II (E1-D/ E1-R; E2-D/E2-R)	Clase II	-		+	-	-	-	27,39

En general los pesos de biomasa y PHAs obtenidos son relativamente bajos respecto a los reportados por estudios donde se emplean fuentes de carbono diferentes a hidrocarburos, como es el caso de los estudios realizados en la Universidad de Nariño, los cuales informaron la acumulación promedio de 0,31 g/L de PHAs (Fernández *et al.*, 2005) y 2 g/L de PHAs (Otero y Fernández, 2011) y otras investigaciones en Cuba, Brasil y la India, donde se reporta el PHA contenido en biomasa hasta un 27,48% (Franco *et al.*, 2009) un 68% (Dantas, 2005) y un 32,07% (TajAl-Deen *et al.*, 2010). Se presenta una situación similar cuando se comparan los resultados obtenidos de PHAs con algunos estudios donde se demuestra que la cantidad de PHAs acumulados a partir de fuentes de carbono como hidrocarburos son de 0,018 g/L en una cepa silvestre de *Alcanivorax borkumensis* SK2 cultivada en octadecano (Sabirova *et al.*, 2006b), porcentajes de 28,3% en *Pseudomonas oleovorans* cuando crece en alcanos de 6 a 12 carbonos (Lageveen *et al.*, 1988) y 58,9% en *Pseudomonas fulva* TY16 cultivada con tolueno (Ni *et al.*, 2010).

A pesar de que no se ha evaluado la acumulación de PHAs en bacterias pertenecientes a los géneros *Stenotrophomonas*, *Halomonas* y *Haererehalobacter*, a partir de n-octano en investigaciones previas, los resultados obtenidos en este estudio demuestran la producción de polímero por las bacterias de estos géneros el cual podría ser caracterizado y relacionarlo con el tipo de gen *phaC* presente en bacterias hidrocarburoclásticas marinas.

La obtención de PHAs en los 6 géneros bacterianos estuvo determinada por algunas condiciones de fermentación como el desbalance de nutrientes y el tiempo de cultivo, en cuanto a los nutrientes el medio de cultivo estuvo limitado por la concentración de compuestos nitrogenados en la composición básica de sales [HN_4Cl_2 (0,27 g/L), K_2HPO_4 (0,25 g/L)] del medio Brito modificado (Brito *et al.*, 2006) y el exceso en la fuente de carbono determinada por el hidrocarburo alifático n-octano suministrado al 1%, proporcionando un desbalance con $8,42 \text{ g L}^{-1}$ de carbono y $0,0042 \text{ g L}^{-1}$ de nitrógeno. El sustrato utilizado como única fuente de carbono en el medio de cultivo fue el alcano alifático n-octano, constituido como uno de los más abundantes en ecosistemas marinos contaminados por petróleo y está relacionado con la biosíntesis de PHA (Mobley, 1994).

A las 720 horas de fermentación se logró extraer PHAs en las cepas bacterianas analizadas, se mantuvo la fermentación durante este tiempo debido a que se realizaron ensayos de extracción previos sin obtener polímero. Es importante tener en cuenta que se logró la extracción satisfactoria de PHAs a partir de las muestras bacterianas empleando en el protocolo descrito por Fernández y colaboradores (2006), el cual se considera un método sensible y está fundamentado en varios procesos conocidos para recuperar PHAs a partir de los sistemas biológicos o biomasa bacteriana, además su utilidad ha sido comprobada en varios estudios realizados en la Universidad de Nariño como los de Fernández y colaboradores (2005), Fernández y colaboradores (2006), Bravo y Fernández (2005) y Otero y Fernández, (2011), y sus bases teóricas son semejantes a otros protocolos donde se han extraído satisfactoriamente PHAs a partir de bacterias como los de Franco y colaboradores (2009) y Cholula, (2005).

Mediante la metodología de cromatografía de gases se pudo obtener los perfiles cromatográficos del polímero extraído de 6 cepas bacterianas (Anexo F). En el perfil cromatográfico del extracto de la cepa bacteriana *Alcanivorax* sp. 337, fue posible identificar un pico que corresponde al mismo tiempo de retención de la muestra analizada posteriormente mediante GC-MS bajo las mismas condiciones.

Teniendo en cuenta la clase de PHA sintasa que presentaron las bacterias *Stenotrophomonas* sp. 371B y *Bacillus* sp. 329B (PHA sintasa clase I y IV respectivamente) y el sustrato suministrado en el proceso de fermentación se esperaba la acumulación de polímeros de cadena corta, especialmente para *Stenotrophomonas* sp. 371B por que para bacterias de este género ha sido reportada recientemente su acumulación (Singh y Parmar, 2011), sin embargo para *Bacillus* sp. 329B podría esperarse además la acumulación de copolímeros como se ha informado para algunas representantes este género (Tajima *et al.*, 2003; Valappil *et al.*, 2007).

Para las cepas que presentaron la PHA sintasa clase II, (*Pseudomonas* sp. 333(1), *Haererehalobacter* sp. 338B, y *Halomonas* sp. 405 no se logró caracterizar el compuesto acumulado. Sin embargo en *Alcanivorax* sp. 337, se obtuvo un heterodímero de 6 carbonos en cada bloque monomérico.

Caracterización de PHA producido por *Alcanivorax* sp. 337 mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se escogió la cepa bacteriana *Alcanivorax* sp. 337 caracterizada en esta investigación, debido a que es una novedosa bacteria hidrocarburoclástica obligada que utiliza frecuentemente alcanos como sustrato para su metabolismo de carbono, reportado como productora mcl-PHAs a partir de octadecano (Saviroba *et al.*, 2006b). Mediante el análisis de la muestra de PHAs obtenido de la cepa *Alcanivorax* sp. 337 por GC-MS, se identificó en el tiempo de retención (Tr)= 14,23 min (Figura 32) el compuesto 1,6- Dimetilhexanodioato de cantidad relativa (13,94%) (Figura 33).

RT: 3.17 - 16.02

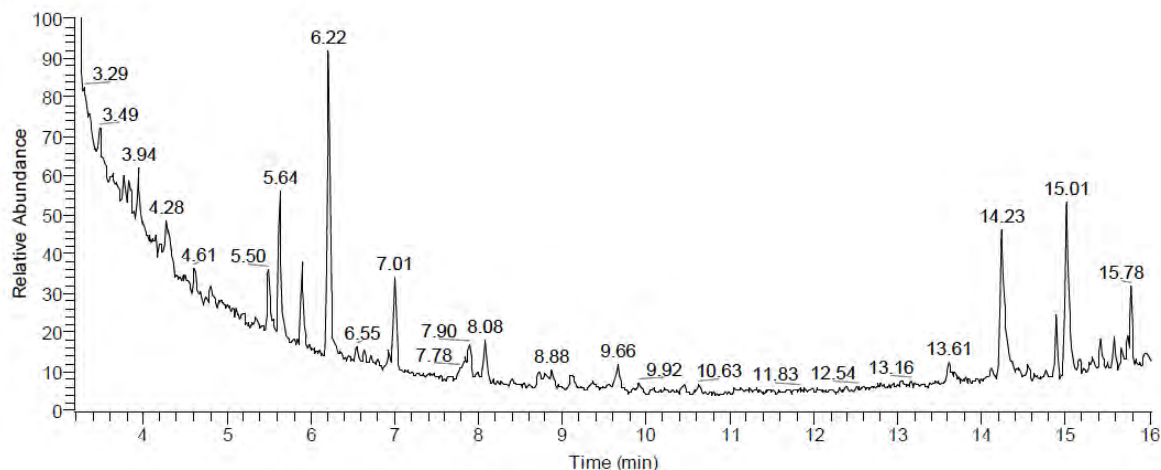


Figura 32. Perfil cromatográfico de la cepa *Alcanivorax* sp. 337. Columna RTX-5(30 m) *Split* 1:30. MSD (EI, 70 eV)

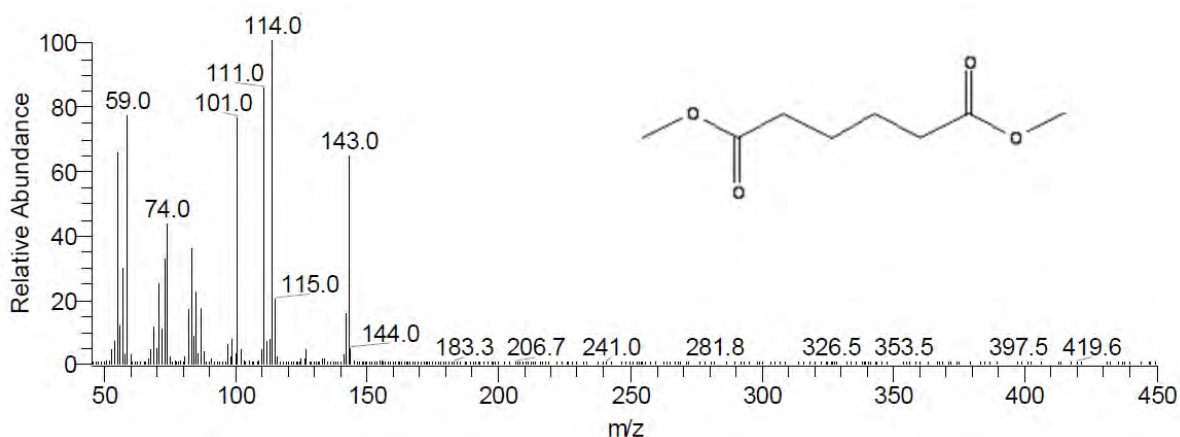


Figura 33. Espectro de masas correspondiente al compuesto 1,6- Dimetilhexanodioato detectado en el extracto de *Alcanivorax* sp. 337.

El compuesto caracterizado de la cepa *Alcanivorax* sp. 337 (Figura 33), correspondiente a 1,6- Dimetilhexanodioato también llamado dimetil adipato, ácido hexanodioico o comúnmente ácido adípico, es un éster de ácido dicarboxílico de cadena lineal de 6 carbonos, cristalino, blanco, ligeramente soluble en agua y soluble en alcohol y acetona (Davis y Kemp, 1991). Casi todo el ácido adípico comercial se produce a partir de ciclohexano en procesos químicos secuenciales de oxidación, que se utiliza en una variedad de aplicaciones directas e indirectas; el consumo de ácido adípico lo vincula como un monómero en casi el 90% de la producción de nylon por la policondensación con hexametildiamina, esto se procesa posteriormente en fibras para aplicaciones en alfombras, cuerdas de neumáticos de automóvil y ropa. El ácido adípico se utiliza en la fabricación de plastificantes y componentes lubricantes, además el monómero es utilizado en la producción de poliuretano y sus ésteres son plastificadores, especialmente en los PVC (Castellan *et al.*, 1991).

La síntesis de ácido adípico ha sido reportada generalmente por vía química a partir de benceno, sin embargo se conocen rutas biotecnológicas capaces de generarlo tales como: i) biosíntesis de ácido cis, cis-mucónico a partir de glucosa por fermentación, seguido de su hidrogenación catalítica a ácido adípico, ii) conversión enzimática del ciclohexanol a ácido adípico y iii) conversión enzimática de adiponitrilo a adipato amónico.

El compuesto 1,6- Dimetilhexanodioato (ácido adípico) ha sido reportado como un precursor de PHAs y está integrado a la ruta metabólica VIII de producción de PHAs descrita por Chen. (2010), ver Figura 4, donde a partir de un ciclohexanol se produce el ácido hexanodioico (ácido adípico) para finalmente obtener el 6-hidroxihexanoato por medio de 6 enzimas descritas (Figura 4, Tabla 2). Además Kunz y Weimer, (1983) reportan que el ácido adípico esta integrado a la formación y metabolismo bacteriano de 6-hidroxihexanoato. El 6-hidroxihexanoato es un mcl-PHA reportado en varias investigaciones (Kunz y Weimer, 1983; Abe *et al.*, 1994; Abe *et al.*, 1995; Łabuzek y Radecka, 2001; Tajima *et al.*, 2003), también ha sido reportado el 3-hidroxihexanoato en estudios como los de Preusting y colaboradores (1990) y Durner y colaboradores (2000) y en investigaciones donde hace parte de copolímeros ampliamente evaluados con propiedades novedosas (Rai *et al.*, 2011).

En esta investigación se diseñó una posible ruta metabólica (Figura 34) bajo el supuesto de que el n-octano fue degradado por las bacterias mediante enzimas como las monooxigenasas obteniéndose el hexanol. El soporte teórico de esta propuesta es la ruta metabólica de degradación de alcanos diseñada por Widdel y Rabus, (2001). Hipotetizando que esta ruta se presente en *Alcanivorax* sp. 337 aislado en este estudio, podría haber una transformación del hexanol a ciclohexanol (parte no definida) el cual ingresa a la ruta anteriormente descrita por Chen, (2010).

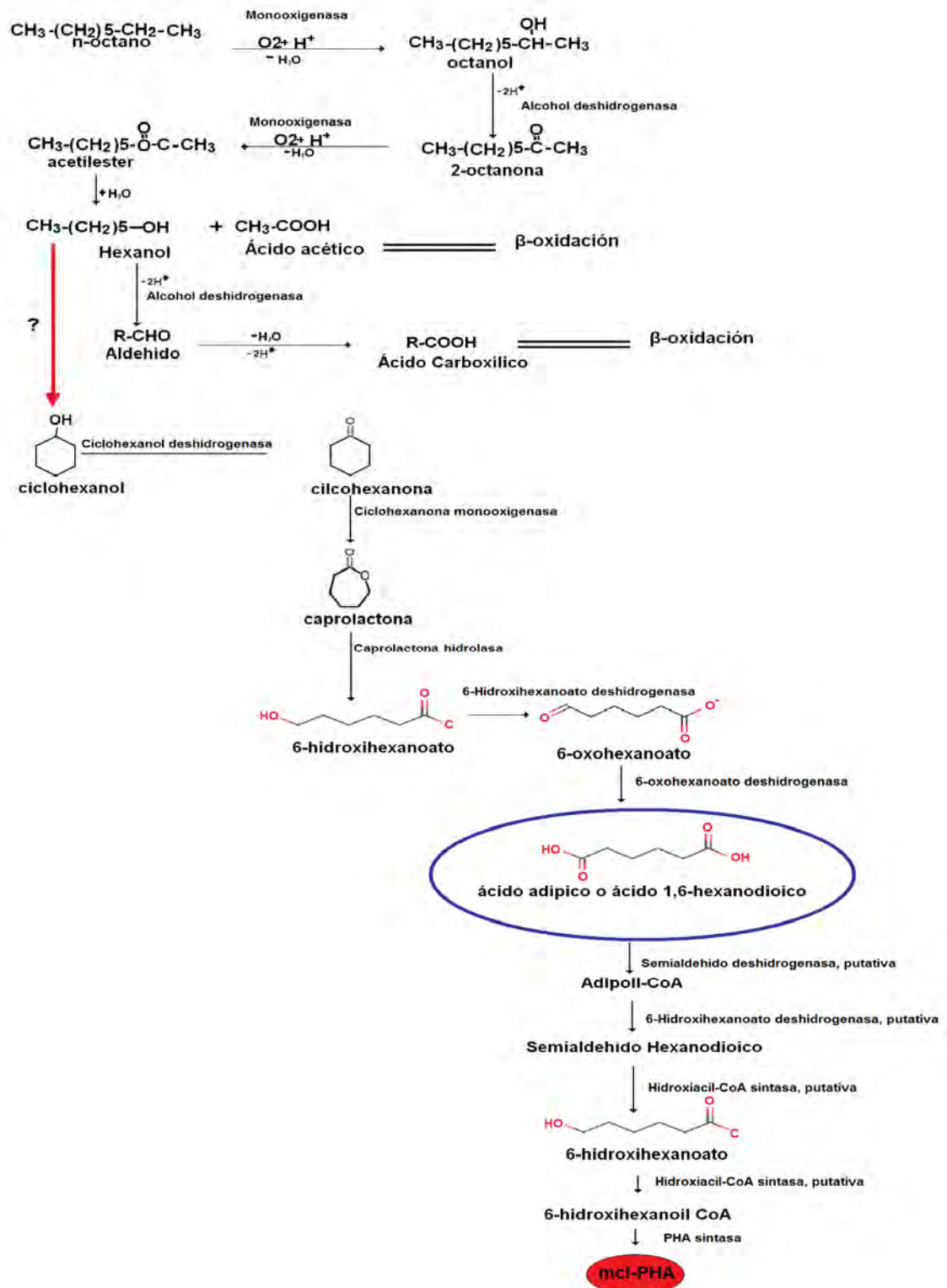


Figura 34. Ruta metabólica hipotética de degradación n-octano para producir mcl-PHAs por *Alcanivorax* sp. 337.

La cepa *Alcanivorax* sp 337 en nuestra investigación degradó el n-octano. La degradación de n-octano se ha estudiado en otras especies del género *Alcanivorax*, por ejemplo, Baik, (2010) obtuvo el gen *P450* de monooxigenasa de *A. borkumensis* SK2 expresado con éxito en *E. coli* para hidroxilar el átomo de carbono terminal de n-octano y producir n-octanol; Sabirova, (2006) reportó los genes *ABO_2707* (AlkB1 alcano monooxigenasa), *ABO_2708* (AlkG rubredoxina), *ABO_2709* (AlkH aldehído deshidrogenasa y *ABO_2710* (alcohol deshidrogenasa AlkJ) implicados en la degradación de alcanos lineales y reveló un operón putativo de genes que codifican proteínas presumiblemente envueltas en el metabolismo de cicloalcanos (ciclohexanol) tales como, la caprolactona hidrolasa (*ABO_0191*), ciclohexanona monooxigenasa (*ABO_0190*), deshidrogenasa ciclohexanol (*ABO_0189*); estas últimas median el metabolismo del ciclohexano partiendo de ciclohexanol para finalmente obtener ácido 6-hidroxihexanoico (6-hidroxihexanoato). Los anteriores genes podrían estar involucrados en la ruta descrita por Chen, (2010). Con base a esto estos argumentos se podría confirmar en posteriores investigaciones que alguno de estos genes pueden codificar las enzimas que hacen parte de la ruta metabólica hipotética esquematizada en esta investigación (Figura 34).

En esta investigación se demostró la obtención del compuesto 1,6- Dimetilhexanodioato (ácido adípico) este compuesto fue detectado en su forma natural como un ácido dicarboxílico, a partir de esto se pueden manejar varias hipótesis para explicar la obtención del compuesto: la bacteria produjo 6-hidroxihexanoato y se transformó en ácido adípico el cual nuevamente se convierte en un precursor para formar monómeros de mcl-PHAs como se describe en la ruta metabólica de Chen, (2010), además se podría pensar que tanto el ácido adípico como el 6-hidroxihexanoato pudieron estar presentes en la muestra, sin embargo, el 6-hidroxihexanoato no pudo ser detectado debido a su baja concentración, situación que podría ser confirmada en posteriores investigaciones. Se recomiendan estudios como espectrofotometría infrarroja (FTIR) para la determinación de posibles enlaces ésteres que en este caso permitirían verificar la presencia de PHAs.

En esta investigación en *Alcanivorax* sp. 337 se logró detectar ácido adípico, este compuesto ha sido propuesto como un componente de copolímeros novedosos como lo reportaron Hirt y colaboradores (1996) quienes analizaron la síntesis y caracterización de un novedoso copolímero en bloque de copoliesteruretanos el cual contiene hidroxi poli [(R)-3-hidroxi butirato-(R)-3-hidroxi valerato]] como el segmento duro (fragmento de cadena cristalizable) y poli (ε-caprolactona) o poli [(ácido adípico)-alt-(1,4-butanodiol, dietilenglicol; etilenglicol)] como el segmento blando (fracción biodegradable).

Se comprobó que *Alcanivorax* sp. 337 tiene los genes implicados en la biosíntesis de PHA sintasa clase II y que produce ácido adípico a partir de la degradación de n-octano, según la literatura el ácido adípico es un precursor del 6-hidroxihexanoato, un tipo de mcl-PHA. Esto nos permitió evaluar el potencial para la producción de PHAs en relación al tipo de gen *phaC* en bacterias marinas hidrocarburoclásticas. Este resultado es relevante principalmente porque existen pocos estudios de la síntesis de PHAs en especies del género *Alcanivorax*.

Con base en los anteriores argumentos se puede inferir que el polímero acumulado por *Alcanivorax* sp. 337 es del tipo mcl-PHA. Es importante destacar que los mcl-PHAs y sus copolímeros son estructuralmente más diversos que los scl-PHAs y pueden ser clasificados en, saturados, insaturados, con grupos reactivos halogenados, con cadenas laterales aromáticas y con monómeros ramificados. La presencia de grupos funcionales tales como halógenos, carboxilo, epoxi, hidroxilo, fenoxi, cianofenoxi y nitrofenoxi, son particularmente importantes en los mcl-PHAs ya que permiten modificaciones químicas que conducen a la producción de nuevos biomateriales con propiedades variables y flexibles para aplicaciones biomédicas (Rai *et al.*, 2011).

Con base en el compuesto obtenido y relacionando este resultado con la PHA sintasa clase II presente en *Alcanivorax* sp. 337 se puede concluir que las cepas *Halomonas* sp. 405, *Haererehalobacter* sp. 338B y *Pseudomonas* sp. 333(1), las cuales presentaron la misma clase de PHA sintasa tienen el potencial para la acumulación de mcl-PHAs en presencia de n-octano.

CONCLUSIONES

El microcosmos desarrollado en BFAs proporcionó las condiciones necesarias para el aislamiento de bacterias marinas hidrocarburoclásticas.

A partir de 53 aislamientos bacterianos iniciales, 18 fueron identificados mediante secuenciación del gen 16S rRNA en cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Halomonas*, *Alcanivorax* y *Haererehalobacter*.

Se determinó que las 18 cepas bacterianas fueron *phaC* positivas, las bacterias pertenecientes a los géneros *Alcanivorax*, *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Haererehalobacter*, presentan PHA sintasas clase II; las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* presentan PHA sintasa clase IV y *Stenotrophomonas sp.* 371B. presenta la PHA sintasa clase I.

Se identificó la cepas *Haererehalobacter sp.* 338B y *Haererehalobacter sp.* 396 como PHA +, se reportan por primera vez como bacterias hidrocarburoclásticas productoras de PHA, las cuales también fueron positivas para las pruebas colorimétricas sudan negro y rojo Nilo.

Alcanivorax sp. 337, *Halomonas sp.* 405, *Pseudomonas sp.* 333(1), *Bacillus sp.* 329B, *Stenotrophomonas sp.* 371B y *Haererehalobacter sp.* 338B, representantes de cada género y clases de PHA sintasas, acumularon PHAs a partir de n-octano.

Alcanivorax sp. 337 con PHA sintasa clase II, sintetizó el compuesto 1,6-Dimetilhexanodiato como precursor de 6-hidroxihexanoato, el cual es un mcl-PHA.

Se logró evaluar la relación entre el tipo de gen *phaC* y el potencial para la producción de PHAs en la cepa identificada como *Alcanivorax sp.* 337 la cual posee la PHA sintasa clase II y produjo un novedoso precursor (ácido adipico) de PHAs de cadena media a partir de n-octano.

La producción de ácido adipico como un compuesto precursor para la síntesis de un mcl-PHA posiblemente 6-hidroxihexanoato a partir de n-octano, es un resultado novedoso pues la capacidad para la producción de PHAs de cepas bacterianas pertenecientes a este género no ha sido evaluada a partir de este hidrocarburo específico.

Esta investigación es el primer estudio en Colombia que brinda nuevos conocimientos sobre genes *phaC* en bacterias marinas hidrocarburoclásticas.

APORTES

En esta investigación se diseñaron BFAs que fueron usados para simular un microcosmos que permitió el desarrollo y crecimiento de una comunidad bacteriana degradadora de petróleo.

Se logró aislar y preservar 18 cepas bacterianas marinas viables catalogadas con el ecotipo hidrocarburoclásticas y productoras de polihidroxicanoatos a partir de n-octano, provenientes de la bahía de Tumaco – Nariño.

Se aportó en el conocimiento de la diversidad de bacterias marinas hidrocarburoclásticas provenientes de microcosmos usando agua marina de la bahía de Tumaco-Nariño como inóculo. Se identificaron cepas pertenecientes a los géneros, *Alcanivorax*, *Bacillus*, *Haererehalobacter*, *Halomonas*, *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*.

Se reporta por primera vez cepas del género *Haererehalobacter* en la costa Pacífica Colombiana que tienen la capacidad para degradar hidrocarburos derivados del petróleo y producir PHAs. Esto podría constituir un reporte importante a nivel mundial debido a los escasos estudios informados en la literatura sobre este género y estas propiedades metabólicas.

Se logró detectar el polímero producido por 6 cepas bacterianas de diferentes géneros lo cual aportó información acerca de la capacidad de estas bacterias para producir polímero a partir de n-octano.

Se remitieron al GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 18 secuencias correspondientes al gen 16S rRNA, 5 secuencias del gen *phaC* detectado con primers generales y 10 secuencias del gen *phaC* diferenciado con primers específicos.

Se aportó al grupo de investigación en Biotecnología Microbiana, los elementos teórico prácticos que permiten la aplicación de PCR con diferentes juegos de primers al estudio de los genes *phaC* y la caracterización parcial hasta el nivel de género de bacterias procedentes de muestras ambientales.

El ácido adípico detectado en la muestra de *Alcanivorax* sp. 337 indica un aporte importante debido a que ha sido producido por un sistema biológico que junto con la profundización de su ruta metabólica y la evaluación de su síntesis a partir de sustratos económicos podría proponer una ruta biotecnológica costo-efectiva para la producción a gran escala de este compuesto de importancia industrial.

Se determinó el potencial de *Alcanivorax* sp. 337 como bacteria marina hidrocarburoclástica que acumula PHAs en relación al tipo de gen *phaC*. Este aporte fue significativo teniendo en cuenta los escasos estudios llevados a cabo en Colombia respecto al tema.

PERSPECTIVAS

Realizar cinéticas de crecimiento con los cultivos obtenidos en los microcosmos BFAs, así como estudiar la diversidad total de bacterias marinas hidrocarburoclásticas cultivables y no cultivables procedentes de la bahía de Tumaco-Nariño, en relación a los procesos de biodegradación de hidrocarburos, mediante DGGE y qPCR vs CFUs de las comunidades presentes en el sistema.

Es recomendable evaluar la extracción de PHAs en una cinética de crecimiento de la bacteria *Alcanivorax* sp. 337, con el fin de que estas muestras sean caracterizadas para verificar el tiempo exacto de producción de 6-hidroxihexanoato como el posible mcl-PHA acumulado por la cepa.

Evaluar los rendimientos de producción de PHAs y la eficiencia de inóculos mixtos para la biorremediación de aguas contaminadas de la costa Pacífica Colombiana, teniendo en cuenta que se determinó la presencia de bacterias hidrocarburoclásticas y posibles productoras de biosurfactantes.

Realizar un análisis que permita determinar las sinergías confirmando la importancia de cultivos mixtos para la degradación y uso de hidrocarburos en el ciclaje del carbono. Con este fin llevar a cabo una re-identificación taxonómica de las cepas bacterianas más representativas en esta investigación que podrían ser tenidas en cuenta para futuros estudios en este tópico.

Proponer estudios metabólicos para las cepas *Haererehalobacter* sp. 338B y *Haererehalobacter* sp. 396 con el fin de determinar su implicación en los procesos de bioremediación de petróleo y producción de PHAs

Adelantar estudios de mutagénesis sobre el gen “*TesB-Like*” para la producción extracelular de PHAs en las bacterias del género *Alcanivorax*, tal como fue demostrado en los estudios de Saviroba y colaboradores (2006b), quienes trabajaron con una bacteria perteneciente a este género.

Estandarizar técnicas para la preservación de bacterias marinas con capacidad de degradar hidrocarburos y producir PHAs previendo la reducción de efectos adversos en el proceso y que conlleven a la pérdida de aislamientos bacterianos potenciales, teniendo en cuenta que corresponden a aislamientos ambientales y que además poseen características metabólicas específicas.

Proponer estudios de biorremediación ex - situ dentro del grupo de investigación en Biotecnología Microbiana con el fin de continuar con el análisis de viabilidad de las 18 cepas bacterianas entregadas teniendo en cuenta que representan un recurso genético y biotecnológico.

Complementar la caracterización molecular y metabólica del polímero producido por aquellos aislamientos bacterianos sobre los cuales se diferenciaron los tipos de gen *phaC*,

esto podría proporcionar información precisa para concluir sobre la versatilidad de la enzima PHA sintasa.

Realizar estudios complementarios de la cepa bacteriana *Alcanivorax* sp. 337 para confirmar la ruta metabólica hipotetizada.

Proponer estudios de marcaje enzimático para la determinación de la ruta metabólica específica en la cual el n-octano es degradado y utilizado como fuente de carbono para la producción de ácido adípico detectado en *Alcanivorax* sp. 337 y su transformación a mcl-PHAs.

Dirigir la producción de PHAs con base en el tipo de gen PHA sintasa y la identificación por 16S rRNA e incluir la utilización de sustratos alternativos de fuentes de carbono como agua marina y aguas contaminadas con hidrocarburos derivados del petróleo de la costa Pacífica Colombiana con el fin de disminuir costos de producción.

Las bacterias marinas caracterizadas parcialmente hasta género y en su tipo de operón de biosíntesis de PHAs clase II pueden ser objeto de futuras investigaciones en cuanto a la obtención PHAs, teniendo en cuenta que la PHA sintasa clase II, es una enzima de interés, debido a su preferencia por sustratos de cadena media que permiten la polimerización de mcl-PHAs los cuales contienen una variedad de monómeros y tienen características versátiles; además adicionalmente son bacterias marinas para las cuáles es importante establecer a futuro otras características tales como la halofilia, la pareja donador/aceptor de electrones, saturación de O₂, saturación de metales y formación de otros carboxosomas.

Realizar estudios sobre optimización de la producción de PHAs a partir de hidrocarburos en las cepas bacterianas obtenidas en este estudio, con el fin de determinar sus rendimientos de producción de PHAs y degradación de hidrocarburos y para establecer su potencial y aplicaciones a escala industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe H, Doi H, Kumagai Y. 1994. Synthesis and Characterization of Poly[(R,S)-3-hydroxybutyrate-b-6-hydroxyhexanoate] as a Compatibilizer for a Biodegradable Blend of Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] and Poly(6-hydroxyhexanoate). *Macromolecules.*, 27:6012–6017.
- Abe H, Doi Y, Aoki H, Akehata T, Hori Y, Yamaguchi A (1995) Physical properties and enzymatic degradability of copolymers of (R)-3-hydroxybutyric and 6-hydroxyhexanoic acids. *Macromolecules.*, 28:7630–763.
- Abedi D, Najafabadi A J, Sadeghi H M, Vallian S. 2007. Cloning and partial sequencing of *phac2* genes encoding poly (3-hydroxyalkanoate) synthases from *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310. *Biotechnology.*, 6:479-504.
- Abyar H, Mojodi A, Safahieh A, Zolgharnein H, Zamani I. 2011. The Role of *Pseudomonas putida* in bioremediation of naphthalene and copper. *World J. Fish & Marine Sci.*, 3:444-449.
- Acinas S G, Marcelino L A, Klepac-Ceraj V, Polz M F. 2004. Divergence and redundancy of 16s rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J. Bacteriol.*, 186:2629–2635.
- Aldor LI S y Keasling J D. 2003. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 14:475-483.
- Almeida A, Ruiz J A, López N I, Pettinari J. 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Rev. Quím. Viva.*, 3:122-133.
- Alonso J M y López A. 2002. Informe preliminar del impacto del vertido del Petrolero “prestige” en tortugas y mamíferos marinos de las aguas Gallegas. Vigo, España. *Coordinadora para o Estudio dos Mamíferos Mariños CEMMA - Sociedad Española de Cetáceos SEC.*
- Al-Saleh E, Drobiowa H, Obuekwe C. 2009. Predominant culturable crude oil-degrading bacteria in the coast of Kuwait. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 63:400-406.
- Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.*, 25:3389-3402.
- Alvarez H M, Kalscheuer R, Steinbüchel A. 1997. Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effects of inhibitors and polyethylene glycol. *Lipid/Fett.*, 99:239-246.
- Amann R I; Ludwig W, Schleifer K H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59:143–169.

Anderson A J, Dawes E A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, 54:450-472.

Antonio R V, Steinbüchel A, Rehm B H A. 2000. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 182:111-117.

Arun A, Arthi R, Shanmugabalaji V, Eyini M. 2009. Microbial production of polyhydroxybutyrate by marine microbes isolated from various marine environments. *Bioresource. Technol.*, 100:2320-2323.

Atlas R M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.*, 45:180-209.

Atlas R y Bartha R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Cuarta edición. Editorial Pearson Educación, SA. Madrid. 677 p. ISBN: 8478290397.

Baik S-H. 2010. Biotransformation of medium-chain alkanes using recombinant P450 monooxygenase from *Alcanivorax borkumensis* SK2 expressed in *Escherichia coli*. *Korean. J. Chem. Eng.*, 27:905-909.

Bartha R. 1977. The microbiology of aquatic oil spills. *Adv Appl Microbiol.*, 22:225–266.

Baumann P, Baumann L, Mandel M. 1971. Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckeia*. *J. Bacteriol.*, 107:268–294.

Benavides J, Quintero G, Guevara A L, Jaimes D C, Gutierrez S M, Miranda J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.*, 4:82-90.

Boonchan S, Britz M L, Stanley G A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:31007–1019.

Bordenave S, Goñi-Urriza M S, Caumette P, and Duran R. 2007. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:6089–6097.

Boyandin A N, Kalacheva G S, Rodicheva E K, Volova T G. 2008. Synthesis of reserve polyhydroxyalkanoates by luminescent bacteria. *Microbiology.*, 77:318-323.

Bracho M, Díaz L, Soto L M. 2004. Degradación de hidrocarburos aromáticos por bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo en el estado Zulia, Venezuela. *Bol. Centro Invest. Biol.*, 38:175-185.

Bracho M, Querales L, Aiello C, Soto L M. 2007. Metabolism of the dibenzothiophene by *Pseudomonas stutzeri* PLC 16. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia.*, 30:58-62.

Braibant C. 2004. Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter sp.* y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. *Requisito parcial para optar al grado de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología*. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.

Braunegg G, Lefebvre G, Genser K F. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiologican and engineering aspects. *J. Biotechnol.*, 65:127-161.

Bravo D y Fernandez P. 2005. Síntesis de polihidroxiálcanoatos en la asociación simbiótica *lupinus cauquensis-Bradyrhizobium sp.* en el páramo de Telpis, Nariño. Colombia. *Rev. Asoc. Col. Cienc. Biol.* ISBN: 01204173.

Brito E M, Guyoneaud R, Goñi-Urriza M, Ranchou-Peyruse A, Verbaere A, Crapez M A C, Wasserman J C, Duran R. 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res. Microbiol.*, 157:752-762.

Cabranes Y, Nuñez R R, Martinez J, Ortiz E. 2006. Bacterias del Género *Bacillus* degradadoras de n- hexadecano aisladas del sedimento marino: parámetros cinéticos. *Rev. Invest. Mar.*, 27:183-189.

Cai L, Tan D, Aibaidula G, Dong X-R, Chen J-C, Tian W-D, Chen G-Q. 2011. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas sp.* TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microb. Cell. Fact.*, 10:88.

Calvo C, Martinez-Checa F, Toledo F L, Porcel J, Quesada E. 2002. Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60:347–351.

Canals M V. 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica química y ecotoxicológica. *Programa de doctorado Microbiología Ambiental y Biotecnología*. Universidad de Barcelona. Barcelona.

Cappello S, Caruso G, Zampino D, Monticelli L S, Maimone G, Denaro R, Tripodo B, Troussellier M, Yakimov M, Giuliano L. 2007. Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *J. Appl. Microbiol.*, 102:184–19.

Casanova R F, Castellón-Castrillón E D, Zambrano M M. 2006. Evaluación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos superficiales de los esteros El Pajal y Cándamo de la bahía de Tumaco. *Bol. Cient. CCCP.*, 13:85-96.

Casanova R F, Timaran P H, Betancourt J M. 1998. Evaluación de los niveles de hidrocarburos aromáticos en la ensenada de Tumáco. *Bol. Cient. CCCP.*, 7:78-82.

CCCP (Centro Control Contaminación del Pacífico), [12 Mayo, 2012], en la web: <http://www.cccp.org.co/>

Cerrone F. 2011. Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde Alpeorujó por medio de bacterias fijadoras de Nitrógeno. *Tesis doctoral, Universidad de Granada. España.*

Cetina A, Matos A, Garma G, Barba H, Vázquez R, Zepeda-Rodríguez A, Jay D, Monteón V, López-A R. 2010. Actividad antimicrobiana de bacterias marinas aisladas del golfo de México. *Rev. Peru. biol.*, 17:231-236.

Chaillan F, Flèche A L, Bury E, Phantavong Y-H, Grimont P, Saliot A, Oudot J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res. Microbiol.*, 155:587–595.

Chen G.-Q. 2010. Plastics completely synthesized by bacteria: Polyhydroxyalkanoates. *plastics from bacteria: natural functions and applications. Microbiol. Monograph.*, 14:17-37

Chen J-Y, Liu T, Zheng Z, Chen J-C, Chen G-Q. 2004. Polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas stutzeri* 1317 had different substrate specificities. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 234:231–237.

Chien C-C, Chen C-C, Choi M-H, Kung S-S, Wei Y-H. 2007. Production of poly- β hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *J. Biotechnol.*, 132:259-263.

Chikere C B, Okpokwasil G C, Ichiakor O. 2009. Characterization of hydrocarbon utilizing bacteria in tropical marine sediments. *Afr. J. Biotechnol.*, 8:2541-2544.

Cholula L P. 2005. Estudio de la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense* Sp7. *Tesis para obtener el grado de maestro en Ciencias en Biotecnología Genómica.* Reynosa. México.

Cole J R, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, Farris R J, Kulam- Syed- Mohideen AS, McGarrell D M, Marsh T, Garrity G M, Tiedje J M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic. Acids. Res.*, 37:141–145.

Colwell R K. 2009. Estimates, Version 8.2: Statistical Estimation of Species Richness and Shared Species from Samples (Software and User's Guide). Freeware for Windows and Mac OS.

Crossman L C, Gould V C, Dow J M, Vernikos G S, Okazaki A, Sebahia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, et al. 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome. Biol.*, 9:4-74.

Cutz F y Redón J. 2007. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's). *JAINA. Bol. Informativ.*, 16:1-5.

Cybulski Z, Dziurla E, Kaczorek E, Olszanowski A. 2003. The Influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by Pseudomonadacea and Bacillacea strains. *Spill. Sci. Technol. B.*, 8:503–507.

Dai Y, Lambert L, Yuan Z, Keller J. 2008. Characterisation of polyhydroxyalkanoate copolymers with controllable four-monomer composition. *J. Biotechnol.*, 134:137–145.

Dalal J, Sarma P M, Lavania M, Mandal A K, Lal B. 2010. Evaluation of bacterial strains isolated from oil-contaminated soil for production of polyhydroxyalkanoic acids (PHA). *Pedobiologia.*, 54:25-30.

Dantas A. 2005. Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido. *Tese apresentada dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em ciências em engenharia química*. Universidade Federal Do Rio De Janeiro. Brasil.

Das K y Mukherjee A K. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource. Technol.*, 98:1339–1345.

Davis D D y Kemp D R. 1991. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. 4th ed. 1. Wiley, New York. 22,950 p. ISBN: 9780471238966.

De Lima T C S, Grisi B M, Bonato M C M. 1999, Bacteria isolated from a sugarcane agroecosystem: their potential production of polyhydroxyalkanoates and resistance to antibiotics. *Rev. Microbiol.*, 30:214-224.

Dejonghe W, Berteloot E, Goris J, Boon N, Crul K, Maertens S, Hofte M, De Vos P, Verstraete W, Top E M. 2003. Synergistic degradation of linuron by bacterial consortium and isolation of a single linuron – degrading *Variovorax* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:1532-1541.

Doggett N A, Smith C L, Cantor C R. 1992. The effect of DNA concentration on mobility in pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic. Acids. Res.*, 20:859-864.

Don R, Cox P, Wainwright B, Baker K, Mattick J. 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic. Acids. Res.*, 19: 4008.

Dorigo U, Volatier L, Humbert J-F. 2005. Review, molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water. Res.*, 39:2207–2218.

Du G, Si Y, Yu J. 2001. Inhibitory effect of medium-chain-length fatty acid on synthesis of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acid by *Ralstonia eutrophus*. *Biotechnol. Lett.*, 23:1613-1617.

Durner R, Zinn M, Witholt B, Egli T. 2001. Accumulation of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during growth in batch and chemostat culture with different carbon sources. *J. Biotechnol. Bioeng.*, 72:278-288.

El Naggar A Y, Kamel M M, Aladly A A, Ismail N A. 2010. Bioremediation of paraffinic and polynuclear aromatic hydrocarbons using laser irradiated *Bacillus amyloliquefaciens*. *J. Am Sci.*, 6:661-670.

Ertola R, Yantorno P, Mignone C. 1994. Microbiología Industrial. *Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico de la OEA*. Washington, DC, USA. 107 p. ISBN: 84-7813-185.

Espinosa L.F (Ed.). 2010. Informe nacional sobre el estado del ambiente marino en los países del Pacífico sudeste, caso Colombia. *INVEMAR, CPPS.*, Santa Marta. 147.

Fenical W y Jensen P R. 1996. Marine microorganisms: A new biomedical resource. *Mar. Biotechnol.*, 1: 419-455.

Fernández P, Ortiz F, España J. 2005. Caracterización de poli-(hidroxibutirato - co-hidroxivalerato) sintetizado por una cepa silvestre de *Bacillus mycoides* FLB2. *Rev. Universidad y Salud.*, 1:1-10.

Fernández P, Ortiz F, Guerrero M, Burbano O, España J. 2006. Influencia de fuentes de carbono y nitrógeno en la síntesis de copolímero Poli-(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) de una cepa Silvestre de *Bacillus mycoides*. *Rev. Universidad y Salud.*, 1:34-42.

Franco Y, Gómez G, Núñez R, Martínez J. 2009. Optimización de las condiciones de fermentación para la producción de polihidroxibutirato por *Rhizobium tropici*. *CENIC Ciencias Biológicas.*, 40:53-57.

Gao X, Chen J C, Wu Q, Chen G Q. 2011. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 22:768-74.

Garay-Tinoco J A, Gómez-López D I, Ortiz Galvis J R. 2006. Integral diagnosis on the biophysical and socioeconomic impact related to the effect of pollution from land based activities on the pacific coastal zone Tumaco bay, Colombia and basic guidelines for a management plan. Project of The United Nations Environment Programme (UNEP), The Global Plan of Action (GPA), and The South Pacific Permanent Commission (SPPC). The Institute of Marine and Coastal Research "Jose Benito Vives De Andreis." *INVEMAR. CCCP.*, The Regional Autonomous Corporation of Nariño –Corponariño, Santa Marta, 290 p. ISBN:978-958-98104-1-5.

García-Tello P. 1985. Microbiología marina. Montevideo, Uruguay. 302-430 pp. UNESCO

Golyshin P N, Chernikova T N, Abraham W-R, Lüsnsdorf H, Timmis K N, Yakimov M M. 2002. *Oleiphilaceae* fam. Nov.; to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov. sp. nov.; a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52:901–911.

González-García Y, Nungaray J, Córdova J, González-Reynoso O, Koller M, Atlic A, Braunegg G. 2008. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates in the polysaccharide-degrading marine bacterium *Saccharophagus degradans* ATCC 43961. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35:629-633.

Guevara L y Cárdenas B. 1999. Aislamiento y diferenciación de bacterias marinas degradadoras de petróleo pertenecientes al género *Pseudomonas* en la ensenada de Tumaco (Nariño). Pasto. Tesis para optar al título de Biólogo con énfasis en microbiología Industrial. Universidad de Nariño.

Guzik U, Grén I, Wojciesz D, Łabuzek S. 2009. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. *Braz. J. Microbiol.*, 40:285-291.

Guzmán H, Van-Thuoc D, Martín J, Hatti-Kaul R, Quillaguamán J. 2009. A process for the production of ectoine and poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84:1069–1077.

Hall T A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis proGram for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.*, 41:95-98.

Hammer Ø, Harper D A T, Ryan P D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.*, 4:4-9.

Hang X, Zhang G, Wang G, Zhao X, Chen G-Q. 2002. PCR cloning of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from *Burkholderia caryophylli* and their functional expression in recombinant *Escherichia coli*. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 210:49-54.

Harayama S, Kasai Y, Hara A. 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15:205-214.

Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K. 1999 Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Molec. Microbiol. Biotechnol.*, 1:63-70.

He W, Tian W, Zhang G, Chen G.-Q, and Zhang Z. 1998. Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 169:45-49.

Hein H, Paletta J R J, Steinbüchel A. 2002. Cloning, characterization and comparison of the *Pseudomonas mendocina* polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2. *Appl. Microbiol and Biotechnol.*, 58:229–236.

Hernández M A, Velasco J A, Rojas F, Campos E, Lara V H, Torres J A, Salgado M A. 2003. Adsorción de compuestos orgánicos volátiles en arcillas del estado de Puebla, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 19:191-196.

Hidalgo J C. 2009. Efectos de los derrames de petróleo sobre los hábitats marinos. *Ciencia Ahora.*, 24:22-40.

Hirt T D, Neuenschwander P, Suter U W. 1996. Synthesis of degradable, biocompatible, and tough block-copolyesterurethanes. *Macromol. Chem. Physic.*, 197:4253–4268.

Huisman G W, Wonink E, Meima R, Kazemier B, Terpstra P, Witholt B. 1991. Metabolism of poly (3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*: identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. *J. Biol. Chem.*, 266:2191–2198.

Humboldt V. 2003. 4.1 Tipos de transectos. *Revista Anual del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt.*, 25:76-81.

Imamura T, Kenmoku T, Honma T, Kobayashi S, Yano T. 2001. Direct biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) bearing epoxide groups. *Int. J. Biol. Macromol.*, 29:295-301.

Imhoff J F, Labes A, Wiese J. 2011. Bio-mining the microbial treasures on the ocean: New natural products. *Biotechnol. Adv.*, 29:468-482.

Jahns A C, Rehm B H A. 2009. Tolerance of the *Ralstonia eutropha* class I polyhydroxyalkanoate synthase for translational fusions to its C terminus reveals a new mode of functional display. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75:5461–5466.

Jamil N y Ahmed N. 2008. Production of Biopolymers by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Marine Source. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 51:457-464.

Juhasz A L y Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [] pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 45:57-88.

Juhasz A L, Stanley G A, Britz M L. 2000. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Lett. Appl. Microbiol.*, 30:396-401.

Kalia V C, Chauhan A, Bhattacharyya G, Rashmi. 2003. Genomic databases yield novel bioplastic producers. *Nat. Biotechnol.*, 21:845–846.

Kalscheuer R, Stöveken T, Malkus U, Reichelt R, Golyshin P N, Sabirova J L, Ferrer M, Timmis K N, Steinbüchel A. 2007. Analysis of storage lipid accumulation in *Alcanivorax borkumensis*: evidence for alternative triacylglycerol biosynthesis routes in bacteria. *J. Bacteriol.*, 189:918–928.

Kaplan C W y Kitts C L. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:1777–1786.

Kasai Y, Kishira H, Sasaki T, Syutsubo K, Watanabe K, Harayama S. 2002. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environ. Microbiol.*, 4:141-7.

Keis S, Bennett C, Ward V, Jones D. 1995. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent producing *Clostridia*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 45:693-705.

- Khiyami M A, Al-Fadual S M, Bahklia A H. 2011. Polyhydroxyalkanoates production via *Bacillus* plastic composite support (PCS) biofilm and date palm syrup. *J. Med. Plants. Res.*, 5:3312-3320.
- Kim D Y, Kim H W, Chung M G, Rhee Y H. 2007. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *J. Microbiol.*, 45:87-97.
- Koelle M. 1996. Degenerate PCR. Molecular biology and techniques manual. Third edition. USA.
- Kranz R G, Gabbert K K, Madigan M T. 1997. Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:3010–3013.
- Kulkarni S O, Kanekar P P, Nilegaonkar S S, Sarnaik S S, Jog J P. 2010. Production and characterization of a biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) copolymer by moderately haloalkalitolerant *Halomonas campisalis* MCM B-1027 isolated from Lonar Lake, India. *Bioresource. Technol.*, 101:9765–9771.
- Kunz D A y Weimer P J. 1983. Bacterial Formation and Metabolism of 6-Hydroxyhexanoate: Evidence of a potential role for w-Oxidation. *J. Bacteriol.*, 156:567-575.
- Łabuzek S y Radecka I. 2001. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *J. Appl. Microbiol.*, 90:353-357.
- Lageveen R G, Huisman G W, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G, Witholt B. 1988. Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2924-2932.
- Lai Q, Wang L, Liu Y, Fu Y, Zhong H, Wang B, Chen L, Wang J, Sun F, Shao Z. 2011. *Alcanivorax pacificus* sp. nov., isolated from a deep-sea pyrene-degrading consortium. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 61:1370–1374.
- León J, Liza L, Soto I, Torres M, Orosco A. 2010. Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud. Publica.*, 27:215-221.
- Li S Y, Dong C L, Wang S Y, Ye H M, Chen G-Q. 2011. Microbial production of polyhydroxyalkanoate block copolymer by recombinant *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 90:659–669.
- Liebergesell M y Steinbüchel A. 1992, Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) in *Chromatium vinosum* strain D. *Eur. J. Biochem.*, 209:135–150

Liebergesell M, Rahalkar S, Steinbüchel A. 2000. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54:186-194.

Lizardi-Jiménez M A, Bautista J, Guitierrez M. 2009. Eficiencia degradadora de petróleo de un consorcio microbiano crecido con hexadecano en un biorreactor. *Memorias XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras*. Acapulco Guerrero, México.

López A. 2009. Bioprospección de bacterias marinas productoras de poli-hidroxialcanoatos en tapetes microbianos contaminados. *Memorias XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras*. Acapulco Guerrero, México.

López-Cortés A, Lanz-Landázuri A, García-Maldonado J Q. 2008. Screening and isolation of phb-producing bacteria in a polluted marine microbial mat. *Microb. Ecol.*, 56:112–120.

López-Cortés A, Rodríguez-Fernández O, Latisnere-Barragán H, Mejía-Ruíz H, González-Gutiérrez G, Lomelí-Ortega C. 2010. Characterization of polyhydroxyalkanoate and the *phaC* gene of *Paracoccus seriniphilus* E71 strain isolated from a polluted marine microbial mat. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 26:109-118.

Lozada M, Itria R F, Figuerola E L M, de Tullio L A, Erijman L. 2004. Dinámica, selección y estabilidad de poblaciones bacterianas en barros activados. *Memorias Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente (AIDIS)*. Buenos Aires, Argentina.

Lugioyo G M. 2003. Distribución, relaciones tróficas y diversidad del bacterioplancton de las aguas oceánicas de Cuba. *Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas*. Ciudad de la Habana. Cuba.

Luo R Y, Tian Y, Huang X, Yan C L, Hong H S, Lin G H, Zheng T L. 2009. Enhanced reduction of COD and aromatics in petroleum-produced water using indigenous microorganisms and nutrient addition. *Mar. Pollut. Bull.*, 58:1159-1163.

Mackey A y Hodgkinson M. 1996. Assesment of the impact of naphthalene contamination on mangrove fauna using behavioral bioassays. *Bull. Environ. Contam Toxicol.*, 56:279–286.

Macnaughton S J, Stephen J R, Venosa A D, Davis G A, Chang Y-G, White D C. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:3566–3574.

Madison L L y Huisman G W. 1999. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalcanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63:21-53.

- Manilla-Pérez E, Lange A B, Hetzler S, Steinbüchel A. 2010. Occurrence, production, and export of lipophilic compounds by hydrocarbonoclastic marine bacteria and their potential use to produce bulk chemicals from hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86:1963-1706.
- Marrugo A. J. 1995. Estudio de la contaminación marina por hidrocarburos en áreas críticas de la costa Pacífica colombiana. *Bol. Cient. CCCP.*, 5:121-145.
- Martínez-Alonso M y Gaju N. 2005. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. *Ecosistemas.*, 14:79-91.
- Matsusaki H, Manji S, Taguchi K, Kato M, Fukui T, Doi Y. 1998. Cloning and molecular analysis of the poly (3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *J. Bacteriol.*, 180:6459–6467.
- McCool G y Cannon M C. 2001. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.*, 183:4235-4243.
- Melcher R J, Apitz S E, Hemmingsen B B. 2002. Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:2858–2868.
- Mergaert J y Swings J. 1996. Biodiversity of microorganisms that degrade bacterial and synthetic polyesters. *J. Ind. Microbiol.*, 17:463- 469.
- Miravet M E. 2003. Abundancia, actividad y diversidad de las bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó y su uso como indicadoras ambientales. *Tesis de Doctorado. UH. Cuba.*
- Mobley D P. 1994. *Plastics from microbes. Microbial synthesis of polymers and polymer precursors.* Carl Hanser Verlag, Munich Viena New York. 1046 p. ISBN 3-446-17367-6.
- Montoya D, Arévalo C, Gonzales S, Aristizábal F, Schwarz W. 2001. New solvent-producing *Clostridium* sp. strains, hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 27:329-335.
- Morales M, Ortiz E, Caballero V, Núñez R. 2010. Performance un marine bacterial collection; Medio ambiente y Desarrollo. *Rev. Electrón. Agencia de Medio Ambiente.*, 19:1683-8904.
- Morlett J A, Barrera H, Flores A C, González X A, Balagurusamy N. 2009. Expresión de genes catabólicos durante la biodegradación de hidrocarburos aromáticos bajo condiciones aerobias y anaerobias. *Rev. Divulgación Científica Universidad Autónoma de Coahuila México.*, 2:1-10.

Müh U, Sinskey A J, Kirby D P, Lane W S, Stubbe J. 1999. PHA synthase from *Chromatium vinosum*: cysteine 149 is involved in covalent Catalysis. *Biochemistry.*, 38:826-837.

Muyzer G, de Waal E C, Uitterlinden A G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:695–700.

Muyzer G y Van der Kraan G M. 2008. Bacteria from hydrocarbon seep areas growing on short-chain alkanes. *Trends. Microbiol.*, 16:138-141.

Nair D, Fernández-Acero F J, García-Luque E, Riba I, Del Valls T A. 2008. Isolation and characterization of naphthalene-degrading bacteria from sediments of Cadiz area (SW Spain). *Environ. Toxicol.*, 23:576–582.

Nakamura S, Sakamoto Y, Ishiyama M, Tanaka D, Kuniib K, Kubob K, Satoc C. 2007. Characterization of two oil-degrading bacterial groups in the Nakhodka oil spill. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 60:202-207.

Narváez-Flórez S, Gomez M L, Martinez M M. 2008. Selection of bacteria with hydrocarbon degrading capacity isolated from Colombian Caribbean. *Bol. Invest. Mar. Cost.*, 37:63-77.

National Center for Biotechnology Information, GenBank, BankIt. Disponible: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [Citado 11 noviembre 2011]

Neefs J-M, De Peer I V, Hendriks L, De Wachter R. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic. Acids. Res.*, 18: 2237-2317.

Nelson K, Weinel C, Paulsen I, Dodson R, Hilbert H, Martins Dos Santos, Fouts D, Gill S, Pop M, Holmes M, et al. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol.*, 4:799-813.

Newton C R y Graharn A. 1994. PCR. Bios Scientific Publishers. *The Alden Press*.Oxford, U.K.

Ni Chadhain S M, Norman R S, Pesce K V, Kukor J J, Zylstra G J. 2006. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72:4078–4087.

Ni Y-Y, Kim D Y, Chung M G, Lee S H, Park H-Y, Rhee Y H. 2010. Biosynthesis of medium-chain-length poly (3-hydroxyalkanoates) by volatile aromatic hydrocarbons-degrading *Pseudomonas fulva* TY16. *Bioresource Technol.*, 101:8485-8488.

Nkwelang G, Kamga H F L, Nkeng G E, Antai S P. 2008. Studies on the diversity, abundance and succession hydrocarbon utilizing micro organisms in tropical polluted with oily sludge. *Afr. J. Biotechnol.*, 7:1075-1080.

- Norman R S, Frontera-Suau R, Morris P J. 2002. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:5096–5103.
- Núñez R, Ortiz E, Fonseca E L, Barban O, Almazán B, Pizarro R, Okuda I. 2002. Biorremediación de hidrocarburos de los sedimentos de la bahía de La Habana. *Rev. Contribución a la Educación y la Protección Ambiental.*, 12:45-60.
- Nwaogu L A, Onyeze G O C, Nwabueze R N. 2008. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. *Afr. J. Biotechnol.*, 7:1939-1943.
- Ojumo T V, Yu J, Solomon B O. 2004. Production of Polyhydroxyalkanoates a bacteriano biodegradable polymer. *Afr. J. Biotechnol.*, 3:18-24.
- Oliver J D y Colwell R R. 1973. Extractable lipids of gram-negative marine bacteria: phospholipid composition. *J. Bacteriol.*, 114:897–908.
- Olmos J. 1996. Caracterización molecular e identificación filogenética de microorganismos marinos. Departamento de biotecnología marina, centro de investigación científica y educación superior de Ensenada. *CICESE. Conferencia de clausura. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.* Puerto Vallarta, Jalisco. Mexico.
- Olsen G J y Woese C R. 1993. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.*, 7:113-123.
- Ostle A G y Holt J G. 1982. Nile blue a as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:238-241.
- Otero I D, Fernández P. 2011. Bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA) como una alternativa para la remoción de carga orgánica de aguas residuales domésticas *Memorias II Congreso Iberoamericano de Biotecnología y Biodiversidad.* Manizales. Colombia. ISBN: 978-958-57073-0-6.
- Pandian S R, Deepak V, Kalishwaralal K, Rameshkumar N, Jeyaraj M, Gurunathan S. 2010. Optimization and fed-batch production of PHB utilizing dairy waste and sea water as nutrient sources by *Bacillus megaterium* SRKP-3. *Bioresource Technol.*, 101:705-711.
- Patel J B. 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *J. Mol.Diagn.*, 6:313-621.
- Pederson E N, McChalicher C W J, Srienc F. 2006. Bacterial synthesis of PHA block copolymers. *Biomacromolecules.*, 7:1904-1911.
- Pellón F, Orozco R, León J. 2001. Bacterias marinas con capacidad antimicrobiana aisladas de moluscos bivalvos en cultivos. *Rev. per. Biol.*, 8:159-170.
- Peoples O P y Sinskey A J. 1989. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). *J. Biol. Chem.* 264:15298–15303.

- Pepi M, Cesaro A, Liut G, Baldi F. 2005. An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 53:157–166.
- Pérez S R M, Camacho P M I, Gómez M O, Rodríguez M A, Viñas M, Cantero M D. 2008. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Rev. CENIC. Ciencias. Biológicas.*, 39:44-51.
- Piubeli F, Grossman M J, Fantinatti-Garboggini F, Durrant R L. 2012. Enhanced reduction of COD and aromatics in petroleum-produced water using indigenous microorganisms and nutrient addition. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 68:78-84.
- Prabhu N N, Santimano M C, Mavinkurve S, Bhosle S N, Garg S. 2010. Native granule associated short chain length polyhydroxyalkanoate synthase from a marine derived *Bacillus* sp. NQ-11/A2. *Antonie. Leeuwenhoek.*, 97:41-50.
- Preusting H, Nijenhuis A, Witholt B. 1990. Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkenoates) produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. *Macromolecules.*, 23:4220-4224.
- Prieto M A. 2007. From oil to bioplastics, a dream come true?. *J. Bacteriol.*, 189:289-290.
- Pucci G N, Acuña A, Llanesi M L, Tiedemanm M C, Pucci O H. 2009. Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. *Rev. de Biología Marina y Oceanografía.*, 44:49-58.
- Pucci G N, Acuña A, Tonin N, Tiedemann M C, Pucci O H. 2010. Diversity of culturable bacteria capable of degrading hydrocarbons from the beach of Caleta Córdova Argentina. *Peruvian J. Biol.*, 17:237-244.
- Queiroga C L, Nascimento L R, Serra G E. 2003 Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. *Braz. J. Microbiol.*, 34:321-324.
- Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D, Hatti-Kaul R. 2010. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85:1687-1696.
- Quillaguamán J, Muñoz M, Mattiasson B, Hatti-Kaul R. 2007. Optimizing conditions for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* LC1 in batch culture with sucrose as carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74:981–986.
- Rai R, Keshavarz T, Roether J A, Boccaccini A R, Roy, I. 2011. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Mater. Sci. Eng.*, 72:29-47.
- Rajendhran J y Gunasekaran P. 2011. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiol. Res.*, 166:99-110.

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

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

Ren Q, Beilen J B, Sierro N, Zinn M, Kessler B, Witholt B. 2005. Expression of PHA polymerase genes of *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli* and its effect on PHA formation. *Antonie. Leeuwenhoek.*, 87:91-100.

Revelo D M, Grosso M V, Moreno C N, Montoya D. 2007. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electron. J. Biotechnol.*, 10:348-357.

Revelo D M. 2005. Diseño de primers y validación de una metodología molecular para la selección de bacterias de diferentes géneros acumuladoras de polihidroxi-alkanoatos (PHAs) *Tesis para optar por el título de Maestría en ciencias microbiológicas*. Bogotá, Colombia.

Revelo D, Guerrero M, Sánchez C, Suárez K, Fernández P. 2012. (Datos no publicados).

Richard J Y y Vogel T M. 1999. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 44:93-100.

Rychlik W. 1995. Primer efficient in PCR. *Biotechniques* 18:84-90.

Rivas R, García-Fraile P, Peix A, Mateos P F, Martínez-Molina E, Velázquez E. 2007. *Alcanivorax balearicus* sp. nov., isolated from Lake Martel. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57:1331–1335.

Rocha R. 2007. Estudo da biossíntese de poli-3-hidroxi-4-pentenoato em *Burkholderia cepacia*. Tese (Doutorado)- instituto de ciencias Biomédicas. Universidade de Sao Paulo-Brasil.

Rodicio M R y Mendoza M C. 2004. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 22:238-245.

Rohlf F. 2004. NTSYS–pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1 1T. New York, Exeter Software.

Röling W F, Milner M G, Jones D M, Fratepietro F, Swannell R P, Daniel F, Head I M. 2004. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:2603–2613.

- Romanenko L A, Uchino M, Tanaka N, Frolova G M, Slinkina N N, Mikhailov V V. 2008. Occurrence and antagonistic potential of *Stenotrophomonas* strains isolated from deep-sea invertebrates. *Arch. Microbiol.*, 189:337-344
- Ron E Z y Rosenberg E. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13:249–252.
- Rothermich M M, Guerrero R, Lenz R W, Goodwin S. 2000. Characterization, seasonal occurrence, and diel fluctuation of poly(hydroxyalkanoate) in photosynthetic microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4279–4291.
- Ruberto L, Vázquez S C, Mac Cormack W P. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 52:1115-125.
- Ryan R P, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L C, Avison M B, Berg G, Van der Lelie D, Dow J M. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 7:414-425.
- Sabirova J S, Ferrer M, Regenhardt D, Timmis K N, Golyshin P N. 2006a. Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* Induced by alkane utilization. *J. Bacteriol.*, 188:3763-3773.
- Sabirova J S, Ferrer M, Lünsdorf H, Wray V, Kalscheuer R, Steinbüchel A, Timmis K N, Golyshin P N. 2006b. Mutation in a “tesB-Like” hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2. *J. Bacteriol.*, 188:8452–8459.
- Sabirova J. 2006. Functional genome analysis of *Alcanivorax borkumensis* strain SK2: alkane metabolism, environmental adaptations and biotechnological potential. *Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Naturales*. Universidad Técnica Carolo-Wilhelmina. Brunswick . Rusia.
- Saiki R K.1992. The Design and Optimization of the PCR. in: PCR Technology. Principles and Applications for ADN Amplification. *Freeman and Company*. NewYork, U.S.A. 7- pp.
- Samanez E. 2008. Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. *Tesis para optar por el grado académico de magíster en biotecnología*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- Sánchez L C L y Corrales L C R. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *NOVA - Publicación Científica.*, 3:1-116.
- Satoh Y, Minamoto N, Tajima K, MuneKata M. 2002. Polyhydroxyalkanoate synthase from *Bacillus* sp. INT005 is composed of *PhaC* and *PhaR*. *J. Biosci. Bioeng.*, 94:343-350.
- Schlegel H G, Lafferty R, Krauss I. 1970. The isolation of mutants not accumulating poly-a-hydroxybutyric acid. *Arch. Mikrobiol.*, 71:283-294.

Shahidul I y Tanaka M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries approach for management: a review and synthesis. *Mar. Poll. Bull.*, 48:624-649.

Shamala T R, Chandrashekar A, Vijayendra S V N, Kshama L. 2003. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus spp.* using the polymerase chain reaction (PCR). *J. Appl. Microbiol.*, 94:369-374.

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

Shrivastav A, Mishra S K, Shethia B, Pancha I, Jain D. and Mishra S. 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (PHAs) production utilizing *Jatropha* biodiesel by product. *Int. J. Biol. Macromol.*, 47:283-287.

Shrivastav A, Mishra S K, Pancha I, Jain D, Bhattacharya S, Patel S, Mishra S. 2011. Biodegradability studies of polyhydroxyalkanoate (PHA) film produced by a marine bacteria using *Jatropha* biodiesel byproduct as a substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27:1531-1541.

Sieburth J M. 1979. Sea microbes. *Oxford University Press*. 154 p. Nueva York. ISBN: 0195024192.

Sikkema J, Bont J A M, Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59:201-222.

Simon-Colin C, Raguénes G, Cozien J, Guezennec J G. 2008. *Halomonas profundus* sp. nov., a new PHA-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *J. Appl. Microbiol.*, 104:1425–1432.

Singh M, Patel S, Kalia V C. 2009. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microb. Cell. Fact.*, 8:38-49.

Singh P y Parmar N. 2011. Isolation and characterization of two novel polyhydroxybutyrate (PHB)- producing bacteria. *Afr. J. Biotechnol.*, 10:4907-4919.

Solaiman D K Y, Ashby R D, Foglia T A. 2000. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53:690-694.

Solaiman D K Y, Ashby R D, Foglia T A. 2002. Physiological characterization and genetic engineering of *Pseudomonas corrugata* for medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthesis from triacylglycerols. *Curre. Microbiol.*, 44:189–195.

Song J J y Yoon C C. 1996. Biosynthesis of novel aromatic copolyesters from insoluble 11-phenoxyundecanoic acid by *Pseudomonas putida* BM01. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:536-544.

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

Stackebrandt E y Goebel B M. 1994. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16s rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44:846-849.

Steinbüchel A y Lütke-Eversloh T. 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochem. Eng. J.*, 16:81-96.

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

Steinbüchel A. 1991. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom, D. (Ed.), Biomaterials: novel materials from biological sources. *Stockton Press*, New York. 213 p. ISBN: 1561590371.

Suárez K. 2008. Fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos en piscinas intemperizadas con el uso de leguminosas de cobertura en asociación de una especie forestal y un sustrato compuesto por zeolita como catalizador y materia orgánica. *Tesis de grado previa a la obtención del título de ingeniero en gestión ambiental*. Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador.

Suarez M. 1993. Degradación de los ácidos 3- y 4- Hidroxibenzoico en *Klebsiella pneumoniae*: Purificación caracterización y propiedades de las hidroxilasas. *Trabajo para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas*. Universidad Complutense De Madrid-España.

Sudesh K, Abe H, Doi Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog Polym Sci.*, 25:1503–1555.

Syutsubo K, Kishira H, Harayama S. 2001. Development of specific oligonucleotide probes for the identification and *in situ* detection of hydrocarbon-degrading *Alcanivorax* strains. *Environ. Microbiol.*, 3:371-379.

Taguchi K, Aoyagi Y, Matsusaki H, Fukui T, Doi Y. 1999. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. *Biotechnol Lett.*, 21:579–584.

TajAl-Deen W, Al-Kaaby T, Al-Hussaniy W, Jadooh M. 2010. Evaluation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus cereus*. *Diario de Babel Ciencias Puras y Aplicadas*. 18:474-477.

Tajima K, Igari T, Nishimura D, Nakamura M, Satoh Y, Munekata M. 2003. Isolation and characterization of *Bacillus sp.* INT005 accumulating polyhydroxyalkanoate (PHA) from gas field soil. *J. Biosci. Bioeng.*, 95:77–81.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24:1596–1599.

Tejada C, Castro L, Navarrete A, Cardona T, Otero L, Afanador F, Mogollón A, Pedroza W. 2003. Panorama de la contaminación marina del Pacífico colombiano. *Centro Control Contaminación del Pacífico Colombiano. DIMAR*. 3:1-120

Thirumala M, Reddy S V, Mahmood S K. 2010. Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus spp.* isolated from soil and activated sludge. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37:271-278.

Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids. Res.*, 22:4673-4680.

Tian P-Y, Shang L, Ren H, Mi Y, Fan D-D, Jiang M. 2009. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. *Review. Afr. J. Biotechnol.*, 8:709-714.

Tian W, Hong K, Chen G-Q, Wu Q, Zhang R-q, Huang W. 2000. Production of polyesters consisting of medium chain length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas mendocina* 0806 from various carbon sources. *Antonie. Leeuwenhoek.*, 77:31-36.

Ting A S Y, Fang M T, See C S. 2010. Evaluation on the efficacy of formulated *Pseudomonas* cells in degrading the aromatic hydrocarbon toluene. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 4:3122-3127.

Ting A S Y, Tan CHC, Aw CS. 2009. Hydrocarbon-degradation by isolate *Pseudomonas lundensis* UTAR FPE2. *Mal. J. Microbiol.*, 5:104-108.

Uad I, Silva-Castro G A, Pozo C, González-López J, Calvo C. 2010. Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediment and fuel extracted at 4000 m of depth (Prestige wreck), *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 64:511-518.

Valappil S P, Boccaccini A R, Bucke C, Roy I. 2007. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie. Leeuwenhoek.*, 91:1-17.

Valentin H E y Dennis D. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. *J Biotechnol.*, 58:33–38.

Valentin H E y Steinbüchel A. 1995. Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid-co-4-hydroxyvaleric acid) by mutants and recombinant strains of *Alcaligenes eutrophus*. *J Environ Polym Degrad.*, 3:169–175

- Van Hamme J D, Singh A, Ward O P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67:503-549.
- Velmurugan N, Kalpana D, Cho J Y, Lee G-H, Park S-H, Lee Y-S. 2011. Phylogenetic analysis of culturable marine bacteria in sediments from South Korean Yellow Sea. *Microbiology.*, 80:275-86.
- Verma V, Raju S C, Kapley A, Kalia V C, Kanade G S, Dagainawala H F, Purohit H J. 2011. Degradative potential of *Stenotrophomonas* strain HPC383 having genes homologous to dmp operon. *Bioresour. Technol.*, 102:3227-3233.
- Volke T L y Velasco J A. 2003. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos interemperizados mediante composteo. *Centro nacional de investigación y capacitación ambiental. CENICA.* México.
- Wältermann M y Steinbüchel A. 2005. Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots. *J Bacteriol.*, 187:3607–3619.
- Wang J y Bakken L. 1998. Screening of soil bacteria for poly- γ -hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microb. Ecol.*, 35:91-101.
- Wang Q, Zhang H, Chen Q, Chen X, Zhang Y, Qui Quingsheng. 2010. A marine bacterium accumulates polyhydroxyalkanoate consisting of mainly 3-hydroxydodecanoate and 3-hydroxydecanoate. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26:1149-1153.
- Wang X, Chi N-Y, Zhang Q-F. 2011. Research on the Isolation, Identification and characteristics of a moderately halophilic bacterium wick from Liaodong Bang, *Adv. Mat. Res.*, 183-185, 1085-1089.
- Wei Y-H, Chen W-C, Huang C-K, Wu H-S, Sun Y-M, Lo C-W, Janarthanan O-M. 2011. screening and evaluation of polyhydroxybutyrate-producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. *Int. J. Mol. Sci.*, 12:252-265.
- Widdel F y Rabus R. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotech.*, 12:259-276.
- Williams J, Hanafey M, Rafalki J, Tingey S. 1993. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic ADN Markers. In: *Methods in Enzymology'* Vol. 218. *Academic Press.*
- Woese C R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 51:221–71.
- Wu Y, Lai Q, Zhou Z, Qiao N, Liu C, Shao Z. 2009. *Alcanivorax hongdengensis* sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59:1474–1479.

Xie W P y Chen G Q. 2008. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaPCJ*. *Biochem Eng J.*, 38:384–389

Yakimov M M, Golyshin P N, Lang S, Moore E R, Abraham W-R, Lunsdorf H, Timmis K N. 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48:339-348.

Yakimov M M, Timmis K N, Golyshin P N. 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr. Opin. Biotech.*, 18:257–266.

Yanine H F. 2010. Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos Otún y la Vieja. *Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de Magister Scientiae en Microbiology*. Bogotá. Colombia.

Zhang G, Hang X, Green P, Ho K-P, Chen G-Q. 2001. PCR cloning of type II polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from two *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, 198:165-170.

Zhang G-I, Wu Y-T, Qian X-P, Meng Q. 2005. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids. *J. Zhejiang. Univ. Sci.*, 6:725-730.

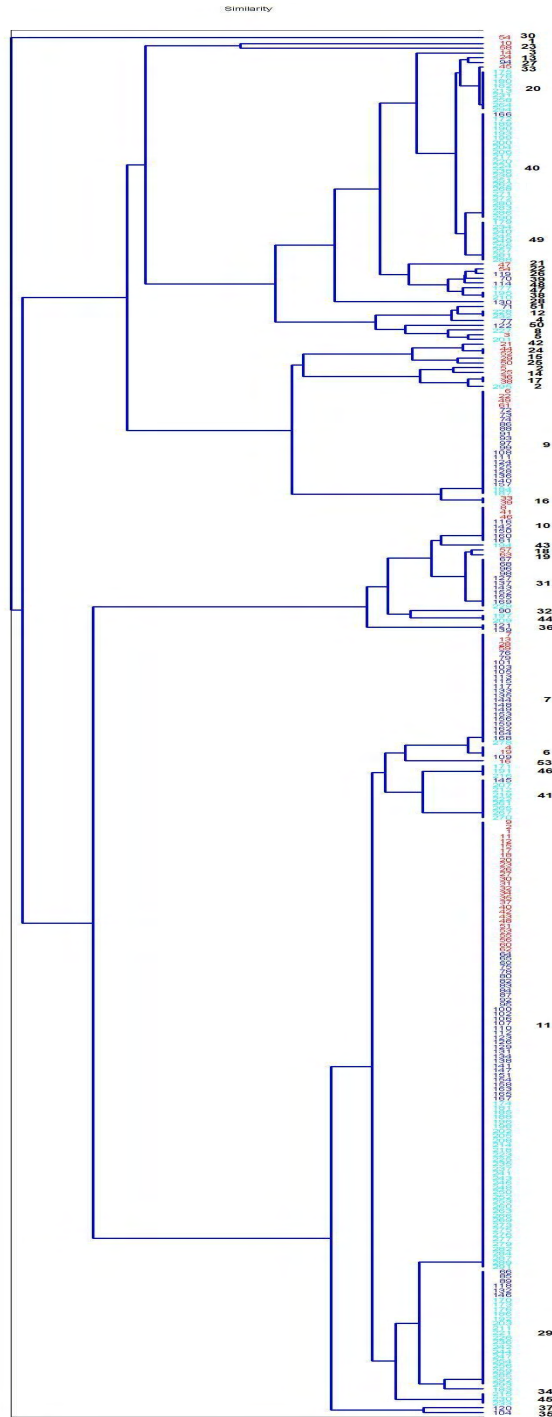
Zhao J, Lü J, He Y L, Jin Q, Zhang W Y, He X. 2007. Biodegradation of toxic organic pollutants by *Bacillus* sp. LY with heterotrophic nitrogen removal ability. *Chinese J. Environ. Sci.*, 28:2838-2842. Chinese J Environmen Sci

Zheng L Z, Li Z, Tian H L, Li M, Chen G Q. 2005. Molecular cloning and functional analysis of (R)- 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein: coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. *FEMS Microbiol Lett.*, 252:299–307.

Zobell C E, y Upham HC. 1944. A list of marine bacteria including descriptions of sixty new species. *Bulletin of The Scripps Institution of Oceanography*. 5:239-292.

ANEXOS

Anexo A. Dendrograma generado por el programa PAST. Indica el agrupamiento de los aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos según sus características macroscópicas y microscópicas



Anexo B. Características microscópicas y macroscópicas de los 53 aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos diferenciables obtenidos en sistemas de cultivo continuo realizados en BFAs.

Aislamiento bacteriano	Características macroscópicas					Características microscópicas
	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color	Tinción Gram
1	Irregular	Elevada	Entero	Concéntrica	Rosado	Bacilos Gram-negativo
2	Circular	Difusa	Entero	Concéntrica	Blanco	Bacilos Gram-negativo
3	Irregular	Difusa	Ondulado	Ondulada	Blanco	Bacilos Gram-negativo
4	Irregular	Difusa	Filamentoso	Radiada	Blanco	Bacilos Gram-negativo
5	Irregular	Elevada	Ondulado	Concéntrica	Blanco	Bacilos Gram-negativo
6	Circular	umbilicada	Ondulado	Ondulada	Blanco	Bacilos Gram-negativo
7	Circular	Elevada	Ondulado	Ondulada	Blanco	Bacilos Gram-negativo
8	Rizoide	Elevada	Ondulado	Ondulada	Blanco	Bacilos Gram-negativo
9	Circular	Aplanada	Ondulado	Ondulada	Blanco	Cocos Gram-positivo
10	Circular	Elevada	Ondulado	Ondulada	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
11	Puntiforme	Aplanada	Entero	Lisa	Blanco	Bacilos Gram-negativo
12	Puntiforme	Elevada	Entero	Lisa	Blanco	Bacilos Gram-negativo
13	Irregular	Aplanada	Ondulado	Ondulada	Crema	Bacilos Gram-positivo
14	Circular	Difusa	Ondulado	concéntrica	Blanco	Bacilos Gram-negativo
15	Circular	Aplanada	Filamentoso	Radiada	Blanco	Bacilos Gram-positivo
16	Rizoide	Umbilicada	Filamentoso	Radiada	Blanco	Bacilos Gram-positivo
17	Rizoide	Elevada	Radiado	Irregular	Blanco	Bacilos Gram-negativo
18	Circular	Elevado	Ondulado	Lisa	Azul	Bacilos Gram-negativo
19	Puntiforme	Aplanada	Entero	Lisa	Rojo	Bacilos Gram-negativo
20	Irregular	Aplanada	Ondulado	Ondulada	Blanco	Bacilos Gram-negativo
21	Irregular	Elevada	Ondulado	Ondulada	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
22	Irregular	Aplanada	Ondulado	Ondulada	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
23	Irregular	Difusa	Ondulado	Ondulada	Rosado	Bacilos Gram-negativo
24	Rizoide	Rizoide	Filamentoso	Concéntrica	Blanco	Bacilos Gram-negativo
25	Circular	Aplanada	Filamentoso	Concéntrica	Blanco	Bacilos Gram-negativo
26	Irregular	Difusa	Ondulado	Lisa	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
27	Irregular	Difusa	Ondulado	Lisa	Blanco	Bacilos Gram-negativo
28	Irregular	Aplanada	Ondulado	Concéntrica	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
29	Circular	Elevada	Entero	Lisa	Blanco	Bacilos gram-negativo
30	Circular	Aplanada	Ondulado	Ondulada	Crema	Bacilos Gram-negativo
31	Puntiforme	Aplanada	Entero	Lisa	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
32	Circular	Aplanada	Ondulado	Lisa	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
33	Circular	Umbilicada	Ondulado	Ondulada	Crema	Bacilos Gram-negativo
34	Circular	Aplanada	Entero	Lisa	Blanco	Bacilos gram-positivo

35	Puntiforme	Elevada	Entero	Ondulada	Blanco	Bacilos Gram-negativo
36	Circular	Aplanada	Ondulado	Ondulada	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
37	Circular	Umbilicada	Ondulado	Concéntrica	Blanco	Bacilos Gram-positivo
38	Rizoide	Aplanada	Filamentoso	Lisa	Blanco	Bacilos Gram-negativo
39	Irregular	Difusa	Ondulado	Ondulada	Amarillo	Bacilos Gram-positivo
40	Irregular	Aplanada	Ondulado	Lisa	Blanco	Bacilos Gram-negativo
41	Circular	Elevada	Ondulado	Lisa	Blanco	Bacilos Gram-positivo
42	Puntiforme	Elevada	Entero	Lisa	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
43	Circular	Elevada	Entero	Lisa	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
44	Circular	Elevada	Ondulado	Lisa	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
45	Circular	Elevada	Entero	Lisa	Crema	Bacilos Gram-positivo
46	Circular	Aplanada	Ondulado	Lisa	Blanco	Bacilos Gram-negativo
47	Irregular	Aplanada	Ondulado	Lisa	Amarillo	Bacilos Gram-negativo
48	Irregular	Aplanada	Ondulado	Lisa	Crema	Bacilos Gram-negativo
49	Irregular	Elevada	Ondulado	Lisa	Blanco	Bacilos Gram-positivo
50	Irregular	Aplanada	Ondulado	Irregular	Blanco	Bacilos Gram-negativo
51	Irregular	Aplanada	Ondulado	Concéntrica	Crema	Bacilos Gram-positivo
52	Circular	Aplanado	Ondulado	Concéntrica	Blanco	Bacilos Gram-positivo
53	Circular	Elevada	Ondulado	Ondulada	Crema	Bacilos Gram-negativo


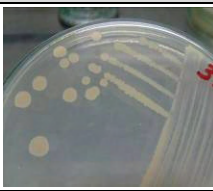
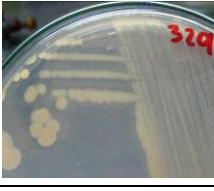





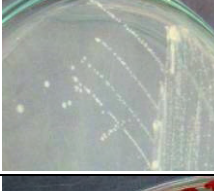




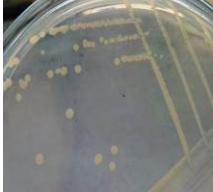
Anexo C. Riqueza de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos diferenciables provenientes de los BFAs.

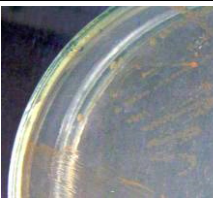


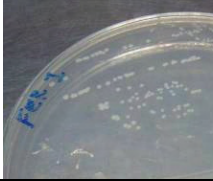
Tiempo de fermentación	Riqueza de los tres BFAs	Riqueza en cada uno de los BFA		Riqueza por nivel de muestreo de los BFAs	
		BFA	# de aislamientos	Nivel	# de aislamientos
0	25 aislamientos	BFA1	12 Aislamientos	Uno	5 aislamientos
				Dos	5 aislamientos
				Tres	6 aislamientos.
		BFA2	8 aislamientos	Uno	5 aislamientos
				Dos	2 aislamientos
				Tres	4 aislamientos
		BFA3	12 aislamientos	Uno	7 aislamientos
				Dos	3 aislamientos
				Tres	6 aislamientos
1	28 aislamientos	BFA1	13 aislamientos	Uno	8 aislamientos
				Dos	5 aislamientos
				Tres	5 aislamientos
		BFA2	14 aislamientos	Uno	6 aislamientos
				Dos	10 aislamientos
				Tres	6 aislamientos
		BFA3	10 aislamientos	Uno	6 aislamientos
				Dos	6 aislamientos
				Tres	7 aislamientos
2	23 aislamientos	BFA1	17 aislamientos	Uno	9 aislamientos
				Dos	10 aislamientos
				Tres	9 aislamientos
		BFA2	10 aislamientos	Uno	9 aislamientos
				Dos	4 aislamientos
				Tres	3 aislamientos
		BFA3	10 aislamientos	Uno	5 aislamientos
				Dos	6 aislamientos
				Tres	3 aislamientos
3	4 aislamientos	BFA1	2 aislamientos	Uno	2 aislamientos
				Dos	1 aislamientos
				Tres	2 aislamientos
		BFA2	1 aislamientos	Uno	1 aislamientos
				Dos	1 aislamientos
				Tres	1 aislamientos
		BFA3	3 aislamientos	Uno	1 aislamientos
				Dos	2 aislamientos
				Tres	1 aislamientos
4	5 aislamientos	BFA1	1 aislamientos	Uno	1 aislamientos
				Dos	1 aislamientos
				Tres	2 aislamientos
		BFA2	2 aislamientos	Uno	2 aislamientos
				Dos	1 aislamientos
				Tres	1 aislamientos
		BFA3	1 aislamientos	Uno	1 aislamientos
				Dos	2 aislamientos
				Tres	1 aislamientos

Anexo D. Abundancias de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos diferenciables provenientes de los BFAs (medida como UFC/mL de dilución serial).

Tiempo de fermentación	BFA	Abundancia = # de colonias por aislamientos (UFCs/mL)			
0	BFA1	M1=5	M2=2	M3=8	M4=3
		M5=3	M6=8	M7=8	M8=52
		M9=6	M10=4	M11=1563	M12=13
	BFA2	M11=1421	M10=8	M7=4	M13=21
		M14=2	M15=1	M16=40	M17=85
	BFA3	M18=1	M19=1	M20=1	M10=1
		M21=1	M22=1	M23=2	M11=1246
		M9=10	M7=2	M24=6	M25=2
1	BFA1	M26=3	M27=10	M28=5	M21=4
		M29=18	M12=9	M11=938	M9=205
		M7=92	M30=7	M31=652	M32=41
		M33=1			
	BFA2	M7=181	M5=8	M34=5	M9=131
		M29=6	M35=214	M11=1331	M10=15
		M36=20	M31=15	M37=12	M38=1
		M39=7	M22=13		
	BFA3	M40=17	M11=1390	M29=4	M41=272
		M7=216	M9=83	M31=110	M42=135
		M36=26	M10=13		
	2	BFA1	M43=2	M44=24	M11=1182
M29=495			M41=71	M45=15	M9=61
M46=122			M47=30	M48=16	M22=6
M49=22			M40=172	M20=68	M50=14
M6=18					
BFA2		M50=16	M51=30	M29=246	M41=120
		M45=27	M11=2779	M31=300	M40=139
		M20=6	M49=275		
BFA3		M52=1	M49=48	M40=86	M20=51
		M7=11	M41=62	M29=111	M11=2443
		M30=9	M53=40		
3		BFA1	M12=120	M29=225	
	BFA2	M29=180			
	BFA3	M40=212	M11=2190	M29=150	
4	BFA1	M29=230			
	BFA2	M9=350	M42=392		
	BFA3	M40=219	M11=1245		

Anexo E. Características microscópicas y macroscópicas de aislamientos bacterianos hidrocarburoclásticos acumuladores de PHAs.

Aislamiento bacteriano	Fotografía macroscópica morfología de colonias bacterianas	Tinción Gram	Aislamiento bacteriano	Fotografía macroscópica morfología de colonias bacterianas	Tinción Gram
329A		Bacilos Gram positivo	371A		Bacilos Gram positivo
329B		Bacilos Gram positivo	371B		Bacilos Gram negativo
333(1)		Bacilos Gram negativo	377C		Bacilos Gram positivo
333(2)		Bacilos Gram negativo	380		Bacilos Gram negativo
337		Bacilos Gram negativo	387		Bacilos Gram positivo
338B		Bacilos Gram negativo	393		Bacilos Gram negativo
353B		Bacilos Gram positivo	394		Bacilos Gram negativo

396		Bacilos Gram negativo	405		Bacilos Gram negativo
400		Bacilos Gram negativo	FER1		Bacilos Gram positivos

Anexo F. Cromatogramas obtenidos al aplicar la técnica de cromatografía de gases (GC). A) Perfil cromatográfico de *Pseudomonas* sp. 333(1); B) Perfil cromatográfico de *Bacillus* sp. 329B. C). Perfil cromatográfico de *Haererehalobacter* sp. 338B; D) Perfil cromatográfico de *Stenotrophomonas* sp. 371B; E) Perfil cromatográfico de *Halomonas* sp. 405; F) Perfil cromatográfico de *Alcanivorax* sp. 337.

