

AISLAMIENTO DE BACTERIAS NATIVAS PRODUCTORAS DE
 POLIHIDROXIALCANOATOS PHAs PRESENTES EN SUELOS DE LA REGIÓN
 ANDINA DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

WILLIAM FERNANDO HIDALGO
 JUAN CARLOS ZAMBRANO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
 FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
 DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
 SAN JUAN DE PASTO
 2005

AISLAMIENTO DE BACTERIAS NATIVAS PRODUCTORAS DE
 POLIHIDROXIALCANOATOS PHAs PRESENTES EN SUELOS DE LA REGIÓN
 ANDINA DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

WILLIAM FERNANDO HIDALGO
 JUAN CARLOS ZAMBRANO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de:
 Químico

Asesor

Candidato a Ph.D, PABLO FERNÁNDEZ IZQUIERDO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
 FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
 DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
 SAN JUAN DE PASTO
 2005

“Las ideas y conclusiones aportadas en ésta tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1. del acuerdo No. 324 de octubre 14 de 1966, emanada del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño”

Nota de aceptación:

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, noviembre de 2005

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Miguel Zambrano y Cecilia Arteaga y a mis hermanos, que me colaboraron incondicionalmente en todo tiempo.

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres José Félix Hidalgo y Stella Buchelli, mis hermanos, demás familiares y mi novia Alexandra Ortiz, quienes me apoyaron incondicionalmente en todo el transcurso de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos de manera especial al Profesor Pablo Fernández Izquierdo, por su colaboración prestada en el desarrollo del trabajo de investigación y sus recomendaciones apropiadas.

Ernesto Luque, magíster en Bioquímica y al Ph.D Jesús Cabrera, por su colaboración como jurados en el trabajo de grado.

De igual manera agradecemos a la Ph.D Elena E. Stashenko, investigadora de la Universidad Industrial de Santander, por su colaboración incondicional en la fase final de nuestro proyecto y a todos los compañeros de estudio y profesores que intervinieron de alguna manera para el desarrollo del mismo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	17
INTRODUCCIÓN	19
1. DEFINICION Y DELIMITACION DEL PROBLEMA	21
2. MARCO TEORICO	23
2.1 PLÁSTICOS BIODEGRADABLES	23
2.2 POLIHIDROXIALCANOATOS	24
2.2.1 Generalidades.	24
2.2.2 Estructuras y propiedades Físico-químicas.	25
2.2.3 Síntesis de PHA.	27
2.2.4 Sustratos utilizados para la biosíntesis de PHA.	31
2.2.5 Condiciones que afectan la síntesis de PHAs.	36
2.2.6 Aplicaciones de los PHAs.	37
2.2.7 Degradación de Polihidroxicanoatos.	39
2.2.8 Métodos de detección y cuantificación de PHA.	40
2.3 BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs	44
2.3.1 Identificación y caracterización fenotípica.	46
2.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES	51
2.4.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	52
2.4.2 Análisis de ácidos grasos mediante GC.	52

	Pág.
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	58
3.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	58
3.2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	59
3.2.1 Recolección de la muestra.	59
3.2.2 Prueba Piloto.	59
3.2.3 Tamizaje cualitativo de bacterias productoras de PHA.	60
3.3 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL Poli(3-HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIVALERATO)	60
3.3.1 Estandarización externa.	61
3.3.2 Parámetros analíticos.	61
3.4 CUANTIFICACIÓN DEL BIOPOLÍMERO SINTETIZADO POR LAS CEPAS BACTERIANAS	63
3.4.1 Preparación de inóculos.	63
3.4.2 Fermentación bacteriana.	63
3.4.3 Extracción del biopolímero.	63
3.4.4 Esterificación de los monómeros de PHA.	64
3.4.5 Cuantificación e identificación de los monómeros de PHA.	64
3.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO	65
3.5.1 Oxidación de carbohidratos.	65
3.5.2 Análisis de ácidos grasos.	65
3.6 ESTUDIOS DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN Y ÁREAS DE LOS PICOS OBTENIDOS POR GC	68

	Pág.
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	70
4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs	70
4.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA	73
4.2.1 Flujo óptimo.	73
4.2.2 Nivel mínimo de detección.	74
4.2.3 Nivel mínimo de cuantificación.	74
4.2.4 Factor de respuesta.	75
4.2.5 Tiempos de retención (t_R).	76
4.3 CUANTIFICACIÓN DEL BIOPOLÍMERO SINTETIZADO POR LAS CEPAS BACTERIANAS	77
4.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS SILVESTRES SELECCIONADAS CON MAYOR PRODUCCIÓN DE PHA	81
4.4.1 Oxidación de carbohidratos.	81
4.4.2 Perfil de ácidos grasos.	83
4.5 IDENTIFICACIÓN POR GC-MS	88
5. CONCLUSIONES	93
RECOMENDACIONES	95
BIBLIOGRAFÍA	96
ANEXOS	106

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Propiedades físico-químicas del PHB, P(HB-co-HV) y polipropileno	27
Tabla 2. Ácidos grasos saturados más comunes en fuentes naturales	53
Tabla 3. Ácidos grasos monoinsaturados más importantes	54
Tabla 4. Ácidos grasos poliinsaturados más importantes	54
Tabla 5. Concentraciones de los metil ésteres del copolímero en las soluciones de trabajo preparadas a partir de la solución Stock de concentración 2500 ppm	61
Tabla 6. Aislamiento de bacterias productoras de PHA mediante técnica cualitativa con Nilo rojo.	72
Tabla 7. Datos promedio para la determinación del flujo óptimo.	73
Tabla 8. Datos obtenidos para el nivel mínimo de cuantificación.	75
Tabla 9. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención (t_R) de los metil ésteres 3HB y 3HV en una columna MDN-5 (30m x 0.25mm, d.i. 0.25 μ m)	77
Tabla 10. Concentración promedio $\pm \sigma$ de los compuestos constituyentes del copolímero producidos por las 25 cepas bacterianas en estudio.	78
Tabla 11. Datos obtenidos del análisis de varianza de las 25 cepas bacterianas PHA positivas con GC-FID.	79
Tabla 12. Prueba de rango múltiple de Duncan del nivel de producción de PHA por parte de las 25 cepas bacterianas en estudio.	80
Tabla 13. Porcentajes relativos en la oxidación de azúcares	82
Tabla 14. Tiempos de retención de los FAME's de la cepa M17-2 obtenidos por GC-FID	85
Tabla 15. Concentración promedio de los FA's presentes en las 10 cepas bacterianas en estudio.	86
Tabla 16. Composición relativa (%) promedio de los FA's presentes en las 10 cepas bacterianas productoras de PHA.	87

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura general del PHA	25
Figura 2. Biosíntesis de PHA	28
Figura 3. Ruta biosintética PHA en <i>Alcaligenes eutrophus</i>	29
Figura 4. Gránulos de biopolímero de tipo poli-3-hidroxi-butarato en el interior de bacterias, tomado mediante técnica de microscopía electrónica	30
Figura 5. Producción de PHA en <i>Pseudomonas</i> y <i>Bacillus</i>	45
Figura 6. Composición estructural de las membranas de bacterias Gram positivas y Gram negativas	47
Figura 7. Transesterificación de lípidos catalizada por ácidos	55
Figura 8. Transesterificación de lípidos catalizada por bases	56
Figura 9. Sistema de recolección de muestras de suelo	59
Figura 10. Cromatógrafo de gases con detector FID. Universidad de Nariño	62
Figura 11. Espectrofotómetro UV-VIS. Universidad de Nariño	63
Figura 12. Dispositivo utilizado para llevar a cabo las reacciones de Transesterificación	66
Figura 13. Detección cualitativa de PHA, en medio de cultivo basal suplementado con Nilo rojo e irradiado con luz UV	71
Figura 14. Tinción de bacterias con Sudan negro para observar gránulos de PHA. Observado a 1000X.	71
Figura 15. Curva de Vann Deemter	73
Figura 16. Determinación de la relación S/Ruido – nivel mínimo de detección	74
Figura 17. Determinación del factor de respuesta para el metil éster 3HB	75
Figura 18. Determinación del factor de respuesta para el metil éster 3HV	75
Figura 19. Cromatograma típico obtenido de la mezcla certificada de ésteres metílicos de 3HB y 3HV tomado en el cromatógrafo de Universidad de Nariño	76
Figura 20. Perfil cromatográfico de los constituyentes del copolímero obtenido por GC-FID de la cepa M17-2	77
Figura 21. Perfil bioquímico obtenido mediante pruebas API 50CH	81
Figura 22. Cromatograma típico obtenido por GC de la mezcla certificada de FAME's	83
Figura 23. Perfil cromatográfico de los FAME's de la cepa M17-2	85
Figura 24. Espectro de masas del metil éster del ácido 3-hidroxi-butírico	89
Figura 25. Espectro de masas del metil éster del ácido 3-hidroxi-valérico	90
Figura 26. Espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico	90
Figura 27. Espectro de masas del éster metílico del ácido palmitoleico	91

ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Reactivos, materiales y equipos de laboratorio	106
Anexo B. Tabla de datos obtenidos para el sistema de recolección de muestras representativas en el estudio de la producción de PHA	108
Anexo C. Tinciones utilizadas en microbiología	109
Anexo D. Perfil cromatográfico (GC-FID) de la mezcla de parafinas lineales C ₆ – C ₁₈ .	110
Anexo E. Preparación de medios de cultivo	111
Anexo F. Preparación de la escala de McFarland	112
Anexo G. Descripción fenotípica de las cepas Gram positivas	113
Anexo H. Repetibilidad de las áreas cromatográficas a diferentes concentraciones de los monómeros de PHA determinado por GC/FID	115
Anexo I. Estudio de la reproducibilidad de tiempos de retención y áreas de los metil ésteres del co-polímero obtenido por GC, de las 25 cepas bacterianas en estudio	117
Anexo J. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención (t _R) de la mezcla de FAME's certificados	119
Anexo K. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención relativos (t _{RR}) de la mezcla certificada de FAME's corridos en una columna DB-23	120
Anexo L. Estudio de la reproducibilidad de las áreas y áreas relativas de la mezcla certificada de FAME's	121
Anexo M. Tablas de datos ordenados de áreas y reproducibilidad de los FAME's obtenidos por GC de las cepas en estudio	122
Anexo N. Espectros de masas de los FAME's identificados en las cepas bacterianas productoras de PHA	124

ABREVIATURAS

AOAC. Association Official Analytical Chemists
ATP. Adenosin trifosfato
CV (%). Coeficiente de variación
DB-5 MS. Columna ligeramente polar de 5% fenil poli (dimetilsiloxano)
eV. Electrón voltios
FA's. Ácidos Grasos
FAME's. Metil ésteres de ácidos grasos
FID. Detector de ionización en llama
GC. Cromatografía de gases
GC-MS. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GLP. Buenas prácticas de laboratorio
HA. Hidroxialcanoicos
HRGC-MS. Cromatografía de gases de alta resolución - espectrometría de masas
ISO. Organización Internacional de estándares
Istd. Estándar interno
ISTE. Transesterificación in- situ
IR. Infrarrojo
IUPAC. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
MHz. Mega Hertz
msnm. Metros sobre el nivel del mar
PCL. Policaprolactano
PHAs. Polihidroxialcanoatos
P (3HB-co-3HV). Poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato)
PHB. Polihidroxi butirato
PLA. Polilactato
ppm. Partes por millón
PUFA's. Ácidos grasos poli-insaturados
Rf. Factor de respuesta
RMN H^1 y C^{13} . Resonancia magnética nuclear protónica y de carbono 13
rpm. Revoluciones por minuto
SFA's. Ácidos grasos saturados
TAG. Triacilglicéridos
 t_R . Tiempos de retención
 t_{RR} . Tiempos de retención relativos
UFA's. Ácidos grasos insaturados
UFC. Unidades formadoras de colonias
UIS. Universidad Industrial de Santander
UV-VIS. Ultravioleta-visible
 μV . Microvoltios
3HB. Ácido 3-hidroxi butírico
3HV. Ácido 3-hidroxi valérico

RESUMEN

Los polihidroxicanoatos PHAs, son polímeros producidos como material de reserva por diversos grupos bacterianos que resultan de gran aplicación en biotecnología y en la industria farmacéutica. En el presente trabajo se muestran los resultados de la investigación realizada con 36 cepas bacterianas aisladas de diferentes suelos del Departamento de Nariño que dieron positiva la presencia del biopolímero mediante tamizaje cualitativo con Nilo rojo.

El polímero sintetizado por las especies bacterianas en estudio, se cuantificó e identificó mediante técnicas de GC-FID y GC-MS, de un total de 36 cepas, 15 produjeron el biopolímero poli-3-hidroxi-butirato (PHB), 10 produjeron el copolímero poli-(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) entre las cuales se destacan las cepas M 17-2 y GSJ-6 con niveles de producción potencialmente útiles y para las restantes, no se logró detectar la presencia de PHA por esta técnica.

Aplicando el respectivo análisis de varianza y comparación de medias, se seleccionaron las 10 cepas de mayor producción del biopolímero y se las caracterizó mediante dos técnicas, sistema de oxidación de carbohidratos - API 50CH y el perfil de ácidos grasos totales, utilizando HRGC-MS. Los resultados obtenidos muestran que las bacterias en estudio pertenecen a las especies *Bacillus mycoides* excepto las cepas ILE-6 y TUQ-3, las cuales corresponden a *Bacillus cereus*. En cuanto al perfil lipídico, no se encontró diferencias con respecto a la composición de ácidos grasos de cada una de las cepas en estudio, pero se determinó que en éstas predominan los ácidos grasos saturados entre ellos los ramificados iso-anteiso (C₁₂-C₁₆) y el ácido palmítico C16:0, siendo éste el más abundante.

ABSTRACT

The polyhydroxyalkanoates PHAs are polymers produced as reserve materials by several bacterial groups of great biotechnological application and biopharmaceutical factory. In the present work we report the results of the investigation was carried out with 36 isolated bacterial strains of different soils of the Department of Nariño that gave positive the presence of the biopolymer by the probe qualitative sift with red Nile.

The polymer synthesized by the studied bacterial species, was quantified and it identified using the GC-FID and the GC-MS techniques, that from these 15 strains produced the polymer poly-3-hydroxybutyrate (PHB), 10 produced the copolymer poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) among the strains M17-2 and GSJ-6 were better producers of the and the remaining ones, didn't produced the PHA, according with the results of this technique.

Applying the variance analysis and comparison of stockings, 10 strains of the best production of the biopolymer were selected and characterized using two techniques, the system of oxidation of carbohydrates - API 50CH and the profile of total fatty acids, by HRGC-MS. The obtained results shown that the studied bacterias belong to the species ***Bacillus mycoides*** except the strains ILE-6 and TUQ-3, which correspond to ***Bacillus cereus***. For the profile fatty acids, it didn't found differences according to the composition of fatty acids of each one of the studied strains, but it was determined that in to strains saturated fatty acids to such as the ramified iso-anteiso acid (C₁₂-C₁₆) and the palmitic acid C16:0, are the most abundant.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad uno de los factores que contribuyen a la contaminación ambiental surge del carácter no degradable de la mayoría de los polímeros sintéticos, los cuales son derivados de productos petroquímicos que carecen de un tratamiento adecuado para su posterior eliminación, es decir, no son biodegradables y esto provoca un alarmante daño ecológico¹.

De ahí que en las últimas décadas, el estudio de nuevas alternativas frente a este problema, ha despertado el interés de los científicos por plantear la sustitución de estos polímeros por materiales que sean de tipo natural, tales como los ácidos polihidroxicanoicos (PHAs) que son sintetizados por una gran variedad de especies bacterianas como fuente de reserva y los cuales, presentan excelentes propiedades físico-químicas similares al polipropileno, son biodegradables, termoplásticos, resistentes a químicos corrosivos y lo más importante, no son tóxicos; características importantes para su aplicación en medicina, industria, biofarmacia y en el sector agropecuario^{2,3}.

Una desventaja importante de este tipo de biopolímeros es el alto costo de producción, por lo cual se están realizando estudios para el mejoramiento de los procesos de fermentación y separación, así como también el desarrollo de cepas más eficientes que consuman fuentes de carbono más económicas⁴.

En muchas universidades y centros de investigación científica del mundo especialmente en Alemania, Inglaterra, Brasil y Cuba entre otros, han realizado estudios de la evaluación de la producción de PHAs en diferentes cepas bacterianas silvestres aisladas de ambientes naturales como suelos agrícolas y agua de mar logrando avances satisfactorios pero que reducen en muy poco el costo de producción de PHA; igualmente se han obtenido cepas transgénicas de *E. coli* con buen rendimiento en la producción de biopolímero, pero que por problemas de mutagénesis, los genes causantes de la producción de PHAs van desapareciendo con el tiempo⁵.

¹ MANG, Michael. Poly(lactic acid) : performance materials from renewable resources.2000. Vol. 49

² BRANDL, H; BACHOFEN, R. and MAYER, J. Degradation and Applications of Polyhydroxyalkanoates. 1995. Vol. 41. pág. 143-149.

³ Ibid., p. 149-153.

⁴ SOO, Kim and NAW, Chang. Production of poly(3- hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. 1998. Vol 20, No. 2. p 109-112.

⁵ TARRAND, J; KRIEG, N. and DOBEREINER. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum*. 1978. Vol. 24. p. 967- 980.

El presente trabajo de investigación se desarrolló en la Universidad de Nariño y sus objetivos fueron aislar cepas nativas de diferentes suelos agrícolas del departamento de Nariño (región andina), cuantificar la producción de PHAs y, caracterizar fenotípicamente las cepas con mayor producción del biopolímero.

Para esto, se realizaron 41 aislamientos de cepas silvestres diferentes en las cuales se evaluó la presencia de gránulos de polihidroxialcanoato (PHA) mediante tinción con Nilo rojo y Sudan negro, diferenciándose 36 aislamientos positivos para su respectivo estudio. La identificación y cuantificación de PHA de las 36 cepas se llevó a cabo empleando las técnicas de GC y GC-MS utilizando el método de estandarización externa, diferenciando 15 cepas con síntesis de poli(3-hidroxi-butirato), 10 sintetizan el copolímero P(3HB-co-3HV) y las 11 restantes, no sintetizaron el biopolímero.

Mediante el respectivo análisis de varianza, se realizó la selección de cepas con mayor producción de PHA entre las cuales se destacan las especies de ***Bacillus mycoides*** que fueron caracterizadas a través de la oxidación de carbohidratos aplicando las pruebas API 50CH y mediante el perfil de ácidos grasos totales, cuya identificación y cuantificación se llevó a cabo por GC y HRGC-MS empleando el método del estándar interno.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

En épocas recientes, se ha incrementado la acumulación de desechos sólidos en el ambiente, que representan un problema de disposición final ya que las superficies destinadas a rellenos sanitarios se ven cada vez más limitadas y además alteran el ecosistema⁶. Dentro de los desechos sólidos se ha puesto gran atención a los materiales plásticos, debido a su producción en rápida expansión, aparte de su difícil o nula degradación y su permanencia durante decenios en basureros y rellenos sanitarios, considerando un periodo aproximado de 40 a 50 años y en casos extremos hasta 200 años, produciendo grandes cantidades de sustancias tóxicas⁷.

En Estados Unidos la producción de plásticos sintéticos excede 50 millones de toneladas métricas y aproximadamente 25 millones de toneladas se acumulan en el ambiente cada año. En Europa aproximadamente el 10% en peso y más del 25% del volumen de los residuos sólidos están constituidos por plásticos, los cuales representan una amenaza potencial para muchos ecosistemas⁸.

Debido a esto, la problemática se manifiesta así mismo en el marco legal, pues en los próximos años entrará en vigor una ley que afectará a los productores de empaques plásticos, envases, entre otros, que les obligará a hacerse cargo de sus residuos y de los embalajes usados. Además, se une la crisis nacional y mundial de petróleo en la que el precio del combustible fósil crece desmedidamente y como consecuencia de la escasez de este recurso no renovable, disminuye la producción de plástico⁹.

Como respuesta a estas exigencias, en los últimos 10 años las industrias y la comunidad científica han ejecutado proyectos sobre plásticos biodegradables que no perjudiquen al medio ambiente, dentro de los cuales está la biosíntesis de polihidroxicanoatos (PHAs) obtenidos a partir de diferentes tipos de bacterias (aisladas de ambientes como agua, suelos, pantanos, ecosistemas marinos) que con fuentes renovables como los residuos agrícolas de la industria azucarera y alimenticia, constituyen la opción de suministro más económica en la producción de biopolímeros fácilmente degradables en corto tiempo (6-12 meses) y que reemplazan productos contaminantes obtenidos a partir de fuentes no renovables^{10,11}.

⁶ VOLKE, S. Tania. Los plásticos en la actualidad y su efecto en el entorno. 1998. p. 3

⁷ CRONOLOGÍA DO desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro. 2002. Vol. 13. p. 61-62.

⁸ VOLKE, Op. cit., p.4.

⁹ LOS PLÁSTICOS. 2004. Vol. 5 p. 11-18.

¹⁰ DEMICHELI, Mario. Plásticos biodegradables a partir de fuentes renovables. 2001. Vol. 10. p.5.

¹¹ VOLKE, Op. cit., p.5.

Una alternativa frente a la problemática descrita, radica en la búsqueda de cepas bacterianas de alta producción de PHAs que puedan ser caracterizadas, evaluadas y manipuladas genéticamente con el fin de utilizarlas en la industria. Por tanto, el presente trabajo de investigación se ha desarrollado con el fin de determinar que tipo de bacterias productoras de PHAs, aisladas de diferentes suelos de la región Andina del Departamento de Nariño, presentan potencial industrial.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 PLÁSTICOS BIODEGRADABLES

La palabra plástico, procede de la voz griega *plastikós*, que significa "capaz de ser moldeado" y que destaca la principal característica de las sustancias plásticas: su deformabilidad ante la aplicación de fuerzas relativamente débiles y a temperaturas no muy alejadas de la ambiental. El plástico ha reemplazado en parte, a la madera en la fabricación de muebles y en la construcción de edificios; se utiliza con mucha frecuencia como substitutivo del cuero, en la industria del calzado y de la lana en la textil; ha reemplazado a la goma como aislante en las instalaciones eléctricas y al metal en muchas piezas de automóviles; también se utiliza para fabricar todo tipo de electrodomésticos¹².

Los plásticos convencionales se producen a partir de reservas fósiles de energía como el petróleo. Estos polímeros perduran en la naturaleza por largos períodos de tiempo y por tanto se acumulan, generando así grandes cantidades de residuos sólidos. Muchos materiales pueden ser reciclados, sin embargo, su proceso origina grandes cantidades de sustancias tóxicas que afectan notablemente el medio ambiente¹³. Como alternativa viable a dicha problemática surgieron los plásticos biodegradables. En contraste con los plásticos convencionales, estos pueden ser producidos a partir de fuentes renovables de energía como carbohidratos y además, son biodegradados a agua, dióxido de carbono y humus, productos que no dañan el medio ambiente^{14,15}.

Los polímeros biodegradables se dividen en cuatro grandes grupos: *naturales* como las proteínas, el almidón, la celulosa; los *naturales modificados* como el acetato de celulosa; *los materiales compuestos* que combinan partículas biodegradables como el almidón con polímeros sintéticos como el poliestireno y el último grupo formado por *los poliésteres biosintéticos* como el polihidroxialcanoato (PHA), el polilactato (PLA), el policaprolactano (PCL) entre otros, que son absolutamente biodegradables¹⁶.

¹² LOS PLÁSTICOS, Op. cit., p.15-18.

¹³ PEARCE, F. Dead in the water. 1995. p. 26-27.

¹⁴ BIOTECH, Brussels. Biopolymers as viable alternatives to common plastic materials. 2004. p 6-9.

¹⁵ DEMICHELI, Op. cit., p.6.

¹⁶ Ibid., p.7.

Actualmente, los biopolímeros más utilizados son los ácidos polilácticos y los polihidroxicanoatos (PHAs), debido a que sus características son muy similares a las de los polímeros no-degradables más utilizados actualmente¹⁷.

2.2 POLIHIDROXIALCANOATOS

2.2.1 Generalidades. El D(-) ácido-3-hidroxi-butírico (3HB) fue descubierto por primera vez en 1923 por Lemoigne quien en 1926 caracterizó químicamente este biopolímero y observó que estaba involucrado en la esporulación de algunos *Bacillus* como el *B. megaterium*¹⁸. Desde entonces se conocía al PHB como el único polihidroxicanoato identificado en cepas bacterianas, hasta que otros compuestos de polihidroxicanoatos (PHAs) fueron reportados en las décadas de los sesenta y setenta¹⁹.

A comienzo de los ochenta, el monómero ácido 3-hidroxi-valérico (3HV) y algunos ácidos 3-hidroxi-alcanóicos fueron accidentalmente detectados como componentes adicionales del biopolímero acumulados por cepas de *Bacillus sp.* y *Alcaligenes eutrophus*. En posteriores investigaciones se utilizaron como nutrientes, sustratos de estructuras relacionadas con los compuestos polihidroxicanoicos, lo cual reveló un abrumador e inesperado gran número de nuevos ácidos hidroxi-alcanóicos (HA) como componentes del PHA biosintético. Esto produjo expectación, el que nuevos compuestos podrían continuar siendo detectados por el uso de diferentes sustratos precursores u otras bacterias²⁰.

Hasta el presente se han encontrado más de 90 unidades monoméricas constituyentes de PHA²¹. Debido a la gran variabilidad de la posición del grupo hidroxilo, el sustituyente que conforma el grupo R, la amplia variedad de monómeros diferentes que pueden conformarlos y el grado variable de polimerización, permiten obtener diferentes polímeros o copolímeros que exhiben propiedades físico-químicas diversas²².

¹⁷ LOS PLÁSTICOS, Op. cit., p.17.

¹⁸ LEMOIGNE, M. Produits de déshydratation et de polymerisation de l'acide b-oxybutyrique. 1926. Vol. 8. p. 770-782.

¹⁹ STEINBÜCHEL, A and VALENTIN, H. Diversidad de ácidos polihidroxicanoicos bacterianos. 1995. Vol. 17. No. 13. p.1-3.

²⁰ Ibid., p.22.

²¹ FUKUI, T and DOI, Y. Cloning and Analysis of the Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate). 1997. Vol. 179 No.15. p. 4801-4809.

²² STEINBÜCHEL, A. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxicanoic acid inclusions. En : Can. Journal of Microbiol. Vol. 41. No. 1 (1995); p. 94-105.

Hoy en día, después de conocer la gran diversidad de polihidroxicanoatos existentes y las propiedades termoplásticas de algunos biopolímeros como el copolímero poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) del cual se ha industrializado su producción, los científicos se han enfocado en la búsqueda de nuevos microorganismos y en la utilización de sustratos económicos para la producción de biopolímero valiéndose de los aspectos fisiológicos, genético-moleculares del metabolismo del PHA, de la estructura y bioquímica de las inclusiones de PHA en el microorganismo y las propiedades físico-químicas²³.

2.2.2 Estructura y propiedades físico-químicas. Los polihidroxicanoatos son poliésteres provenientes de ácidos alcanóicos, que contienen un grupo hidroxilo como grupo funcional, adicionado a un grupo carbonilo²⁴. La mayoría de PHAs están compuestos por monómeros de R(-)3-ácidos hidroxicanoicos que oscilan entre 3 a 14 átomos de carbono, con cadenas saturadas e insaturadas, lineales o ramificadas que contienen grupos laterales que pueden ser alifáticos o aromáticos²⁵.

En la figura 1, se muestra la estructura general del polihidroxicanoato y algunos sustituyentes del grupo R.

Figura 1. Estructura general del PHA.



n = 1	R =	Hidrógeno	poli(-3-hidroxi-propionato)
		Metil	poli(-3-hidroxi-butirato)
		Etil	poli(-3-hidroxi-valerato)
		Propil	poli(-3-hidroxi-hexanoato)
		Pentil	poli(-3-hidroxi-octanoato)
n = 2	R =	Hidrógeno	poli(-4-hidroxi-butirato)
n = 3	R =	Hidrógeno	poli(-5-hidroxi-valerato)

Fuente: <http://www.academicjournals.org/AJB>.

²³ STEINBÜCHEL. Diversidad de ácidos polihidroxicanoicos bacterianos, Op, cit., p. 4-7.

²⁴ FUKUI, Op. cit., p. 4810-4813.

²⁵ OJUMU, T; YU, J. and SOLOMON, B. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. 2003. Vol. 3 No. 1. p. 18-19.

Es importante conocer de manera general que los PHA son insolubles en agua, son fotodegradados y biodegradados a compuestos que no contaminan el medio ambiente en comparación con los plásticos convencionales, los cuales son muy estables, perduran por largos periodos de tiempo y son grandes contaminantes^{26, 27}.

La gran diversidad de PHAs permite obtener plásticos con características que van desde materiales rígidos y quebradizos, hasta productos semejantes al hule. La mayoría de los estudios referentes a las propiedades físico-químicas de los PHAs se han realizado con el poli-3-hidroxitbutirato (PHB) y el copolímero *P(3HB-co-3HV)*^{28,29}.

El PHB tiene un peso molecular promedio de 155.000 g/mol, es decir, de 20.000 a 30.000 monómeros por molécula polimérica dependiendo del tipo de microorganismo y condiciones de crecimiento^{30,31}. Además, otra de las propiedades de este biopolímero son el tener un comportamiento óptimo ante la luz ultravioleta, ser un termoplástico duro y relativamente quebradizo, 100% estereoespecífico con átomos de carbono asimétricos que tienen una configuración D (-) por lo cual es altamente cristalino^{32,33}.

El *P(3HB-co-3HV)*, se diferencia del anterior por ser más flexible y elástico. Esta propiedad le disminuye el carácter quebradizo que posee el PHB, por cuanto contiene fracciones de 3-hidroxitvalerato (3HV) que producen una disminución progresiva de la temperatura de fusión sin producir ningún cambio en la temperatura de descomposición térmica. Por consiguiente las propiedades mecánicas del copolímero *P(3HB-co-3HV)* pueden ser mejoradas dependiendo de la relación 3HB/3HV, que se puede controlar ajustando la fracción de 3-hidroxitvalerato durante la fermentación³⁴.

²⁶ JUKKA, Tuominen. Chain linked acid polymers. 2003. p.45-57.

²⁷ LOS PLÁSTICOS, Op. cit., p.18.

²⁸ JAN, S et al. ¹HMR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass. 1996. p. 195-198.

²⁹ TURI, E. Thermal Characterization of Polymeric Materials. 1997. p. 389-392.

³⁰ LOS PLÁSTICOS, Op. cit., p.18.

³¹ WEINER, R. Biopolymers from marine prokaryotes. 1997. Vol. 15. p. 390-392.

³² JAN, Op. cit., p.197

³³ OJUMU, Op. Cit., p. 19-24.

³⁴ FINKELSTEIN, R. et al. Colonial opacity vararions among the choleraogenic vibrios. 1997. p. 23-34.

El aumento de fragmentos de 3HV, permite que el copolímero sea más duro y más flexible; además, el peso molecular no varía notablemente. Por ejemplo, una mezcla de P(HB-co-11%HV) tiene un peso molecular de 150.000 g/mol³⁵.

Algunas propiedades físicas del PHB, P(3HB-co-3HV) y del polipropileno, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Propiedades físicas del PHB, P(3HB-co-3HV) y Polipropileno.

Parámetro	PHB	P(3HB-co-3HV)			Polipropileno
		3% 3HV	14% 3HV	25% 3HV	
Punto de fusión	175	169	150	137	176
Temperatura de transición vítrea	15	---	---	-1	-10
Cristalinidad (%)	80	---	---	40	70
Elongación de ruptura (%)	5	---	---	50	400
Fuerza de tensión(Mpa)	40	38	35	30	34.5

Fuente: <http://www.academicjournals.org/AJB>

2.2.3 Síntesis de PHA. Una ruta general que utilizan las bacterias para la síntesis de PHA se lleva a cabo en tres fases metabólicas (Figura 2). Primero, debe haber en el medio de cultivo una fuente de carbono apropiada para la biosíntesis de PHA. Esto se logra, en cualquier caso, por un sistema de transporte específico localizado en la membrana citoplasmática, o por difusión del compuesto dentro de la célula. Segundo, las reacciones anabólicas o catabólicas, o las dos, convierten el compuesto interiorizado en un tioéster de hidroxiacil coenzima A, el cual es un sustrato de la enzima PHA-sintetasa.

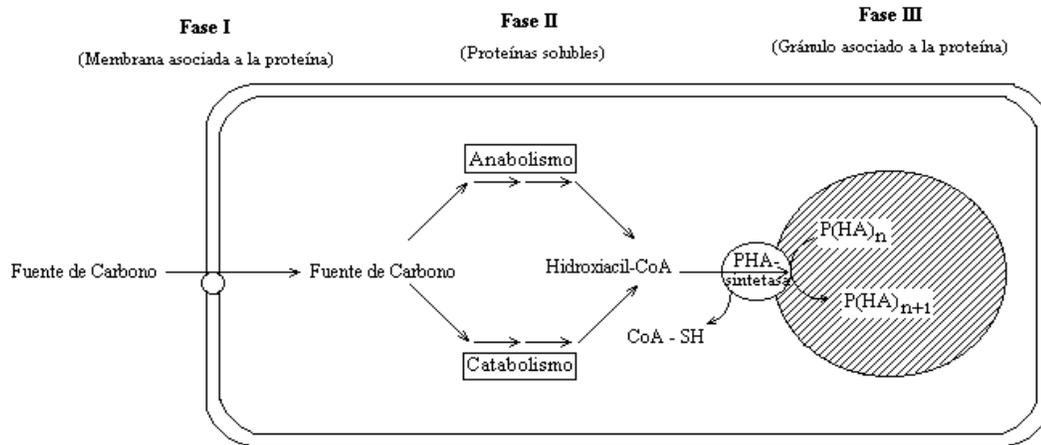
Tercero, la PHA-sintetasa, la cual es la enzima clave para la síntesis de PHA, usa estos tioésteres como sustratos y cataliza la formación de enlaces éster con la consecuente liberación de coenzima A sustratos. La fase dos es de mayor importancia; desde que comienza esta fase, la fuente de carbono es convertida adentro, en un sustrato apropiado para la PHA-sintetasa^{36,37}.

³⁵ ROZSA, C. et al. Miscibilidad de mezclas poliméricas de polihidroxicanoatos. 2004. p. 55-60.

³⁶ ROZSA, Op. cit., p.61-65.

³⁷ STEINBÜCHEL. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalcanoic acid inclusions, Op. cit., p.103-104.

Figura 2. Biosíntesis de PHA.



Fuente: Steinbüchel A, Valentin H; (1995) Diversidad de ácidos polihidroxicanoicos bacterianos

Por lo general, la biosíntesis tiene algunas diferencias en la etapa II, dependiendo de la bacteria que realice dicho proceso. En *Alcaligenes eutrophus*, dos moléculas de acetil-CoA son condensadas por una β -cetiolasas. Luego una acetoacetil-CoA reductasa NADPH-dependiente cataliza la reducción estereoselectiva de la molécula de acetoacetil-CoA formada en el paso anterior a D(-)-3-hidroxiacil-CoA. En la última reacción de esta vía, una PHA sintasa une este producto a una molécula polimérica ya existente, mediante un enlace éster^{38,39}.

Una variante del primer paso de esta reacción es la condensación de la molécula de acetil-CoA con una de malonil-CoA, catalizada por una β -cetoacilsintetasa, aunque se cree que la primera de estas vías es la preferida por la mayoría de las bacterias que sintetizan PHB. La acción de la acetoacetil-CoA reductasa puede estar ligada al $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$. La mayoría de los organismos productores de PHA usan esta ruta⁴⁰.

Cabe mencionar que la gran variedad de PHAs con diferentes monómeros de 3 a 5 carbonos han sido producidos en *A. eutrophus*, pero la proporción de estos monómeros son influenciados por el tipo y la cantidad relativa de las fuentes de carbono suministradas en el medio de cultivo.

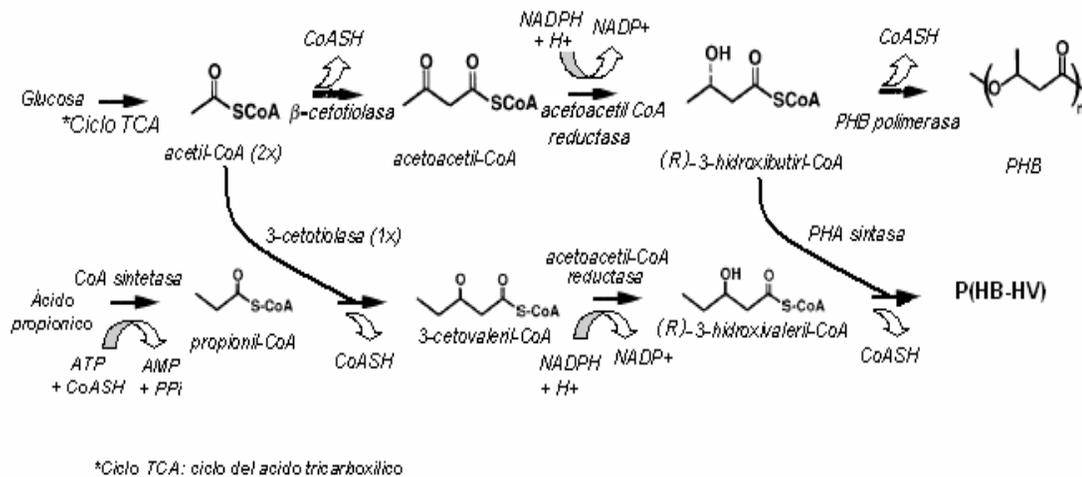
³⁸ ROSE, A. Microbiología Química. 1997. p. 35-37.

³⁹ HENDERSON, R. and JONES, C. Physiology of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production for *Alcaligenes eutrophus* growing in continuous culture. 1997. p. 2361-2371.

⁴⁰ Ibid., p.2368.

Por ejemplo, se ha reportado que la adición de ácido propiónico o valérico al medio de cultivo que contiene glucosa lleva a la producción del copolímero compuesto por 3-hidroxi butirato y 3-hidroxi valerato (figura 3) ⁴¹.

Figura 3. Ruta biosintética de PHAs en *Alcaligenes eutrophus*.



Fuente: <http://www.academicjournals.org/AJB>

➤ **Formación de gránulos de PHA.** El PHA sintetizado por las cepas bacterianas es acumulado en forma de gránulos retráctiles, que almacenan grandes cantidades de carbono reducido en forma de inclusiones intracelulares insolubles sin afectar la presión osmótica de la célula, rodeada de una envuelta proteínica dentro de las células, bajo condiciones de desbalance nutricional.

Algunas bacterias crecen en medios con limitación de fuente de N, pero con una relación abundante de las fuentes de Carbono y energía. En esta situación, se detiene prácticamente la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, y la mayor parte del Carbono asimilado se convierte rápidamente en estos materiales de reserva. Cuando estas células se pasan a un medio rico en Nitrógeno, pero carente de fuente de Carbono, las inclusiones se usan como fuente interna de Carbono para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas⁴².

Estas inclusiones actúan como sistemas de almacenamiento de carbono osmóticamente inertes donde la célula puede albergar grandes cantidades de PHA; puede contener de 8 a 12 de estos gránulos, que miden unos 0.2-0.7 μm de

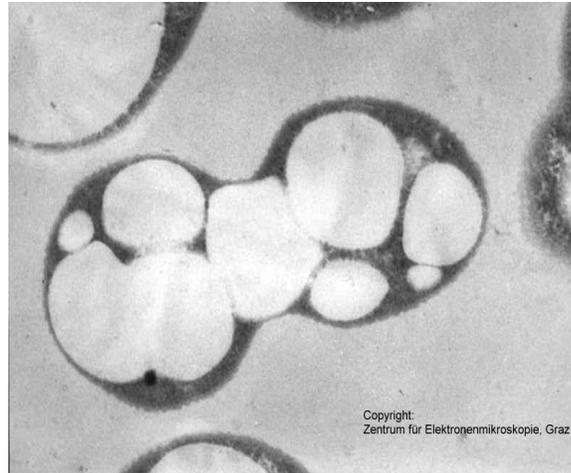
⁴¹ STEINBÜCHEL. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalcanoic acid inclusions, Op. cit., p. 103.

⁴² STEINBÜCHEL. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalcanoic acid inclusions, Op. cit., p. 105.

diámetro, y que van provistos de una envuelta proteica de unos 3-4 nm de grosor. Estos gránulos pueden llegar a representar el 80% en peso de la célula (figura 4)⁴³.

Las inclusiones de PHA in “vivo” son amorfas y fluidas, rodeadas de una monocapa de fosfolípidos, cuyo contenido cuenta con variadas enzimas y proteínas estructurales. Luego de su obtención, las inclusiones de biopolímero cristalizan rápidamente en forma de gránulos sólidos⁴⁴.

Figura 4. Gránulos de biopolímero de tipo poli-3-hidroxi-butirato en el interior de bacterias, tomado mediante técnica de microscopía electrónica.



Fuente: Barnard, G. N. Sanders (1999): The poly- β -hydroxybutyrate granules "in vivo"

➤ *Principales funciones del PHA en las células.* Las inclusiones en forma de gránulos de PHA son muy importantes biológicamente dentro de la célula. La principal función es ser material de reserva de carbono y energía que puede ser utilizado en periodos de limitación de nutrientes^{45,46}.

En bacterias fijadoras de nitrógeno, estos gránulos son utilizados específicamente en la protección de la nitrogenasa ya que el PHB permite la protección contra el oxígeno en ausencia de una fuente de carbono exógena, al proveer a la célula de una fuente

⁴³ LÁÑEZ, Enrique. Curso de microbiología General. 1998. p. 2-10.

⁴⁴ BARNARD, G and SANDERS, N. The poly- β -hydroxybutyrate granules "in vivo". 1999. p. 3286-3289.

⁴⁵ STEINBÜCHEL, Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalcanoic acid inclusions. Op. cit., p.102,104.

⁴⁶ ESPIN, Guadalupe. Biología de *Azotobacter*. 2000. p 8-10.

de energía y carbono rápidamente oxidable, permitiendo mantener una tasa respiratoria adecuada para disminuir la concentración de oxígeno⁴⁷.

Otro papel propuesto para el PHB es el de regulador de los equivalentes de reducción intracelulares. Cuando en la célula se presenta una condición de baja concentración de oxígeno como la requerida para la fijación de nitrógeno, y existe una concentración de carbono alta, se favorece la acumulación de NADH y NADPH⁴⁸. Además existen evidencias de muchas células eucarióticas que contienen pequeñas cantidades de PHB cuya función es acomplejarse con polifosfatos en el transporte de membranas⁴⁹.

La síntesis de PHA esta involucrada en procesos de diferenciación celular, por ejemplo, en algunas especies del género *Bacillus*, el PHB sirve como fuente de carbono y energía para la formación de esporas. En *Azotobacter vinelandii* el metabolismo de PHB esta íntimamente relacionado con el proceso de diferenciación que da como resultado la formación de quistes resistentes a la desecación⁵⁰.

2.2.4 Sustratos utilizados para la biosíntesis de PHA. La síntesis y acumulación de los PHAs es el resultado de la deficiencia o limitación de algunos nutrientes, así como del desbalance nutricional entre las fuentes de carbono, nitrógeno, fosfatos, sulfatos, magnesio y potasio en los diferentes medios de cultivo empleados⁵¹.

Por otro lado la producción de los PHAs, es función de los ciclos celulares que dependen de la cepa en estudio y del estudio fisiológico de la misma. Los primeros procesos desarrollados para la producción de PHA en microorganismos se realizaron mediante fermentación utilizando a la bacteria *Ralstonia eutropha*, la cual es capaz de producir PHB a partir de glucosa, o polihidroxitirato-valerato (PHBV) a partir de glucosa y propionato, sustratos cuyo alto costo incidía en el precio final del polímero obtenido⁵².

La síntesis de copolímero considerando su composición (% 3HB) y (% 3HV), está influenciado principalmente por el sustrato usado⁵³. De manera que cuando un

⁴⁷ LEE, S. Plastic bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalcanoate production in bacteria. 1996. p. 431-438.

⁴⁸ SEGURA, D. and ESPÍN, G. Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-b-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. 1998. p. 4790-4793.

⁴⁹ ESPIN, Op. cit., p.10-12.

⁵⁰ SEGURA, Op. cit., p. 4795-4796.

⁵¹ JAN, Op. cit., p.198.

⁵² PUSCHMANN, M. et al. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. 1999. p. 43-50.

⁵³ ROZSA, Op. cit., p.8.

ácido alcanoico de longitud de cadena par es usado como sustrato, el polímero producido por *R. Eutropha* es el homopolímero PHB, mientras que cuando se usa como sustrato un ácido alcanoico de cadena impar, este microorganismo produce el copolímero P(3HB-co-3HV), igualmente sucede al utilizar glucosa⁵⁴.

La concentración del sustrato proporcionado también afecta la cantidad de polímero producido. Es por eso que al utilizar propionato como única fuente de carbono en *R. Eutropha* a una concentración de 14g/L se produce un 56% de PHA, mientras que un bajo contenido de propionato (2g/L) se produce un 12% de PHA. Así mismo la estructura, propiedades físicas y de biodegradabilidad pueden ser controladas por la composición y la concentración de los sustratos⁵⁵.

Se han clasificado dos tipos de sustratos: sustratos relacionados y sustratos no relacionados; además, éstos deben estar acondicionados con los requerimientos necesarios para la síntesis de PHA como son las sales minerales, los fosfatos y el agua, entre otros⁵⁶.

➤ *Sustratos relacionados.* La mayoría de los monómeros de los PHAs son incorporados al polímero sólo si las células son cultivadas con una fuente orgánica cuyo esqueleto carbonado esté relacionado con la estructura del monómero constituyente. Dentro de estos se encuentran los -n-alcoholes (metanol, octanol, decanol, etanol), -n-alcanos (hexano, octano, metano, decano, heptano), -n-alcanoicos (octanoato, hexanoato, heptanoato)⁵⁷.

Las bacterias incorporan una amplia variedad de 3-hidroxi-alcanoatos, así como 4-hidroxi-butirato y 5-hidroxi-valerato en el poliéster. En *R. eutropha* se han detectado ácidos hidroxialcanoicos de 3 a 5 átomos de carbono, mientras que en *Pseudomonas oleovorans*, se han encontrado de 6 a 14. Esto refleja la existencia de dos tipos de PHA sintasa en estos microorganismos, dependientes de sustratos de cadena corta y larga, respectivamente^{58,59}.

⁵⁴ GREEN, P. et al. Formation of Short Chain Length/Medium Chain Length. No.2001. p. 4-7.

⁵⁵ Ibid. p. 8-9.

⁵⁶ YU, H. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. 1997. p. 28-32.

⁵⁷ XIN, W. et al. Studies on the production of PHB from HFS by *Alcaligenes eutrophus* H16. 1995. p.115-116.

⁵⁸ Ibid., p.118-120.

⁵⁹ PREUSTING, H; NIJENHUIS, A. and WITHOLT, B. Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkenoates) produced by *pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. 1996. p. 4220-4224.

➤ *Sustratos no relacionados.* En estos casos un intermediario central del metabolismo de la célula que es empleado para la generación de energía o para propósitos anabólicos, debe ser dirigido hacia la biosíntesis de PHA. Estas rutas son muy importantes pues permiten la síntesis de PHAs complejos a partir de sustratos simples en lugar de sustratos caros o relativamente tóxicos. Algunos sustratos no relacionados son: fructosa, glucosa, acetato, lactato, succinato⁶⁰.

Por ejemplo se ha reportado la síntesis de *P(3HB-co-3HV)* a partir del almidón por *Haloferax mediterranei* de fructosa, glucosa, succinato, acetato y lactato, por *Corynebacterium hydrocaroxydans*; diferentes fuentes únicas de carbono no relacionadas, por un mutante de *R. eutropha*; y a partir de glucosa, sacarosa, melibiosa, sirope de maíz y melazas de remolacha y caña por *Azotobacter salinestris*⁶¹.

En cepas de *E. coli* recombinantes, la síntesis de PHB fue promovida considerablemente por la adición simultánea de pequeñas cantidades de extracto de levadura y/o hidrolizado de caseína, junto con licor de remojo de maíz. Después de analizar la composición de diferentes fuentes de nitrógeno, aún no se conocen las causas de por qué los complejos de diferentes fuentes de nitrógeno, promueven la síntesis de PHB en diferentes cantidades⁶².

Rhizobium meliloti M5N1 acumula PHB hasta el 85% de su peso seco celular en un medio rico que contiene extracto de levadura, suplementado con fructosa y en el cual no se observa fase logarítmica^{63,64}.

Todos los sustratos, además de contener una fuente carbonada, sean estos relacionados o no relacionados, deben contener otros nutrientes como son:

⁶⁰ VALENTIN, H. and DENNIS, D. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. 1997. p. 33–38.

⁶¹ WANG, F. and LEE, S. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. 1998. p. 325–327

⁶² Ibid., p. 328.

⁶³ TOMBOLINI, R et al. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti*. 1995. p. 2553–2559.

⁶⁴ EMERICH, W. et al. Optimization of cultivation conditions for microorganisms using mathematical experiment design. 1996. p. 46-47.

a. *Nitrógeno*. La limitación de nitrógeno en el medio de cultivo es una de las causas que favorecen la biosíntesis de estos polímeros, ya que al producirse un desbalance nutricional de este elemento, la síntesis de proteínas y el metabolismo celular se ven impedidos^{65,66}.

b. *Fósforo*. El fosfato es un componente vital de varias estructuras celulares, incluyendo ácidos nucleicos, fosfolípidos y proteínas. Las transformaciones de compuestos fosfatados que están involucradas en la energética celular y la dirección de varios procesos bioquímicos en los microorganismos dependen fuertemente de la presencia de fosfatos^{67,68}.

Con referencia a que los genes involucrados en la biosíntesis de PHB en *Acinetobacter* sp se activan transcripcionalmente bajo limitación de fósforo o que bajo estas condiciones *Pseudomonas putida* convierte todo el carbono extracelular en materiales de reserva, respectivamente. Podemos decir entonces que en esta cepa al igual que otras bacterias productoras de PHB, el fósforo tiene una marcada influencia sobre la producción del polímero⁶⁹.

Los resultados señalan también que manteniendo la relación original de fósforo, pero aumentando la de nitrógeno se alcanzan rendimientos mucho mayores que los obtenidos inicialmente. Estos resultados también sugieren que la relación P:N es una relación compleja que debe ser estudiada debido a que ambos iones influyen notablemente sobre la producción y la productividad⁷⁰.

c. *Azufre*. Este elemento hace parte de algunas proteínas que hacen parte de las moléculas de algunos aminoácidos como cisteína y metionina⁷¹.

d. *Sales inorgánicas*. De acuerdo con el hábitat, las comunidades microbianas responden de una u otra forma a determinados factores. Un factor determinante es la influencia de las sales en el crecimiento de cepas productoras de PHA. Un estudio realizado con cepas bacterianas silvestres aisladas de un ecosistema marino demuestra que el crecimiento es mucho mejor en sustratos con concentraciones de

⁶⁵ JAN, Op. cit., p.195-198.

⁶⁶ LEE, Plastic bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Op. cit., p. 436-438.

⁶⁷ YU, Op. cit., p. 31-32.

⁶⁸ ASENJO, J. Effect of Single Nutrient limitation on Poly-β-hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*. 1995. p. 497-502.

⁶⁹ LEE, S. et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. 2000. p. 466-470.

⁷⁰ EMERICH, Op. Cit., p. 46,47.

⁷¹ PEÑA, Saenz. Nutrición bacteriana. 2004. p. 5-8.

salinidad similares a las del agua de mar (3,5 % NaCl), que en sustratos con concentraciones mas bajas o mas altas, concentraciones que son garantizadas en el medio de cultivo con agua de mar natural. Esta condición favoreció un incremento en la síntesis de los biopolímeros, contrario a lo que ocurre en un medio donde la concentración de sales es del 0,35%, no favorecedora de una actividad fisiológica adecuada para alcanzar niveles de producción del polímero iguales o superiores al medio utilizado^{72,73}.

Si tenemos en cuenta lo anterior, la formación de biomasa celular puede estar favorecida por la presencia de sales inorgánicas en el medio de cultivo, las cuales en general juegan un papel esencial en el metabolismo celular como cofactores de reacciones enzimáticas y en la energética celular⁷⁴.

e. *Magnesio y otros elementos.* El magnesio es esencial para el crecimiento y el funcionamiento celular y parece tener los mejores papeles, principalmente en la preservación de la integridad de los ribosomas, como parte de un mecanismo de control para la permeabilidad de membrana celular y como cofactor en varias reacciones enzimáticas. Es por eso que la producción de PHA es un factor muy influyente. Estudios realizados con *Pseudomonas Aeruginosa* al utilizar un medio con magnesio, aumentó la producción de PHA y al privar el medio de cultivo de este elemento se obtuvieron rendimientos muy bajos lo que indica la importancia del magnesio en la producción de PHA⁷⁵.

El potasio es un activador de enzimas, *sodio y calcio*; juegan un papel esencial en el metabolismo celular como cofactores de reacciones enzimáticas. Además, el *calcio* mantiene la estabilidad de las capas de lipopolisacáridos. Estos tres elementos se encuentran en mayor abundancia en suelos alcalinos, lo que inhibe el crecimiento celular bacteriano. *El hierro* es utilizado en el ciclo respiratorio y se encuentra en mayor cantidad en suelos ácidos en donde se convierte en un elemento tóxico por estar en exceso, inhibiendo el crecimiento bacteriano⁷⁶.

f. *Micronutrientes.* Estos elementos químicos son indispensables para el crecimiento bacteriano, se requieren en cantidades muy pequeñas y funcionan como antioxidantes. *El cobalto* forma parte de la vitamina B₁₂, el *zinc* es utilizado por varias

⁷² MIRAVET, M. Comportamiento de las bacterias marinas en la Plataforma Sur Occidental de Cuba. 1996. p.48-52.

⁷³ CARBALLO, M. et al. Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos por cepas bacterianas marinas. 2003. p. 36-42.

⁷⁴ Ibid., p. 37.

⁷⁵ BARBUZZI, T. et al. Microbial Synthesis of Poly(3 hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas aeruginosa* from Fatty Acids. 2004. p. 35-41.

⁷⁶ PEÑA, Op. cit., p. 8-13.

enzimas, y el *cobre* es requerido en la respiración celular. Estos elementos se encuentran en el suelo y las bacterias pueden aprovecharlos fácilmente para desarrollar su metabolismo⁷⁷.

g. *Agua*. Este líquido es vital; sin ella las bacterias no pueden completar su ciclo de vida. Si no disponen de agua, algunas pueden dar lugar a formas de resistencia y esporular, viviendo de forma latente; por tanto, el agua hace parte de las reacciones enzimáticas dentro de la bacteria y además es el medio en el cual se da el crecimiento celular. Una bacteria está conformada en su mayoría por agua (70-85%) y el sustrato en el que crece para la producción de PHA contiene aproximadamente 90% de este líquido, lo que indica la esencialidad del solvente universal en los procesos biológicos^{78,79}.

2.2.5 Condiciones que afectan la síntesis de PHAs. La producción de PHAs está íntimamente relacionada con los sustratos utilizados, pero además, las condiciones de temperatura, pH, aireación y agitación, entre otros, juegan un papel esencial en la producción de biomasa y por ende del biopolímero⁸⁰.

➤ *Temperatura*. La temperatura influye en la composición de los ácidos grasos de las membranas bacterianas. Esto se debe a que las actividades enzimáticas de la biosíntesis de ácidos grasos se ve regulada por la temperatura del ambiente para que estos microorganismos se adapten al medio; igualmente sucede en la síntesis de PHAs. Los microorganismos se reproducen a mayor velocidad a una temperatura óptima y bajo unas condiciones adecuadas. Es por esto que la temperatura es un factor muy importante que debe tenerse en cuenta para lograr una mayor producción de biomasa y por consiguiente, mayor síntesis de polihidroxicanoatos^{81,82}.

➤ *pH*. La regulación del pH interno de los microorganismos se realiza mediante un sistema de transporte de protones localizado en la membrana citoplásmica y que, básicamente, es una bomba de protones ATP-dependiente. Las condiciones altamente ácidas o alcalinas tienden a inhibir muchas bacterias comunes, ya que el óptimo de la mayoría de las especies es cercano a la neutralidad. La bacteria *Azospirillum brasilense*, crece bien y acumula PHB a valores de pH cercanos a la

⁷⁷ Ibid., p.8.

⁷⁸ EMERICH, Op. Cit., p. 46,47.

⁷⁹ WITHOLT, B. Bacterial nutrition. 2004. p. 2-8.

⁸⁰ MARTINEZ, J et al. Influencia de la aeración en la síntesis de poli-hidroxi-butarato en *Azospirillum brasilense* cepa 7. 2004. p. 14-15.

⁸¹ Ibid., p.17.

⁸² ASENJO, J. et al. Effect of single nutrient limitation on poly-β-hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. 1995. p. 497-502.

neutralidad aunque el crecimiento y rendimiento, no muestran estar marcadamente influenciados por el pH, pudiéndose llegar a la conclusión de que el pH no influye decisivamente en la respuesta productiva^{83,84}.

➤ *Aereación y agitación.* El efecto de la aireación sobre la formación de biopolímero influye notablemente, debido a que los microorganismos aeróbicos productores de PHAs requieren mayor cantidad de oxígeno en la fase exponencial; igualmente la agitación contribuye en la distribución homogénea de las bacterias en el medio de cultivo para lograr mayor aprovechamiento de los nutrientes del mismo y, de esta manera, alcanzar altas densidades celulares^{85,86}.

2.2.6 Aplicaciones de los PHAs. Las características fisicoquímicas y biológicas de estos biopolímeros les permite tener una amplia aplicación ya sea en medicina, farmacia, estética, agropecuaria, etc.

➤ *Usos Médicos.* Los PHAs son utilizados en las siguientes aplicaciones médicas: marcapasos, plasmas, prótesis para fijaciones ortopédicas, bolsas de sueros, fármacos encapsulados, grapas y material odontológico⁸⁷.

Se usan como materia prima de vendas para heridas e hilos para suturas, cuyo deterioro no contamina el medio ambiente. También como lubricante en forma de polvo para guantes quirúrgicos y en el suministro de medicamentos de acción sostenida. Además, son candidatos de preferencia para aplicaciones quirúrgicas: compuestos para cirugía ortopédica y remodelación en implantes óseos o de piel, en parches que insertados en el pericardio limitan las adhesiones pericárdicas post-operatorias⁸⁸.

Una aplicación muy interesante de los PHAs, es su empleo en ingeniería tisular mediante la fabricación de diferentes componentes, en consonancia con sus propiedades biológicas.

La ingeniería tisular ha emergido como una ciencia multidisciplinar que abarca la biología, medicina y la reconstrucción quirúrgica para suministrar productos tisulares que restauren, mantengan o mejoren la actividad del tejido.

⁸³ BAATH, E. Adaptation of soil bacterial communities to prevailing pH in different soils. 1996. p. 227-237.

⁸⁴ MARTINEZ, Op. cit., p.16.

⁸⁵ CARBALLO, Op. cit., p.38.

⁸⁶ YAMANE, T; FUKUNAGA, M. and LEE, Y. Increase PHB productivity by high-cell- density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a Growth-Associated PHB Producer. 1996. p.197-202.

⁸⁷ MONTEOLIVA, M. y RAMOS, A. Polisacáridos microbianos y aplicaciones farmacéuticas. 1998. p. 72-75.

⁸⁸ DUVERNOY, O. A biodegradable patch used as a pericardial substitute after cardiac surgery. 1995. p. 271.

En consecuencia los PHAs deberán reunir cinco propiedades: ser biocompatibles, mantener el crecimiento celular, servir de guía, permitir el desarrollo tisular y degradarse a productos no tóxicos⁸⁹.

➤ *Usos farmacéuticos.* El interés farmacéutico de los PHAs, todavía se puede incrementar basándonos en recientes consideraciones, pues se ha propuesto que su potencial sea utilizado en la fabricación u obtención industrial de principios activos tales como antibióticos, vitaminas y otros compuestos químicos, a través de los que podría ser considerada como la ruta verde para la obtención por síntesis de compuestos químicos de bastante interés en farmacia “*de azúcares a plásticos y de éstos, a compuestos químicos definidos*”⁹⁰.

Un segundo aspecto de aplicación farmacéutica de los polihidroxicanoatos es su uso en la preparación de microcápsulas o nanocápsulas, que permitan la liberación lenta del principio activo y así prolongar su acción^{91,92}.

➤ *Usos Agropecuarios.* Los PHAs son biodegradables en el suelo. Por consiguiente, se utilizan en agricultura y en embalaje donde existen problemas de reciclado y recogida; también se usan como portadores biodegradables en la dosificación a largo plazo de plaguicidas, fertilizantes, como matriz biodegradable en el suministro de droga en medicina veterinaria y en tuberías para la irrigación de cosechas. Como aplicaciones adicionales, se usan también para amarres de frutales y camas en cultivos de fresa^{93,94}.

➤ *Empaques y envases.* El PHA posee propiedades como fuerza de tensión y flexibilidad similares a las del polipropileno y poliestireno. Estos pueden ser utilizados en procesos de separación, moldeado y mezclado con polímeros sintéticos para formar heteropolímeros, además las pequeñas cantidades de PHA mejoran las propiedades de algunos plásticos convencionales⁹⁵.

⁸⁹ WILLIAMS, S. et al. PHA applications. 1999. p. 11-121.

⁹⁰ LEE, S; LEE, Y. and WANG, F. Chiral Compounds from Bacterial Polyesters. 1999. p. 363-368.

⁹¹ MONTEOLIVA, Op. cit., p. 76-77.

⁹² OGAWA Y. Injectable microcapsules prepared with biodegradable poly(α -hydroxy) acids for prolonged release of drugs. 1999. p. 391-409.

⁹³ DUVERNOY, Op. cit., p. 272.

⁹⁴ VOLKE, Op. cit., p. 7.

⁹⁵ O, Miguel; F, Berridi and J, Iruiñ. Survey on Transport Properties of Liquids, Vapors, and Gases in Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate) - (PHB). 1997. p.1849-1850.

Los PHAs se utilizan en alimentos como revestimiento de papel, sustituyendo las hojas de aluminio, además son usados para hacer películas, láminas, fibras, bolsas y recipientes para cosmetología⁹⁶.

En implementos de aseo se utilizan como recipientes, además existe una línea de frascos de champú fabricados con el copolímero P(3HB-co-3HV)^{97,98}.

2.2.7 Degradación de polihidroxicanoatos. La degradación de biopolímeros puede definirse como un cambio en su estructura química que conlleva una modificación apreciable de sus propiedades. Actualmente se aceptan cinco mecanismos básicos de degradación que pueden interactuar entre sí produciendo un efecto sinérgico: fotodegradación, oxidación mediante aditivos químicos, degradación térmica, degradación mecánica y degradación biológica.

Estos mecanismos se desarrollan en condiciones apropiadas tales como:

- a. *Las condiciones del medio:* temperatura, humedad, pH, radiación.
- b. *Las características del polímero:* presencia de enlaces químicos susceptibles a la hidrólisis, hidrofobicidad, estereoquímica, peso molecular, cristalinidad, superficie específica, temperatura de transición vítrea, y de fusión, presencia de monómero residual o aditivos, distribución de la secuencia,
- c. *Las características biológicas de los microorganismos:* cantidad, variedad, fuente, actividad⁹⁹.

La biodegradabilidad puede ser parcial o total, la primera consiste en una alteración de la estructura química y la pérdida de las propiedades específicas. La biodegradabilidad total se asocia a una mineralización completa con producción de CO₂ en condiciones aeróbicas y metano en condiciones anaeróbicas; además, deben producirse agua y sales minerales aunque en algunos casos pueden quedar fragmentos (oligómeros) resistentes a la degradación¹⁰⁰.

⁹⁶ NOTHENBERG, M. Bactéria Produz resina biodegradável de açúcar. 1995. p. 28-34.

⁹⁷ Ibid., p. 35-37.

⁹⁸ O, Miguel. Op. cit., p. 1851-1859.

⁹⁹ VOLKE, Op. cit., p. 2,7.

¹⁰⁰ ALBERTSSON and S, KARLSSON. Degradable Polymers for the Future. 1995. p. 114-123.

La biodegradabilidad tiene lugar por vía hidrolítica siendo la primera fase aquella en donde el agua penetra en el material atacando a los enlaces químicos de la fase amorfa y convirtiendo las cadenas poliméricas largas en fragmentos más cortos solubles en agua. Esto permite una reducción del peso molecular sin pérdidas de las propiedades mecánicas porque la matriz del material está soportada aun por las regiones cristalinas. Una nueva reducción del peso molecular da lugar a la pérdida de las propiedades físicas cuando el agua comienza a fragmentar el material¹⁰¹.

Una segunda fase es el ataque enzimático y la metabolización de los fragmentos ocurriendo una pérdida de masa del polímero, proceso denominado erosión, en el cual el polímero es convertido en fragmentos solubles en agua. Este mecanismo es iniciado por una enzima proteolítica que desorganiza la envuelta proteica de los gránulos; los gránulos así "activados" sufren ahora la acción de una despolimerasa, que va generando dímeros de hidroxibutírico. Finalmente la acción de una dimerasa específica, genera β -hidroxibutírico a partir de los ésteres diméricos. Estas unidades son consumidas por las bacterias como una fuente de carbono para el crecimiento de las mismas¹⁰².

Aunque muchos microorganismos están involucrados en la degradación de plásticos biodegradables en medio ambientes naturales, los hongos parecen jugar un papel muy importante partiendo del hecho de que los polisacáridos de base PHA son generalmente degradados bajo condiciones ambientales, en las cuales los hongos son los microorganismos dominantes (Ej. abono, rellenos municipales, invernaderos, etc.)¹⁰³.

La ventaja que tienen los PHAs en cuanto a la biodegradabilidad frente a otros plásticos es que se realiza mucho más rápido, porque a diferencia del polipropileno, los PHAs penetran más en el suelo formando parte del sedimento y esto facilita su degradación aproximadamente en un mes; si permaneciera en la superficie podría degradarse en 1 año¹⁰⁴.

2.2.8 Métodos de detección y cuantificación de PHA. No todas las bacterias sintetizan biopolímeros. Es por eso necesario realizar pruebas de detección de PHA después de un aislamiento de cepas bacterianas, para poder clasificarlas como productoras y no productoras.

¹⁰¹ BRANDL, Op. cit., p.145.

¹⁰² MERGAERT J, et al. Microbial degradation of poly-(3- Hydroxybutyrate) and poly-(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in compost. 1994. p. 117-183.

¹⁰³ ODA, Y. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and polycaprolactone by filamentous fungi. 1995 p. 265-269.

¹⁰⁴ WEINER, R. Op. cit., p.393.

Una vez realizado el tamizaje se deben desarrollar métodos analíticos que determinen la cantidad de biopolímero producido por las cepas estudiadas para seleccionar finalmente cual es la cepa de mayor producción¹⁰⁵.

➤ **Métodos Cualitativos.** Los métodos cualitativos permiten detectar la presencia de PHA dentro de la célula bacteriana, utilizando generalmente tinciones que sean afines al polímero, de tal manera que se forme un complejo coloreado característico de los gránulos de PHA¹⁰⁶.

Dentro de estos métodos se encuentran:

a. *Tinciones y Fluorescencias.* El uso del Azul de nilo como colorante histológico, fue propuesto originalmente por Smith (1907) para una diferenciación simultánea de los lípidos ácidos y neutros. Esta doble acción es posible porque el Azul de nilo comercial (sulfatoaminodietil aminonaftofenoxazona), también contiene pequeñas cantidades de esta forma de la oxazona oxidada¹⁰⁷.

El Azul de nilo se encuentra asociado con los ácidos grasos coloreándolos de azul, mientras que el Nilo rojo lipofílico se disuelve en grasas neutrales, coloreándolas con las tonalidades que van desde el rojo hasta el amarillo¹⁰⁸.

La fluorescencia que manifiestan las inclusiones de PHB en células de *Azotobacter vinelandii*, luego de ser teñidas con Azul de Nilo, es proporcional con la concentración de PHB, por cuanto los resultados manifiestan que el Azul de Nilo puede ser usado en una determinación cuantitativa de PHB en una gran variedad de células^{109,110}.

¹⁰⁵ CARBALLO, Op. cit., p.38-40.

¹⁰⁶ PAGE, W. and TENOVE, J. Quantitation of poly- β - hydroxybutyrate by fluorescence of Bacteria and granules stained with Nile Blue. 1996). p. 215-217.

¹⁰⁷ Ibid., p. 218.

¹⁰⁸ BOUSSIBA, S and BENDOV, E. Nile Blue A as fluorescent of poly(3-hidroxibutirate) in strain of *azotobacter vinelandii*. 1999). p.25-30.

¹⁰⁹ PAGE, Op. cit., p.219.

¹¹⁰ CARBALLO, Op. cit., p. 36-42.

Otro tipo de colorante utilizado para determinar la presencia de PHA o lípidos es el Sudán negro que es una sustancia liposoluble; este tipo de colorantes se combinan con los materiales lipídicos de la célula, usándose a menudo para revelar la localización de las gotículas que son depósitos de grasa o gránulos de PHA¹¹¹.

b. *Microscopía óptica y Electrónica.* La microscopía óptica ayuda a determinar la presencia o ausencia de gránulos de PHA en células que han sido teñidos con Azul de nilo, Nilo rojo o con Sudán negro. Las inclusiones intracelulares pueden ser observadas en el microscopio como cuerpos brillantes, o con una fluorescencia de color naranja, luego de haber sido teñidas con Azul de Nilo u otro color, dependiendo de la tinción realizada^{112,113}.

La técnica de microscopía electrónica es apropiada para una descripción confiable de la estructura del PHA, pero los resultados deben ser cuidadosamente interpretados, porque los compuestos que forman parte de los gránulos tienden a alterarse durante el congelamiento de la muestra interfiriendo la visualización directa de los planos tridimensionales que forma el copolímero¹¹⁴.

➤ *Métodos Cuantitativos.* Dentro de estos se encuentran:

a. *Gravimétrico.* Uno de los más usados es purificar la muestra por liofilización y extracción gravimétrica del PHB en solución de cloroformo, aunque este tiene la dificultad de ser muy lento y suele ser específico y cuantitativo. El método permite determinar las propiedades de estos polímeros como son: punto de fusión, peso molecular, termoplasticidad, empleando además la pirólisis para determinar la composición de los elementos formadores de estos materiales¹¹⁵.

b. *Espectroscopia UV-VIS.* Este método espectroscópico involucra la hidrólisis y deshidratación del polímero a ácido crotónico mediante ácido sulfúrico y su posterior análisis cuantitativo por luz ultravioleta (método espectrofotométrico de Law y Slepecky), cuya lectura se realiza a una absorbancia de 214 nm en espectrofotómetro UV-VIS. Este método tiene el inconveniente de que hay interferencia de azúcares (se transforman a furfural, que absorbe la luz a esa longitud de onda) y nucleótidos¹¹⁶.

¹¹¹ VAL, Daniel. Técnicas de tinción bacteriana. 1998. p. 3-7.

¹¹² Ibid., p. 7-10

¹¹³ PAGE, Op. cit., p.220.

¹¹⁴ KATO, M. and BAO, J. High- resolution electron microscopy of poliesters. 1998. p. 363–370.

¹¹⁵ BASSETT, D. Developments in crystalline, polymers-2. Elsevier. 1988. p. 533-548.

¹¹⁶ CARBALLO, Op. cit., p. 36-42.

c. *Espectroscopía Infrarroja (IR)*. La espectroscopía infrarroja (IR) se utiliza para analizar las características vibracionales de moléculas, estructuras cristalinas y cristales. Los espectros de PHA son registrados en el rango de $4000-400\text{ cm}^{-1}$, utilizando técnicas como la fase sólida en pastillas de KBr. Las bandas más significativas se presentan para el carbonilo (C=O) con vibración de tensión del grupo ésteres entre $1750-1730\text{ cm}^{-1}$, el enlace (C-O) de vibración de tensión se presenta entre el rango de $1300-1000\text{ cm}^{-1}$ y el grupo hidroxilo (O-H) se presenta a frecuencias de $3000 - 3600\text{ cm}^{-1}$. Equipos como el espectrofotómetro son empleados con este fin y las muestras para el análisis de polímero (PHA), deben prepararse en forma de lámina¹¹⁷.

d. *Resonancia Magnética Nuclear RMN H^1 y C^{13}* . Las muestras de PHA son tratadas con cloroformo deuterado, utilizándose tetrametilsilano (TMS) como referencia interna, a partir del cual se reportan los corrimientos químicos (delta) (ppm) a la temperatura de 300 K, se utilizan para registrar estos corrimientos, espectrómetros a la frecuencia de 250 MHz (H^1) y 62.9 MHz (C^{13}) en tubos de 5 mm. de diámetro¹¹⁸.

La RMN es un método analítico que permite cuantificar el PHA luego de una extracción celular inicial del polímero. Los análisis de RMN pueden usarse para analizar la producción de PHB de cadenas cortas, de esta forma la combinación de una vasta cantidad de información derivada de la técnica del RMN, permitirá una mejor comprensión del impacto de las condiciones de cultivo, así como la naturaleza de materias primas sobre el metabolismo del PHB en las células¹¹⁹.

e. *Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS*. Esta técnica es una herramienta muy útil para la detección, cuantificación e identificación de los monómeros constituyentes del PHA.

Además, permite obtener información de la estructura molecular de cada monómero con los respectivos espectros de masas¹²⁰.

¹¹⁷ RUBINSON, J. and RUBINSON, K. Química Analítica Contemporánea. 1 ed. México 2000. p. 434-440.

¹¹⁸ MARTINEZ, Op. cit., p.16.

¹¹⁹ JAN, Op. cit., p. 195-198.

¹²⁰ Ibid., p. 203.

2.3 BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHA

Para poder entender la dinámica de la tierra y la comunidad microbiana, puede ser útil saber qué factores limitan el crecimiento microbiano. Normalmente se asume que el carbono es el factor limitante para el crecimiento microbiano en el suelo, aunque también se ha determinado que el nitrógeno y el fósforo actúan como factores limitantes en algunos suelos. Es por consiguiente probable que diferentes sustancias actúen como limitantes en suelos diferentes y que estos factores puedan cambiar con el tipo de organismo, el tiempo, las condiciones físico-químicas y ambientales predominantes en las diferentes zonas.

Los factores limitantes del crecimiento bacteriano han hecho que estos microorganismos evolucionen con el fin de sobrevivir en ambientes limitados de nutrientes. Una característica es la de almacenar, en forma de inclusiones de reserva, la mayoría de elementos que se encuentren en abundancia. Entre ellos están los gránulos de polifosfato, glóbulos de azufre, gránulos de cianoficina y gránulos de PHA entre otros. Todas las bacterias ya sean aeróbicas, anaeróbicas, heterótrofas y fotosintéticas son capaces de acumular PHA, incluso algunas acumulan hasta 90% de su peso seco¹²¹.

Hasta el momento se han reportado más de 300 microorganismos formadores de gránulos de PHA, pero no todos son un vehículo apropiado para la producción de este polímero debido a que en la mayoría de los casos, el promedio del peso molecular del polímero sintetizado es bajo, de manera que solo algunos pueden ser utilizados para la producción de PHA a escala industrial. Es necesario que las cepas productoras de PHAs tengan una velocidad específica de crecimiento, que puedan utilizar diferentes sustratos y que el porcentaje de producción del polímero sea alto en relación al peso seco de la biomasa¹²².

Para la producción de PHAs a escala industrial se han utilizado cepas que han sido rigurosamente seleccionadas, algunas incluso han sido patentadas como por ejemplo la PI 9806581 “cepa transgénica *Alcaligenes eutrophus*” e igualmente el método de obtención del PHA. Empresas productoras de biopolímeros pagan el 3% de la producción del polímero a los dueños de la patente. Es por esta razón que muchos científicos se han interesado por la búsqueda de microorganismos productores de PHAs a gran escala¹²³.

¹²¹ ALDÉN, L; DEMOLING, F. and BAATH, E. Method of Determining Factors Limiting Bacterial Growth in Soil. 2001. p. 1830-1838.

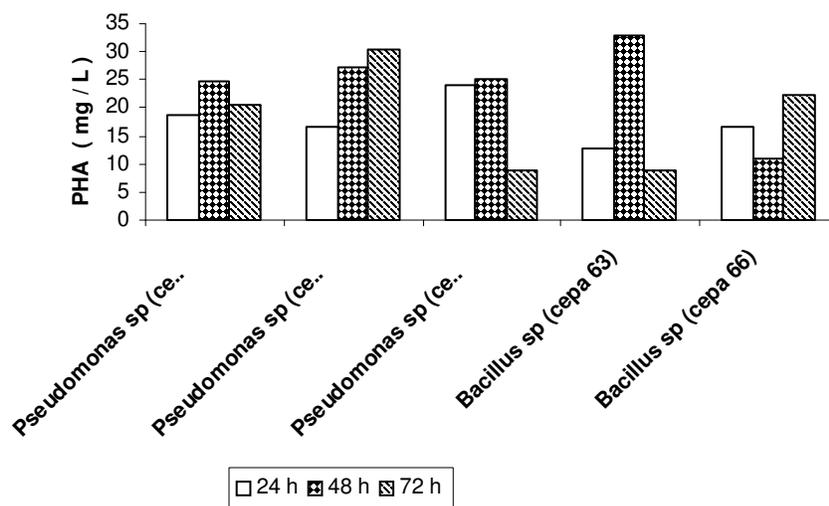
¹²² MARTINEZ, Op. cit., p. 16.

¹²³ LEE, Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. Op. cit., p. 466-470.

En la actualidad se han reportado una cantidad considerable de bacterias productoras de PHAs que acumulan, bajo condiciones apropiadas de limitación de nutrientes, gran cantidad de biopolímero¹²⁴. Dentro de algunos antecedentes acerca de investigaciones realizadas en la búsqueda de nuevas cepas productoras de PHAs se encuentran los siguientes:

María E. Carballo¹²⁵ en la investigación realizada con 7 cepas silvestres de origen marino de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* para las cuales se determinó la capacidad de producir el biopolímero así como también, los niveles de producción de PHA bajo diferentes condiciones de crecimiento obtuvo que, el 71 % de las cepas en estudio sintetizaron PHA tal y como se indica en la figura 5.

Figura 5. Producción de PHA en *Pseudomonas* y *Bacillus*.



Fuente: Carballo, M; et al. Evaluación de la producción de polihidroxicanoatos por cepas bacterianas marinas

Martínez J, y colaboradores¹²⁶, aislaron una nueva cepa silvestre en costas cubanas y fue identificada como *Azospirillum brasilensis* y determinaron una producción de PHB de alrededor de 1.5 g/L de caldo de cultivo en condiciones apropiadas de aereación y agitación.

En Colombia los estudios realizados de PHAs son muy pocos. En 1998, Gómez D. realizó una búsqueda preliminar de bacterias nativas productoras de PHAs en suelos del Valle del Cauca, Parque Natural Chicaque y Amazonas. De 69 aislamientos obtenidos en las tres zonas, se identificaron 29 aislamientos positivos a la producción

¹²⁴ ASENJO, Op. Cit., p. 497-502.

¹²⁵ ASENJO, Op. Cit., p. 497-502.

¹²⁶ MARTINEZ, Op. cit., p.18.

de PHAs. Los resultados mostraron tan solo 10 aislamientos con cantidades de trazas de PHAs de cadena media y una producción máxima de 67 mg/L en una fermentación discontinua durante 24 horas. La identificación taxonómica mostró a *Pseudomonas sp* como las cepas predominantes¹²⁷.

CHEN G. Q. y colaboradores¹²⁸ aislaron y caracterizaron la cepa *Aeromonas hydrophila* 4AK4 que ha sido utilizada para la producción industrial de PHAs bajo condiciones adecuadas.

Actualmente se está empleando la genética molecular como herramienta para caracterizar los genes responsables de la síntesis del biopolímero en algunas cepas bacterianas productoras de PHA. Entre las cepas bacterianas comúnmente utilizadas en procesos biotecnológicos, *E. coli* es el microorganismo mejor conocido, ya que su metabolismo ha sido extensivamente estudiado y caracterizado.

Debido a esto, *E. coli* es un microorganismo modelo, ideal para su uso en fermentaciones. Además, debido al gran número de herramientas disponibles para realizar manipulaciones genéticas, es el organismo adecuado para realizar ensayos previos al traspaso de los genes a plantas. *E. coli* no posee la capacidad de sintetizar o degradar PHA pero crece rápido y es fácil de lisar. Se han expresado los genes PHA de varias especies bacterianas en *E. coli*, obteniéndose buenos rendimientos del polímero. Asimismo, al no poseer enzimas que degraden a los PHA, permite la acumulación de polímero de alto peso molecular¹²⁹.

2.3.1 Identificación y caracterización fenotípica. La identificación de una bacteria es su asignación a un taxón según una clasificación dada. Consiste en la determinación de las características fenotípicas y/o genotípicas y la comparación de estas características con los diferentes taxones de la clasificación considerada. Las características a determinar y su número dependen principalmente del tipo de bacteria y del fin que se persigue en la identificación. Dentro de algunas técnicas para la caracterización genotípica están la tinción de Gram., tinción de esporas, patrón de oxidación de azúcares, perfil de ácidos grasos, entre otras^{130,131}.

¹²⁷ GÓMEZ D. Aislamiento y caracterización de bacterias nativas productoras de polihidroxialcanoatos de suelos del Valle del Cauca, Parque Natural Chicagúe y Amazonas. (1998); p. 32-35.

¹²⁸ CHEN, G, et al. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). 2001. Vol. 57. p. 50-55.

¹²⁹ ALMEIDA, Alejandra. Bioplásticos : una alternativa ecológica. 2004. p.3-7.

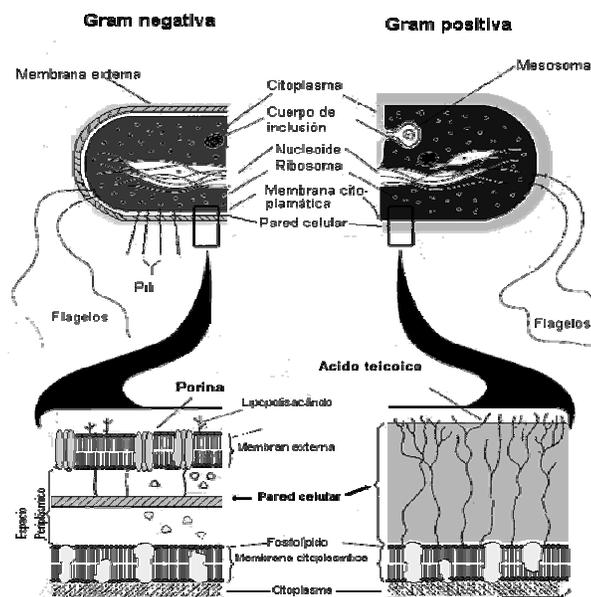
¹³⁰ MATEOS, Pedro. Observación de los microorganismos. 2002.

¹³¹ VAL, Op. cit., p.9.

➤ *Tinción de Gram.* En 1884 el patólogo danés Christian Gram estableció una tinción de contraste que permite distinguir dos tipos bacterianos en función de sus reacción diferencial de tinción y que, como se vería mucho más tarde, reflejaba la existencia de dos grupos de bacterias con rasgos estructurales distintivos; las bacterias Gram-positivas y gram-negativas que tiñen de forma distinta debido a las diferencias constitutivas en la estructura de sus paredes celulares (figura 6)¹³².

La pared de la célula bacteriana sirve para dar su tamaño y forma al organismo así como para prevenir la lisis osmótica. El material de la pared celular bacteriana que confiere rigidez es el peptidoglicano. La pared de la célula gram-positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano así como algo de ácido Teicoico. La pared de la célula gram-negativa, por otro lado, contiene una capa mucho más delgada, únicamente de peptidoglicano y está rodeada por una membrana exterior compuesta de fosfolípidos, lipopolisacáridos, y lipoproteínas. Sólo 10% - 20% de la pared de la célula gram-negativa es peptidoglicano¹³³.

Figura 6. Composición estructural de las membranas de bacterias gram positivas y gram negativas.



Fuente: Sáenz, Peña, Chaco. *En: Hipertextos del área de biología. La pared bacteriana.* Universidad Nacional del Nordeste. República Argentina, 1998-2005.

¹³² MANUAL GRAM. 1998. p. 27-33.

¹³³ JUNQUEIRA, Luis y CARNEIRO, José. *Biología celular y molecular.* 1998. p. 24, 25.

Esta diferencia en la pared celular de las bacterias permite teñirse o no de violeta oscuro (Gram positivas o Gram negativas), lo cual es un criterio de clasificación importante correlacionable con otras propiedades bacterianas pero no está asociada con la identificación de cepas productoras de PHA ya que este tipo de polímeros es realizado tanto por bacterias Gram-negativas como Gram-positivas¹³⁴.

➤ *Patrón de oxidación de azúcares.* En 1857, Pasteur trabajando sobre un problema que había surgido en los destiladores de Lille encontró que en sus cubas, la fermentación alcohólica se vio sustituida por una indeseable fermentación láctica con lo cual demostró que los agentes responsables de la fermentación láctica eran bacterias. Este fue el inicio de una larga serie de estudios que habría de durar hasta 1876, en los que Pasteur identificó distintos microorganismos comprometidos en diferentes clases de procesos fermentativos¹³⁵.

Hoy en día estos procesos fermentativos son considerados como un conjunto de reacciones basadas en el metabolismo de los microorganismos. Entre otros aspectos, se analiza la acción de la bacteria sobre los hidratos de carbono (qué fuente de carbono utiliza, en qué condiciones, cómo la utiliza, qué productos se obtienen), la liberación de exoenzimas, metabolitos y toxinas al medio de cultivo y la motilidad entre otros. Esta técnica trata de procesos de óxido-reducción de azúcares capaces de regenerar NAD⁺ y que comúnmente tienen como productos finales alcoholes (etanol, isopropanol, n-butanol, etc.), ácidos (acético, fórmico, láctico, etc.) acompañados o no por la formación de gases.

Las bacterias anaeróbicas o anaeróbicas facultativas a menudo fermentan carbohidratos a ácidos orgánicos y gas (H₂ o CO₂). La producción de ácidos se observará por el viraje en un indicador de pH. Estos ensayos bioquímicos permiten determinar el género y la especie de la bacteria en estudio¹³⁶.

➤ *Perfil de Ácidos Grasos.* La función de los ácidos grasos es principalmente la de servir de componente estructural en las membranas biológicas, almacenamiento de energía y de carbono, también son precursores de otras sustancias importantes y sirven como aislantes térmicos y físicos en las células. La formación de los ácidos grasos en hongos y bacterias ocurre por su condición genética y la cantidad a sintetizar por factores ambientales y de cultivo, así como de su estado de desarrollo. La síntesis de esta sustancia ocurre en el citosol, mediante una gran variedad de enzimas que se encuentran en la célula¹³⁷.

¹³⁴ BERGEY, D. et al. Manual of systematic bacteriology. 1986. Vol. 2. p.1114-1139.

¹³⁵ IAÑEZ, Enrique. Concepto e historia de la microbiología. 1998. p. 6-8.

¹³⁶ MURRIA, P. et al. Manual of clinical Microbiology. p. 351,360.

¹³⁷ MOORE, E. Fundamentals of the Fungi. 1996. p.123-130.

Esta característica ha sido aprovechada en el caso de las bacterias y otros organismos para su respectiva identificación obteniendo su perfil lipídico, mediante una técnica muy conocida como es la cromatografía en capa fina, que ayudó a definir e identificar especies de micobacterias desde la década de los 60, a la vez que mostró la complejidad de los diferentes tipos de lípidos micobacterianos mediante el análisis de éstos en diferentes mezclas de solventes orgánicos¹³⁸.

La aplicación de la cromatografía fue avanzando rápidamente en la identificación de microorganismos y fue como la cromatografía de gases se desarrolló en forma paralela con la de capa fina, al inicio combinada con pirólisis y posteriormente sola, como técnica analítica de ácidos grasos¹³⁹. Esta técnica se expandió con rapidez en las décadas de los 70 y 80, más tarde se incorporó a ella la espectrometría de masas, con el fin de conseguir una mayor resolución e información "cualitativa" de los perfiles cromatográficos de ácidos grasos. Esta combinación de técnicas se propone como método de detección rápida de algunos componentes bacterianos^{140,141}.

Uno de los primeros trabajos realizado por Toshi, K. en 1967¹⁴², utilizando la técnica de cromatografía gas-liquida; muestra el perfil de ácidos grasos producidos por 22 cepas de 10 especies de *Bacillus*: *B. alvei*, *B. brevis*, *B. cereus*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, y *B. subtilis*, con las cuales se obtuvieron 8 ácidos grasos, 6 ramificados (anteiso-C15, anteiso-C17, iso-C14, iso-C15, iso-C16, y iso-C17) y 2 lineales(n-C14 y n-C16).

Además de los 8 ácidos grasos obtenidos, en *B. cereus* se obtuvieron 4 ácidos grasos más, diferentes a los ya mencionados, 3 ramificados (anteiso-C13, iso-C12, e iso-C13) y 1 monoenoic-n-C16. Las diferencia más notoria se muestran entre *B. cereus*. y las 9 especies de *Bacillus* aunque la diferencia general para todas las especies de *Bacillus* a excepción de *B. cereus* radica esencialmente en las ramificaciones y la composición relativa de los ácidos grasos.

¹³⁸ BRENNAN, P. et al. Identification of atypical mycobacteria by thin-layer chromatography of their surface antigens. 1978. Vol. 8. p. 374,379.

¹³⁹ VALERO, L. A thin-Layer chromatographic method for separating methyl esters of mycobacteria mycolic acid. 1986. p. 373-376.

¹⁴⁰ VALERO, L. y LUENGO F. Cromatografía de capa fina y cromatografía de gases en la identificación de micobacterias de interés clínico. 1987. Vol. 5. p.361-366.

¹⁴¹ REINER, E; BEAM, R. and KUBICA, P. Pyrolysis-gas liquid chromatography studies for the classification of mycobacteria. 1969. Vol. 99. p. 750-759.

¹⁴² KANEDA, Toshi. Fatty acids in the genus *Bacillus* Iso- and anteiso- fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species.1967. Vol. 93 No.3. p. 894-903.

En 1976, Lucía González¹⁴³ determinó el perfil de ácidos grasos como criterio taxonómico en algas azul verdosas *Nostoc sp* y miembros de la familia Nostocaceae aisladas de las raíces de *Macrozamia (Cycadaceae)*. Los perfiles obtenidos indicaron características específicas y genéricas, estableciéndose la prevalencia de seis ácidos grasos: mirístico, C14:0; palmítico, C16:0; polmitoléico, C16:1; esteárico, C18:0; oléico, C18:1 y linoléico, C18:2. Se observó una alta proporción de ácido palmítico, pero el ácido linolénico C18:3, solo estaba presente en algunas especies del género *Nostoc* y en escasa proporción. De esta forma se establece una diferencia notoria con respecto a la composición de los ácidos grasos cualitativa y cuantitativamente en algas azul verdosas *Nostoc sp* y miembros de la familia *Nostocaceae*.

Ahmad A. y su grupo de investigación¹⁴⁴ en 1996, realizaron un estudio de clasificación de 10 tipos bacterianos: *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus* subsp. *Aureus*, *Enterococcus (Streptococcus) faecalis*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*; las cinco primeras Gram positivas y las siguientes Gram negativas de las cuales se determinó su perfil de ácidos grasos: C15:0 y C17:0 junto con C18:0 los cuales eran predominantes en bacterias Gram positivas, mientras que C16:1, C16:0, C18:1, ciclopropil-cis-C17:0 y cis-C19:0 eran predominantes en bacterias Gram-negativas. Esto demuestra que la diferencia es notoria entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Además se determinó una diferenciación entre las especies del mismo género.

Liliana Maderos y colaboradores¹⁴⁵ en 1999, analizaron comparativamente las fracciones de ácidos grasos micobacterianos de cepas pertenecientes a las especies *Mycobacterium habana* y *Mycobacterium simiae*. Los resultados demostraron que las cepas en estudio presentan cantidades cuantificables de ácidos grasos con cadenas de más de 20 átomos de carbono. Entre las cepas existen pequeñas diferencias con respecto a estos componentes orgánicos. Quedó demostrado que cada una describe un patrón cromatográfico característico, aunque la composición de los ácidos grasos presentes es muy parecida en las 2 especies en estudio.

Torrenegra, R y colaboradores¹⁴⁶ en el año 2001, identificaron seis cepas fúngicas de *Fusarium sp* nativas del Páramo de Guasca utilizando diferentes claves taxonómicas; dentro de estas el perfil de ácidos grasos. Los perfiles obtenidos mostraron

¹⁴³ GONZÁLEZ, Lucía. Determinación de ácidos grasos en una nueva especie de alga del género nostoc. 1976. Vol. 46. p.36-42.

¹⁴⁴ AHMAD, A. et al. Characterization of Lipid Fatty Acids in Whole-Cell Microorganisms Using in Situ Supercritical Fluid Derivatization/Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 1996. Vol. 68 No. 17 p.2805-2810.

¹⁴⁵ MADEROS, L. et al. Análisis de ácidos grasos de cepas de *Mycobacterium habana* y *Mycobacterium simiae*. 1999. Vol. 51 No.2. p. 27-32.

¹⁴⁶ TORRENEGRA, R. et al. Ácidos grasos como criterio taxonómico en cepas nativas de *Fusarium sp*. 2001. Vol. 3. p. 1-6.

características específicas y genéricas, estableciéndose la prevalencia del ácido palmítico, oléico y linoléico como carácter genérico del *Fusarium* y algunos ácidos como el behénico y eicosanoico como carácter específico para *F. Equiseti* y *sporotrichioides* respectivamente.

Robles, E. y colaboradores¹⁴⁷ identificaron cuatro especies del género *Shigella*: *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella sonnei*, y compararon los perfiles de ácidos grasos. Realizaron un total de 192 análisis en muestras tanto de cepas de referencia (ATCC 8700, INDRE B2188, B2194 y B2199) como de cepas ambientales, determinando que su perfil cromatográfico está constituido por 12 ácidos grasos, de los cuales el 3-hydroxitetradecanoico, el trans 9-octadecanoico, el heptadecanoico y el octadecanoico resultaron ser determinantes para la diferenciación entre las especies estudiadas.

Kasthuri Venkateswaran¹⁴⁸ en el 2003, determinó los ácidos grasos de 10 cepas bacterianas del género *Bacillus*: *B. circulans* DSM 11^T; *B. firmus* DSM 12^T; *B. megaterium* DSM 32^T; *B. simplex* DSM 1321; *B. pumilus* DSM 27^T; *B. subtilis* DSM 10^T; *B. subtilis* IAM 1026^T; *B. licheniformis* ATCC 14580^T; *B. mycoides* ATCC 6462^T; *B. nealsonii*. El perfil cromatográfico mostró diferencias entre las diferentes cepas como por ejemplo, en *B. mycoides* se encontró que la mayoría de ácidos grasos eran monosaturados, mientras que en *B. licheniformis* el 90% correspondía a ácidos grasos saturados ramificados y en *B. subtilis* se encontraron niveles altos de ácido grasos saturados de cadena recta lo cual permite establecer diferencias entre las especies.

2.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

La GC es un método analítico estudiado y aplicado ampliamente por más de 40 años para resolver problemas analíticos muy diversos; como resultado, se han determinado condiciones para la separación de prácticamente cualquier tipo de compuestos procesables¹⁴⁹.

Keulemans ha definido la cromatografía de gases como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es la fase estacionaria, de gran área superficial y la otra es de un fluido (fase móvil) que pasa a lo largo de la fase estacionaria¹⁵⁰. La fase estacionaria es sólida, mientras que la fase móvil es un gas (nitrógeno, helio o hidrógeno) que circula en contacto con la fase estacionaria. La muestra se vaporiza en un sistema de

¹⁴⁷ ROBLES, E. et al. Determination of the profile of fatty acids of 4 species of *Shigella* spp by chromatography of gases. 2002. Vol. 44 No.2. p. 69 – 74.

¹⁴⁸ VENKATESWARAN, K. et al. *Bacillus nealsonii* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly facility, whose spores are -radiation resistant. 2003. Vol.25 No. 3. p. 15-21.

¹⁴⁹ RUBINSON, Op. Cit., p. 438.

¹⁵⁰ CORTEZ, Ruben. Cromatografía de Gases. 2004. p.37-39.

inyección y es transportada por la fase móvil a través de la columna. El reparto de los componentes de la muestra con la fase estacionaria se basa en sus diferentes solubilidades en esta fase a una temperatura dada. Por lo tanto, los componentes de la mezcla se separan de acuerdo a sus afinidades con la fase estacionaria¹⁵¹.

Para realizar cromatografía de gases se requiere muestras que sean volátiles o semivolátiles. Muchos compuestos como los *ácidos grasos* y algunos aceites esenciales que tienen puntos de ebullición alto se pueden analizar por este tipo de cromatografía, sometiéndolos a una derivatización. Esto se lleva a cabo mediante una reacción con los grupos químicos que ocasionan presión de vapor baja (punto de ebullición alto) para producir compuestos que se vaporicen a menor temperatura. Un ejemplo sencillo de derivación es la transformación de un ácido carboxílico en su éster metílico o etílico¹⁵².

2.4.1 Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de masas. La GC-MS, es una poderosa herramienta analítica que permite la separación y la identificación simultánea de mezclas volátiles complejas. Por medio de la GC-MS los componentes de la mezcla problema son separados, detectados, identificados y cuantificados^{153,154}. La presentación de datos de espectrometría de masas en general se realiza indicando las masas de las moléculas (o átomos) ionizadas de la muestra y de cualquier fragmento iónico que surja por su descomposición, al igual que la abundancia relativa de cada uno¹⁵⁵.

2.4.2 Análisis de Ácidos Grasos mediante GC. La cromatografía de gases ha jugado un papel importante en el análisis de todas las clases de lípidos encontradas en fuentes naturales, tanto de origen animal, vegetal y en microorganismos entre otros¹⁵⁶. Desde la primera separación realizada por James y Martín en 1952, hasta nuestros días, la GC ha revolucionado el estudio de los lípidos porque ha hecho posible la determinación completa de los FA's, en tiempos de análisis muy cortos¹⁵⁷.

➤ *Ácidos Grasos (FA)*. Los FA's se definen como ácidos mono carboxílicos de cadena alifática con número par (por regla general) de átomos de carbono en cada

¹⁵¹ A, Pablo. Cromatografía Gaseosa.2002. p.18.

¹⁵² RUBINSON, Op. Cit., p.439.

¹⁵³ A, Pablo, Op. cit., p. 18-21

¹⁵⁴ CARERI, Maria et al. New multivariate approach for the optimization of the simultaneous distillation-extraction technique for free fatty acids using a face centred cube experimental desing. 2001. Vol. 386 No. 1/2. p.169-180.

¹⁵⁵ RUBINSON, Judith and RUBINSON, Keneth. Análisis Instrumental. 2001. p. 523-524.

¹⁵⁶ HAMILTON, R. and HAMILTON, S. Lipid Analysis. 1992. p. 263-267.

¹⁵⁷ CHRISTIE, William. Gas Chromatography and Lipids. 1989. p. 303-320.

molécula, siendo los miembros de 12 a 22 átomos de carbono los más comunes^{158,159}.

En la actualidad, más de mil FA's han sido identificados en tejidos de origen animal y vegetal, así como en varias especies de microorganismos. Aun cuando son muchos, la mayoría de ellos se encuentran en concentraciones muy bajas¹⁶⁰. Existen 2 clases generales de FA's en la naturaleza a saber, los ácidos grasos saturados (SFA's) y los ácidos grasos insaturados (UFA's), los cuales se distinguen por determinadas características estructurales¹⁶¹.

a. *Ácidos Grasos Saturados (SFA's)*. Este tipo de FA's se encuentran presentes en grasas de origen animal, no presentan enlaces dobles en su estructura y se caracterizan por ser sólidos o semisólidos a temperatura ambiente. Los SFA's más comunes se muestran en la tabla 2, encontrándose generalmente esterificados, integrando los triacilglicéridos (TAG); cuando llegan a estar en estado libre es porque probablemente sufrieron hidrólisis del enlace éster¹⁶².

La nomenclatura sistemática usada más frecuentemente para nombrar un SFA's está basada en poner al nombre del FA, el nombre del hidrocarburo del mismo número de carbonos, sustituyendo la parte final por *oico* aunque la mayoría son conocidos por nombres comunes. También se puede escribir de forma abreviada de la siguiente forma " $C_n : x$ ", donde n es el número de átomos de carbono en la cadena, y x indica la saturación de la misma ($x = 0$)¹⁶³.

Tabla 2. Ácidos grasos saturados más comunes en fuentes naturales.

Nombre común	Nombre científico	Abreviatura
Láurico	Dodecanoico	C12:0
Mirístico	Tetradecanoico	C14:0
Palmítico	Hexadecanoico	C16:0
Esteárico	Octadecanoico	C18:0
Araquídico	Eicosanoico	C20:0

Fuente: Badui, S. En: Química de los Alimentos

¹⁵⁸ BADUI, Salvador. Química de los alimentos. 1996. p. 213–215.

¹⁵⁹ HAMILTON, Op. cit., p. 265–266.

¹⁶⁰ GUNSTONE, F. High resolution ¹³C NMR spectroscopy of lipids. 1992. p.1–68.

¹⁶¹ HAMILTON, Op. cit., p. 267

¹⁶² BADUI, Op. cit., p. 215-216

¹⁶³ MURRAY, Robert. et al. Bioquímica de Harper. 2001. p.169-182.

b. *Ácidos Grasos Monoinsaturados (UFA's)*. Este tipo de FA's esta presente en grasas de origen animal y vegetal; los FA's monoinsaturados se caracterizan por ser líquidos a temperatura ambiente. Su nomenclatura esta basada en varios convencionalismos usados para indicar la posición del doble enlace siendo el símbolo omega "ωx" el más utilizado, donde "x" es el átomo de carbono que contiene la insaturación contando desde el átomo de carbono omega (último carbono de la cadena carbonada)¹⁶⁴. Los UFA's más importantes se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Ácidos grasos monoinsaturados más importantes.

Nombre común	Nombre científico	Serie	Abreviatura
Miristoleico	9-Tetradecenoico	ω5	C14:1;5
Palmitoleico	9-Hexadecanoico	ω7	C16:1;9
Oleico	9-Octadecanoico	ω9	C18:1;9
Nervónico	15-Tetracosanoico	ω9	C18:1;9

* Fuente: Christie, W. En: Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide.

** La configuración en cada caso es *cis* (Z-)

c. *Ácidos Grasos Poli-insaturados*. Este tipo de FA's es abundante en aceites vegetales y marinos; los PUFA's más importantes se caracterizan por la presencia de dos o mas enlaces dobles con configuración Z- (*cis*)¹⁶⁵. Los PUFA's más importantes se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Ácidos grasos poliinsaturados más importantes.

Nombre común	Nombre científico	Serie	Abreviatura
Linoléico	9,12-Octadecadeionico*	ω6	C18:2;9,12
γ-Linolénico	6,9,12-Octadecatrienoico	ω6	C18:3;6,9,12
∞-Linolénico	9,12,15-Octadecatrienoico	ω3	C18:3;9,12,15
Homo- γ-linolénico	8,11,14-Eicosatrienoico	ω6	C20:3;8,11,14
Araquidónico	5,8,11,14-Eicosotetraenoico	ω6	C20:4;5,8,11,14

Fuente: Christie, W. En: Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide.

* La configuración en cada caso es *cis* (Z-)

➤ *Derivación de Ácidos Grasos*. En muchos casos la determinación de analitos de interés es desarrollada sobre moléculas intactas, sin embargo para sustancias no

¹⁶⁴ CHRISTIE, Op. cit., 335-346

¹⁶⁵ Ibid., p. 347-369.

volátiles, termo inestables y reactivas como los FA's se requiere de derivación previa, antes del análisis cromatográfico.

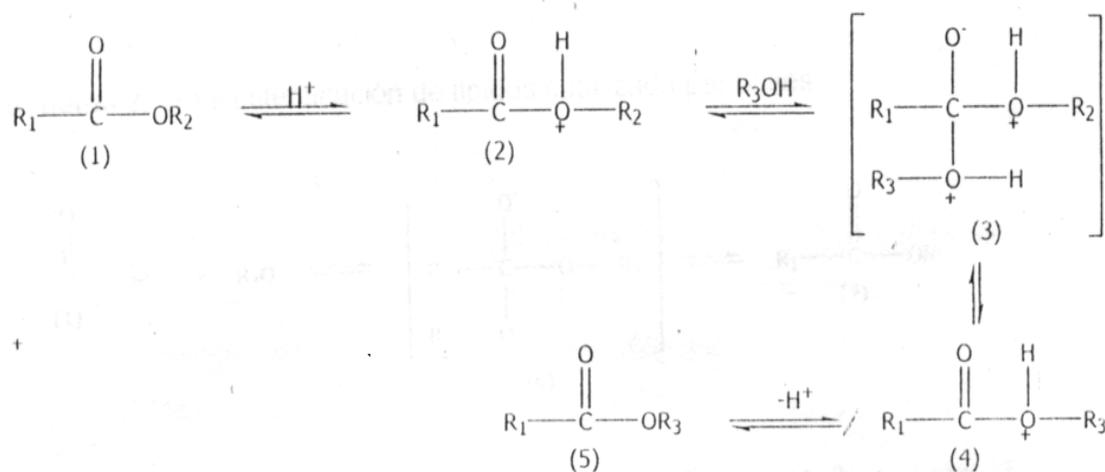
Los derivados más comunes de los FA's son los ésteres metílicos, los cuales se pueden obtener en condiciones ácidas o alcalinas sobre los lípidos aislados o sobre los FA's libres pero pueden también obtenerse directamente sobre la muestra en una sola etapa, combinando la etapa de extracción y transesterificación de los lípidos¹⁶⁶.

Los FAME's se obtienen también empleando diazometano, hidróxido de tetrametil amonio, sales de tetrametil amonio u otros catalizadores^{167,168}.

a. Transesterificación catalizada por ácido. Los FA's, constituyentes de TAG pueden ser transesterificados por un alcohol en presencia de un catalizador ácido conveniente, tal como se ilustra en el figura 7.

En la transesterificación catalizada por ácidos, primero ocurre la protonación del lípido y luego, por la adición de un alcohol, se origina el intermediario (3), el cual se puede disociar a través de un estado de transición (4), produciendo el éster (5)¹⁶⁹.

Figura 7. Transesterificación de lípidos catalizada por ácidos.



¹⁶⁶ HAMILTON, Op. cit., p. 265-268.

¹⁶⁷ CARRAPISO, Ana. *In situ* transesterification of fatty acids from Iberian pig subcutaneous adipose tissue. 2000. Vol. 56. p.159-164.

¹⁶⁸ BEVERLY, M; BASILE, F. and VOORHEES, K. Fatty acid analysis of beer spoiling microorganisms using pyrolysis mass spectrometry. 1997. Vol. 55 No. 2. p.79-82.

¹⁶⁹ CHRISTIE, William. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. 1993. p.69-75.

Las condiciones preferidas para la reacción de transesterificación son exceso de alcohol y ausencia de agua. Las condiciones libres de agua, se alcanzan por adición de sulfato de sodio anhidro o 2,2-dimetoxipropano al medio de reacción¹⁷⁰.

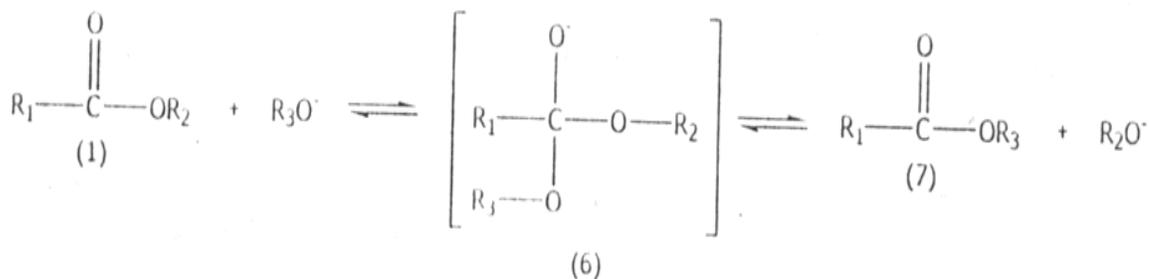
En 1969, se determinó que el ácido de Lewis BF_3 (trifluoruro de boro) al 14% en metanol era un reactivo conveniente para metilar FA's libres cuyo resultado fue aceptado por la *Association Official Analytical Chemists* (AOAC, 1966) y en 1979 por la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 1979), como método oficial¹⁷¹.

La principal ventaja de este reactivo es su fácil disponibilidad comercial, aunque es un reactivo tóxico, relativamente inestable en almacenamiento, puesto que puede formar sólidos contaminantes si el reactivo está vencido¹⁷². Otro ácido de Lewis utilizado para la esterificación de FA's es el tricloruro de aluminio (AlCl_3), el cual tiene una efectividad similar al trifluoruro de Boro¹⁷³.

Otros catalizadores utilizados son el HCl en metanol al 5% y el H_2SO_4 al 2% en metanol los cuales fueron aprobados en 1966 por el *Instrumental Committee of the American Oil Chemist's Society*¹⁷⁴.

b. Transesterificación catalizada por bases. Los lípidos pueden ser transesterificados por medio de un anión alcoholato¹⁷⁵, como se ilustra en la figura 8.

Figura 8. Transesterificación de lípidos catalizada por bases.



¹⁷⁰ Ibid., p.103-108.

¹⁷¹ METCALFE, L. and SCHMITZ, A. The rapid preparation of fatty acids methyl esters for gas chromatography analysis. 1961. Vol. 33. p. 363 – 364.

¹⁷² SHEPHERD, A. and IVERSON, J. Extraction of lipids and derivatives. 1975. p. 263 – 267.

¹⁷³ SEGURA, R. Preparation of fatty acids methyl esters by direct transesterification of lipids with aluminium chloride-methanol AlCl_3 -methanol. 1998. Vol. 441. p.99-113.

¹⁷⁴ CHRISTIE, Gas Chromatography and Lipids. Op. cit., p.380.

¹⁷⁵ CHRISTIE, Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. Op. cit. p.108-111.

En la transesterificación catalizada por bases (ver figura 8), el éster (1) en presencia de una base como el anión alcoholato (R_3O^-) forma un intermediario aniónico (6), que puede disociarse para formar el éster de partida (1) o uno nuevo (7).

La transesterificación catalizada por bases se usó antes que el reactivo BF_3 en metanol, por James y Martín en 1956. Sin embargo, el metóxido de sodio fue reconocido hasta 1978 por la *International Organization for Standardization* (ISO, 1978), como método oficial¹⁷⁶. Este reactivo es muy efectivo para esterificar TAG, glicosil digliceridos, fosfolípidos a temperatura ambiente en tan solo 5-10 minutos, pero no debe utilizarse para metilar FA's libres y ésteres de colesterol. Al igual que en los catalizadores ácidos, las mejores condiciones de reacción son cantidades grandes de alcohol, para producir el nuevo éster y ausencia de agua en el medio de reacción, la cual puede disociar irreversiblemente el intermediario de ácido libre¹⁷⁷.

c. Transesterificación in-situ (ISTE). ISTE ha sido el centro de atención durante las últimas décadas como método alternativo para analizar FA's. El concepto de transesterificación in-situ fue propuesto por Abel K.¹⁷⁸, y es usado actualmente para el análisis de pequeñas muestras de tejido (1-10mg) o pequeños volúmenes (aproximadamente 50 μ L) de fluidos biológicos¹⁷⁹.

Mediante este método, la etapa de extracción de lípidos requerida en métodos convencionales, es eliminada; por ende, el análisis de FA's se hace más rápido y es menos costoso. Muchos estudios muestran que *ISTE* frecuentemente proporciona resultados similares o mejores cuando se compara con métodos convencionales, los cuales involucran extracción previa de la grasa, seguida de transesterificación.

Sin embargo, cabe mencionar algunos inconvenientes que el proceso *ISTE* presenta para el análisis de FA's, los cuales se reflejan en la baja solubilidad de los lípidos en BF_3 / CH_3OH ; por tal motivo, se hace necesaria la adición de solventes orgánicos tales como cloruro de metileno, tolueno o tetrahidrofurano, aconsejables para adquirir reacciones rápidas y completas¹⁸⁰. Otro de los factores, es el bajo rendimiento en el proceso de transesterificación debido a la presencia de agua u otros compuestos que producen interferencia¹⁸¹.

¹⁷⁶ CHRISTIE, Gas Chromatography and Lipids. Op. cit., p. 430-442.

¹⁷⁷ BANNON, C. et al. Development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. 1982. Vol. 247. p.71-89.

¹⁷⁸ ABEL, K; SCHEMERTZING, H. and PETERSON J. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. 1963. Vol. 85. p.1039-1044

¹⁷⁹ PURIFICATION AND analysis of simple or neutral lipids, analysis of fatty acids. 2003.

¹⁸⁰ RUEDA, Elkin. Extracción y análisis de ácidos grasos presentes en la Hormiga "Culona" (*Atta laevigata*). 2004. p.28-37.

¹⁸¹ CARRAPISO, Op. cit., p.164.

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El Departamento de Nariño se distingue por tener tres unidades fisiográficas: La llanura del Pacífico que comprende algunos municipios como Tumaco, Barbacoas y El Charco. En esta zona, la pluviosidad supera los 4000 mm explicada por las masas de aire caliente procedentes del Pacífico, lo cual hace que la región sea selvática y de llanura, además de tener un piso térmico caliente en donde se siembran cultivos de cacao, palma africana, arroz y pastos forrajeros.

La región Andina es el rasgo más sobresaliente del departamento; al penetrar la cordillera de los Andes forma el nudo de los Pastos, de donde se desprenden dos ramales, la cordillera Occidental y la Centro–Oriental que presenta el altiplano de Tuquerres – Ipiales, el altiplano del Valle de Atriz y los volcanes Galeras y Doña Juana. Los suelos de esta región, se caracterizan por ser de origen volcánico, siendo ácidos y fértiles, en los cuales se siembran cultivos tales como papa, cebolla, maíz, frijón, plátano, tomate, café, caña de azúcar y varias especies frutales, productos que hacen parte fundamental de la economía de esta región. La región Andina se caracteriza además porque la mayoría de los municipios que la conforman tienen alturas entre los 1500 y 3500 msnm y se destacan los pisos térmicos medio, frío y páramo¹⁸².

El monte amazónico comprende la tercera unidad fisiográfica que presenta terrenos abruptos poco aprovechables y está cubierta por bosques húmedos. En ella se encuentra la Laguna de La Cocha. En esta zona se cultiva papa y cebolla. Además, las lluvias son superiores a los 4000 mm/año¹⁸³.

El presente trabajo se realizó con muestras de suelos de municipios que hacen parte de la región Andina tales como La Florida, Sardoná, Iles, Tuquerres, Buesaco, Ospina, Guaitarilla, Cumbal, Matituy y Pasto, debido a su gran variedad de cultivos, clima y a su diversidad de suelos.

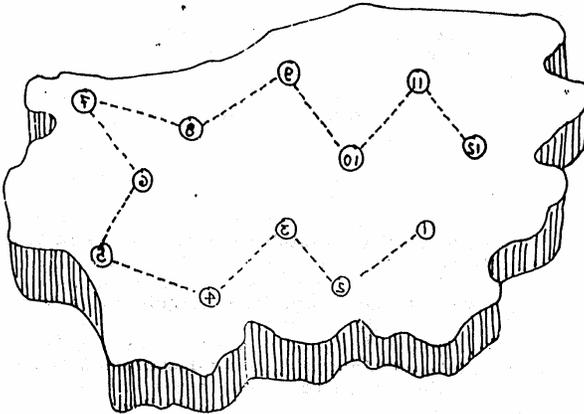
¹⁸² GONZALEZ, Alvaro. Nariño-aspectos geográficos . 1985. p. 33–75

¹⁸³ DUEÑAS, José Vicente. Nariño–93 años. 1997. p. 17-240

3.2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

3.2.1 Recolección de la muestra. En cada municipio, se seleccionó un terreno al azar y se recolectaron varias muestras en distintos sitios del lote, tratando de cubrir toda el área. Cada submuestra se recolecto a 20 cm. de profundidad (aproximadamente), y la forma de muestreo se hizo en forma de zig-zag hasta completar una muestra representativa de aproximadamente 1 Kg, tal y como se indica en la figura 9.

Figura 9. Sistema de recolección de muestras de suelo.



3.2.2 Prueba Piloto. En este estudio se consideró la caja petri como la unidad de muestreo. Con el fin de establecer el número de cajas petri representativas, se aplicó una prueba piloto con 4 muestras de suelos. De cada una de ellas se hicieron diluciones seriadas y se realizó la siembra en 3 cajas petri por dilución (en un medio de Agar nutriente). Luego, se seleccionaron las cajas petri con poblaciones entre 30-300 UFC totales.

La presencia del biopolímero se determinó mediante prueba cualitativa con Rojo nilo. Se calculó la media y desviación estándar de las poblaciones de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs), con lo cual se estableció que presentan una distribución estadística de Poisson. En consecuencia, se aplicó la fórmula:

$$N = [(100 * t_{95}) / e]^2 * (1 / \bar{X})$$

Ecuación 1

Donde:

N : número de cajas petri

t_{95} : probabilidad del 95%

e : % de error relativo al 10%

\bar{X} : valor promedio de colonias con fluorescencia

Se determinó como muestra representativa 92 cajas petri, para un total de 31 muestras de suelo. La respectiva tabla de datos se encuentra en el anexo B.

3.2.3 Tamizaje cualitativo de bacterias productoras de PHA. De cada muestra de suelo, se hicieron diluciones seriadas en base 10 hasta una dilución de 10^{-6} (30-300 UFC), y se sembró 1 mL de la última dilución en una caja petri por triplicado. Luego, se agregó el agar nutriente suplementado con Nilo rojo al 0,1% en una proporción de 1 μ L/mL de medio de cultivo. Se incubaron a 30 ± 2 °C y se evaluaron a 24 y 48 horas con luz UV a una $\lambda = 340$ nm en transiluminador. Del total de cepas, 36 de ellas dieron fluorescencia de color rosado - naranja, por cuanto se consideraron positivas para la síntesis de PHA.

Como técnica complementaria, se realizó tinción con Sudan negro y observación al microscopio de las cepas de trabajo, ya que este colorante tiene gran afinidad por la grasa y por tanto, se puede detectar el gránulo de PHA sintetizado por estas bacterias.

➤ *Purificación y preservación.* Las cepas productoras de polihidroxicanoatos, fueron purificadas en agar nutriente y la pureza de la colonia fue evaluada mediante tinción de Gram, tinción de espora y observación al microscopio. De esta manera se determinó también la característica cultural, su morfotipo y agrupación (anexo G), estableciendo un primer criterio para su respectiva clasificación bacteriana. Los respectivos procesos de tinción se muestran en el anexo C.

Posteriormente, las colonias aisladas y purificadas, se preservaron en perlas de porcelana y en caldo Glicerol a -20 °C.

3.3 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL Poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

Se implementó un método GC-FID para la identificación y cuantificación de los metil ésteres de ácidos grasos (FAME's) constituyentes del polímero de PHA por la técnica de estandarización externa.

La identificación de los ácidos grasos (FA's) contenidos en el polímero se realizó por comparación de los tiempos de retención (t_R) con los de una mezcla certificada de co-polímero (en sus correspondientes ésteres metílicos) de concentración 2500 ppm en proporción 80:20 de 3-hidroxi-butirato (3HB) y 3-hidroxi-valerato (3HV)

respectivamente. Esta mezcla fue adquirida de *BIOMER* (Biodegradable polymers, Krailing, Alemania).

3.3.1 Estandarización externa. Mediante patrones certificados, se estandarizó el método de análisis instrumental para la determinación de los tiempos de retención (t_R) y factores de respuesta (R_f) del FID para los metil ésteres del co-polímero. La curva de calibración se realizó utilizando soluciones de trabajo del co-polímero 2500 mg/L (concentración de la mezcla), cuyas concentraciones finales se reportan en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones de los metil ésteres del co-polímero en las soluciones de trabajo preparadas a partir de la solución stock de concentración 2500 ppm.

Metiléster del ácido	%	Concentración en las mezclas (ppm)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
3-hidroxi butirato (3HB)	80	1000	500	240	120	60	30	15	7.5	3.75	
3-hidroxi valerato (3HV)	20	250	125	60	30	15	7.5	3.75	-	-	

0.4 μ L de cada una de las soluciones de trabajo se inyectaron por triplicado al cromatógrafo de gases mediante inyección manual. Con los valores de concentración y las correspondientes áreas de los picos, se construyeron las curvas de calibración para cada uno de los metil ésteres, los cuales se ajustaron por regresión lineal. Los factores de respuesta (R_f) del FID se determinaron con base en la pendiente obtenida para cada recta por medio de siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{Área (cuentas)}}{\text{Concentración } (\mu\text{g/mL})} \quad \text{Ecuación 2}$$

3.3.2 Parámetros analíticos

➤ *Ajuste de parámetros.* El análisis cromatográfico del biopolímero PHB y P(3HB-co-3HV) se llevo a cabo en un GC *Shimadzu 17A* (figura 10) con un detector de ionización en llama (FID). Columna MDN-5 (30m x 0.25mm, d.i., 0.25 μ m de espesor).

Las condiciones del gas de arrastre (He) fueron: Presión 144 Kpa, velocidad lineal de 40 cm/seg, flujo interno 1 mL/min, razón split 24 y un flujo total de 52 mL/min.

La temperatura del horno se programo de 60 $^{\circ}$ C (2 min) @ 6 $^{\circ}$ C/min hasta 90 $^{\circ}$ C (1min).

Figura 10. Cromatógrafo de gases con detector FID. Universidad de Nariño.



La identificación respectiva se llevo a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (GC-MS) Shimadzu QP5000/Q5050A, con una biblioteca de espectros de masas WILEY-VCH. Columna DB5-MS (30m x 0.25mm, d.i., 0.25 μ m) con fase estacionaria ligeramente polar de 5% fenil poli (dimetilsiloxano). Con programación de temperatura de 60 $^{\circ}$ C (2 min) @ 6 $^{\circ}$ C/min hasta 90 $^{\circ}$ C (1 min).

➤ *Flujo óptimo.* Para determinar este parámetro se hizo necesario emplear una mezcla de parafinas lineales de $C_6 - C_{18}$ (anexo D), la cual se inyectó al cromatógrafo de gases con una programación de temperatura de la columna que inició a 40 $^{\circ}$ C (5min) @ 5 $^{\circ}$ C /min hasta 250 $^{\circ}$ C (15min), con un tiempo total del análisis de 62 min y un flujo total de 25 ml/min.

Del cromatograma se consideró el pico más alto y de menor ancho (C_{12} , $t_R = 20.765$ min) y calculando el número de platos teóricos y la altura de los mismos, se determinó el flujo óptimo mediante la curva de Van Deemter¹⁸⁴, realizando mediciones por triplicado. Las ecuaciones empleadas fueron las siguientes:

$$N = 16 (W / t_R)^2 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$H = L / N \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

N : número de platos teóricos
W : ancho del pico
 t_R : tiempo de retención

H: Altura del plato teórico
L: Longitud de la columna

¹⁸⁴ SKOOG, Douglas; WEST, Donald y HOLLER, James. Química Analítica. 1999. p.502-503

➤ *Nivel mínimo de detección.* Para determinar este parámetro, se prepararon soluciones del patrón estándar de 0.5, 1.0, 3.75 ppm de cada uno de los metil ésteres constituyentes del polímero, y se inyectaron por triplicado con el fin de determinar la mínima cantidad de analito detectable.

➤ *Nivel mínimo de cuantificación.* Para determinar este parámetro se prepararon soluciones de 1.0, 3.75, 7.5, 15 ppm respectivamente, que se inyectaron por triplicado para determinar la mínima cantidad cuantificable.

3.4 CUANTIFICACIÓN DEL BIOPOLÍMERO SINTETIZADO POR LAS CEPAS BACTERIANAS

3.4.1 Preparación de inóculos. De las colonias aisladas y purificadas, se prepararon inóculos de trabajo para cada cepa, utilizando para ello 50 mL de caldo de cultivo “*peptona – sacarosa – extracto de levadura*” cuyas cantidades se describen en el anexo E, y se incubaron a 30 °C con agitación constante de 100 rpm durante 24 horas. Superado este tiempo, todos los inóculos fueron ajustados a una densidad óptica de 0,02 Absorbancia mediante un espectrofotómetro *Perkin–Elmer Lambda 11* (figura 11)

Figura 11. Espectrofotómetro UV-VIS. Universidad de Nariño



3.4.2 Fermentación bacteriana. Se aplicó un diseño experimental de bloques al azar, considerando el erlenmeyer como unidad experimental con 3 réplicas por tratamiento (cepas bacterianas); los inóculos bacterianos se sembraron en 200 ml de caldo de cultivo peptona-sacarosa-extracto de levadura a una concentración del 10% de inóculo y se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

3.4.3 Extracción del biopolímero. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 3 minutos y lavadas con agua destilada en viales Eppendorf. Los pellets obtenidos se resuspendieron en hipoclorito de sodio con 5% de cloro libre y EDTA 10 mM, y se sometieron a 37 ± 2 °C durante 1 ½ h. Luego se centrifugaron a 8000 rpm durante un minuto y se hicieron lavados con agua destilada varias veces. El sedimento recuperado se resuspendió en 200 µl de acetona, se centrifugó durante 5

minutos, se desechó el sobrenadante y finalmente, se adicionaron 200 µl de etanol, repitiendo nuevamente el proceso de centrifugación^{185,186}.

Posteriormente, se secó el biopolímero a 50 °C y se conservó para su posterior análisis.

3.4.4 Esterificación de los monómeros del PHA. La muestra de biopolímero extraída se disolvió en 1 mL de cloroformo (grado cromatografía), posteriormente se esterificó el polímero en sus respectivos metil ésteres de ácido graso (FAME's) con 1 mL de agente derivatizante metanol: ácido sulfúrico (al 15% v/v). Luego se sometió a reflujo a 90°C en baño María durante dos horas y se dejó enfriar, adicionando 1 mL de cloruro de sodio al 0.1%^{187,188}. Finalmente, se deshidrató con adición de sulfato de sodio anhidro, se extrajo 0.2 µL de fase orgánica y se inyectó al cromatógrafo de gases. El mismo procedimiento se sigue para el análisis por GC-MS.

3.4.5 Cuantificación e identificación de los monómeros del polímero. La cuantificación se realizó con base en los Rf obtenido para cada metil éster del patrón de copolímero a partir de su curva de calibración. El cálculo de las concentraciones de 3HB y 3HV en mg/L de suspensión bacteriana, se realizó por medio de la ecuación 5.

$$Cx = \frac{Ax}{Rf_x} * \frac{Vf}{Vo} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

Cx : concentración del compuesto de interés (mg/L de suspensión bacteriana)

Ax : área cromatográfica del compuesto de interés (cuentas)

Rf_x : factor de respuesta del compuesto de referencia (cuentas. L/mg)

Vf : volumen final del extracto (mL)

Vo : volumen de suspensión bacteriana (mL)

La respectiva identificación se realizó por comparación de los espectros de masas obtenidos para la mezcla certificada de 3HB y 3HV por medio de GC-MS.

¹⁸⁵ KUNIKO, M, NAKAMURA, Y. and DOI, Y. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids.1988. Vol. 29. p.174-176.

¹⁸⁶ YU, Jian and SI, Yingtao. A Dynamic Study and Modeling of the Formation of Polyhydroxyalkanoates Combined with Treatment of High Strength Wastewater. 2000. p 3-4

¹⁸⁷ PHILLIP, R. et al. Formation of Short Chain Length/Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Copolymers by Fatty Acid β-Oxidation Inhibited *Ralstonia eutropha*. 2001. Vol. 3 No. 1. p. 208-213

¹⁸⁸ LAW, K. et al. Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge 2001]: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&emv=Display&dopt=pubmed_pubmed&fn.>

3.5 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO

De las 36 cepas PHA positivas con Nilo rojo, se seleccionaron 10 con mayor producción del biopolímero de acuerdo con los resultados obtenidos por cromatografía de gases, y se caracterizaron fenotípicamente.

Este proceso se llevó a cabo mediante un diseño experimental de bloques al azar en donde se consideró como unidad experimental los erlenmeyer y como factor de análisis, el aislado bacteriano. Para los análisis de varianza se utilizó el software *STATGRAPHICS PLUS* versión 4.0 ...sección 4.3 ...

3.5.1 Oxidación de Carbohidratos. Para este tipo de caracterización, se utilizó el sistema API 50 CH, el cual se desarrolló de la siguiente manera:

Las cepas purificadas, se cultivaron en un medio de agar nutritivo (anexo E) durante 24 horas a 30 °C. Superado este tiempo, se realizó una suspensión densa del microorganismo a estudiar a partir del crecimiento obtenido de una placa de agar nutritivo.

Luego, se transfirió un cierto número de gotas (n) de esa primera suspensión a 5ml de solución fisiológica estéril hasta obtener una nueva suspensión de turbidez equivalente al 2 en la escala de McFarland (anexo F).

Posteriormente se inoculó una ampolla de medio API 50CH con dos veces el número de gotas (2n) encontrado anteriormente y se procedió a homogenizar. Con esta última suspensión, se llenaron los tubos de la galería y se incubó durante 48 ± 6 horas a 36 °C, tiempo en el cual se hizo la respectiva lectura e interpretación de los datos. Los resultados obtenidos en esta prueba, constituyen el perfil bioquímico de la cepa bacteriana y por lo general son suficientes para su identificación.

3.5.2 Análisis de ácidos grasos.

➤ *Obtención de la biomasa.* El método empleado es una modificación del estandarizado por Sthal¹⁸⁹, en la cual, la biomasa se obtiene removiendo del caldo de cultivo “peptona-sacarosa-extracto de levadura” mediante centrifugación a 8000 rpm durante 5 minutos y se lava con 300 mL de agua destilada estéril para luego secar a 50°C durante 12 horas.

➤ *Esterificación de los ácidos grasos.* Se utilizó la metodología de *TRANSESTERIFICACIÓN in situ (ISTE)*, propuesta por Park y Goins¹⁹⁰, para obtener

¹⁸⁹ STHAL, P and KLUG, M. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. 1996. Vol. 62. p. 4136 – 4146.

¹⁹⁰ PARK, P. W. and GOINS, R.E. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. 1994. Vol. 59. p. 1262 – 1266.

FAME's de forma directa, sin previa extracción de la grasa. El método *ISTE* se llevó a cabo según la Norma ISO 5509 (*Animal and Vegetable Fats and Oils – Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids*), de la siguiente manera:

La muestra de biomasa (aproximadamente, 200 mg) previamente seca y homogenizada, se colocó en un tubo de ensayo con tapa rosca (16x150 mm). Seguidamente, se adicionaron 500 μ L de cloruro de metileno y 1 mL NaOH/metanol 0.5N. Una corriente de nitrógeno se usó para purgar el espacio de cabeza del tubo, para evitar procesos de oxidación. La mezcla, con agitación, se sumergió en un baño de aceite a $85 \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos, y luego se dejó enfriar.

Seguidamente se adicionaron 5 mL del complejo de trifluoruro de boro al 14% en metanol. La mezcla, con agitación, se sumergió en un baño de aceite a $85-90^{\circ}\text{C}$ durante 45 min. Posteriormente, la muestra se retiró del baño de aceite y se dejó reposar durante 5 minutos. Finalmente, se realizó la extracción de los FAME's con 3 x 1 mL de n-hexano. Del extracto orgánico se tomaron 0.5 mL, se adicionaron 1 μ L de n-hexadecano, se aforó la mezcla a 1 mL con el mismo extracto orgánico y 1 μ L de la solución fueron inyectados al cromatógrafo de gases, para su respectivo análisis.

La metodología de conversión de ácidos grasos a sus respectivos FAME's fue implementada y validada por Fuentes¹⁹¹, en el Laboratorio de Cromatografía del Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, UIS.

En la figura 12, se puede observar el dispositivo empleado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación de las diferentes muestras analizadas en este proyecto.

Figura 12. Dispositivo utilizado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación.



¹⁹¹ FUENTES, Hernán. Monitoreo de la termodegradación de ácidos grasos en aceites vegetales de consumo humano, por medio de cromatografía de gases de alta resolución y evaluación in Vitro de la actividad antioxidante de productos naturales. 1999. 131p.

➤ *Identificación de ácidos grasos.* La identificación de los FA's en las muestras de biomasa celular se realizó por comparación de los t_R de sus ésteres metílicos, con los de una mezcla certificada de FAME's *GLC10, GLC50, GLC70, GLC80 y GLC100*, adquirida de Matreya, Inc., Pennsylvania, EE.UU. Los patrones se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas que las muestras. La identificación de los FA's fue confirmada mediante sus espectros de masas.

➤ *Cuantificación de ácidos grasos.* La cuantificación promedio de los FA's, en forma de sus FAME's, se realizó empleando el método de normalización interna, según la norma ISO 5508 (Animal and Vegetable Fats and oil – Análisis by GC of Methyl Esters of Fatty Acids). La siguiente fórmula fue aplicada para calcular el contenido de un FA dado (i) (expresado como porcentaje en masa de éster metílico), mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico en relación con la suma de todos los picos:

$$FA (\%) = \frac{A_i}{\sum A} * 100(\%) \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

A_i : Área del pico correspondiente al componente i.

$\sum A$: Suma de las áreas de todos los picos.

También se llevo a cabo la cuantificación de los FA's (mg FA / 100 mg de muestra) de las cepas bacterianas en estudio, empleando la técnica de estandarización interna, donde se utilizó el n-hexadecano (sustancia de referencia para GC) de densidad 0.8356 g/mL como patrón interno.

Las áreas de los picos cromatográficos de cada uno de los FA's presentes en las muestras bajo análisis, se compararon con el área reportada para el patrón interno. Asumiendo que los factores de respuesta del detector para el patrón interno (R_f) y para los FA's de la muestra son similares, las concentraciones de cada uno de los componentes se calcularon con base en las siguientes ecuaciones:

$$C_x = C_i * \frac{V_e}{W} * 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

$$C_i = C_A * \frac{A_x}{A_A} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

C_x : Concentración de ácido graso en la muestra (mg FA /100mg muestra);

W : Peso de biomasa transesterificada (mg);

C_i : Concentración de ácido graso en el extracto final (mg/mL);

V_e : Volumen del solvente de extracción (3 mL);

C_A : Concentración del patrón interno en el extracto (mg/mL)

A_X : Área del compuesto de interés (cuentas);
 A_A : Área del patrón interno (cuentas)

➤ *Análisis cromatográfico.* El análisis cromatográfico de los FA's, presentes en las muestras bajo estudio, se realizó en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus*, equipado con un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies 5973N* y un inyector automático HP-7683; la inyección fue realizada en el modo split (1:30).

Los datos fueron procesados a través de un sistema de datos HP ChemStation 1.05, equipado con las bases de datos de espectros de masas NBS75K y Wiley 138K. Se usó una columna capilar de sílice fundida DB-23 (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU) de 60 m x 25 mm (D.I.), recubierta con una fase estacionaria de 0.25 μm de espesor. La temperatura del horno se programó de 100°C @ 2°C/min hasta 136°C (1 min) @ 7°C/min hasta 240°C (25 min.)

Como gas de arrastre se empleó helio (99.995 %, Aga Fano S.A), con un flujo de 1 mL/min, con presión de entrada en la columna de 200 kPa y velocidad lineal de 37 cm s^{-1} . Los flujos de aire e hidrógeno para el FID fueron 300 y 30 mL min^{-1} , respectivamente.

3.6 ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN y ÁREAS DE LOS PICOS OBTENIDOS POR GC

Tanto la cuantificación del polímero como de los FAME's, las muestras fueron inyectadas por triplicado al cromatógrafo de gases bajo las condiciones determinadas ...sección 3.3.2 y 3.4.2..., y se realizó el estudio estadístico de la reproducibilidad de los tiempos de retención y áreas de los picos.

Para cada parámetro, se determinó los valores promedio (\bar{X}), desviación estándar (σ) y coeficientes de variación (CV,%), cuyas ecuaciones se muestran a continuación:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{Ecuación 9}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$\text{CV} = \frac{\sigma}{\bar{X}} * 100\% \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

\bar{X} = valor promedio de la variable X (t_R o área);

X_i = valor "iesimo" obtenido para la variable X en una medición;

n = número de mediciones;

σ = desviación estándar;

CV = coeficiente de variación (%).

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs

La síntesis de PHA por parte de las cepas aisladas de los diferentes suelos del Departamento de Nariño, fue evaluada mediante el uso del colorante Nilo rojo, debido a la fluorescencia de color rosado de diferentes intensidades (figura 13) que emite la colonia cuando es irradiada con luz UV causado por la absorción y acumulación del colorante en los gránulos de PHA¹⁹².

Por lo anterior, el uso de este colorante fue indispensable en la selección de las especies bacterianas productoras del polímero, determinando un total de 36 cepas de estudio PHA positivas.

Como técnica complementaria, se utilizó tinción con Sudan Negro ya que éste es un colorante liposoluble que permite revelar la localización de los depósitos de grasa o gránulos PHA¹⁹³, por cuanto del total de cepas PHA positivas en estudio, se observó la presencia de gránulos del polímero teñido de un color violeta oscuro (figura 14) a excepción de las cepas *OSM-32*, *CUM-1* y *CUM-42* cuya tinción no fue detectada al microscopio debido a la interferencia de las partículas del colorante. Esto permite afirmar que el colorante Nilo rojo tiene una mayor afinidad por el PHA que el Sudán negro, por cuanto es más selectivo para este tipo de determinaciones¹⁹⁴.

Mediante tinción de Gram, se determinó que 17 de ellas corresponden a bacilos Gram-positivos casi todas con presencia de espora y las 19 restantes, bacilos Gram-negativos.

En la tabla 6, se muestra el número de cepas PHA positivas por cada municipio.

¹⁹² . CARBALLO, Op. cit., p. 40

¹⁹³ VAL, Op. cit., p. 9

¹⁹⁴ PAGE, Op. cit., p.216.

Figura 13. Detección cualitativa de PHA, en medio de cultivo basal suplementado con Nilo rojo e irradiado con luz UV



Figura 14. Tinción de bacterias con Sudan negro para observar gránulo de PHA. Observado a 1000X.

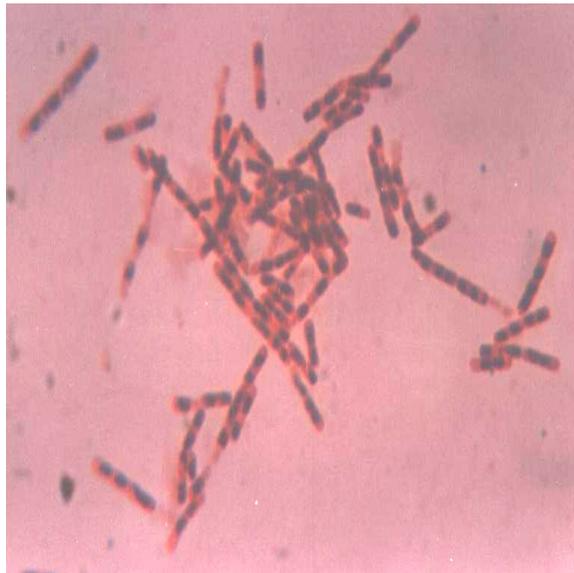


Tabla 6. Aislamiento de Bacterias productoras de PHA mediante técnica cualitativa de Nilo rojo.

<i>Municipio</i>	<i>Identificación Cepa</i>	<i>Tinción Gram</i>	<i>Total cepas PHA (+)</i>
FLORIDA	FLB – 1	+	4
	FLO – 1	+	
	FLO – 2	-	
	FLO – 3	-	
ILES	ILE – 1	-	4
	ILE – 2	-	
	ILE – 3	+	
	ILE – 6	+	
SANDONÁ	SP – 1	+	4
	SP – 40	-	
	SP – 41	-	
	SP – 28	-	
TUQUERRES	TUQ – 1	+	3
	TUQ – 2	+	
	TUQ – 3	+	
BUESACO	BUE – 10	-	3
	BUE – 30	+	
	BUE – 33	-	
OSPINA	OSM – 1	+	3
	OSM – 32	-	
	OSM – 34	-	
GUAITARILLA	GSJ – 3	-	4
	GSJ – 4	-	
	GSJ – 5	-	
	GSJ – 6	+	
CUMBAL	CUM – 1	-	4
	CUM – 2	+	
	CUM – 15	-	
	CUM – 42	+	
MATITUY	M 17-1	-	4
	M 17-2	+	
	M 38	+	
	M 32	+	
PASTO	PCO – 1	-	3
	PCO – 2	+	
	PCO – 3	-	
TOTAL CEPAS			36

En el anexo G, se muestran las características culturales y morfológicas de cada una de las cepas silvestres que dio positiva la presencia del biopolímero mediante la técnica de cromatografía de gases.

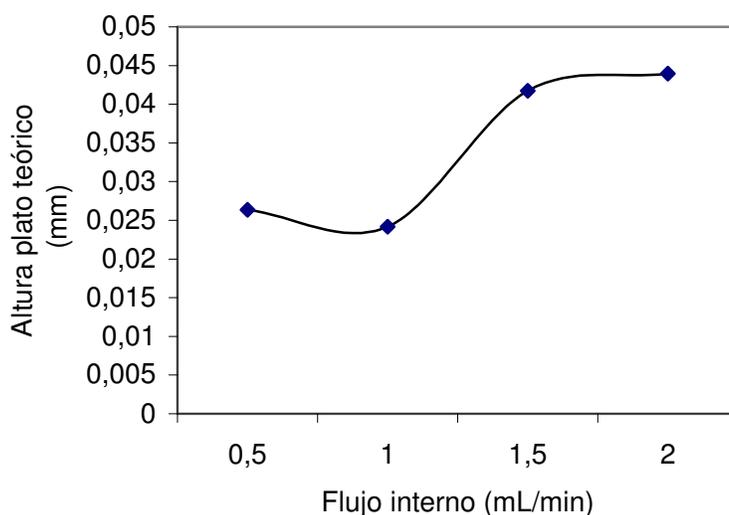
4.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA

4.2.1 *Flujo óptimo.* El número de platos teóricos y la altura de los mismos se calcularon mediante la aplicación de las ecuaciones 3 y 4 referenciadas en ... sección 3.3.2 ... Con base en los datos presentados en la tabla 7, se construyó la correspondiente curva de Van Deemter (figura 15).

Tabla 7. Datos promedio para la determinación del flujo óptimo.

Flujo Interno (mL/min)	t_R (min)	W (min)	N	H (mm)
0.5	27.407	0.325	1.138×10^5	2.637×10^{-2}
1.0	23.523	0.267	1.242×10^5	2.416×10^{-2}
1.5	21.782	0.325	7.187×10^4	4.174×10^{-2}
2.0	20.707	0.317	6.827×10^4	4.394×10^{-2}

Figura 15. Curva de Vann Deemter



De acuerdo con la gráfica anterior, el flujo óptimo es 1 mL/min., ya que a este flujo el valor de la altura del plato teórico es más bajo (2.416×10^{-2} mm), lo que indica que la columna presenta mayor número de platos teóricos y por ende, es mayor la eficiencia de la misma.

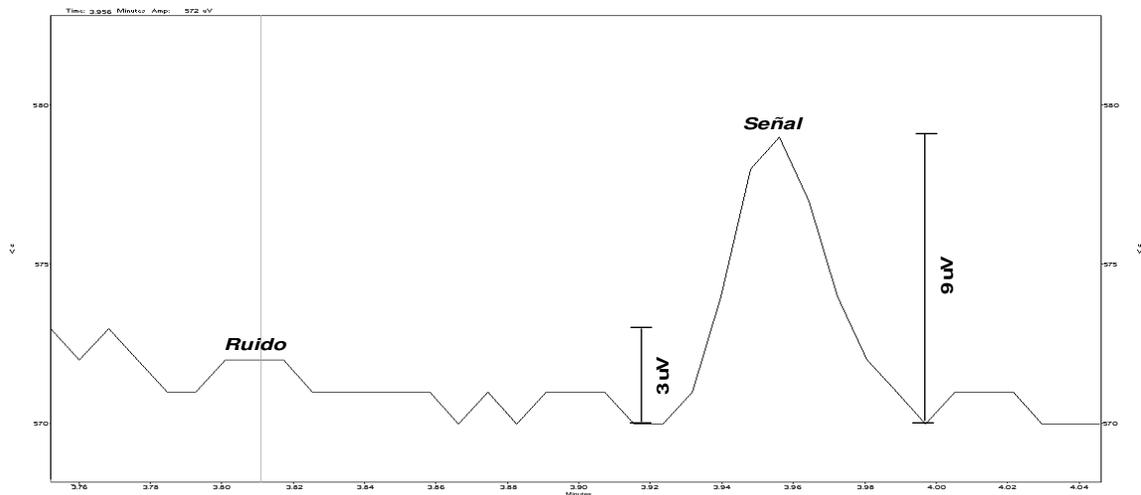
4.2.2 *Nivel mínimo de detección.* Una vez determinado el flujo óptimo, se hicieron las respectivas inyecciones de cada solución ...sección 3.3.2... para evaluar la relación S/N que para este caso tuvo un valor de 3.0 y 3.3 para los metil éster 3HB y 3HV respectivamente.

De acuerdo con el concepto propuesto por HUBER¹⁹⁵, quien afirma que en cromatografía, el límite de detección es la cantidad inyectada que da lugar a un pico con una altura al menos tres veces mayor que el ruido de la línea base de acuerdo con la siguiente ecuación: $S/N = 3$ en donde, S: altura del pico y N: altura de la señal del ruido.

Por tanto, los valores obtenidos en esta determinación cumplen con la relación establecida para cromatografía, por lo que se determinó que la mínima cantidad detectable del estándar para el detector FID corresponde a 1.0 mg/L para ambos compuestos, como se indica en la figura 16.

4.2.3 *Nivel mínimo de cuantificación.* Teniendo en cuenta el análisis cromatográfico de cada solución ... sección 3.3.2 ... como se observa en la tabla 8, se determinó que la mínima cantidad cuantificable de la mezcla estándar para el detector FID corresponde a 3.75 mg/L para los dos compuestos, por cuanto para esta determinación se requiere que las alturas del pico sean de 10 a 20 veces mayores que el ruido de la línea base¹⁹⁶.

Figura 16. Determinación de la relación señal/ruido - nivel mínimo de detección.



¹⁹⁵ HUBBER, L. Buenas Prácticas de Laboratorio y buenas prácticas de fabricación actuales. 1994. 160 p.

¹⁹⁶ Ibid., p.67

Tabla 8. Datos obtenidos para el nivel mínimo de cuantificación.

Metil éster del ácido	Concentración	Altura (μV)	Altura Ruido (μV)	S/N
3-hidroxi-butirato	1,00 mg/L	9	3	3
	3,75 mg/L	41.2	2.8	14.7
	7,50 mg/L	208	2	104
3-hidroxi-valerato	1,00 mg/L	10	3	3.3
	3,75 mg/L	46.6	2.6	17.9
	7,50 mg/L	252	2	126

4.2.4 *Factor de respuesta (Rf)*. La determinación del factor de respuesta (figura 17 y 18) se realizó por medio de la pendiente de la recta asociada a la ecuación 2.

Figura 17. Determinación del factor de respuesta para el metil éster 3HB

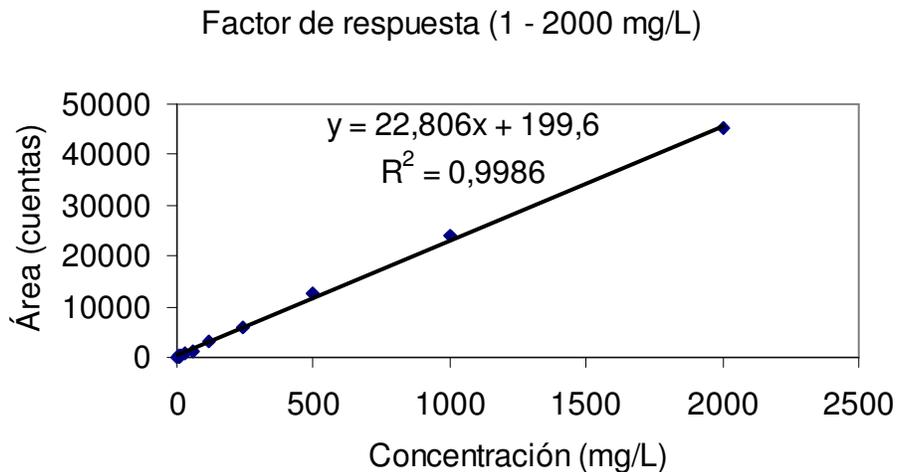
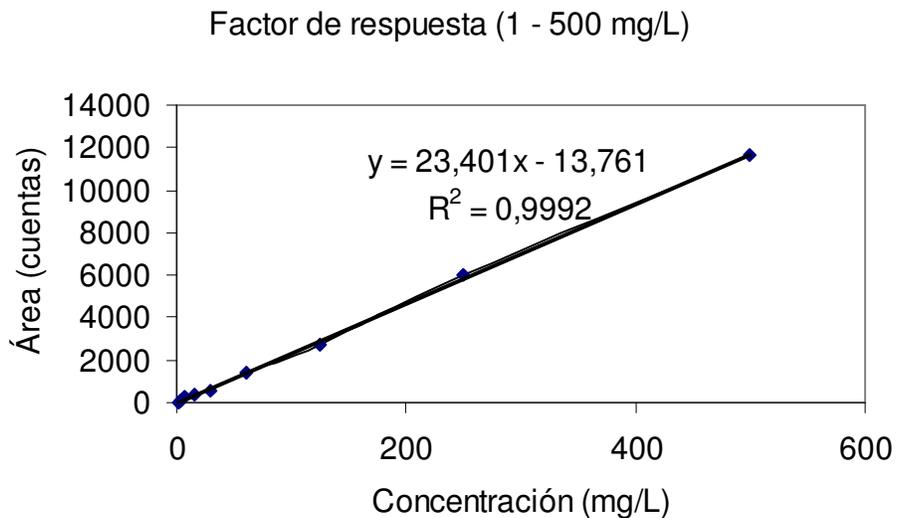


Figura 18. Determinación del factor de respuesta para el metil éster 3HV



De acuerdo a las respectivas ecuaciones, se estima que el factor de respuesta necesaria para el proceso de cuantificación de los metil ésteres 3HB y 3HV corresponden a 22.806 y 23.401 cuentas x L/mg respectivamente.

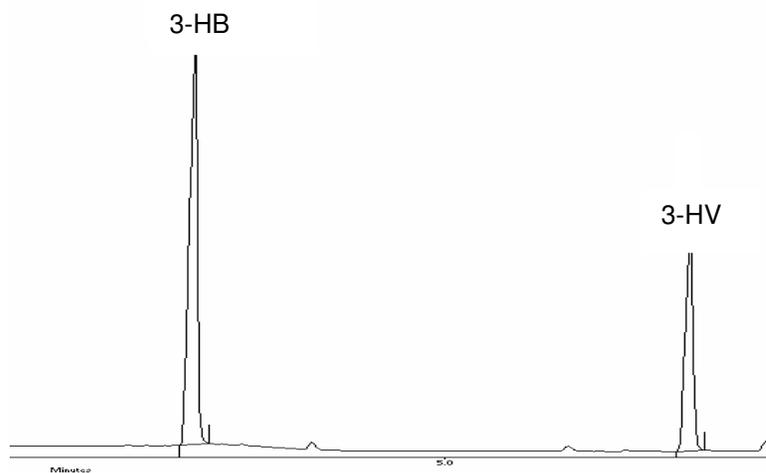
Los correspondientes resultados cromatográficos de este análisis se muestran en el anexo H. Considerando que el coeficiente de variación es una estimación del error relativo que permite comparar la precisión de los resultados, la repetibilidad de las áreas cromatográficas presentan valores aceptables (< 5%) para los dos tipos de compuestos, por lo que están dentro de los parámetros reglamentados en las Buenas Prácticas de Laboratorio¹⁹⁷.

4.2.5 *Tiempos de retención (t_R)*. En la tabla 9 se reportan los valores de tiempos de retención (t_R) para los metil ésteres 3HB y 3HV empleados en el método de estandarización externa, así como el estudio estadístico para los mismos: desviación estándar (σ) y coeficiente de variación (CV%).

Como puede apreciarse en la tabla 9, el coeficiente de variación para los dos casos no sobrepasa el 0.221%, indicando una alta reproducibilidad en las inyecciones, y además, fue inferior al valor exigido por las Buenas Prácticas del Laboratorio (GLP), que establecen en un 2% el valor máximo permitido para la inyección manual de muestras al GC.

En la figura 19 se muestra el cromatograma típico, obtenido por GC de la mezcla certificada de los metil ésteres 3-Hidroxibutirato y 3-Hidroxivalerato empleada en este proyecto.

Figura 19. Cromatograma típico obtenido de la mezcla certificada de ésteres metílicos de 3HB y 3HV tomado en el cromatógrafo de la Universidad de Nariño.



¹⁹⁷ Ibid., p. 69

Tabla 9. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención (t_R) de metil ésteres 3HB y 3HV en una columna MDN-5 (30m x 0.25mm, d.i, 0.25 μ m).

Metiléster del ácido	t_R , min*	σ	CV, %
3-hidroxi butirato	3,947	0,009	0,221
3-hidroxi valerato	6,017	0,007	0,120

* Valor promedio ($n = 12$)

4.3 CUANTIFICACIÓN DEL BIOPOLÍMERO SINTETIZADO POR LAS CEPAS BACTERIANAS

El proceso de cuantificación de los metil ésteres constituyentes del co-polímero se llevo a cabo de acuerdo con la ecuación 5 ...sección 3.4.5... dado que V_f y V_o corresponden a 1mL y 200 mL y los valores de R_f para 3HB y 3HV 22,806 y 23,401 cuentasxL/mg respectivamente. En la tabla 10 se muestra las respectivas concentraciones del co-polímero producidos por las cepas silvestres aisladas en el Departamento de Nariño.

En la figura 20 se muestra el perfil cromatográfico de una de las cepas en estudio que produjo los dos monómeros del polímero.

Figura 20. Perfil cromatográfico de los constituyentes del co-polímero obtenido por GC de la Cepa M17-2.

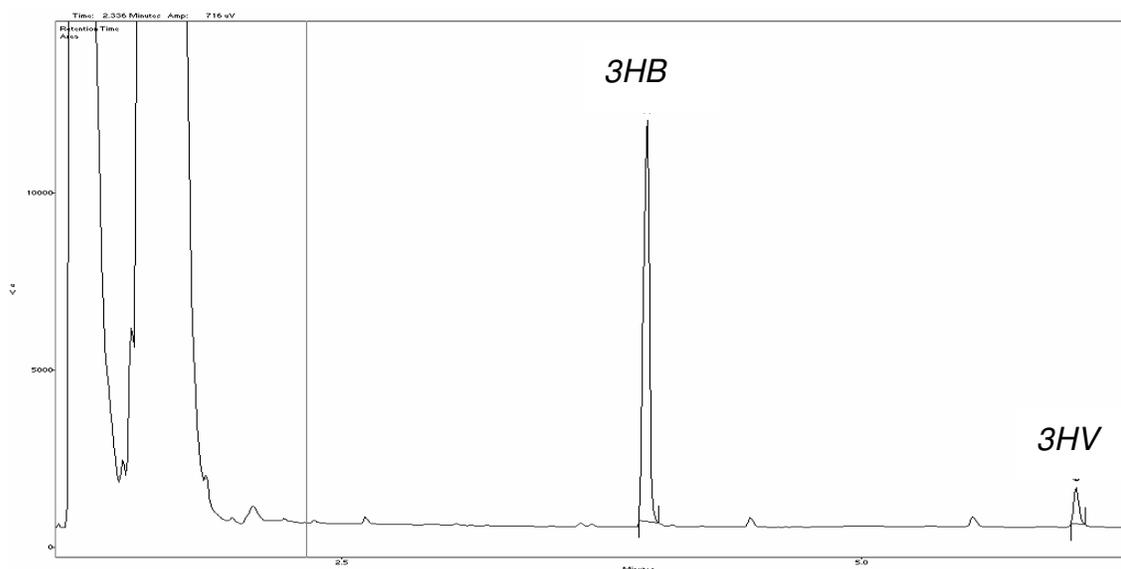


Tabla 10. Concentración promedio $\pm \sigma$ de los compuestos constituyentes del co-polímero producidos por las cepas bacterianas en estudio.

No.	Cepa	Concentración (mg/L de suspensión bacteriana)*	
		<i>3-Hidroxitirato</i>	<i>3-Hidroxitirato</i>
1	BUE -30	0,179 \pm 0,007	0,067 \pm 0,003
2	BUE -33	0,239 \pm 0,021	0,071 \pm 0,004
3	CUM -1	0,098 \pm 0,007	-
4	CUM -42	0,212 \pm 0,010	-
5	FLB -2**	0,429 \pm 0,016	-
6	FLO -3	0,196 \pm 0,018	-
7	GSJ -3	0,124 \pm 0,006	-
8	GSJ -4	0,198 \pm 0,008	-
9	GSJ -5	0,065 \pm 0,004	-
10	GSJ -6**	5,008 \pm 0,096	1,286 \pm 0,018
11	ILE -3**	3,995 \pm 0,244	0,387 \pm 0,005
12	ILE -6**	1,234 \pm 0,068	0,325 \pm 0,009
13	M 17-1	0,088 \pm 0,004	0,022 \pm 0,001
14	M 17-2**	7,400 \pm 0,245	0,742 \pm 0,049
15	M -32**	2,469 \pm 0,150	0,410 \pm 0,011
16	M -38**	1,901 \pm 0,112	0,188 \pm 0,006
17	OSM -1**	0,405 \pm 0,033	-
18	OSM -32	0,198 \pm 0,005	-
19	OSM -34	0,112 \pm 0,005	-
20	PCO -3	0,124 \pm 0,004	-
21	SP -1**	0,596 \pm 0,014	-
22	SP -28	0,069 \pm 0,005	-
23	SP -40	0,141 \pm 0,009	-
24	SP -41	0,100 \pm 0,004	-
25	TUQ -3**	2,953 \pm 0,127	0,163 \pm 0,003

* Valor promedio ($n=3$)

** Cepas Gram (+), con mayor producción de polihidroxitirato.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las mediciones cromatográficas para los metil ésteres 3HB y 3HV, se determinó que estos presentan una alta reproducibilidad y confiabilidad en la cuantificación del co-polímero, ya que los coeficientes de variación para t_R y áreas estuvieron por debajo del 2 y 10% respectivamente, cumpliendo así con los requisitos de GLP. Las respectivas tablas de datos se muestran en el anexo I.

Para las cepas *FLO-1*, *FLO-2*, *IPI-1*, *IPI-2*, *TUQ-1*, *TUQ-2*, *BUE-10*, *BUE-33*, *CUM-15*, *PCO-1*, *PCO-2* no se detectó ningún pico cromatográfico, puesto que la cantidad extraída del biopolímero puede haber estado en niveles de trazas inferiores al nivel mínimo de detección del Cromatógrafo de gases y/o puede ser que la cepa no haya sintetizado el biopolímero. Por lo cual la detección cualitativa con Nilo rojo no es una técnica muy apropiada y selectiva para este tipo de determinaciones ya que este colorante puede interactuar y fluorecer con sustancias de propiedades químicas similares a las del biopolímero, interfiriendo en el análisis; razón por la cual se considera la técnica de cromatografía de gases como una opción mas viable para este tipo de investigación.

En la tabla 11 se muestra el análisis de varianza (ANDEVA) de la aplicación del diseño experimental irrestrictamente al azar (DIA) para las 25 cepas (tratamientos) productoras del biopolímero con el fin de determinar si existen diferencias en cuanto a la producción del PHA por parte de las bacterias en estudio.

Tabla 11. Datos obtenidos del análisis de Varianza de las 25 cepas bacterianas PHA positivas con GC-FID.

Análisis de Varianza					
Fuente variación	S.C	Gl	C.M	F-cal	F-tab
Tratamiento	330.996	24	13.7915	946.06	1.745
Error exp.	0.72889	50	0.0145778		
Total (Corr.)	331.725	74			

Suma de cuadrados (S.C)

Grados de libertad (Gl)

Cuadrados medios (C.M)

F calculada (F-cal)

F tabulada (F-tab)

De acuerdo los resultados obtenidos del ANDEVA, la $F\text{-cal} > F\text{-tab}$ determinando que si existen diferencias en cuanto al nivel de producción de PHA por parte de las cepas en estudio.

Con el fin de determinar cuales de las cepas en estudio sobresalen dentro del parámetro establecido, se aplicó la prueba de comparación de medias (Prueba de Duncan) con un nivel de confianza del 95%. Los respectivos resultados se indican en la tabla 12.

Tabla 12. Prueba de rango múltiple de Duncan del nivel de producción de PHA por parte de las 25 cepas bacterianas en estudio.

Método: 95.0 % LSD			
Cepa	Repetición	Medios	Homogeneidad entre las cepas bacterianas en la producción PHA
GSJ 5	3	0.0653333	X
SP 28	3	0.0693333	X
CUM 1	3	0.096	X
SP 41	3	0.0996667	X
M 17-1	3	0.110667	X
OSM 34	3	0.111667	X
GSJ 3	3	0.124	X X
PCO 3	3	0.124	X X
SP 40	3	0.140667	X X
FLO 3	3	0.195667	X X
GSJ 4	3	0.197333	X X
OSM 32	3	0.197667	X X
CUM 42	3	0.212	X X X
BUE 30	3	0.246333	X X X X
BUE 33	3	0.31	X X X
OSM 1	3	0.405	X X X
FLB 2	3	0.428667	X X
SP 1	3	0.595333	X
ILE 6	3	1.55933	X
M 38	3	2.08867	X
M 32	3	2.87867	X
TUQ 3	3	3.11567	X
ILE 3	3	4.502	X
GSJ 6	3	6.29467	X
M 17-2	3	8.14167	X

Esto indica que las bacterias más productoras de biopolímero pertenecen al género *Bacillus Gram (+)*, ya que las concentraciones de PHA producidas por éstas superan en forma considerable a las determinadas para las Gram negativas. Por lo anterior, se consideró como objeto de estudio las 10 cepas bacterianas Gram positivas de mayor producción de polihidroxicanoatos, para caracterizarlas de acuerdo al perfil bioquímico y lipídico ...sección 4.4.1 - 4.4.2... respectivamente.

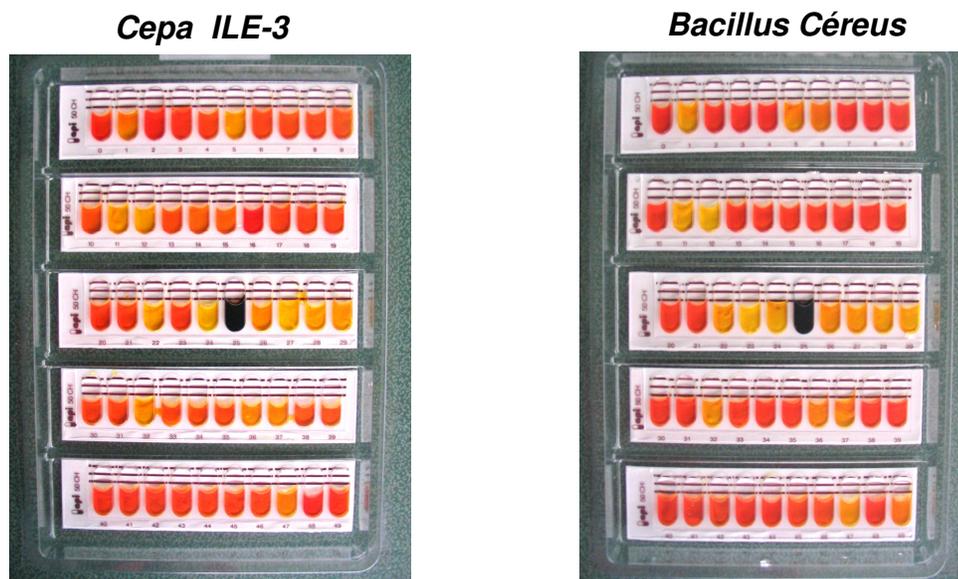
4.4 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CEPAS SILVESTRES SELECCIONADAS CON MAYOR PRODUCCIÓN DE PHA

4.4.1 Oxidación de carbohidratos. Los resultados obtenidos del perfil bioquímico aplicando el Sistema API 50CH (figura 21), indican que las cepas en estudio corresponden a las especies *Bacillus mycoides* a excepción de las cepas ILE-6 y TUQ-3, las cuales pertenecen a *Bacillus cereus*.

Además, de acuerdo con las descripciones de *Bacillus* que se encuentran en el *Manual de Microbiología Bacteriana de Bergey's*, tales como las características culturales, su morfología microscópica, forma de agrupación, tinción de Gram y tinción de spora de cada una de las cepas en estudio, confirman los resultados obtenidos mediante el sistema de oxidación de carbohidratos¹⁹⁸. Como testigo para estas pruebas se utilizó una cepa de *Bacillus cereus* caracterizada por el laboratorio de Biología de la Universidad de Nariño.

En la tabla 13, se muestra la oxidación positiva de 16 azúcares (de un total de 49) que fueron fermentados por las 10 cepas de estudio. Los resultados fueron comparados con los reportados por las fichas técnicas API 50CH.

Figura 21. Perfil bioquímico obtenido mediante pruebas API 50 CH.



¹⁹⁸ BERGEY, Op. cit., p.1122.

Tabla 13. Porcentajes relativos en la oxidación de azúcares.

Cepa	Azúcar Oxidado							
	1	5	10	11	12	22	24	25
	GLY	RIB	GAL	GLU	FRU	NAG	ARB	ESC
ILE - 3	20	95	20	100	100	100	95	100
M 17-2	10	100	20	100	95	100	90	100
M - 32	10	100	20	100	100	100	90	100
M - 38	20	95	25	100	50	100	80	100
OSM - 1	15	95	25	100	100	100	80	100
ILE - 6	25	100	10	100	100	100	90	100
FLB - 2	20	100	25	100	100	100	95	100
GSJ- 6	10	90	25	100	100	100	80	100
SP -1	20	95	20	100	100	100	80	100
TUQ - 3	30	100	10	100	100	100	90	100
B. Cereus*	40	95	10	100	95	100	80	93
B. Cereus**	44	98	7	100	99	96	80	85
B. Mycoides**	15	100	31	100	98	100	62	56

Continuación de la tabla 13.

Cepa	Azúcar Oxidado							
	26	27	28	31	32	36	37	47
	SAL	CEL	MAL	SAC	TRE	AMD	GLYG	GNT
ILE - 3	100	80	100	25	100	100	100	5
M 17-2	100	20	100	20	100	100	100	5
M - 32	100	85	100	20	100	95	100	10
M - 38	100	5	100	10	100	100	100	5
OSM - 1	100	80	100	20	100	98	95	5
ILE - 6	100	80	100	30	100	100	95	20
FLB - 2	100	100	100	20	100	100	100	5
GSJ- 6	100	70	100	20	100	100	100	5
SP -1	100	80	100	20	100	100	100	10
TUQ - 3	100	60	100	30	100	100	95	20
B. Cereus*	100	80	100	25	100	100	100	20
B. Cereus**	65	56	100	59	100	100	96	33
B. Mycoides**	62	43	100	50	100	100	99	14

* Testigo (cepa caracterizada en la Universidad de Nariño)

** Datos reportados por las fichas técnicas API 50 CH.

Componentes activos oxidados por las cepas de trabajo: GLY (glicerol), RIB (D-ribosa), GAL (D-galactosa), GLU (D-glucosa), FRU (D-fructosa), NAG (N-acetilGlucosamina), ARB (arbutina), ESC (esculina citrato férrico), SAL (salicina), CEL (D-celobiosa), MAL (D-maltosa), SAC (D-sacarosa), TRE (D-trehalosa), AMD (almidón), GLYG (glicógeno), GNT (gluconato potasico).

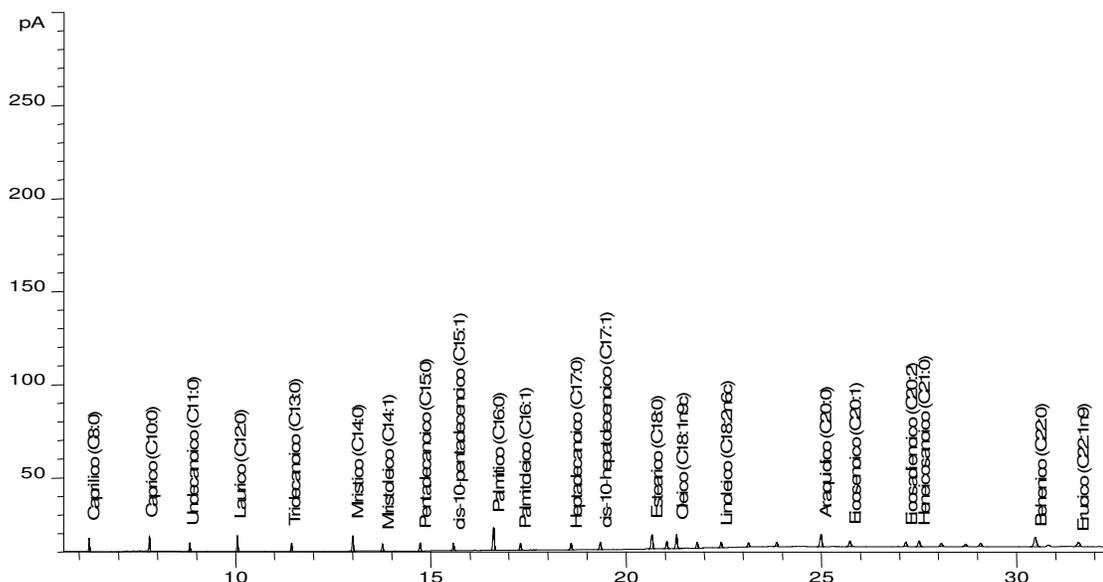
4.4.2 Perfil de ácidos grasos.

➤ *Parámetros cromatográficos.*

a. Tiempos de retención (t_R). En el anexo J se reportan los valores de t_R obtenidos para los FAME's de la mezcla certificada, empleada para realizar la identificación de los FA's en las muestras de biomasa bacteriana. Como puede apreciarse en dicho anexo, los coeficientes de variación para todos los FA's en forma de sus ésteres metílicos, estuvieron por debajo del 0.022%.

Estos valores no sobrepasaron el valor máximo permitido por las Buenas Prácticas de Laboratorio, que establecen un valor máximo de 2%, lo que indica una alta reproducibilidad en el sistema de inyección y, por ende, una confiabilidad en la identificación de los FA's en las muestras, al emplear el método de comparación de tiempos de retención. En la figura 22, se muestra el cromatograma típico, obtenido por GC, de la mezcla certificada de FAME's empleada en este proyecto.

Figura 22. Cromatograma típico obtenido por GC de la mezcla certificada de FAME's.



b. Tiempos de retención relativos (t_{RR}). En el anexo K se reportan los valores de tiempos de retención relativos obtenidos para la mezcla certificada de FAME's. Un patrón certificado de n-hexadecano (sustancia de referencia para GC) se utilizó como estándar interno (Istd).

El análisis estadístico obtenido para los t_{RR} de la mezcla certificada de FAME's presentó desviación estándar (σ) y coeficientes de variación (CV, %) iguales e inferiores en algunos casos a los que se obtuvieron para los t_R .

Estos resultados demuestran la ventaja de emplear estándar interno (Istd), ya que la presencia de este compuesto en las muestras bajo estudio no afecta la reproducibilidad y confiabilidad en la identificación cromatográfica.

c. Áreas y áreas relativas. Los valores de las áreas y áreas relativas de los patrones certificados de FAME's se muestran en el anexo L.

Los resultados muestran alta reproducibilidad en la medición de las áreas A_{FAME} (< 5.72%), cumpliendo así con las exigencias de las Buenas Prácticas de Laboratorio, que recomiendan valores inferiores al 10% para las áreas de los picos cromatográficos.

➤ Contenido de ácidos grasos de las cepas bacterianas en estudio. El proceso de cuantificación de los FA's se llevó a cabo empleando n-hexadecano como Istd, por medio de CG-FID.

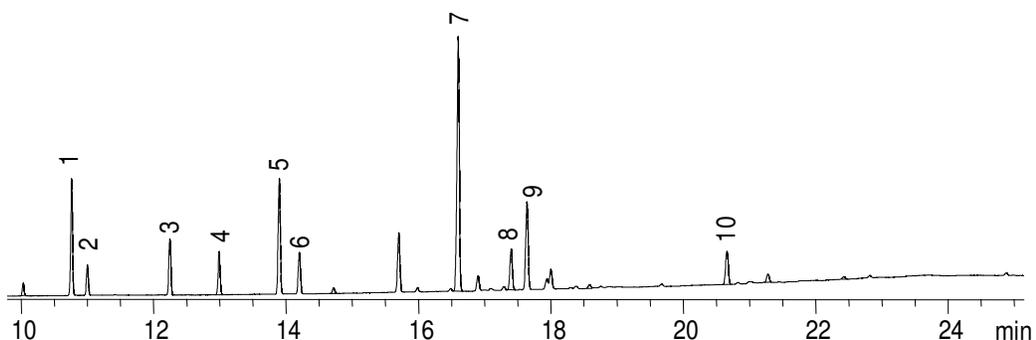
En los análisis cromatográficos, se determinaron 10 metil ésteres contenidos en las cepas bacterianas tal y como se muestran en la figura 23, de los cuales, 6 fueron identificados mediante comparación con los espectros de las bases de datos, Wiley 138 y NBS 74K del equipo GC-MSD *Agilent Technologies 6890 Plus*, MSD 5973, con un 93-95% de coincidencia, ya que estos son ácidos grasos ramificados que no se encontraban en la mezcla certificada de FAME's.

Los respectivos datos de áreas y análisis de reproducibilidad para los FAME's se muestran en el anexo M.

Las concentraciones relativas al Istd y concentraciones relativas (%) de cada uno de los FAME's se calcularon de acuerdo con las ecuaciones 6, 7 y 8 teniendo en cuenta que los valores de V_e , W corresponden a 1 mL y 200 ± 2 mg respectivamente.

En las tablas 15 y 16 se muestran las concentraciones de estos compuestos.

Figura 23. Perfil cromatográfico de los FAME's de la Cepa M17-2.



En la tabla 14, se muestra los tiempos de retención de los compuestos obtenidos por GC.

Tabla 14. Tiempos de retención de los FAME's de la cepa M17-2 obtenidos por GC-FID.

Pico	Fórmula	Éster metílico del ácido:	$t_R \pm \sigma$, min.*
1	<i>i</i> -C13:0	11-metildodecanoico	10,769 \pm 0,004
2	<i>ai</i> -C13:0	10-metildodecanoico	11,004 \pm 0,003
3	<i>i</i> -C14:0	12-metiltridecanoico	12,250 \pm 0,003
4	C14:0	Tetradecanoico (Mirístico)	12,993 \pm 0,005
5	<i>i</i> -C15:0	13-metiltetradecanoico	13,901 \pm 0,002
6	<i>ai</i> -C15:0	12-metiltetradecanoico	14,204 \pm 0,003
7	C16:0	Hexadecanoico (Palmitico)	16,604 \pm 0,002
8	C16:1	9-hexadecenoico (Palmitoleico)	17,403 \pm 0,002
9	<i>ai</i> -C17:0	14-metilhexadecanoico	17,643 \pm 0,004
10	C18:0	Octadecanoico (Esteárico)	20,661 \pm 0,003

* Valor promedio ($n=3$)

i: iso

ai: anteiso

Tabla 15. Concentración promedio de FA's presentes en las 10 cepas bacterianas en estudio.

No.	Cepa	Concentración* (mg FA's / 100mg de biomasa)				
		<i>i</i> -13:0	<i>ai</i> -13:0	<i>i</i> -14:0	14:0	<i>i</i> -15:0
1	ILE-3	0,167	0,062	0,107	0,102	0,241
2	M17-2	0,182	0,078	0,120	0,091	0,256
3	M32	0,187	0,074	0,115	0,063	0,261
4	M38	0,179	0,067	0,099	0,058	0,277
5	GSJ-6	0,214	0,087	0,112	0,098	0,218
6	FLB-2	0,177	0,084	0,095	0,103	0,252
7	ILE-6	0,165	0,083	0,101	0,095	0,262
8	OSM- 1	0,169	0,092	0,119	0,099	0,224
9	SP-1	0,197	0,072	0,131	0,146	0,274
10	TUQ-3	0,179	0,070	0,116	0,088	0,273
11	B. Céreus	0,178	0,081	0,110	0,106	0,246

Continuación de la Tabla 15.

No.	Cepa	Concentración* (mg FA's / 100mg de biomasa)				
		<i>ai</i> -15:0	16:0	16:1	<i>ai</i> -17:0	18:0
1	ILE-3	0,112	0,773	0,078	0,211	0,140
2	M17-2	0,122	0,719	0,093	0,159	0,100
3	M32	0,125	0,624	0,061	0,222	0,117
4	M38	0,129	0,415	0,094	0,236	0,112
5	GSJ-6	0,123	0,885	0,099	0,214	0,167
6	FLB-2	0,110	0,693	0,116	0,182	0,096
7	ILE-6	0,118	0,844	0,095	0,180	0,068
8	OSM- 1	0,128	0,919	0,102	0,225	0,174
9	SP-1	0,111	1,033	0,116	0,193	0,153
10	TUQ-3	0,115	0,739	0,075	0,181	0,119
11	B. Céreus	0,118	0,771	0,104	0,187	0,096

* Valor promedio (n=3)

Tabla 16. Composición relativa (%) promedio de los FA's presentes en las 10 cepas bacterianas productoras de PHA.

Cepa	Cantidad relativa promedio* (%)									
	<i>i</i> -13:0	<i>ai</i> -13:0	<i>i</i> -14:0	14:0	<i>i</i> -15:0	<i>ai</i> -15:0	16:0	16:1	<i>ai</i> -17:0	18:0
ILE -3	8,4	3,1	5,4	5,1	12,1	5,6	38,8	3,9	10,6	7,0
M17-2	9,5	4,0	6,2	4,8	13,4	6,3	37,4	4,9	8,3	5,2
M 32	10,1	4,0	6,2	3,4	14,1	6,8	33,8	3,3	12,0	6,3
M 38	10,7	4,0	6,0	3,5	16,6	7,7	24,9	5,6	14,2	6,8
GSJ-6	9,7	3,9	5,0	4,4	9,8	5,6	39,9	4,4	9,7	7,5
FLB-2	9,3	4,4	5,0	5,4	13,2	5,7	36,3	6,1	9,5	5,0
ILE -6	8,2	4,1	5,0	4,7	13,0	5,9	42,0	4,7	8,9	3,4
OSM- 1	7,5	4,1	5,3	4,4	10,0	5,7	40,8	4,5	10,0	7,7
SP-1	8,1	3,0	5,4	6,0	11,3	4,6	42,6	4,8	7,9	6,3
TUQ-3	9,2	3,6	6,0	4,5	14,0	5,9	37,8	3,8	9,2	6,1
B.cereus	8,9	4,1	5,5	5,3	12,3	5,9	38,6	5,2	9,3	4,8

* Valor promedio (n=3)

La distribución de ácidos grasos extraídos de las 10 cepas en estudio confiere mayor importancia a la presencia de ácidos grasos saturados - ramificados (*i*C13:0, *ai*C13:0, *i*C14:0, *i*C15:0, *ai*C15:0, *ai*C17:0) en una proporción del 60% en comparación con los demás constituyentes, siendo un 30% la proporción de ácidos grasos saturados de cadena lineal (C14:0, C16:0, C18:0) y un 10%, ácidos grasos lineales con una insaturación (C16:1).

Estos resultados indican que no hay diferencias en cuanto a la composición de ácidos grasos en las cepas Gram-positivas en estudio, por cuanto se define que el perfil lipídico no es un marcador para la identificación de *Bacillus cereus* y *Bacillus mycoides* productores de polihidroxicanoatos, dado que la composición lipídica determinada en este proyecto, es similar a los reportados en otros trabajos para el género bacillus^{199,200}.

Por otra parte, es posible que el estudio genético de las cepas utilizadas para este proyecto, muestren diferencias a nivel del RNA ribosomal dado que, aunque

¹⁹⁹ KANEDA, Op. cit., p. 898-900

²⁰⁰ AHMAD, Op. cit., p.2807-2809

presentan las mismas características morfológicas, bioquímicas y lipídicas, unas producen un monómero como constituyente del biopolímero en tanto que otras producen dos, por cuanto es probable que se esté tratando con variedades diferentes y esto sólo se podría verificar mediante un estudio genético de las cepas.

4.5 IDENTIFICACIÓN POR GC-MS

Con el fin de obtener una mayor certeza en la identificación del poliéster y de los FA's presentes en las muestras bajo estudio, se obtuvieron sus correspondientes espectros de masas, que fueron comparados con los espectros de las bases de datos, Wiley 138 y NBS 74K del equipo (GC-MSD *Agilent Technologies 6890 Plus*, MSD 5973).

Para todos los FA's analizados en forma de sus ésteres metílicos, el grado de coincidencia de los espectros de masas obtenidos para las muestras y los de la base de datos (biblioteca) del equipo, superó el 95%.

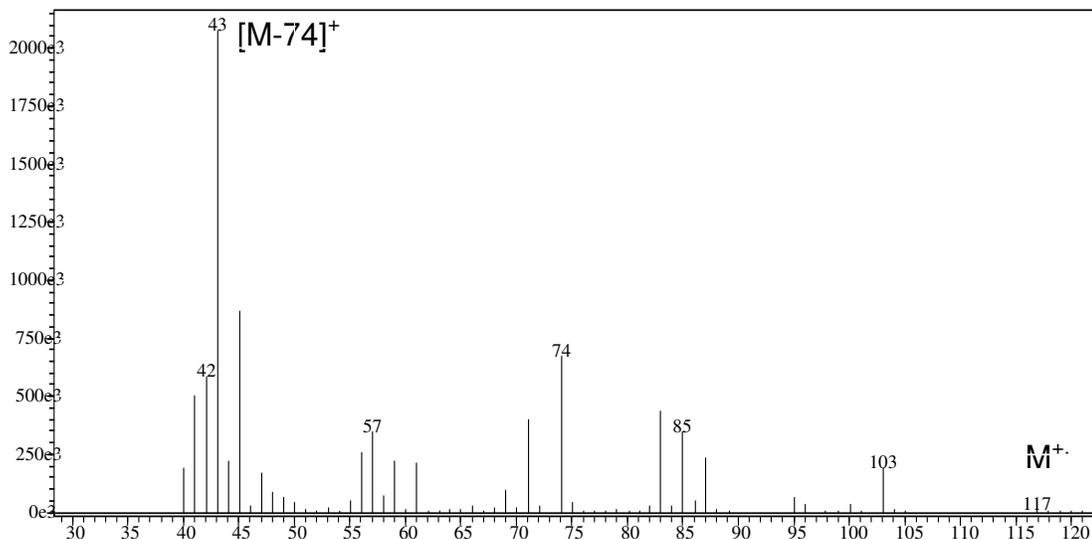
Durante la interpretación "manual" de los espectros de masas, se estudiaron las respectivas rutas de fragmentación, típicas para los diferentes FAME's.

Como los constituyentes del polímero son ácidos grasos hidroxilados de cadena corta, sufren una ruta de fragmentación similar a los FAME's en estudio.

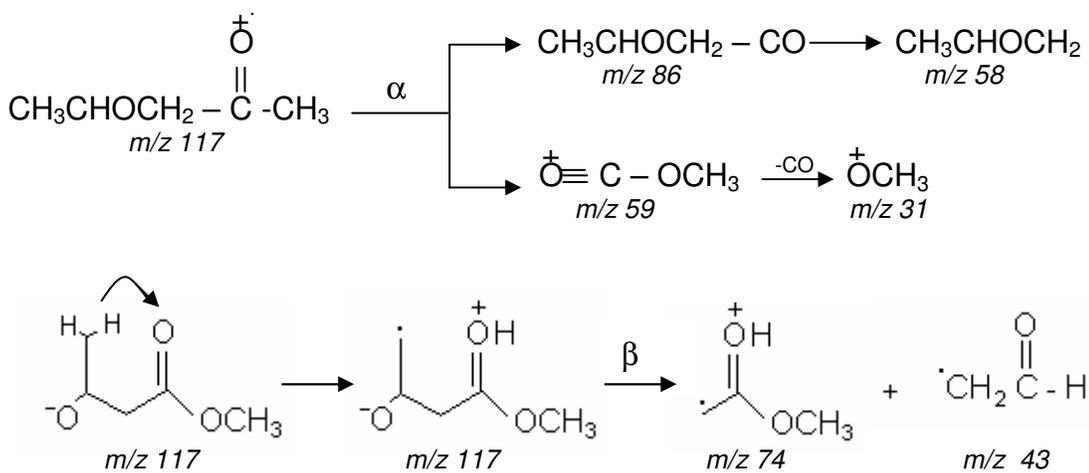
En las figuras 24 y 25, se ilustran los espectros de masas de los ésteres metílicos del ácido 3-hidroxibutirico y 3-hidroxicaproico obtenidos por GC-MS en la *Universidad de Nariño*.

En el espectro de masas del ácido 3HB se muestra el ión molecular M^+ (m/z 117) y los iones correspondientes a las pérdidas del radical $CH_3O\cdot$ y del reordenamiento McLafferty, $[M-74]^+$, en m/z 87 y 43, cuyo ión pico base m/z 43 corresponde a la formación de $[C_2H_3O]^+$.

Figura 24. Espectro de masas del éster metílico del ácido 3-hidroxibutírico

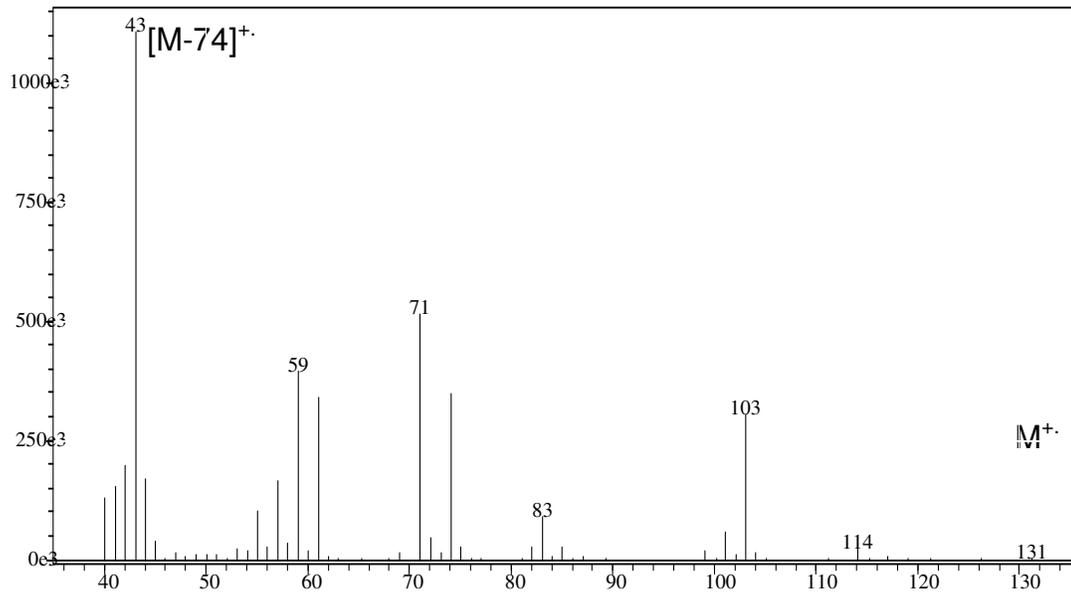


Posible ruta de fragmentación del éster metílico del ácido 3-hidroxibutírico.



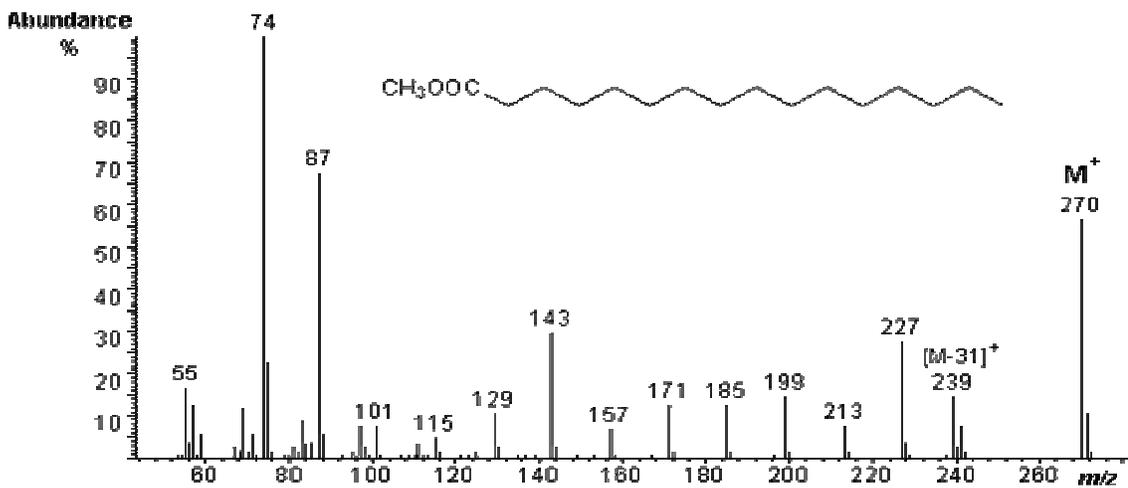
La ruta de fragmentación para el éster metílico 3-hidroxivalérico es similar para el éster metílico 3-hidroxibutírico.

Figura 25. Espectro de masas del éster metílico del ácido 3-hidroxiácido



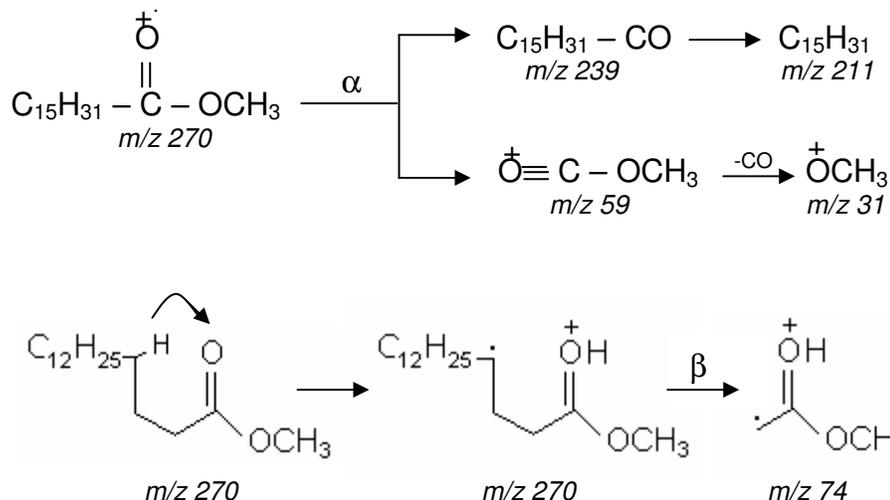
En la figura 26, se ilustra el espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico, FA's mayoritario en las bacterias de estudio. En el espectro de masas de éste ácido, se destaca la presencia del ión pico de base, con una relación m/z 74, que corresponde a un rearrreglo McLafferty²⁰¹. El ión molecular M⁺ (m/z 270), se descompone eliminando los radicales CH₃O· y C₃H₇·, con formación de los iones en m/z 239 y 227, respectivamente.

Figura 26. Espectro de masas del éster metílico del ácido palmítico (C16:0).



²⁰¹ McLAFFERTY, M. Interpretation of mass spectra. 1980. p. 201-205.

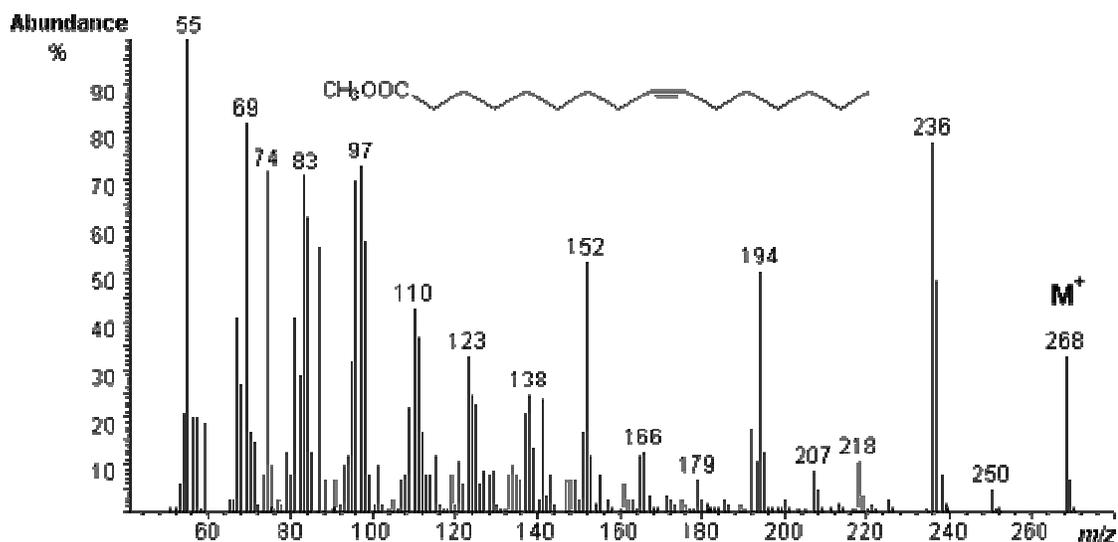
Fragmentación típica del éster metílico del ácido palmítico.



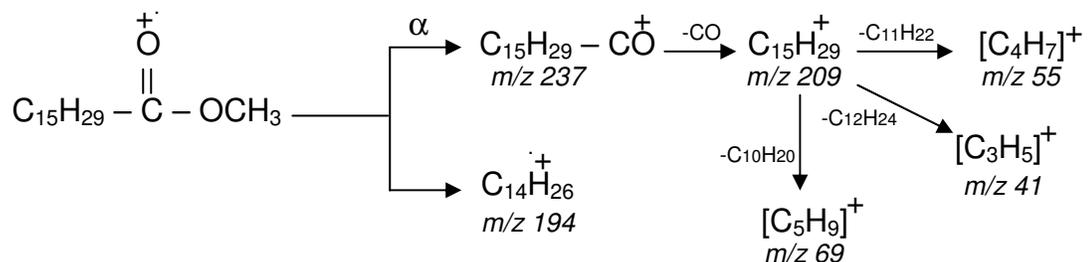
En la figura 27, se presenta el espectro de masas del éster metílico del ácido palmitoleico (C16:1). Su ruta de fragmentación se caracteriza por la formación del ión molecular, M^+ , en m/z 268 y los iones correspondientes a las pérdidas del radical $\text{CH}_3\text{O}^\cdot$ y el reordenamiento McLafferty, $[M-74]$, en m/z 237 y 194 respectivamente. El ión pico base, en m/z 55, corresponde a la formación de $[\text{C}_4\text{H}_7]^+$.

La posición de los enlaces dobles no puede determinarse y los isómeros *cis/trans* son indistinguibles para este tipo de ácidos, cuando se utiliza impacto de electrones (EI, 70 eV), como fuente de ionización.

Figura 27. Espectro de masas del éster metílico del ácido palmitoleico.



Fragmentación típica del éster metílico del ácido palmitoleico



Las rutas de fragmentación de los demás FA's presentes en las cepas bacterianas, son similares a las descritas anteriormente, por cuanto los espectros de masas de los demás ácidos grasos obtenidos en la Universidad Industrial de Santander se muestran en el anexo N.

5. CONCLUSIONES

El tamizaje cualitativo en la selección de las cepas silvestres productoras de PHA presentes en diferentes suelos del Departamento de Nariño, se llevó a cabo mediante tinción con Sudan negro y fluorescencia con Nilo rojo, determinando que la detección de gránulos de PHA con este último fue mas selectiva, pese a que el colorante Sudan negro presenta muchos artefactos que no permiten observar el gránulo de PHA, produciendo error al momento de catalogar la cepas como positivas y/o negativas a la presencia del biopolímero.

El análisis por GC-FID es una técnica que garantiza la correcta selección de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos, ya que de las 36 cepas PHA positivas con Nilo rojo, sólo 25 presentaron picos cromatográficos correspondientes al biopolímero, considerando al Nilo rojo como una técnica utilizada exclusivamente para tamizaje cualitativo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico por GC-FID, se determinó que las cepas M17-2 y GSJ-6 tienen unos niveles de producción de biopolímero que las destaca de las demás cepas aisladas, por lo cual son potencialmente útiles en el sistema de producción de PHB y P(3HB-co-3HV).

Mediante el sistema API 50CH se determinó que las cepas seleccionadas con producción potencial de PHA pertenecen a las especies ***Bacillus mycoides*** a excepción de las cepas ILE-6 y TUQ-3, las cuales pertenecen a ***Bacillus cereus***, siendo éste un método de fácil manejo, muy sensible y altamente confiable.

Mediante el análisis cromatográfico por GC-FID se determinó la presencia de 10 ácidos grasos para las cepas en estudio, en donde predominan los ácidos grasos saturados, entre ellos los ramificados iso-anteiso (C_{12} – C_{16}) y el ácido palmítico ($C_{16:0}$) siendo éste el más abundante.

El método de extracción de ácidos grasos utilizando la técnica de transesterificación *in situ* resultó ser muy sensible, sencilla y rápida, pese a que el contenido de grasa en las células procariontas es muy baja (< 10%). Además, la cuantificación se llevó a cabo por el método del Istd con n-hexadecano, encontrándose que la mayoría de los compuestos mencionados se presentan en concentraciones relativamente bajas menores de 1,033 mg de FA/ 100 mg de biomasa.

El perfil de ácidos grasos no resultó ser un marcador para la identificación de las especies *Bacillus cereus* y *B. mycooides* productoras de polihidroxicanoatos, dado que la composición lipídica determinada en la presente investigación, es igual a los reportados en otros trabajos para el género *Bacillus*. Sin embargo, este perfil puede utilizarse como un parámetro de control de calidad de la cepa, ya que el incremento, desaparición o aumento de otros ácidos grasos diferentes, pueden ser causa de contaminación por parte de otros agentes o mutación en la codificación genética de la misma.

El estudio de la reproducibilidad de los parámetros cromatográficos tales como tiempos de retención (t_R), tiempos de retención relativos (t_{RR}), áreas y áreas relativas, mostró coeficientes de variación inferiores a los valores máximos recomendados por las Buenas Prácticas de Laboratorio (2% para t_R y 10% para áreas). Tales resultados indicaron alta reproducibilidad en el método cromatográfico y una excelente confiabilidad tanto en la identificación y cuantificación del co-polímero como en la de los FA's presentes en las muestras bajo estudio.

RECOMENDACIONES

Evaluar la producción de poli-3-hidroxi-butirato (PHB) y poli-(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) de las cepas M 17-2 y GSJ-6, con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno que sean económicas, renovables y fáciles de adquirir en el medio, tales como melaza de caña, harina de sangre y harina de quinua, entre otros, que permitan obtener buenos niveles de síntesis de PHA a bajos costos.

Optimizar las concentraciones de los sustratos y las condiciones de crecimiento como son, temperatura, pH, aireación y agitación para favorecer a gran escala la síntesis del polímero.

Realizar estudios de fermentación en biorreactores con el fin de obtener parámetros de agitación y concentración de oxígeno que permitan escalar el proceso de síntesis de PHA en las cepas con niveles de producción potencial del biopolímero.

Caracterizar las cepas en estudio por técnicas de Biología molecular, mediante su secuencia del ARN ribosomal, para establecer si existen diferencias taxonómicas entre las bacterias productoras de PHB y P(3HB-co-3HV).

BIBLIOGRAFIA

- A, Pablo. Cromatografía Gaseosa [en línea]. "Lugar de publicación desconocido": s.n. [citado en marzo 2002]. p.18. Disponible en Internet: <<http://www.Bilbo.edu.uy/~planta/pdf/GC.dc>.
- ABEL, K; SCHEMERTZING, H. and PETERSON J. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition : Feasibility of utilizing gas chromatography. En : Journal Bacteriol. 1963. Vol. 85. p.1039-1044.
- AHMAD, A. et al. Characterization of Lipid Fatty Acids in Whole-Cell Microorganisms Using in Situ Supercritical Fluid Derivatization/Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. En : Journal Anal. Chem. 1996. Vol. 68 No. 17. p.2805-2810.
- ALBERTSSON and S, KARLSSON. Degradable Polymers for the Future. En : Acta Polymerica.1995. Vol. 46 No.1. p. 114-123.
- ALDÉN, L; DEMOLING, F. and BAATH, E. Method of Determining Factors Limiting Bacterial Growth in Soil. En : Environmental Microbiology. 2001. Vol. 67. p.1830-1838.
- ALMEIDA, Alejandra. Bioplásticos : una alternativa ecológica. En : Revista *Químicasviva*. 2004. p.3-7.
- ASENJO, J. Effect of Single Nutrient limitation on Poly- β -hydroxybutyrate Molecular Weight Distribution in *Alcaligenes eutrophus*. En : Biotechnol. Bioeng. 1995. p. 497-502.
- ASENJO, J. et al. Effect of single nutrient limitation on poly- β -hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. En : Biotech Bioeng. 1995. Vol. 46. p. 497-502.
- BAATH, E. Adaptation of soil bacterial communities to prevailing pH in different soils. En : Microbiology Ecology. 1996. Vol. 19. p. 227-237.
- BADUI, Salvador. Química de los alimentos. México: Legman de México, 1996. p. 213-215.
- BANNON, C. et al. Development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. En : Journal Chromatogr. 1982. Vol. 247. p.71-89.

BARBUZZI, T. et al. Microbial Synthesis of Poly(3 hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas aeruginosa* from Fatty Acids: Identification of Higher Monomer Units and Structural Characterization. En : Biomacromolecules, 2004. Vol. 10. p. 35-41.

BARNARD, G and SANDERS, N. The poly- β -hydroxybutyrate granules "in vivo". En : Journal of Biol. Chem. 1999. Vol. 24. p. 3286-3289.

BASSETT, D. Developments in crystalline, polymers-2. Elsevier En : Appl. Science publishers, London. 1988. p. 533-548.

BERGEY, D. et al. Manual of systematic bacteriology. USA: Williams and Wilkins, 1986. Vol. 2. p.1114-1139.

BEVERLY, M; BASILE, F. and VOORHEES, K. Fatty acid analysis of beer spoiling microorganisms using pyrolysis mass spectrometry. En : Journal Am. Soc. Brew. Chem. 1997. Vol. 55 No. 2. p.79–82.

BIOTECH, Brussels. Biopolymers as viable alternatives to common plastic materials. En : Galáctica. 2004. p 6-9.

BOUSSIBA, S and BENDOV, E. Nile Blue A as fluorescent of poly(3-hydroxybutyrate) in strain of *azotobacter vinelandii*. En : Curr. Microbiol. 1999. Vol. 44 No. 12. p.25-30.

BRANDL, H; BACHOFEN, R. and MAYER, J. Degradation and Applications of Polyhydroxyalkanoates. En : Canadian Journal of Microbiology. 1995. Vol. 41. p. 143-149.

BRENNAN, P. et al. Identification of atypical mycobacteria by thin-layer chromatography of their surface antigens. En : Journal Clin. Microbiol. 1978. Vol. 8. p. 374,379.

CARBALLO, M. et al. Evaluación de la producción de polihidroxiálcanoatos por cepas bacterianas marinas. En : Revista biológica. 2003. Vol. 17. No. 1. p. 36-42.

CARERI, Maria et al. New multivariate approach for the optimization of the simultaneous distillation-extraction technique for free fatty acids using a face centred cube experimental design : Application to parmigiano - reggiano cheese. En : Analytica Chemical Acta. 2001. Vol. 386 No. 1/2. p.169-180.

CARRAPISO, Ana. *In situ* transesterification of fatty acids from Iberian pig subcutaneous adipose tissue. En : Meat Science. 2000. Vol. 56. p.159–164.

CHEN, G, et al. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). En : Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. Vol. 57. p. 50-55.

CHRISTIE, William. Gas Chromatography and Lipids : A Practical Guide. En: Du The Oily Press.1989. p. 303–320.

CHRISTIE, William. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis: Advances in lipid methology. En : The Oily Press. 1993. p. 69–75.

CORTEZ, Ruben. Cromatografía de Gases [en línea]. “Lugar de publicación desconocido”: s.n. [citado en septiembre 2004]. p.37-39. Disponible en Internet: <www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografía/Gas htm.>

CRONOLOGÍA DO desenvolvimento científico e tecnológico brasileiro. En : Revista ITSO. 2002. Vol. 13. p. 61-62.

DEMICHELI, Mario. Plásticos biodegradables a partir de fuentes renovables. En : IPTS. 2001. Vol. 10. p.5.

DUEÑAS, José Vicente. Nariño–93 años. En : Sinopsis histórica, geográfica, económica y social del departamento de Nariño. Santafé de Bogotá: Kimpres, 1997. p. 17-240

DUVERNOY, O. A biodegradable patch used as a pericardial substitute after cardiac surgery : 6- and 24- month evaluation with CT; Thorac Cardiovasc. Surg. En : Biomedichal. 1995. Vol. 43 No.5. p.271.

EMERICH, W. et al. Optimization of cultivation conditions for microorganisms using mathematical experiment design : optimization of cultivation medium composition. En : Chem. Technol. 1996. p. 46-47.

ESPIN, Guadalupe. Biología de *Azotobacter vinelandii* [en línea]. “Lugar de publicación desconocido”: s.n. [citado, dic. 2000]. p 8-10. Disponible en Internet: <www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf.>

FINKELSTEIN, R. et al. Colonial opacity vararions among the choleraenic vibrios. En : Microbiology. 1997. Vol. 143. No. 1. p. 23-34.

FUENTES, Hernán. Monitoreo de la termodegradación de ácidos grasos en aceites vegetales de consumo humano, por medio de cromatografía de gases de alta resolución y evaluación in Vitro de la actividad antioxidante de productos naturales. Bucaramanga, 1999, 131p. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

FUKUI, T and DOI, Y. Cloning and Analysis of the Poly(3-Hydroxybutirate-co-3-Hydroxyhexanoate) : Biosynthesis Genes of *Aeromonas caviae*. En : Bacteriol. 1997. Vol. 179 No.15. p. 4801-4809.

- GÓMEZ D. Aislamiento y caracterización de bacterias nativas productoras de polihidroxicanoatos de suelos del Valle del Cauca, Parque Natural Chicague y Amazonas. 1998. p. 32-35.
- GONZALEZ, Alvaro. Nariño-aspectos geográficos : Instituto geográfico Agustín Codazzi. Santafé de Bogotá: Sección Imprenta y Ediciones IGAC, 1985. p. 33–75.
- GONZÁLEZ, Lucia. Determinación de ácidos grasos en una nueva especie de alga del género nostoc. En : Journal of microbiology. 1976. Vol. 46. p.36-42.
- GREEN, P. et al. Formation of Short Chain Length/Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate : copolymers by Fatty acids β -Oxidation Inhibited *Ralstonia eutropha*. 2001. Vol. 133. No. 43. p. 4-7.
- GUNSTONE, F. High resolution ^{13}C NMR spectroscopy of lipids. En : The Oily Press 1992. p.1–68. Citado por: CHRISTIE, W. Advances in lipid methology-two.
- HAMILTON, R. and HAMILTON, S. Lipid Analysis: A practical approach. En : Du The Oily Press. 1992. p. 263-267.
- HENDERSON, R. and JONES, C. Physiology of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production for *Alcaligenes eutrophus* growing in continuos culture. En : Microbiology. 1997. Vol. 143. p.2361-2371.
- HUBBER, L. Buenas Prácticas de Laboratorio y buenas prácticas de fabricación actuales. Miami, Hewlett- Packard Company, 1994. 160 p.
- IAÑEZ, Enrique. Concepto e historia de la microbiología. Buenos Aires, (Argentina): s.n. [citado en agosto 1998]. p. 6-8. Disponible en Internet: <fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/archivospdf/01_micro.PDF.>
- JAN, S et al. ^1H MNR spectroscopic determination of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass. En : Enzyme Microb. Technol. 1996. Vol. 18. p. 195-198.
- JUKKA, Tuominen. Chain linked acid polymers : polimerization degradation studies. Finlandia, 2003. p.45-57. Tesis doctoral. Universidad Tecnológica de Helsinki.
- JUNQUEIRA, Luis y CARNEIRO, José. Biología celular y molecular. 6 ed. Santiago de Chile : Mac Graw Hill, 1998. p. 24, 25.
- KANEDA, Toshi. Fatty acids in the genus Bacillus Iso- and anteiso- fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. En : Journal of Bacteriology. 1967. Vol. 93 No.3. p. 894-903.

KATO, M. and BAO, J. High- resolution electron microscopy of poliesters. En : Microbiol Biotechnol. 1998. Vol. 45. p. 363–370.

KUNIKO, M, NAKAMURA, Y. and DOI, Y. New bacterial copolyesters produced in *Alcaligenes eutrophus* from organic acids. En : Polymer Commun. 1988. Vol. 29. p.174-176.

LÁÑEZ, Enrique. Curso de microbiología General : Citoplasma, Inclusiones citoplasmáticas. 1998. p. 2-10.

LAW, K. et al. Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge [online]. Hong Kong (China): Pubmed [cited august 2001]: Available from Internet: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&emv=Display&dopt=pubmed_pubmed&fn.>

LEE, S. et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by high-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* under phosphorus limitation. En : Biotechnol Bioeng. 2000. Vol. 68 No. 21. p. 466–470.

LEE, S. Plastic bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. En : TIBCH. 1996. Vol. 14. p. 431-438.

LEE, S; LEE, Y. and WANG, F. Chiral Compounds from Bacterial Polyesters : Sugars to Plastics to Fine Chemicals. En : Biotechnology and Bioengineering. 1999. Vol. 65. p. 363-368.

LEMOIGNE, M. Produits de déshydratation et de polymerisation de l'acide b-oxxybutyrique. En : Bull. Soc. Chim. Biol. 1926. Vol. 8. p. 770-782.

LOS PLÁSTICOS [online]. "Lugar de publicación desconocido": Eco Sitio. [citado el 15 febrero de 2004]. Vol. 5 p. 11-18. Available from Internet < www.admin@ecositio.com.ar.>

MADEROS, L. et al. Análisis de ácidos grasos de cepas de *Mycobacterium habana* y *Mycobacterium simiae*. En : Revista Cubana de Medicina Tropical. 1999. Vol. 51 No.2. p. 27-32.

MANG, Michael. Poly(lactic acid) : performance materials from renewable resources. En : NPE 2000 Conference, Chicago. 2000. Vol. 49. p. 52

MANUAL GRAM [online]. "sine loco": s.n. [cited on august 1998]. p. 27-33. Available from internet: <www.uphs.upenn.edu/bugdrug/antibioticmanual/gram.htm.>

MARTINEZ, J et al. Influencia de la aeración en la síntesis de poli-hidroxitirato en azospirillum brasilense cepa 7. En : Revista Biológica. 2004. Vol. 18. No. 1. p. 14-15.

MATEOS, Pedro. Observación de los microorganismos : preparación y examen de muestras [en línea]. "Lugar de publicación desconocido": s.n. [citado en julio 2002]. Disponible en Internet: <<http://www.institutomaritimo.cl/espec/elab/microbio/micro2.html>>.

McLAFFERTY, M. Interpretation of mass spectra. California, University Science Books, tercera edición, 1980. p. 201-205.

MERGAERT J, et al. Microbial degradation of poly-(3- Hydroxybutyrate) and poly-(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in compost. En : Journal Environ polymer Degrad. 1994. Vol. 2. p. 117-183.

METCALFE, L. and SCHMITZ, A. The rapid preparation of fatty acids methyl esters for gas chromatography analysis. En : Anal. Chem. 1961. Vol. 33. p. 363 – 364.

MIRAVET, M. Comportamiento de las bacterias marinas en la Plataforma Sur Occidental de Cuba. La Habana, Cuba. 1996. p.48-52, Tesis de Maestría. Universidad de la Habana.

MONTEOLIVA, M. y RAMOS, A. Polisacáridos microbianos y aplicaciones farmacéuticas. En : Congress Pharmacy and Biomedichal. 1998. p. 72-75.

MOORE, E. Fundamentals of the Fungi. USA: Prentice Hall, 1996. p.123-130.

MURRAY, Robert. et al. Bioquímica de Harper : Manual moderno. 15 ed. México: s.n., 2001. p.169-182.

MURRIA, P. et al. Manual of clinical Microbiology. 7 ed. Washington: American Society for Microbiology. p. 351,360.

NOTHENBERG, M. Bactéria Produz resina biodegradável de açúcar. En : Plástico moderno. 1995. Vol. 15. p. 28-34.

O, Miguel; F, Berridi and J, Iruin. Survey on Transport Properties of Liquids, Vapors, and Gases in Biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate) - (PHB). En : Journal of applied Polymer Science. 1997. Vol. 64. p.1849-1850.

ODA, Y. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and policaprolactone by filamentous fungi. En : Journal Ferment. Bioeng. 1995. Vol. 80 No. 3. p. 265-269.

OGAWA Y. Injectable microcapsules prepared with biodegradable poly(α -hydroxy) acids for prolonged release of drugs. En : Journal Biomater. Sci. Polymer. 1999. Vol. 8 p. 391-409.

OJUMU, T; YU, J. and SOLOMON, B. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. En : African, Journal of Biotechnology. 2003. Vol. 3 No. 1. p. 18-19.

PAGE, W. and TENOVE, J. Quantitation of poly- β - hydroxybutyrate by fluorescence of Bacteria and granules stained with Nile Blue. En : Biotech. Tech. 1996. Vol. 10 No. 4. p. 215-217.

PARK, P. W. and GOINS, R.E. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. En : J. Food Sci. 1994. Vol. 59. p. 1262 – 1266.

PEARCE, F. Dead in the water. En : New Scientist. 1995. p. 26-27.

PEÑA, Saenz. Nutrición bacteriana [en línea]. Buenos Aires, (Argentina): Hipertextos del área de Biología. [citado el 4 de agosto 2004]. p. 5-8. Disponible en Internet: <www.biologia.edu.ar>

PHILLIP, R. et al. Formation of Short Chain Length/Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoate Copolymers by Fatty Acid β -Oxidation Inhibited *Ralstonia eutropha*. En : Institut fur Mikrobiologie. 2001. Vol. 3 No. 1. p. 208-213

PREUSTING, H; NIJENHUIS, A. and WITHOLT, B. Physical characteristics of poly(3-hydroxyalkanoates) and poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *pseudomonas oleovorans* grown on aliphatic hydrocarbons. En : Macromolecules. 1996. Vol. 23. p. 4220–4224.

PURIFICATION AND analysis of simple or neutral lipids, analysis of fatty acids [online]. "sine loco": Cyberlipid Center. [cited june 2003]. Available from internet: <www.cyberlipid.org/cyberlipid/an10010htm>

PUSCHMANN, M. et al. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. En : Appl. Microbiol. Biotechnol. 1999. Vol. 53. p. 43-50.

REINER, E; BEAM, R. and KUBICA, P. Pyrolysis-gas liquid chromatography studies for the classification of mycobacteria. En : Rev Respir Dis. 1969. Vol. 99. p. 750-759.

ROBLES, E. et al. Determination of the profile of fatty acids of 4 species of *Shigella* spp by chromatography of gases. En : Revista Latinoamericana de Microbiología. 2002. Vol. 44 No.2. p. 69 – 74.

ROSE, A. Microbiología Química : Introducción a la fisiología Microbiana. 2 ed. Madrid, España: Alhambra. 1997. p. 35-37.

ROZSA, C. et al. Miscibilidad de mezclas poliméricas de polihidroxicanoatos. En : Revista Iberoamericana de Polímeros. 2004. Vol. 5. No. 2. p. 55-60.

RUBINSON, J. and RUBINSON, K. Química Analítica Contemporánea. 1 ed. México : Pearson. 2000. p. 434-440.

RUBINSON, Judith and RUBINSON, Keneth. Análisis Instrumental. 1 ed. Madrid : Pearson Education. 2001. p. 523-524.

RUEDA, Elkin. Extracción y análisis de ácidos grasos presentes en la Hormiga "Culona" (*Atta laevigata*). Bucaramanga, 2004. p.28-37. Trabajo de grado (Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

SEGURA, D. and ESPÍN, G. Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly- β -hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. En : Journal Bacteriol. 1998. Vol. 180. p. 4790-4793.

SEGURA, R. Preparation of fatty acids methyl esters by direct transesterification of lipids with aluminium chloride-methanol $AlCl_3$ -methanol. En : Journal Chromatogr. 1998. Vol. 441. p.99–113.

SHEPHERD, A. and IVERSON, J. Extraction of lipids and derivatives. En : HAMILTON, R. and HAMILTON, S. Lipid Analysis: A Practical Approach. 1975. p. 263 – 267.

SKOOG, Douglas; WEST, Donald y HOLLER, James. Química Analítica. 6 ed. México : Mc Graw Hill, 1999. p.502-503

SOO, Kim and NAW, Chang. Production of poly(3- hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. En : Biotechnology Letters. 1998. Vol 20, No. 2. p 109-112.

STEINBÜCHEL, A and VALENTIN, H. Diversidad de ácidos polihidroxicanoicos bacterianos. En : FEMS Microbiol. Journal of. Microbiol. 1995. Vol. 17. No. 13. p.1-3.

STEINBÜCHEL, A. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxicanoic acid inclusions. En : Can. Journal of Microbiol. 1995. Vol. 41. No. 1. p. 94-105.

STHAL, P and KLUG, M. Characterization and differentiation of filamentous fungi based on fatty acid composition. Pennsylvania. En : Applied and environmental microbiology. 1996. Vol. 62. p. 4136 – 4146.

TARRAND, J; KRIEG, N. and DOBEREINER. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum*. Gen nov and two species; *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov and *Azospirillum brasilense* sp nov. En : Journal of Microbiol. 1978. Vol. 24. p. 967- 980.

TOMBOLINI, R et al. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti*. En : Microbiology. 1995. Vol. 141. p. 2553–2559.

TORRENEGRA, R. et al. Ácidos grasos como criterio taxonómico en cepas nativas de *Fusarium* sp. En : Comisión Biotecnológica. 2001. Vol. 3. p. 1-6.

TURI, E. Thermal Characterization of Polymeric Materials. En : New York, 1997. p. 389-392.

VAL, Daniel. Técnicas de tinción bacteriana [en línea]. “Lugar de publicación desconocido”: notas microbiológicas. [citado el 18 septiembre de 1998]. p. 3-7. Disponible en Internet: www.danival.org/notasmicro/tincion/madre_tincion.html.

VALENTIN, H. and DENNIS, D. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. En : Journal of Biotechnol. 1997. Vol. 58. No. 26. p. 33–38.

VALERO, L. A thin-Layer chromatographic method for separating methyl esters of mycobacteria mycolic acid. En : Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect. 1986. Vol. 94. p. 373-376.

VALERO, L. y LUENGO F. Cromatografía de capa fina y cromatografía de gases en la identificación de micobacterias de interés clínico. En : Enf. Infec Microbiol Clin. 1987. Vol. 5. p.361-366.

VENKATESWARAN, K. et al. *Bacillus nealsonii* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly facility, whose spores are -radiation resistant. En : Biotechnology and Planetary. 2003. Vol.25 No. 3. p. 15-21.

VOLKE, S. Tania. Los plásticos en la actualidad y su efecto en el entorno [en línea]. “lugar de publicación desconocido”: s.n [citado el 4 abril de 1998], p.3 : Disponible en Internet: < www.conacyt.mx/secobi/bancos/cyd/pdf/139-54.pdf>

WANG, F. and LEE, S. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. En : Biotechnol. Bioeng. 1998. Vol. 58. No 41. p. 325–327.

WEINER, R. Biopolymers from marine prokaryotes. En : Tibtech. 1997. Vol. 15. p. 390-392.

WILLIAMS, S. et al. PHA applications : addressing the price performance issue Tissue engineering. En : Biological Macromolecules. 1999. Vol. 25. p.11-121.

WITHOLT, B. Bacterial nutrition [online]. "sine loco": s.n. [cited on January 2004]. p. 2-8. Available from internet:<www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_09/Capitulo09.pdf>

XIN, W. et al. Studies on the production of PHB from HFS by *Alcaligenes eutrophus* H16. En : Acta Microbiol. 1995. Vol. 35. No. 2. p.115-116.

YAMANE, T; FUKUNAGA, M. and LEE, Y. Increase PHB productivity by high-cell-density fed-batch culture of *Alcaligenes latus*, a Growth-Associated PHB Producer. En : Biotechnol and Bioeng. 1996. Vol.50. p.197-202.

YU, H. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. En : Biotech. Bioeng. 1997. Vol. 55. No. 1. p. 28-32.

YU, Jian and SI, Yingtao. A Dynamic Study and Modeling of the Formation of Polyhydroxyalkanoates Combined with Treatment of High Strength Wastewater [online]. Hong Kong, (China): Department of Chemical Engineering, Hong Kong University of Science & Engineering. [Received for review november 8 2000]. p 3-4. Available from internet: <pubs.acs.org/cgi-bin/chemport/version>

ANEXOS

Anexo A. Reactivos, materiales y equipos de laboratorio.

Los reactivos y solventes, utilizados en esta investigación, fueron grado analítico. Las casas productoras y el grado de pureza de reactivos y solventes se resumen en la posterior tabla. Los reactivos y solventes utilizados en la parte experimental del presente trabajo, destinados a la preparación de patrones, extracción del material lipídico y en la obtención de los FAME's fueron grado HPLC y grado analítico.

A continuación se describen los materiales y equipos utilizados en este proyecto:

Materiales:

- Cajas Petri;
- Perlas de Porcelana;
- Perlas de sílica gel;
- Tubos de ensayo tapa rosca de 16 x 150 mm (Kimax);
- Tubos cónicos de poli(propileno) de 1.5 mL (BRAND, Postfach 1155. D-97864 Wertheim, Alemania);
- Pipetas Pasteur en vidrio de 230 mm de longitud (BRAND, Postfach 1155. D-97861 Wertheim, Alemania);
- Balones aforados de 5, 10, 50 y 100 mL (Kimax);
- Micropipetas de 10-100 y 100-1000 μ L (BRAND, Postfach 1155. D-97864 Wertheim, Alemania);
- Agitadores magnéticos recubiertos de teflón;
- Consumibles cromatográficos (septa, férulas, liners, frascos de 1.5 mL para GC, jeringas Hamilton de 10 μ L, otros);
- Gas especial (Helio).

Equipos menores:

- Cabina de flujo laminar (MASER, S.A., Modelo FLH-48, Cali-Colombia);
- Centrífuga (IEC MULTI RF, modelo 120, EE.UU);
- Microscopio OLYMPUS CH-2
- Plancha de calentamiento con agitación magnética (SCHOTT MER 1065, Schott-Geräte GMBH, D-65719 Hofheim/Ts, Alemania);
- Minishaker (SCHOTT MR 1065, Schott-Geräte GMBH, D-65719 Hofheim / Ts, Alemania);
- Balanza digital (BA 310S Startius Basic, \pm 0.0005g, Alemania);
- Balanza analítica (AG285 METTLER TOLEDO, \pm 0.00001g, Suiza).

Sustancias químicas, empleadas en este proyecto.

<i>REACTIVOS</i>	<i>PUREZA Y CASA PRODUCTORA</i>
Mezcla certificada de <i>co-polímero</i>	99.8%, Biomer, Krailing, Alemania.
Mezcla certificada de FAME's (GLC-10, GLC-50, GLC-70, GLC-80, GLC-100)	99.8%, Matreya, Inc., Pennsylvania, EE.UU.
Complejo de trifluoruro de boro en metanol (BF ₃ /CH ₃ OH)	14%, Merck, Hohenbrunn, Alemania.
n-hexadecano (sustancia de referencia para GC)	99.5%, Merck, Darmstadt, Alemania.
Cloruro de metileno	99.9%, Mallinckrodt Baker, Inc., Paris, Francia.
Cloruro de sodio	99.5%, Merck, Darmstadt, Alemania.
n-Hexano	99.9%, Mallinckrodt Baker, Inc., Francia.
Metanol	99.8%, Riedel-de Haën, Seelze, Alemania.
Cloroformo	99%, Panreac Química S.A, EE.UU.
Ácido sulfúrico	95.6%, Merck, Darmstadt, Alemania.
Peptona	98%, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra.
Extracto de levadura LP0021	98%, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra.
Agar nutriente CM3	98%, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra.
Sacarosa	98%, Carlo Erba, Milán, Italia.
API- 50 CHB/E Medium	Bio Mérieux, Marcy-l'Etoile, Francia.
Etanol	96%, Comercial.

Anexo B. Tabla de datos obtenidos para el sistema de recolección de muestras representativas en el estudio de la producción de PHA.

<i>Caja Petri</i>	<i>No. colonias</i>	<i>Colonias RN +</i>	<i>% colonias RN +</i>
1	39	6	15
2	36	3	8
3	67	8	12
4	34	3	9
5	36	5	14
6	31	3	10
7	62	7	11
8	37	3	8
9	38	4	11
10	36	2	6
11	63	5	8
12	22	3	14
Desviación estándar		1,87	2,90
Promedio o media		4,33	10,43
Índice de dispersión		0,43	0,28

RN: rojo nilo

$t_{95} = 2.0$

error = 10%

Promedio = 4.33

Aplicando la ecuación:

$$N = [(100 * t_{95}) / e]^2 * (1 / \bar{X}) \quad \text{se tiene:}$$

$$N = [(100 * 2) / 10]^2 * (1 / 4.33) = 92,4 \text{ Cajas petri aproximadamente.}$$

Por tanto, se deben considerar 92 cajas petri como tamaño de la muestra para el respectivo sistema de muestreo.

Anexo C. Tinciones utilizadas en microbiología.

Tinción de Gram.

Se trata de una tinción diferencial muy utilizada que distingue las bacterias por las características de su pared celular. El proceso de tinción se efectúa siguiendo el siguiente protocolo:

Se toma una pequeña colonia bacteriana con el asa y se resuspende en una gota de agua estéril sobre un portaobjetos. Se procede a secar con mechero de tal manera que las bacterias queden impregnadas sobre el portaobjetos.

Seguidamente, se adicionan las siguientes sustancias con un tiempo determinado:

- a. Cristal violeta y se deja durante un minuto. Posterior lavado con agua.
- b. Aplicación de Lugol y se deja actuar durante un minuto. Se lava con agua.
- c. Se adiciona suficiente alcohol etílico 96% durante 30 segundos o hasta observar que no se desprende mas tinte. Posteriormente, se hace un lavado con agua.
- d. Se aplica safranina o fucsina durante 30 segundos y se lava con agua.

Finalmente, se observa la tinción de las bacterias utilizando el microscopio.

Tinción Sudan Negro.

Se suspende una colonia bacteriana en una gota de agua estéril sobre un portaobjetos y se fija al calor. Posteriormente se tiñe con Sudan Negro durante 30 minutos y se lava con abundante agua.

Seguidamente, se tiñe con safranina o fuchina durante 1 minuto y se lava con agua. Finalmente, se deja secar al aire y se procede a observar en el microscopio.

Tinción de espora.

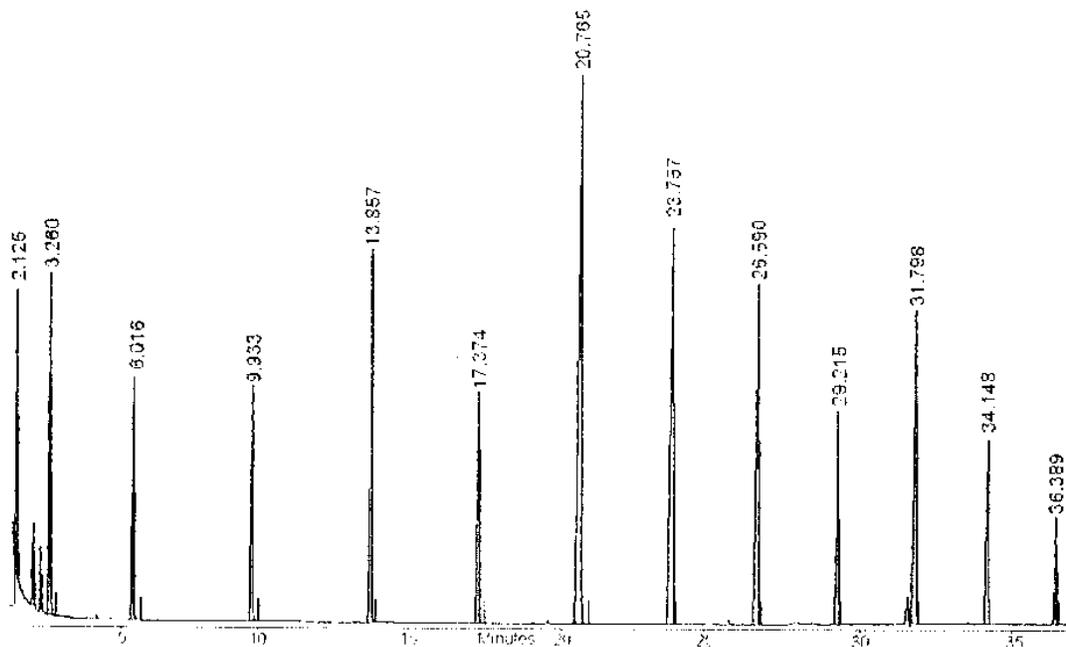
El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Hacer dos frotis de cultivos procedente de medio sólido de la bacteria. Fijarlos por calor de la forma ya descrita.
2. Colocar los portas sobre el trípode y cubrir la preparación con tres papeles de filtro recortados de forma que no sobresalgan.
3. Añadir verde de malaquita hasta que los papeles queden empapados y pegados a los frotis. Coger el mechero por su base y calentar lentamente las preparaciones hasta que estas empiecen a emitir un vapor blanquecino (detectable mejor sobre fondo negro). Mantener esa emisión con el mechero

durante 5 a 7 minutos sin dejar que se sequen las muestras (se añade más colorante). En esta fase se tiñen las formas vegetativas y las esporas.

4. Coger las preparaciones con pinzas y lavarlas intensamente con agua fría hasta que se observe muy poca coloración. Durante este lavado diferencial el agua arrastra el colorante de las formas vegetativas, mientras que el incluido en las esporas se mantiene en el interior debido al enfriamiento de las envolturas, que se vuelven de esta forma mucho menos permeables.
5. Se tiñen, ahora en frío, las preparaciones durante un minuto con un colorante de contraste como la safranina. Este sólo teñirá a las formas vegetativas, mientras que las esporas permanecerán refractarias a su entrada.
6. Desteñir con agua fría. Secar al aire y observar con el objetivo de inmersión. Si todo va como debe, las esporas aparecerán de color verde.

Anexo D. Perfil cromatográfico (GC-FID) de la mezcla de parafinas lineales $C_6 - C_{18}$.



Anexo E. Preparación de medios de cultivo.

Caldo común. Composición por litro.

Glucosa	5.0g
Peptona	2.5g
Extracto de levadura	2.5g

Para prepararlo, se llevan los distintos componentes a un matraz, se disuelven en agua hasta el volumen correspondiente. El (o los) recipiente (s) se aíslan con tapones de algodón cubriendo la boca del recipiente con papel aluminio y se esterilizan en autoclave a 120°C y 15 psi durante 15-20 minutos. Posteriormente, se deja enfriar y estarán listos para inocular las especies bacterianas.

Agar nutriente.

Para la preparación de este medio, se deben disolver 28g de agar nutriente por un litro de agua en un matraz. Posteriormente, se esteriliza en autoclave a 120°C y 15 psi durante 15-20 minutos. Luego de ser esterilizado y aún en caliente se agita para hacer la disolución de agar homogénea y se extiende en cajas petri (\pm a 50°C). Una vez solidificado el agar, está listo para realizar la respectiva inoculación bacteriana.

Anexo F. Preparación de la Escala de McFarland.

Preparación del tubo 0,5

Con el objeto de estandarizar la cantidad de bacterias que se emplean en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana debe prepararse un estándar de BaSO₄ equivalente al estándar de McFarland 0,5 el cual a su vez, representa una concentración aproximada de $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL.

Preparación del estándar de McFarland 0,5

Agregue 0,5 mL de una solución 0,048M de BaCl₂ (1,175% peso/vol BaCl₂.2H₂O) a 99,5 mL de una solución 0,18 M de H₂SO₄ (1% v/v). Agite constantemente para mantener la suspensión. Verifique la densidad correcta del estándar de turbidez con un espectrofotómetro con un paso de luz de 1 cm para determinar la absorbancia de la suspensión. La absorbancia a 625 nm debe estar entre 0,08 y 0,10 para el estándar de McFarland 0,5.

Procedimiento para la preparación de la escala McFarland.

Añadir en cada tubo (de 16x150 mm) los volúmenes que aparecen en la siguiente tabla y luego, mida la absorbancia de cada solución de acuerdo con la longitud de onda determinada anteriormente.

Tubo	BaCl ₂ contenido por mL	H ₂ SO ₄ (mL)	Concentración bacteriana correspondiente x mL ($\times 10^8$)
0,5	0,05	9,95	1,5
1	0,10	9,90	3,0
2	0,20	9,80	6,0
3	0,30	9,70	9,0
4	0,40	9,60	12,0
5	0,50	9,50	15,0
6	0,60	9,40	18,0
7	0,70	9,30	21,0
8	0,80	9,20	24,0
9	0,90	9,10	27,0
10	1,00	9,00	30,0

Anexo G. Descripción fenotípica de las cepas Gram- positivas.

Cepa	Características Culturales	Características Morfológicas
ILE -3	Colonia filamentosa, filamentos cortos, rizos hacia la derecha, de color amarillo claro.	Bacilos muy grandes, anchos, extremos redondos, se disponen en empalizadas.
M17-2	Colonia filamentosa, con rizos en todas las direcciones, de color amarillo claro.	Bacilos grandes y gruesos, se disponen en cadenas ramificadas, presenta esporas ovaladas.
M 32	Colonia filamentosa, rizos en todas direcciones, filamentos delgados, de color amarillo claro.	Bacilos grandes, gruesos y rectos. Borde redondo, se disponen en cadenas y presenta esporas.
M 38	Colonia filamentosa, rizado irregular, filamentos delgados de color amarillo.	Bacilos grandes, extremos redondos, se disponen en cadenas, presenta esporas ovaladas en el centro.
CUM-42	Colonia filamentosa, rizos hacia la derecha, de color amarillo claro.	Bacilos grandes, gruesos, extremos redondos y se disponen en cadenas.
BUE -30	Colonia filamentosa, rizos en todas direcciones, de color amarilla clara.	Bacilos medianamente grandes, extremos redondos, se disponen en cadenas largas.
OSM-1	Colonia filamentosa, rizos gruesos hacia la derecha, color amarillo.	Bacilos grandes, extremos redondos, se agrupan formando filamentos.
FLB-2	Colonia filamentosa, rizos delgados en todas las direcciones, color amarillo claro.	Bacilos grandes, borde redondo. Se agrupan en empalizadas y presentan esporas ovaladas.
ILE - 6	Colonias redondas y grandes en forma de manchas, de color amarillo claro.	Bacilos grandes, delgados, extremo ligeramente curvos, se disponen en cadenas. Presenta esporas.
SP-1	Colonia filamentosa, filamentos delgados, rizos hacia la derecha, de color amarillo.	Bacilos gruesos, de borde redondo, se agrupan en cadenas, presenta esporas ovaladas en el centro.
TUQ-3	Colonias redondas, grandes, borde entero, elevación convexa, opaca, color amarillo pálido.	Bacilos grandes, extremos rectos, gruesos, se agrupan formando cadenas.
G SJ-6	Colonia filamentosa, con rizos hacia la derecha, de color amarillo claro.	Bacilos grandes, medianamente gruesos, extremo redondo, agrupación en cadenas.

Descripción fenotípica de las cepas Gram- negativa.

Cepa	Características Culturales	Características Morfológicas
M17-1	Colonias redondas, pequeñas, borde entero, convexa, color amarilla clara.	Bacilos pequeños, con bordes redondos y su forma de agrupación es en grupos indefinidos.
SP 28	Colonias pequeñas, redondas, borde entero, elevación convexa, color naranja.	Bacilos muy pequeños, en forma de frijoliformes, se disponen en forma dispersa.
BUE 33	Colonias en forma de puntos, de borde entero, color naranja.	Bacilos demasiados pequeños, se disponen en agrupación dispersa.
OSM 34	Colonias en forma de puntos, borde entero, color amarillo claro.	Bacilos cortos, extremos redondeados, no tienen agrupación definida.
SP 40	Colonia ondulada, borde entero, elevación plana, de color amarillo.	Bacilos grandes, extremos redondos y se disponen en cadenas.
SP 41	Colonia redonda, borde entero, elevación convexa, de color amarillo	Bacilos pequeños, se encuentran formando grupos en forma dispersa.
FLO-3	Colonias en forma de puntos, borde entero, de color amarillo claro.	Bacilos muy pequeños, los cuales se agrupan marcadamente en cadenas.
CUM 1	Colonias redondas, pequeñas, borde entero, de color amarillo claro.	Bacilos cortos, extremos redondeados, se encuentran muy dispersos, no forman agrupación definida.
GSJ-3	Colonias redondas, borde entero, elevación convexa, color amarillo.	Bacilos pequeños, los cuales se agrupan en forma de figuras irregulares.
GSJ-4	Colonias redondas, elevación convexa brillante, centro oscuro, color amarilla clara.	Bacilos pequeños, de borde entero, se agrupan en cadenas ramificadas.
GSJ-5	Colonias pequeñas redondas, borde entero, elevación convexa, color amarilla oscura.	Bacilos muy pequeños, los cuales se agrupan marcadamente en cadenas.
PCO -3	Colonias redondas, borde ondulado, elevación convexa, color amarilla clara.	Bacilos largos, extremos redondeados, se encuentran muy dispersos, no forman agrupación definida.
OSM 32	Colonias redondas, borde entero, elevación convexa, de color amarilla	Bacilos pequeños, se encuentran formando grupos en forma dispersa

Anexo H. Repetibilidad de las áreas cromatográficas a diferentes concentraciones de los monómeros de PHA determinado por GC/FID.

➤ Para el metil éster 3HB

Concentración (mg/L)	Área (cuentas)	Área Promedio	σ	%CV
1	24	25.3	1.15	4.56
1	26			
1	26			
3.75	105	108.3	3.51	3.24
3.75	112			
3.75	108			
7.5	220	218	9.17	4.20
7.5	226			
7.5	208			
15	389	388.3	14.01	3.61
15	374			
15	402			
30	618	621	24.64	3.97
30	647			
30	598			
60	1086	1143	50.29	4.40
60	1160			
60	1182			
120	2878	3001	149.78	4.99
120	3168			
120	2958			
240	5462	5731	274.16	4.78
240	5720			
240	6010			
500	13066	12618	444.05	3.52
500	12178			
500	12610			
1000	24396	23956	448.21	1.87
1000	23500			
1000	23972			
2000	44448	45090	958.69	2.13
2000	46192			
2000	44630			

➤ Para el metil éster 3HV

Concentración(mg/L)	Área (cuentas)	Área Promedio	σ	%CV
1	26,2			
1	27	26,4	0,53	2,00
1	26			
3,75	127			
3,75	116	121	5,57	4,60
3,75	120			
7,5	254			
7,5	276	266	11,14	4,19
7,5	268			
15	372			
15	406	392	17,78	4,53
15	398			
30	529			
30	572	549	21,66	3,94
30	546			
60	1329			
60	1465	1393	68,41	4,91
60	1384			
125	2596			
125	2648	2698	134,75	4,99
125	2851			
250	5750			
250	6156	5975	206,65	3,46
250	6020			
500	12182			
500	11670	11675	504,02	4,32
500	11174			

Anexo I. Estudio de la reproducibilidad de tiempos de retención y áreas de los metil ésteres del co-polímero obtenido por GC, de las 25 cepas bacterianas en estudio.

➤ Tabla de datos para el metil éster *3-hidroxibutirato*.

No.	Cepa	Promedio*		σ		%, CV	
		t _R , min.	Área (cuentas)	t _R , min.	Área (cuentas)	t _R , min.	Área (cuentas)
1	BUE 30	3,955	818	0,005	33,0	0,12	4,04
2	BUE 33	3,944	1091	0,005	97,9	0,13	8,97
3	CUM 1	3,953	447	0,005	33,8	0,12	7,56
4	CUM 42	3,952	967	0,013	45,5	0,32	4,71
5	FLB -2	3,955	1955	0,009	72,5	0,23	3,71
6	FLO -3	3,947	892	0,010	81,4	0,25	9,12
7	GSJ -3	3,947	566	0,010	25,7	0,25	4,54
8	GSJ -4	3,944	901	0,005	34,5	0,13	3,83
9	GSJ -5	3,952	299	0,013	19,5	0,32	6,53
10	GSJ -6	3,944	22843	0,005	438,7	0,13	1,92
11	ILE 3	3,955	18223	0,004	1111,2	0,11	6,10
12	ILE 6	3,953	5627	0,005	311,8	0,12	5,54
13	M 17-1	3,955	403	0,005	16,5	0,12	4,10
14	M 17-2	3,947	33753	0,005	1117,3	0,13	3,31
15	M 32	3,941	11261	0,000	686,2	0,00	6,09
16	M 38	3,953	8669	0,005	508,6	0,12	5,87
17	OSM 32	3,952	901	0,013	21,8	0,32	2,42
18	OSM 34	3,955	509	0,009	23,9	0,23	4,69
19	OSM 1	3,955	1848	0,009	152,7	0,23	8,26
20	PCO 3	3,944	566	0,005	19,1	0,13	3,37
21	SP 28	3,947	316	0,005	21,6	0,13	6,85
22	SP 40	3,947	643	0,010	39,3	0,25	6,12
23	SP 41	3,944	454	0,005	16,8	0,13	3,71
24	SP-1	3,944	2717	0,005	66,0	0,13	2,43
25	TUQ -3	3,947	13470	0,005	578,1	0,13	4,29

* Valor promedio (n=3)

➤ Tabla de datos para el metil éster 3-hidroxivalerato.

No.	Cepa	Promedio*		σ		%, CV	
		t _R , min.	Área (cuentas)	t _R , min.	Área (cuentas)	t _R , min.	Área (cuentas)
1	BUE 30	6,013	313	0,005	16,0	0,08	5,12
2	BUE 33	6,019	332	0,005	18,5	0,09	5,57
3	CUM 1	ND	-	-	-	-	-
4	CUM 42	ND	-	-	-	-	-
5	FLB -2	ND	-	-	-	-	-
6	FLO -3	ND	-	-	-	-	-
7	GSJ -3	ND	-	-	-	-	-
8	GSJ -4	ND	-	-	-	-	-
9	GSJ -5	ND	-	-	-	-	-
10	GSJ -6	6,013	6021	0,005	82,3	0,08	1,37
11	ILE 3	6,019	1809	0,005	21,2	0,09	1,17
12	ILE 6	6,022	1523	0,005	42,8	0,09	2,81
13	M 17-1	6,014	105	0,010	7,0	0,16	6,67
14	M 17-2	6,019	3471	0,005	229,3	0,09	6,61
15	M 32	6,019	1920	0,005	52,7	0,09	2,74
16	M 38	6,022	880	0,010	26,2	0,16	2,98
17	OSM 32	ND	-	-	-	-	-
18	OSM 34	ND	-	-	-	-	-
19	OSM-1	ND	-	-	-	-	-
20	PCO 3	ND	-	-	-	-	-
21	SP 28	ND	-	-	-	-	-
22	SP 40	ND	-	-	-	-	-
23	SP 41	ND	-	-	-	-	-
24	SP-1	ND	-	-	-	-	-
25	TUM -3	6,022	761	0,005	13,1	0,09	1,71

* Valor promedio (n=3)

ND: no detectado

Anexo J. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención (t_R) de la mezcla de FAME's certificados

Pico No.	Fórmula	Éster metílico del ácido	t_R , min*	σ	CV, %
1	C8:0	Caprílico	6,251	0,001	0,009
2	C10:0	Caprico	7,788	0,001	0,007
3	C11:0	Undecanoico	8,826	0,001	0,013
4	C12:0	Láurico	10,034	0,001	0,006
5	C13:0	Tridecanoico	11,432	0,001	0,010
6	C14:0	Mirístico	12,992	0,002	0,012
7	C14:1	Miristoleico	13,762	0,001	0,008
8	C15:0	Pentadecanoico	14,721	0,003	0,022
9	C15:1	cis-10-pentadecenoico	19,334	0,001	0,003
10	C16:0	Palmítico	16,603	0,001	0,003
11	C16:1	Palmitoleico	17,401	0,002	0,009
12	C17:0	Heptadecanoico	18,589	0,002	0,011
13	C17:1	cis-10-heptadecenoico	15,584	0,002	0,003
14	C18:0	Esteárico	20,660	0,001	0,006
15	C18:1	Oleico	21,282	0,003	0,015
16	C18:2	Linoleico	22,429	0,002	0,007
17	C20:0	Araquídico	24,985	0,001	0,005
18	C20:1	Eicosenoico	25,726	0,001	0,002
19	C20:2	Eicosadienoico	27,164	0,001	0,002
20	C21:0	Heneicosanoico	27,502	0,001	0,004
21	C22:0	Behenico	30,676	0,002	0,005
22	C22:1	Erucico	31,576	0,002	0,005

* Valor promedio (n=3)

Anexo K. Estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención relativos (t_{RR}) de la mezcla certificada de FAME's corridos en una columna DB-23.

FA's	t_R , min*	t_{RR} **	σ		CV, %	
			t_R	t_{RR}	t_R	t_{RR}
C8:0	6,251	0,8474	0,001	8E-05	0,009	0,009
C10:0	7,788	1,0558	0,001	8E-05	0,007	0,006
C11:0	8,826	1,1965	0,001	2E-04	0,010	0,010
C12:0	10,034	1,3604	0,001	8E-05	0,006	0,005
C13:0	11,432	1,5498	0,001	2E-04	0,010	0,010
C14:0	12,992	1,7613	0,002	2E-04	0,020	0,009
C14:1	13,762	1,8658	0,001	2E-04	0,008	0,008
C15:0	14,721	1,9958	0,003	4E-04	0,020	0,020
C15:1	15,584	2,1132	0,001	8E-05	0,003	0,002
C16:0	16,603	2,2510	0,001	8E-05	0,003	0,003
C16:1	17,401	2,3591	0,002	2E-04	0,009	0,009
C17:0	18,589	2,5202	0,002	3E-04	0,010	0,010
C17:1	19,332	2,6209	0,002	3E-04	0,010	0,010
C18:0	20,660	2,8010	0,001	2E-04	0,006	0,006
C18:1	21,282	2,8853	0,003	4E-04	0,020	0,020
C18:2	22,429	3,0409	0,002	2E-04	0,007	0,007
C20:0	24,985	3,3873	0,001	2E-04	0,005	0,005
C20:1	25,726	3,4878	0,001	8E-05	0,002	0,002
C20:2	27,164	3,6828	0,001	8E-05	0,002	0,002
C21:0	27,502	3,7286	0,001	2E-04	0,004	0,004
C22:0	30,676	4,1588	0,002	2E-04	0,005	0,005
C22:1	31,576	4,2810	0,002	2E-04	0,005	0,005

* Valor promedio ($n = 3$)

** $\bar{X}_{std} = 7.376$, $\sigma = 0.001$, $CV = 0.014\%$

Anexo L. Estudio de la reproducibilidad de las áreas y áreas relativas de la mezcla certificada de FAME's.

FA's	Áreas (cuentas)*		σ		CV, %	
	A _{FAME}	A _i / A _{Istd} **	A _{FAME}	A _i / A _{Istd}	A _{FAME}	A _i / A _{Istd}
C8:0	10,43	0,0371	0,48	0,0013	4,67	3,48
C10:0	13,38	0,0476	0,38	0,0014	2,87	2,93
C11:0	8,09	0,0288	0,13	0,0011	1,70	3,65
C12:0	15,88	0,0565	0,21	0,0018	1,37	3,17
C13:0	8,86	0,0316	0,20	0,0012	2,26	3,91
C14:0	17,98	0,0640	0,22	0,0019	1,24	2,99
C14:1	8,66	0,0308	0,22	0,0013	2,59	4,29
C15:0	9,80	0,0349	0,26	0,0015	2,72	4,29
C15:1	9,76	0,0347	0,41	0,0019	4,22	5,55
C16:0	28,99	0,1031	0,58	0,0000	2,01	0,04
C16:1	9,25	0,0329	0,27	0,0016	2,95	5,00
C17:0	8,96	0,0319	0,07	0,0009	0,81	2,78
C17:1	10,24	0,0364	0,27	0,0017	2,69	4,74
C18:0	21,00	0,0747	0,27	0,0022	1,32	3,01
C18:1	20,77	0,0739	0,52	0,0030	2,54	4,01
C18:2	8,31	0,0296	0,34	0,0014	4,12	4,77
C20:0	21,59	0,0768	0,38	0,0029	1,77	3,82
C20:1	11,12	0,0396	0,28	0,0018	2,60	4,64
C20:2	10,59	0,0377	0,38	0,0021	3,63	5,68
C21:0	11,42	0,0407	0,39	0,0022	3,44	5,47
C22:0	22,52	0,0801	0,50	0,0031	2,22	3,84
C22:1	11,12	0,0396	0,40	0,0023	3,66	5,72

* Valor promedio (n=3)

** $\bar{X}_{Istd} = 281,39$ $\sigma = 13,37$ $CV = 4,75\%$

Anexo M. Tablas de datos ordenados de áreas y reproducibilidad de los FAME's obtenidos por GC de las cepas en estudio.

➤ Tabla de áreas $\pm \sigma$ de los FAME's obtenidos por GC-FID.

No. cepa	Promedio Áreas*				
	<i>i</i> -C13:0	<i>ai</i> -C13:0	<i>i</i> -C14:0	C14:0	<i>i</i> -C15:0
1 FLB-2	40,4 \pm 1,8	19,3 \pm 0,8	21,8 \pm 1,4	23,5 \pm 0,8	57,7 \pm 2,4
2 GSJ-6	48,1 \pm 2,8	19,5 \pm 1,0	25,2 \pm 1,3	22,1 \pm 1,6	49,0 \pm 2,4
3 ILE 3	37,5 \pm 0,9	13,9 \pm 0,5	24,0 \pm 0,8	22,9 \pm 0,9	54,2 \pm 1,6
4 ILE 6	37,4 \pm 1,4	18,7 \pm 0,6	22,8 \pm 0,8	21,6 \pm 1,4	59,2 \pm 2,3
5 M17-2	40,9 \pm 1,8	17,4 \pm 1,4	26,9 \pm 1,2	20,5 \pm 1,6	57,6 \pm 2,3
6 M32	42,2 \pm 2,5	16,6 \pm 0,5	26,1 \pm 1,5	14,2 \pm 1,0	58,9 \pm 2,0
7 M38	40,9 \pm 1,6	15,3 \pm 1,0	22,7 \pm 2,3	13,2 \pm 1,0	63,4 \pm 2,9
8 OSM- 1	38,7 \pm 1,5	21,1 \pm 1,0	27,3 \pm 1,5	22,8 \pm 1,4	51,3 \pm 2,4
9 SP-1	44,4 \pm 2,3	16,2 \pm 1,2	29,6 \pm 1,8	32,8 \pm 1,6	61,7 \pm 2,6
10 TUQ-3	40,4 \pm 2,0	15,9 \pm 1,0	26,3 \pm 1,3	19,8 \pm 2,0	61,6 \pm 2,8
11 B. cereus	40,3 \pm 2,7	18,4 \pm 1,5	25,0 \pm 1,4	24,1 \pm 1,4	55,6 \pm 3,1

Continuación de la tabla de datos.

No. cepa	Promedio Áreas * $\pm \sigma$				
	<i>ai</i> -C15:0	C16:0	C16:1	<i>ai</i> -C17:0	C18:0
1 FLB-2	25,0 \pm 1,0	158,5 \pm 5,0	26,6 \pm 1,4	41,6 \pm 1,7	21,9 \pm 1,5
2 GSJ-6	27,7 \pm 0,9	199,0 \pm 6,6	22,2 \pm 1,1	48,1 \pm 1,5	37,5 \pm 1,8
3 ILE 3	25,1 \pm 1,2	173,9 \pm 6,5	17,5 \pm 1,1	47,5 \pm 1,7	31,6 \pm 2,1
4 ILE 6	26,7 \pm 1,6	191,0 \pm 6,7	21,5 \pm 1,4	40,7 \pm 1,8	15,4 \pm 0,6
5 M17-2	27,4 \pm 1,5	161,5 \pm 4,2	20,9 \pm 1,3	35,8 \pm 1,5	22,4 \pm 1,6
6 M32	28,2 \pm 0,8	140,9 \pm 3,8	13,8 \pm 0,5	50,1 \pm 2,1	26,5 \pm 1,0
7 M38	29,5 \pm 3,2	95,00 \pm 3,9	21,5 \pm 1,6	54,0 \pm 2,3	25,5 \pm 1,2
8 OSM- 1	29,3 \pm 1,6	210,8 \pm 9,4	23,3 \pm 1,6	51,5 \pm 2,5	39,9 \pm 2,0
9 SP-1	25,1 \pm 1,0	232,5 \pm 9,9	26,2 \pm 1,7	43,4 \pm 1,8	34,3 \pm 1,8
10 TUQ-3	26,0 \pm 2,2	166,7 \pm 9,0	16,8 \pm 1,1	40,8 \pm 2,2	26,8 \pm 2,0
11 B. cereus	26,6 \pm 1,7	174,4 \pm 8,6	23,6 \pm 1,3	42,2 \pm 1,6	21,6 \pm 1,3

* Valor promedio (n=3)

- Estudio de la reproducibilidad de áreas de los FAME`s obtenidos por GC, de las 10 cepas bacterianas en estudio.

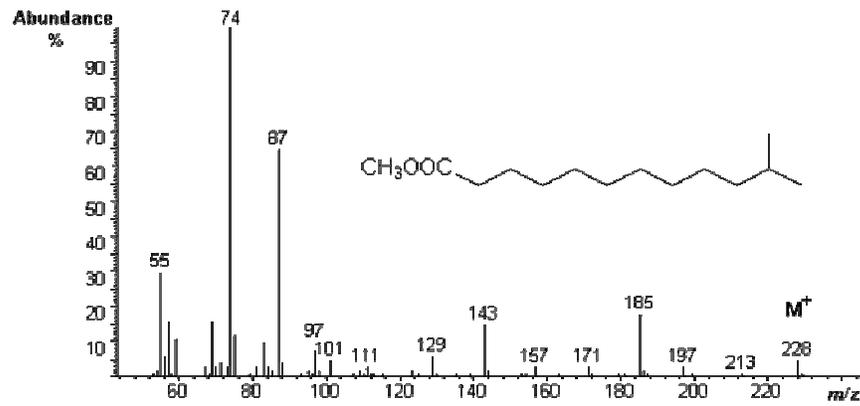
No.	Cepa	<i>Coefficiente de variación (%)</i>				
		<i>i-C13:0</i>	<i>ai-C13:0</i>	<i>i-C14:0</i>	<i>C14:0</i>	<i>i-C15:0</i>
1	FLB-2	4,47	4,09	6,64	3,52	4,20
2	GSJ-6	5,74	5,19	5,01	7,18	4,94
3	ILE 3	2,48	3,61	3,39	4,01	2,97
4	ILE 6	3,81	3,25	3,32	6,47	3,90
5	M 32	5,98	3,12	5,90	7,23	3,43
6	M 38	3,84	6,37	5,14	7,27	4,51
7	M17-2	4,31	8,01	4,29	7,73	3,92
8	OSM- 1	3,77	4,57	5,53	6,28	4,68
9	SP-1	5,27	7,25	6,12	4,80	4,26
10	TUQ-3	4,84	6,43	4,90	9,90	4,48
11	B. cereus	6,62	7,99	5,69	5,97	5,64

Continuación de la tabla de datos.

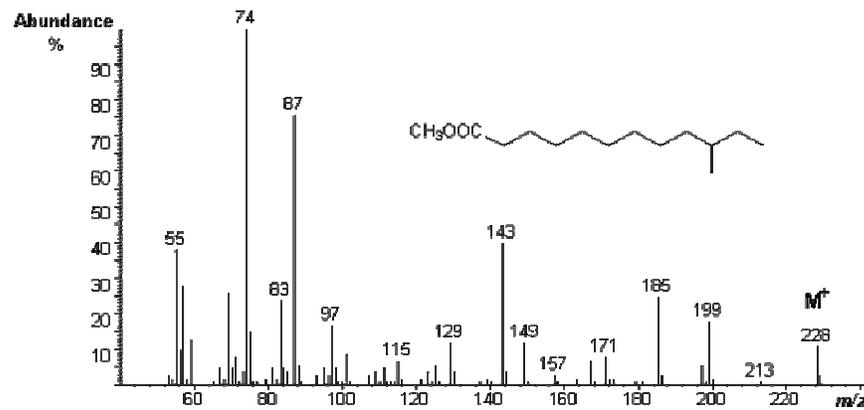
No.	Cepa	<i>Coefficiente de variación (%)</i>				
		<i>ai-C15:0</i>	<i>C16:0</i>	<i>C16:1</i>	<i>ai-C17:0</i>	<i>C18:0</i>
1	FLB-2	4,07	3,15	5,28	4,10	6,82
2	GSJ-6	3,07	3,33	4,79	3,15	4,68
3	ILE 3	4,87	3,71	6,40	3,61	6,75
4	ILE 6	5,85	3,51	6,70	4,36	4,20
5	M17-2	5,53	2,60	6,01	4,27	7,21
6	M32	2,71	2,72	3,66	4,21	3,77
7	M38	4,89	4,07	7,35	4,31	3,98
8	OSM- 1	5,60	4,47	6,78	4,81	5,11
9	SP-1	3,96	4,26	6,46	4,13	5,25
10	TUQ-3	8,48	5,39	6,49	5,30	7,34
11	B. cereus	6,46	4,91	5,67	3,71	6,01

Anexo N. Espectros de masas de los FAME's identificados en las cepas bacterianas productoras de PHA.

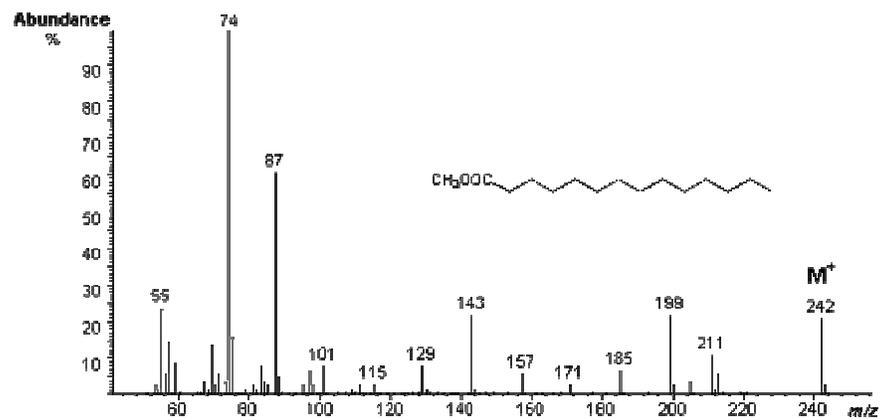
Metil éster del ácido 11- metil dodecanoico (*i*-C13:0)



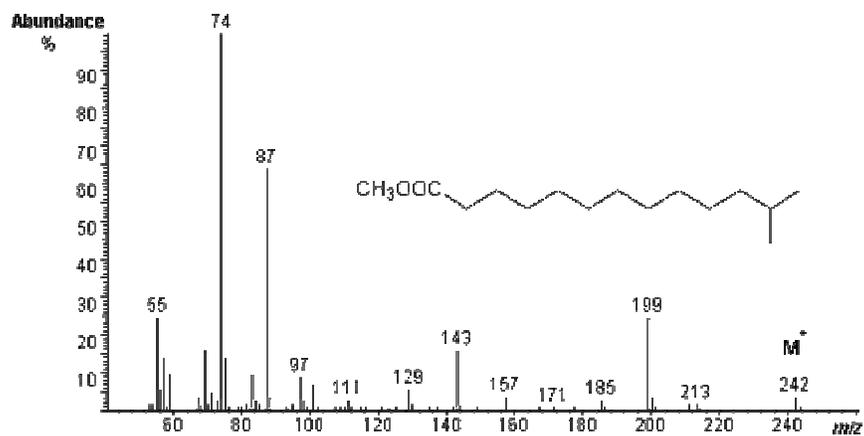
Metil éster del ácido 10-metil dodecanoico (*ai*-C13:0)



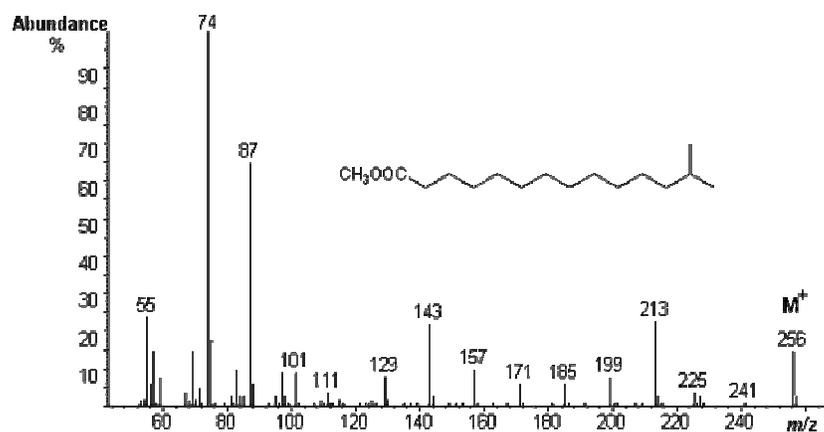
Metil éster del ácido mirístico (C14:0)



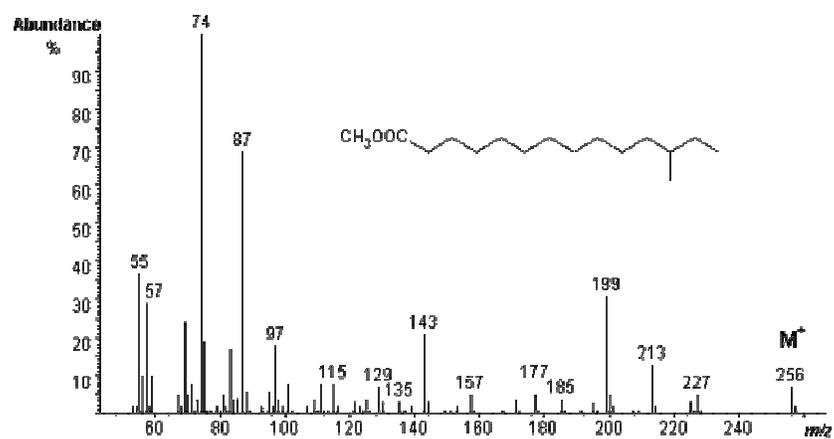
Metil éster del ácido 12-metil-tridecanoico (*i*-C14:0)



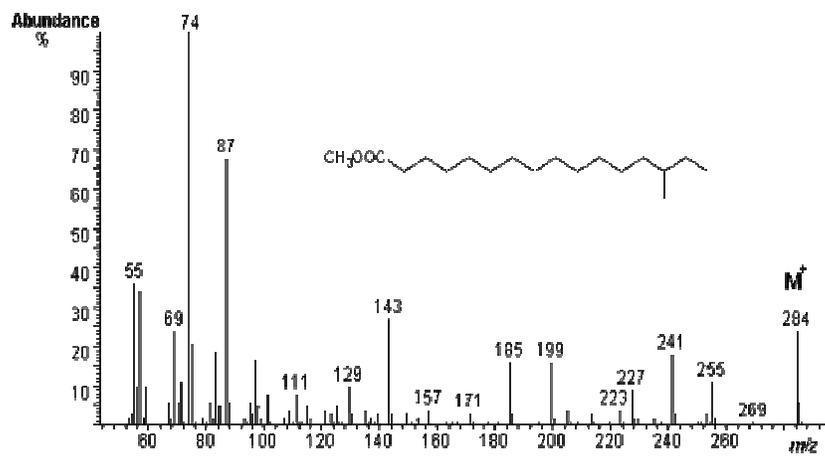
Metil éster del ácido 13- metil tetradecanoico (*i*-C15:0)



Metil éster del ácido 12-metil tetradecanoico (*ai*-C15:0)



Metil éster del ácido 14-metilhexadecanoico (ai-C17:0)



Metil éster del ácido esteárico (C18:0)

