





# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

## **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS PARA PRODUCCIÓN DE BIOPLÁSTICO DE ORIGEN MICROBIANO UTILIZANDO COMO SUSTRATO AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA LACTEA, 2015**

Trabajo de titulación para optar por el título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL**

**AUTOR:** CHRISTIAN ORLANDO CAMACHO LÓPEZ

**TUTOR:** PhD. Gerardo Emilio Medina

Riobamba, Ecuador

Marzo 2016

©2016, Christian Orlando Camacho López

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS**

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS PARA PRODUCCIÓN DE BIOPLÁSTICO DE ORIGEN MICROBIANO UTILIZANDO COMO SUSTRATO AGUA RESIDUAL DE LA INDUSTRIA LACTEA, 2015**, de responsabilidad del señor Christian Orlando Camacho López, ha sido cuidadosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación:

PhD. Gerardo Emilio Medina

**DIRECTOR DE TRABAJO** \_\_\_\_\_  
**DE TITULACIÓN**

MSc. Paola Argüello

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL** \_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Christian Orlando Camacho López, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 12 de abril de 2016

Christian Orlando Camacho López

180463989-4

## **DEDICATORIA**

A Dios por ser mi guía y bendecir cada instante de mi vida, a mis abuelos pues es el fruto del cuidado y la educación que me brindaron, a mi padre por su amor, sacrificio y apoyo incondicional, así como a mi familia por su paciencia y altruismo.

Christian Orlando Camacho López

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis abuelitos por su apoyo y consejo permanente

A mi padre por su sacrificio y soporte constante

A mi familia por brindarme ánimo y fortaleza

A mi tutor Emilio Medina y mi asesora Paola Argüello por su constante apoyo, conocimiento, paciencia y estoicismo.

A la Empresa Lácteos Santillán por abrir las puertas de su industria colaborando en la presente investigación, especialmente a la Dra. Mery Oleas Jefa de Producción.

A Fausto Tapia y Aida Fierro por su colaboración, así como a todos los docentes, técnicos, amigos y colegas que colaboraron durante el transcurso de esta investigación.

Christian Orlando Camacho López

## RESUMEN

Los polihidroxicanoatos son bioplásticos sintetizados por algunas bacterias como material de reserva de carbono y energía. La presente investigación analizó la producción del biopolímero en 52 clones estabilizados provenientes de aguas residuales lácteas, así como, producción de exopolímeros, tolerancia a medios salinos, crecimiento en medios ácidos, resistencia a metales pesados y producción de enzimas. La selección de los clones fue realizada bajo dos criterios, los clones del grupo A (21 clones) fueron obtenidos del medio específico para producción de polihidroxicanoatos (ADP) considerando su crecimiento y características macroscópicas, mientras que los clones del grupo B (31 clones) obtenidos de muestras sometidas a refrigeración fueron no fermentadores de lactosa, oxidasa positivo. El análisis de producción de polihidroxicanoatos fue realizado utilizando diferentes sustratos y condiciones de estrés mediante tinción con Sudan Black y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. Los resultados obtenidos demostraron que ninguno de los clones aislados fue capaz de producir polihidroxicanoatos, sin embargo, fueron capaces de producir exopolímeros, tolerar concentraciones entre 5 y 7.5% de cloruro de sodio, adaptarse a plomo y cadmio en concentraciones mayores a 50mg/ml, y a mercurio, arsénico y cobre en concentraciones entre 5-50 mg/ml, un 16.13% de clones del Grupo B fue tolerante a pH ácido, la mayoría de los clones del Grupo B fueron capaces de producir proteasas y lipasas, mientras que un 14.29% del Grupo A sintetizó amilasas. Durante la investigación se concluye que la refrigeración de las muestras ayudó a seleccionar clones con mayor adaptación a medios hostiles de crecimiento, recomendando realizar nuevas investigaciones sobre el tema, así como de otros relacionados a la producción de polihidroxicanoatos, al considerarse campos de estudio nuevos a nivel local cuyos resultados pueden brindar mecanismos de producción ambientalmente sostenibles.

**Palabras clave:** <BIOPOLÍMEROS> <BIOPLÁSTICOS> <POLIHIDROXIALCANOATOS> <AGUA RESIDUAL> <EXOPOLÍMEROS> <HALOTOLERANCIA> <METALES PESADOS> <ENZIMAS>

## ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates are bioplastics synthesized by some bacteria as reserve of carbon and energy. This research analyzed the production of biopolymer stabilized by 52 clones from dairy wastewater, as well as production of Exopolymers, tolerance to saline environments, growth in acidic media, resistance to heavy metals and enzyme production. The clone choice was performed under two criteria, clones of group A (21 clones) were obtained from specific means in order to produce polyhydroxyalkanoates (ADP) considering their growth and macroscopic characteristics, whereas clones of group B (31 clones) were obtained from samples subjected to cooling, these were not fermenters of lactose, positive oxidase. The analysis of polyhydroxyalkanoates production was performed using different substrates and stress conditions by staining with Sudan Black and infrared spectroscopy processed with Fourier. The results showed that none of the isolated clones was able to produce polyhydroxyalkanoates, however, they were able to produce exopolymers, tolerate concentrations between 5 and 7.5 % of sodium chloride, adapted to cadmium and lead in higher concentrations to 50mg/ml, and mercury, arsenic and copper concentrations between 5-50 mg/ml; 16.13% of clones from group B was tolerant to acidic pH, so most group B clones were capable of producing lipases and proteases, while a 14.29% from group A synthesized amylases. During the research it concludes that the cooling of samples helped to select clones with higher suit on hostile environments, that is why it recommends further research on the topic, as well as related to the production of polyhydroxyalkanoates, considering new local study whose results can provide mechanisms of environmentally sustainable production.

**Keywords:** <BIOPOLYMERS> <BIOPLASTICS> <POLYHYDROXYALKANOATES>  
<WASTEWATER> <EXOPOLYMERS> <HALOTOLERANCE> <HEAVY METALS>  
<ENZYMES>.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>PORTADA.....</b>	<b>i</b>
<b>DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....</b>	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>xiv</b>

### **CAPÍTULO I**

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Identificación del problema .....	1
1.2 Justificación de la investigación.....	3
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo General .....	5
1.3.2 Objetivos Específicos .....	5

### **CAPÍTULO II**

<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>6</b>
2.1 Antecedentes de la Investigación .....	6
2.2 Bases Teóricas .....	8
2.2.1 Contaminación .....	8
2.2.1.1 Contaminación del agua .....	9
2.2.1.2 Agua residual de la industria láctea .....	9
2.2.1.3 Microbiota en aguas residuales lácteas .....	10
2.2.2 Técnicas de análisis microbiológico .....	10
2.2.2.1 Inoculación.....	10
2.2.2.2 Aislamiento .....	11
2.2.2.3 Identificación morfológica y bioquímica.....	11
2.2.3 Las bacterias y su alcance biológico e industrial .....	13
2.2.3.1 Las bacterias en el sistema ecológico .....	13
2.2.3.2 Las bacterias en la salud y la industria.....	13
2.2.3.3 Las bacterias y el medio ambiente .....	13
2.2.4 Polímeros .....	13

2.2.4.1	Polímeros sintéticos.....	14
2.2.4.2	Polímeros naturales o Biopolímeros .....	15
2.2.4.3	Polímeros extracelulares.....	16
2.2.4.4	Polímeros intracelulares .....	17
2.2.5	Polihidroxicanoatos .....	18
2.2.5.1	Tipos de Polihidroxicanoatos.....	18
2.2.5.2	Propiedades y aplicaciones de polihidroxicanoatos .....	20
2.2.5.3	Bacterias y mecanismos de producción de polihidroxicanoatos .....	21
2.2.5.4	Métodos de Identificación de polihidroxicanoatos .....	22

### **CAPÍTULO III**

<b>3.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>24</b>
3.1	Metodología de la Investigación .....	24
3.2	Diseño de la investigación .....	24
3.3	Unidad de Análisis.....	24
3.4	Etapas de la investigación .....	24
3.4.1	Obtención de clones bacterianos .....	24
3.4.1.1	Recolección de las muestras de análisis.....	24
3.4.1.2	Criterios para la selección de los clones analizados.....	25
3.4.1.3	Recuento bacteriológico .....	25
3.4.1.4	Aislamiento de los clones de las muestras .....	26
3.4.1.5	Tinción Gram .....	26
3.4.2	Análisis de producción de polihidroxicanoatos .....	26
3.4.2.1	Cultivo de clones en medios específicos para producción de polihidroxicanoatos ..	26
3.4.2.2	Cultivo de clones en medios suplementados con diferentes azúcares .....	27
3.4.2.3	Cultivo de clones en medios salinos .....	27
3.4.2.4	Cultivo de clones en medios con diferentes concentraciones de lactosa. ....	27
3.4.2.5	Cultivo de clones a pH ácido.....	27
3.4.2.6	Prueba de producción de gránulos de PHA con Tinción Negro Sudán .....	28
3.4.2.7	Determinación de polihidroxicanoatos mediante espectroscopia Infrarrojo.....	28
3.4.3	Caracterización de bacterias .....	29
3.4.3.1	Prueba de resistencia a metales pesados .....	29
3.4.3.2	Prueba de producción de proteasas .....	30
3.4.3.3	Prueba de producción de lipasas.....	30
3.4.3.4	Prueba de producción de amilasas .....	31
3.4.3.5	Pruebas Bioquímicas para identificación bacteriana.....	31

## CAPÍTULO IV

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
4.1	Obtención de los clones bacterianos .....	33
4.1.1	Recolección de las muestras .....	33
4.1.2	Recuento Bacteriológico Inicial .....	33
4.1.3	Análisis del tipo de bacteria según el metabolismo de lactosa.....	34
4.1.4	Inhibición del crecimiento bacteriano en el medio específico ADP.....	35
4.1.5	Crecimiento bacteriano post-refrigeración.....	36
4.1.6	Selección de clones bacterianos.....	37
4.1.7	Estabilización de clones bacterianos.....	38
4.2	Características Macroscópicas, microscópicas y tinción Gram de los clones aislados	38
4.2.1	Forma .....	38
4.2.2	Superficie .....	39
4.2.3	Borde.....	40
4.2.4	Color .....	41
4.2.5	Presencia de Gas.....	42
4.2.6	Segregación de pigmento en el medio .....	43
4.2.7	Tinción Gram .....	45
4.3	Análisis de producción de polihidroxicarboxilatos .....	46
4.4	Caracterización bacteriana .....	48
4.4.1	Producción de Exopolímeros.....	48
4.4.2	Crecimiento en medios ácidos .....	49
4.4.3	Halotolerancia .....	50
4.4.4	Resistencia a metales pesados .....	51
4.4.4.1	Plomo .....	51
4.4.4.2	Mercurio.....	52
4.4.4.3	Cobre.....	54
4.4.4.4	Cadmio.....	55
4.4.4.5	Arsénico .....	56
4.4.5	Producción de enzimas .....	57
4.4.6	Identificación bacteriana .....	59
	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>62</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
	<b>ANEXOS</b>	

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2-1</b>	Contaminación según el agente contaminante .....	8
<b>Figura 2-2</b>	Representación de los diferentes tipos de cadenas poliméricas .....	14
<b>Figura 2-3</b>	Síntesis de dextrano por <i>Leucostonoc mesenteroides</i> .....	16
<b>Figura 2-4</b>	Micrografía de transmisión electrónica de bacterias productoras de PHB .....	18
<b>Figura 2-5</b>	Fórmula General de Polihidroxicanoatos .....	19
<b>Figura 2-6</b>	Láminas de PHB extraído de cultivo bacteriano. ....	20
<b>Figura 2-7</b>	Vías metabólicas usuales de biosíntesis de polihidroxicanoatos. ....	22
<b>Figura 2-8</b>	Tinción de los gránulos de PHA's utilizando Azul de Nilo .....	23
<b>Figura 2-9</b>	Espectro FT-IR de una lámina de PHB .....	23
<b>Figura 4-1</b>	Identificación de los puntos de muestreo .....	33
<b>Figura 4-2</b>	Tipo de bacteria según el metabolismo de lactosa .....	35
<b>Figura 4-3</b>	Diferencia de crecimiento bacteriano en medio nutritivo y ADP .....	36
<b>Figura 4-4</b>	Decrecimiento bacteriano post-refrigeración .....	37
<b>Figura 4-5</b>	Tipo de forma macroscópica de los clones aislados .....	39
<b>Figura 4-6</b>	Tipo de superficie presentada por las colonias bacterianas .....	40
<b>Figura 4-7</b>	Tipo de borde de las colonias bacterianas .....	41
<b>Figura 4-8</b>	Color macroscópico de las colonias bacterianas .....	42
<b>Figura 4-9</b>	Formación gas en el clon A17 .....	42
<b>Figura 4-10</b>	Presencia de gas en las colonias bacterianas .....	43
<b>Figura 4-11</b>	Producción de exopigmento.....	44
<b>Figura 4-12</b>	Presencia de exopolímeros en clones del Grupo A y B.....	45
<b>Figura 4-13</b>	Tinción Gram del Clon A12 .....	46
<b>Figura 4-14</b>	Tinción con Sudan Black del Clon B1 .....	47
<b>Figura 4-15</b>	Espectro infrarrojo por transformada de Fourier del Clon B1 .....	47
<b>Figura 4-16</b>	Formación de exopolímeros en medio suplementado con D-Glucosa.....	49
<b>Figura 4-17</b>	Cantidad de clones capaces de producir exopolímeros .....	49
<b>Figura 4-18</b>	Cantidad de clones capaces de crecer en pH ácido .....	50
<b>Figura 4-19</b>	Capacidad de halotolerancia a diferentes concentraciones.....	51
<b>Figura 4-20</b>	Resistencia a diferentes concentraciones de plomo.....	52
<b>Figura 4-21</b>	Resistencia a diferentes concentraciones de mercurio .....	53
<b>Figura 4-22</b>	Resistencia a diferentes concentraciones de cobre .....	54
<b>Figura 4-23</b>	Resistencia a diferentes concentraciones de cadmio .....	55
<b>Figura 4-24</b>	Resistencia a diferentes concentraciones de arsénico.....	56

<b>Figura 4-25</b>	Producción de diferentes tipos de enzimas .....	58
<b>Figura 4-26</b>	Identificación bacteriana de los clones aislados.....	59

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2-1</b>	Métodos de aislamiento frecuentes.....	11
<b>Tabla 2-2</b>	Características más importantes para identificación bacteriana. ....	12
<b>Tabla 2-3</b>	Principales polímeros sintéticos .....	15
<b>Tabla 2-4</b>	Tipos de polímeros naturales.....	15
<b>Tabla 2-5</b>	Tipos de exopolímeros bacterianos .....	17
<b>Tabla 2-6</b>	Principales monómeros constituyentes de polihidroxicarboxilatos .....	19
<b>Tabla 3-1</b>	Composición de medio agar para detección de polihidroxicarboxilatos (ADP) .....	25
<b>Tabla 3-2</b>	Longitudes de onda características de la estructura de polihidroxicarboxilatos .....	29
<b>Tabla 3-3</b>	Composición de medio para analizar resistencia a metales pesados .....	30
<b>Tabla 3-4</b>	Composición de medio para producción de lipasas .....	31
<b>Tabla 3-5</b>	Pruebas bioquímicas de identificación .....	32
<b>Tabla 4-1</b>	Conteo microbiológico inicial en medio nutritivo .....	34
<b>Tabla 4-2</b>	Cantidad de clones seleccionados por muestra.....	37
<b>Tabla 4-3</b>	Cantidad de clones aislados por muestra .....	38

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Identificación del problema

El principal problema ambiental de la industria láctea es la generación de aguas residuales originadas durante la etapa de producción, las cuales son habitualmente eliminadas sin tratamiento previo y con alta carga contaminante, en gran parte de carácter orgánico. (Escuela de Organización Industrial de Sevilla, 2008, pp. 9-12)

Las centrales lecheras según el tipo de planta producen diariamente entre 4 y 10 litros de aguas residuales por cada litro de leche procesada, procedentes principalmente de la limpieza de aparatos, máquinas y salas de tratamiento que contienen restos de lácteos y químicos como ácidos, detergentes, desinfectantes entre otros. (Instituto de Academias de Andalucía, 1995, pp. 14-18).

En Ecuador, según el Sistema Estadístico Agropecuario Nacional la producción nacional de leche en el año 2011 fue de 6.375 metros cúbicos, el mayor aporte de producción se registra en la región sierra con el 75,9%, con el consiguiente impacto ambiental y tendencia de crecimiento. (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2011)

Los envases de plásticos derivados del petróleo, también constituyen un impacto ambiental, a nivel mundial se calcula que aproximadamente 25 millones de toneladas de plásticos se acumulan en el ambiente cada año y pueden permanecer inalterables por un periodo comprendido entre 100 y 500 años, debido a su lenta degradación que consiste principalmente en la fragmentación en partículas más pequeñas. (Ortiz, 2013)

El plástico constituye uno de los materiales más utilizados en todo el mundo y su disposición genera un peligro constante para el medio ambiente, especialmente en el mar donde cada año se desechan grandes cantidades de residuos plásticos procedentes de vertederos mal gestionados, aguas residuales y pluviales, así como actividades comerciales cercanas. (PNUMA-DEAT, 2011, pp. 21-26)

Un ejemplo representativo del daño ecológico del plástico se evidencia durante la descarga indiscriminada de desperdicios plásticos en el mar, que ocasionan daños de nivel letal o subletal a más de 260 especies marinas, como consecuencia de su enmarañamiento o enredamiento por el

tamaño y complejidad del residuo plástico, e igualmente por problemas gastrointestinales causados por su ingestión al confundirlos con alimento debido a la fragmentación y reducción de su tamaño. (PNUMA-DEAT, 2011, pp. 21-26)

Otro problema de los residuos plásticos es el indeseable aspecto que otorgan al medio ambiente, creando un importante impacto visual negativo. (PNUMA-DEAT, 2011, pp. 21-26)

En el periodo de enero a julio de 2012 las importaciones de materias primas para la industria de la manufactura de plásticos registradas por el Banco Central del Ecuador, fueron de 236.274 toneladas métricas con un costo de 386,77 millones de dólares, cuyas mayores importaciones en valor incluyen polietileno (PE), polietilentereftalato (PET), polipropileno (PP) y policloruro de vinilo (PVC), materiales que pueden ser reemplazados por polímeros amigables ambientalmente producidos de manera local, fortaleciendo la producción nacional y generando una considerable disminución a la salida de divisas. (Cámara de Industrias de Guayaquil, 2012)

Bajo este contexto, la presente investigación pretende aislar, caracterizar e identificar bacterias de aguas residuales de la industria láctea, capaces de aprovechar dichos fluidos para la producción de bioplástico, generando con ello una alternativa ambientalmente amigable y económicamente viable a la utilización de plásticos derivados de petróleo.

## **1.2 Justificación de la investigación**

La búsqueda e identificación de microorganismos en ambientes extremos o poco frecuentes permite a los investigadores conocer diferentes especies microbiológicas capaces de producir nuevos metabolitos de interés industrial, que posteriormente se pueden optimizar mejorando su capacidad de producción. (Piñero, 2013, pp. 298-306)

El presente estudio busca asilar, caracterizar e identificar bacterias en aguas residuales de la industria láctea, considerando dichos fluidos como un potencial recurso microbiológico para la producción de biopolímeros, específicamente polihidroxicanoatos (PHA's), un tipo de bioplástico cuyo tiempo de degradación puede ser inferior a los seis meses. (AIMPLAS, 2011)

La identificación de bacterias capaces de sintetizar polihidroxicanoatos (PHA's) a partir de fuentes de carbono renovables, baratas y reproducibles a gran escala, representa una alternativa ambiental potencialmente viable a la fabricación de plásticos derivados del petróleo, reduciendo la contaminación asociada a su producción y desecho. (González, et al., 2013, pp. 78,79)

La producción de biopolímeros a partir de bacterias permite el aprovechamiento de grandes cantidades de residuos de la industria láctea, constituidos mayormente por grasas, proteínas, carbohidratos, calcio y minerales, que sin tratamiento previo se convierten en sustancias contaminantes. (Valencia & Ramírez, 2009, p. 28)

El aprovechamiento a nivel industrial de biopolímeros hace imprescindible identificar las bacterias sintetizadoras necesarias para su obtención, constituyendo la base para cualquier etapa de producción a nivel piloto e industrial.

Este proyecto propone la búsqueda, identificación y utilización de microorganismos no explotados, como una alternativa para solucionar el impacto ambiental que generan las aguas residuales de la industria láctea, al considerar que la biotecnología concierne toda aplicación tecnológica que utilice sistemas, organismos o derivados biológicos con el fin de crear o modificar productos o procesos. (United Nations, 1992, p. 3)

A su vez, el proyecto se fundamenta en el perfil de egreso de la carrera de Ingeniera en Biotecnología Ambiental que otorga al estudiante la misión de investigar los impactos ambientales generados por acciones antropogénicas con el fin de proponer soluciones innovadoras al servicio del entorno bio-social respondiendo a leyes y normativas vigentes. (ESPOCH, 2013)

El presente proyecto de investigación se enmarca en las leyes y reglamentos que promueven el cuidado del ambiente, el desarrollo productivo y la generación de la ciencia y la tecnología, que se dictaminan desde la Carta Magna de la República hasta diversas Normas Técnicas.

De forma concreta, la investigación se enmarca en el Acuerdo 019 del Ministerio del Ambiente denominado Políticas Generales para la Gestión Integral de Plásticos que dispone en su artículo 4 fomentar la investigación, transferencia de tecnología y desarrollo de bioplásticos y plásticos degradables, en el artículo 11 promover la generación de incentivos en el uso de plásticos degradables y finalmente impulsar la producción de productos degradables y el reemplazo del plástico tradicional (Ministerio del Ambiente Ecuador, 2014)

Además, de manera complementaria la investigación impulsa el cumplimiento de los objetivos séptimo y décimo del Plan Nacional del Buen Vivir 2013- 2017, que promueven la prevención, control y mitigación de la contaminación ambiental, el manejo sustentable y responsable de los recursos, la transformación de la matriz productiva y el desarrollo del bioconocimiento. (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2013).

### **1.3    Objetivos**

#### ***1.3.1   Objetivo General***

Evaluar bacterias procedentes del agua residual de la industria láctea potencialmente utilizables para la producción de biopolímeros (polihidroxicanoatos).

#### ***1.3.2   Objetivos Específicos***

- Aislar y estabilizar bacterias del agua residual de la industria láctea.
- Analizar la producción de polihidroxicanoatos de las bacterias aisladas del agua residual láctea.
- Caracterizar las bacterias aisladas mediante pruebas adaptativas, enzimáticas y metabólicas.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la Investigación

La primera observación de inclusiones citoplasmáticas de reserva en células bacterianas fue realizada por Martinus Beijerinck en el año de 1888, mientras que en 1925 Maurice Lemoigne realizó el primer aislamiento de este tipo de compuestos de la bacteria *Bacillus megaterium* descubriendo un homopolíéster de 3-hidroxi-butirato, o poli-3-hidroxi-butirato (P3HB), cuya función principal era constituir un material de reserva de carbono y energía para impedir el proceso de autólisis y muerte celular. (Braunegg, et al., 1998, pp. 129, 130) (Belgacem & Gandini, 2011, pp. 452, 453)

Desde 1958, luego de tres décadas de escaso interés sobre el biopolímero P3HB, algunos bioquímicos y microbiólogos realizaron un extenso proceso de investigación sobre su producción en microorganismos fuera del género *Bacillus* incluyendo a *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Cyanobacterium*, entre otros, así como, estudios sobre sus propiedades químicas y físicas, destacando entre las más importantes el peso molecular, la temperatura de fusión, el grado de cristalinidad y la morfología del gránulo, además se analizaron algunos métodos de extracción, identificación y cuantificación del polímero, su metabolismo, enzimología, degradación y función fisiológica. (Babel & Steinbüchel, 2001, pp. 52-55)

En el año de 1974 Wallen y Davis registraron el aislamiento de otro biopolíéster generado por *Bacillus megaterium* con propiedades físico-químicas similares al poli-3-hidroxi-butirato y cuya composición era una combinación de los monómeros 3-hidroxi-valerato (3HV), 3-hidroxi-butirato, 3-hidroxi-hexanoato (3HHx) y 3-hidroxi-heptanoato (3HHp), definiéndose dicho compuesto como un heteropolímero, razón por la cual, todos los compuestos similares a P3HB posteriormente fueron denominados como polihidroxi-alcanoatos (PHA's). (Braunegg, et al., 1998, pp. 130, 131)

Los polihidroxi-alcanoatos fueron producidos de manera comercial desde inicios de la década de 1990 por las empresas Chemie Linz, ICI, Metabolix, ADM, Meridian, Bio on entre otras procedentes de China, Estados Unidos, Austria y Japón, mientras que nuevos sistemas de producción a escala piloto son ampliamente estudiados utilizando nuevos sustratos, por ejemplo, en 2010 Chakravarty, et al., propusieron un sistema de producción continua a escala piloto utilizando como sustrato agua residual de la industria láctea, el cual alcanzó una producción de

43 gramos de polihidroxicanoatos por cada 100 gramos de peso seco del lodo (Braunegg, et al., 1998, p. 131) (Chen, 2010, pp. 122-129)

Las nuevas investigaciones relacionadas a polihidroxicanoatos en el presente siglo se basan fundamentalmente en la utilización de diferentes residuos como sustrato para la síntesis de dichos compuestos, por ejemplo, en 2008 Bengtsson utilizando aguas residuales eliminadas durante la fabricación de papel reportó un rendimiento de 0,10 kilogramo de PHA por kilogramo de demanda química de oxígeno (DQO) del efluente tratado, mientras que en 2010 Bosco & Chiampo usando lodos activados de aguas residuales lácteas reportaron un rendimiento de 13,82 gramos de PHA por gramo de biomasa luego de 92 horas de experimentación.

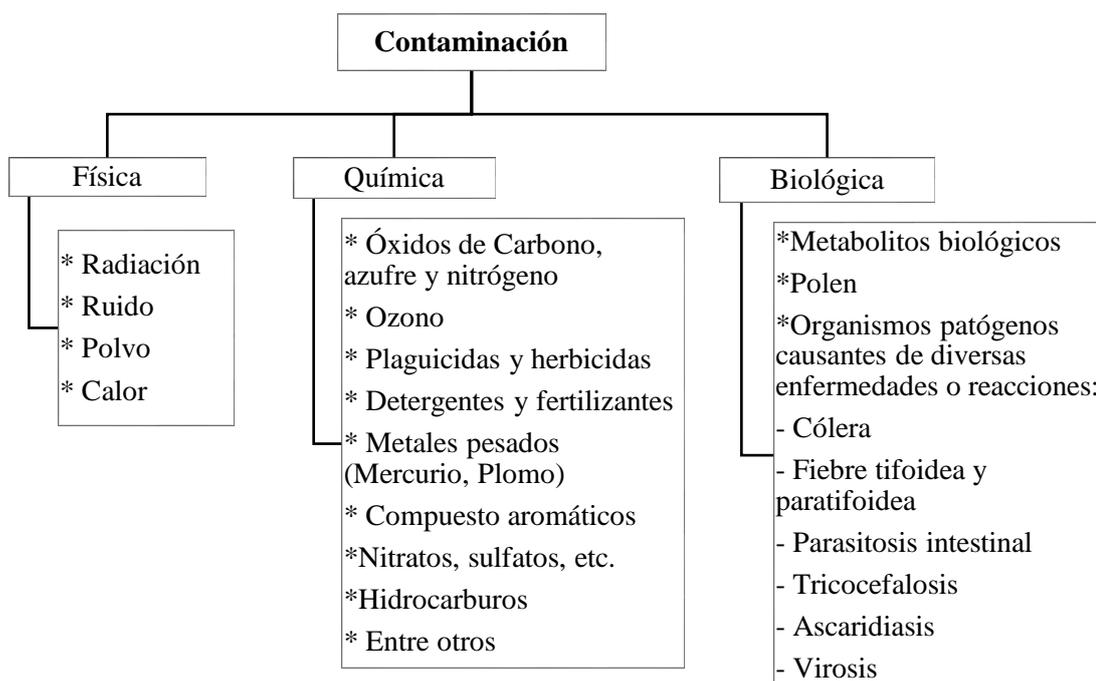
Actualmente existe gran información de microorganismos y sustratos utilizados para la síntesis de polihidroxicanoatos con el fin de identificar cepas microbianas más productivas y que puedan utilizar sustratos de bajo costo, dentro de los cuales prevalecen los géneros microbianos *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Ralstonia*. (González, et al., 2013, pp. 83, 84)

## 2.2 Bases Teóricas

### 2.2.1 Contaminación

La contaminación se puede definir como una alteración del ambiente natural debido a la introducción de factores bióticos o abióticos de origen natural o antropogénico, considerados perjudiciales para el hombre, la flora y la fauna, provocando problemas de salud pública, daño ecológico, deterioro en la calidad de vida, así como riesgos mutagénicos y genéticos. (Sánchez, 2005, pp. 162, 163)

En la actualidad, los diferentes enfoques de estudio exhiben diversos tipos de contaminación, siendo la clasificación más importante la vinculada al agente contaminante, conformada por los agentes físicos, químicos y biológicos (Figura 2-1) e igualmente la relacionada al sistema ambiental contaminado, es decir, los recursos abióticos agua, aire y suelo. (Sánchez, 2005, pp. 162-182)



**Figura 2-1** Contaminación según el agente contaminante

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

### 2.2.1.1 *Contaminación del agua*

La contaminación hídrica es causada fundamentalmente por la actividad humana, a través, de la formación de aguas residuales o negras como resultado de la acumulación de gran cantidad de materia orgánica, tóxica y microorganismos, debido a la descarga de materia fecal, detergentes, plaguicidas, herbicidas, fertilizantes, desechos industriales y urbanos que generan inconvenientes de carácter superficial, subterráneo y oceánico. (Sánchez, 2005, pp. 168-172)

Algunos de los contaminantes más comunes en el agua son celulosa, sulfatos, nitratos, detergentes, plaguicidas, hidrocarburos y metales pesados, además de otros residuos vertidos por refinerías, termoeléctricas, cervecerías, ingenios, curtidurías, petroquímicas, plantas nucleares entre otras industrias químicas, cuya combinación genera un mayor impacto ambiental. (Sánchez, 2005, pp. 168-172)

### 2.2.1.2 *Agua residual de la industria láctea*

El agua residual producida por la industria de lácteos es de composición variable y aunque generalmente está constituida por restos de los productos procesados y de limpieza, depende en gran medida del tipo de productos elaborados, la capacidad de producción y la eficiencia de los procesos de la planta, encontrándose en su conformación residuos de leche, mantequilla, queso, caseína, así como productos químicos. (Nemerow & Dasgupta, 1998, pp. 448, 449)

La limpieza con detergentes alcalinos compuestos por hidróxidos y carbonatos, generan aguas neutras o ligeramente alcalinas, que se tornan ácidas rápidamente en medios anaerobios por la presencia de ácido láctico producido durante la fermentación microbiana de la lactosa, el bajo nivel de pH originado durante la fermentación precipita la caseína de la leche, la cual durante su descomposición forma fangos negros con fuerte olor a ácido butírico. (Nemerow & Dasgupta, 1998, pp. 448, 449)

Así mismo, la elaboración de queso produce aguas residuales ácidas debido a la descomposición microbiológica del suero de leche, cuya materia suspendida genera una demanda de oxígeno considerablemente alta, existiendo de manera general una relación de 0,1 kilogramo de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) por cada kilogramo de leche cruda. (Nemerow & Dasgupta, 1998, pp. 448, 449)

### 2.2.1.3 *Microbiota en aguas residuales lácteas*

Los microorganismos más abundantes en el agua residual de la industria de lácteos son las bacterias, destacando entre las más comunes las ácido-lácticas y coliformes, que pueden desarrollarse durante el proceso de producción de derivados lácteos o por contaminación ambiental, generando un gran aporte de microorganismos al sistema hídrico durante su vertido. (Celis & Juárez, 2009, pp. 4-16)

Los restos de leche no procesada y de algunos productos lácteos, así como la limpieza de equipos de producción sucios o en mal estado, aportan un gran número de microorganismos a los vertidos de agua residual, entre ellos, bacterias pertenecientes a los géneros *Streptococcus Lactococcus Leuconostoc Propionibacterium, Lactobacillus, Enterobacter, Aerogenes, Salmonella, Alcaligenes y Flavobacterium*, así como, hongos de los géneros *Candida y Penicillium*, formando una gran diversidad microbiológica en el vertido residual. (Celis & Juárez, 2009, pp. 4-16)

Existe otro tipo de microorganismos denominados microorganismos ambientales, como las bacterias del género *Pseudomonas*, que pueden ingresar al vertido residual por la contaminación ambiental del aire, superficies de contacto, polvo o insectos, originando una contaminación microbiológica importante durante la generación de líquidos residuales. (Ellner & Schulz, 2000, pp. 37-40)

La presencia de una alta carga microbiológica y la composición rica en nutrientes de la leche y sus derivados, permiten que los microorganismos se reproduzcan rápidamente en condiciones ambientales normales, generando una contaminación microbiológica promedio de 100.000 unidades formadoras de colonia por mililitro. (Hernández, 2003, pp. 65-67)

## 2.2.2 *Técnicas de análisis microbiológico*

Las técnicas de análisis microbiológico son metodologías utilizadas para detectar, cuantificar e identificar diferentes especies de microorganismos en una muestra, las técnicas más relevantes se detallan a continuación. (Gamazo, et al., 2005, p. 1)

### 2.2.2.1 *Inoculación*

La inoculación es un método de laboratorio que permite establecer microorganismos de una muestra en soluciones nutritivas o selectivas (medios de cultivo), existen más de 10.000 medios de cultivo diferentes y su utilización depende exclusivamente del propósito de la investigación,

además las bacterias deben poseer las condiciones ideales para su crecimiento como temperatura, humedad, pH, entre otros específicos de cada microorganismo para un adecuado desarrollo. (Alarcón & Olivas, 2001, pp. 17, 18) (Espinal, 2005, p. 20)

#### 2.2.2.2 Aislamiento

El aislamiento bacteriano es una técnica que permite separar distintos tipos de colonias provenientes de una muestra o cultivo y tiene como finalidad obtener una población de microorganismos procedentes de una misma célula (cultivo puro), existen diversas técnicas de aislamiento como se describe en la Tabla 2-1, sin embargo, en todas es necesario utilizar un medio de cultivo sólido que permita la separación de las colonias. (Hernández, 2003, pp. 16, 17) (Negroni, 2009, pp. 557, 558)

**Tabla 2-1** Métodos de aislamiento frecuentes

<b>Tipo de Siembra</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Técnica</b>
Agotamiento por estrías	Agotamiento progresivo y continuo del inóculo.	Consiste en realizar múltiples estriados en el medio sólido en diferentes secciones, tomando en cada rayado solo la muestra de la sección anterior.
Diseminación en superficie	Extensión múltiple del inóculo.	Se extiende con una espátula de siembra una mínima cantidad de muestra (50µL) rotando múltiples veces el medio sólido.
Diluciones seriadas	Dilución sucesiva del inóculo.	Consiste en realizar diluciones graduales de la muestra con la finalidad de sembrar la menor cantidad de colonias en el medio sólido.

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

#### 2.2.2.3 Identificación morfológica y bioquímica

La identificación microbiológica permite conocer las categorías taxonómicas de un microorganismo, al detallar y comparar varias de sus características, como condiciones de crecimiento, morfología, tinción diferencial o pruebas bioquímicas, con otras de microorganismos conocidos descritos con anterioridad, la Tabla 2-2 detalla las características más importantes utilizadas para la identificación bacteriana. (Tortora, et al., 2007, pp. 292-297)

**Tabla 2-2** Características más importantes para identificación bacteriana.

Característica	Clasificación	Detalle o Tipo
Morfología Colonial	Forma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puntiforme</li> <li>• Circular</li> <li>• Filamentosa</li> <li>• Fusiforme</li> </ul>
	Superficie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lisa/Rugosa</li> <li>• Mate/Brillante</li> <li>• Seca/Cremosa</li> <li>• Invasiva/Superficial</li> </ul>
	Elevación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plano</li> <li>• Convexo</li> <li>• Acuminada</li> <li>• Papilada</li> <li>• Umbilicada</li> </ul>
	Borde	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Redondeado</li> <li>• Ondulado</li> <li>• Filamentoso</li> <li>• Rizoide</li> </ul>
Morfología Microscópica	Cocos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coco</li> <li>• Diplococo</li> <li>• Estafilococo</li> <li>• Estreptococo</li> </ul>
	Bacilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bacilo</li> <li>• Diplobacilo</li> <li>• Estreptobacilo</li> <li>• Cocobacilo</li> </ul>
	Espirilos	
	Vibrio	
Tinción Diferencial	Tinción Gram	Conformación de su membrana plasmática.
	Ziehl Neelsen	Propiedades ácido alcohol resistentes.
Pruebas bioquímicas	$\beta$ - D - Galactosidasa	Metabolización de la lactosa.
	Indol	Degradación de triptófano con producción de Indol
	Catalasa	Presencia de enzima Catalasa
	Citrato	Utilización de citrato como única fuente de carbono
	Coagulasa	Coagulación de plasma
	Descarboxilasas	Descarboxilación de aminoácidos
	Nitrato Reductasa	Capacidad de reducción de nitratos
	Oxidasa	Presencia de enzima citocromo c oxidasa
	Rojo de metileno	Fermentación ácido quinta
	Ureasa	Catálisis de la hidrólisis de la urea.
	Voges Proskauer	Fermentación butanodiólica.

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

### **2.2.3 *Las bacterias y su alcance biológico e industrial***

Las bacterias tienen diversos campos de estudio y aplicación, desde el área de la salud hasta el agrícola, las aplicaciones más relevantes se detallan a continuación

#### **2.2.3.1 *Las bacterias en el sistema ecológico***

Las bacterias son imprescindibles para el sistema ecológico debido a que participan en mecanismos de reciclaje de elementos vitales como oxígeno, nitrógeno y carbono, iniciando cadenas tróficas e integrando sistemas simbióticos que ayudan al desarrollo de macro-especies. (Leonor, 2010, pp. 212, 213)

#### **2.2.3.2 *Las bacterias en la salud y la industria***

El estudio de bacterias permite el tratamiento de infecciones y enfermedades graves o mortales, la producción de antibióticos, biopolímeros y proteínas, así como, la obtención de sustancias de origen fermentativo como yogurt, queso, yakult, sauerkraut y ácido acético. (Leonor, 2010, pp. 212, 213)

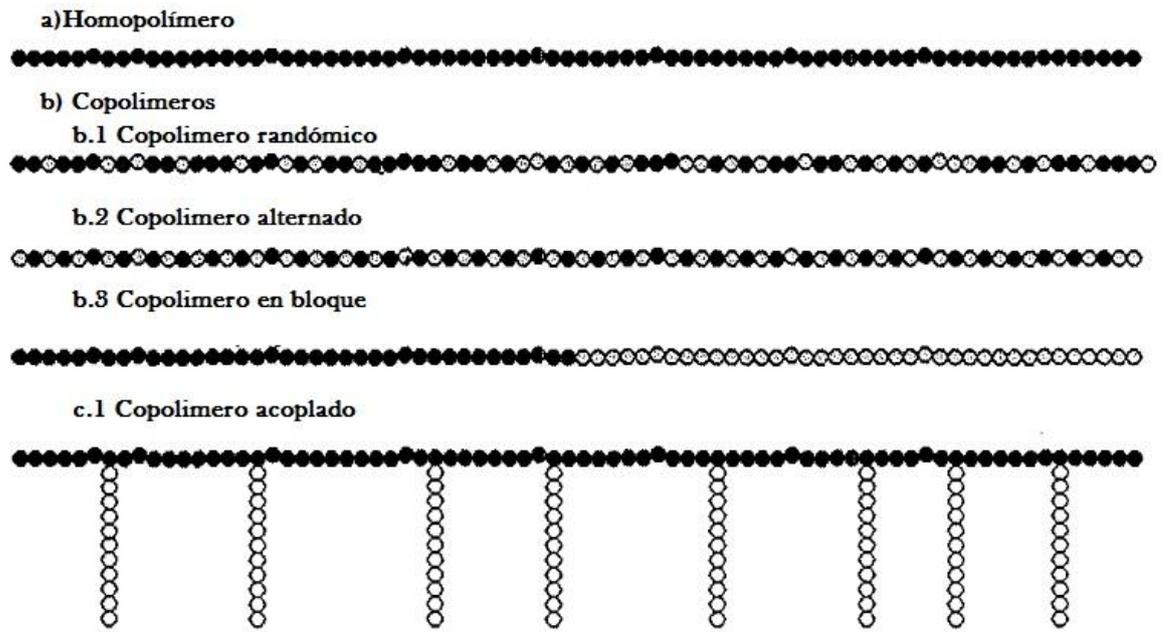
#### **2.2.3.3 *Las bacterias y el medio ambiente***

Las bacterias son de gran interés en el área ambiental siendo utilizadas en el tratamiento de desechos sólidos, degradación de sustancias tóxicas, descontaminación de residuos petroleros, purificación del agua y la producción de energías alternativas. (Morcillo, et al., 2013, pp. 39, 40)

### **2.2.4 *Polímeros***

El término polímero es la unión de vocablos griegos, cuyo prefijo poli significa muchos y la raíz mero significa parte, es decir, un polímero es el resultado de la asociación de una gran cantidad de unidades individuales o partes denominadas monómeros, unidas a través de un proceso químico llamado polimerización, formando una larga cadena monomérica. (Teegarden, 2004, pp. 13,15)

Un polímero puede estar constituido por la repetición de un mismo monómero  $n$  veces formando un compuesto llamado homopolímero, o a su vez puede estar conformado por diferentes tipos de monómeros denominados genéricamente copolímeros, cuya posición, estructura y enlace pueden cambiar notablemente las diferentes propiedades del polímero, la Figura 2-2 detalla las configuraciones de las cadenas poliméricas más frecuentes. (Teegarden, 2004, pp. 13,15)



**Figura 2-2** Representación de los diferentes tipos de cadenas poliméricas

Fuente: Teegarden, 2004, p. 14

#### 2.2.4.1 Polímeros sintéticos

Un polímero sintético es un compuesto de carácter antropogénico sintetizado mediante reacciones y procesos químicos conocidos, la mayoría son de naturaleza orgánica y utilizan como materia prima derivados de petróleo, sin embargo, existen algunos polímeros sintéticos inorgánicos como la silicona, la Tabla 2-3 describe los principales polímeros sintéticos conocidos. (Teegarden, 2004, pp. 5-8)

**Tabla 2-3** Principales polímeros sintéticos

<b>Tipos de polímero</b>	<b>Descripción</b>	<b>Ejemplos</b>	<b>Usos</b>
Plásticos	Compuestos cuya forma puede ser modificada utilizando calor.	* Poliestireno * Policloruro de vinilo	* Botellas * Juguetes
Fibras	Polímeros con alta resistencia procesados en forma de hebras largas.	* Nylon * Poliéster	* Ropa * Redes de pesca
Películas	Polímeros con resistencia en dos dimensiones.	* Polietileno * Poliéster	* Fundas * Pinturas
Elastómeros	Polímeros con capacidad variable de estiramiento.	* Polibutadieno * Poliisopreno	* Látex * Llantas
Adhesivos	Compuesto que proporciona la fuerza de atracción física necesaria para unir dos superficies.	* Poliepóxido * Alcohol de polivinilo	* Pegamento * Epoxi-cemento

Fuente: Teegarden, 2004, pp. 6,7

Realizado por: CAMACHO, Christian, 2015

#### 2.2.4.2 Polímeros naturales o Biopolímeros

Un polímero natural o biopolímero es una macromolécula sintetizada a través de un proceso biológico dentro de las células, generalmente por una reacción de condensación catalizada por enzimas, entre los biopolímeros más importantes destacan las proteínas, ADN y polisacáridos, como se detalla en la Tabla 2-4. (García, et al., 1993, pp. 423, 424)

**Tabla 2-4** Tipos de polímeros naturales

<b>Tipo de Biopolímeros</b>	<b>Ejemplo</b>
Polisacáridos	
Estructurales	Celulosa
De reserva	Amilopectina
Formadores de gel	Mucopolisacáridos
Proteínas	Enzimas
Polinucleótidos	ADN
Poliisoprenos	Caucho natural
Poliésteres	Poli-3-hidroxibutirato
Ligninas	Ligantes de pared celular

Fuente: Teegarden, 2004, p. 5

Las enzimas que participan en una reacción de polimerización determinan de manera específica el tipo y cantidad de monómeros, así como la secuencia de distribución y estereoquímica de cada cadena polimérica. (Teegarden, 2004, pp. 27, 28)

### 2.2.4.3 Polímeros extracelulares

Los polímeros extracelulares son polímeros orgánicos que se depositan en el exterior de la pared celular formando una capa laxa semi-amorfa, pueden permanecer adheridos a la pared celular formando un revestimiento externo denominado cápsula, o formar acumulaciones más dispersas y separadas dependiendo de la abundancia y solubilidad del polímero. (Stanier, et al., 1996, pp. 176, 177)



**Figura 2-3** Síntesis de dextrano por *Leucostonoc mesenteroides*

Fuente: Stanier, et al., 1996, p. 176

Los exopolímeros no son esenciales para las funciones vitales pero ayudan a inmovilizar virus, facilitar las interacciones celulares, además de mejorar la adhesión superficial, capacidad de invasión y resistencia a fagocitos y agentes antibacterianos naturales. (Stanier, et al., 1996, pp. 176, 177)

La composición variable de los exopolímeros detallada en la Tabla 2-5, depende de los nutrientes externos, pudiendo estar constituidos por aminoácidos (generalmente D-ácido glutámico) y polisacáridos sintetizados a través de precursores nucleotídicos de un azúcar, habitualmente UDP-glucosa, -galactosa, -fucosa, -manosa entre otros. (Stanier, et al., 1996, pp. 176, 177)

**Tabla 2-5** Tipos de exopolímeros bacterianos

Tipo de Exopolímeros	Polímero	Subunidades	Estructura	Organismo productor
Exopolipéptidos	Polipéptido	Ácido glutámico (Usualmente isómero D)	Ácido poliglutámico $\gamma$ -glutamil- $\gamma$ -glutamil-	<i>Bacillus anthracis</i> <i>B. megaterium</i>
Exopolisacáridos sintetizados a partir de nucleótidos del azúcar	Celulosa	Glucosa	$\beta$ -glu-1 $\rightarrow$ 4 $\beta$ -glu	<i>Acetobacter xylinum</i>
	Glicano	Glucosa	$\beta$ -glu-1 $\rightarrow$ 2 $\beta$ -glu	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	Ácido colánico	Glucosa, galactosa, fucosa, A. glucurónico, A. pirúvico		Bacterias entéricas
	Poliurónidos	Ácido manurónico, A. glucurónico		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>
	Polisacáridos pneumocócicos:			
	Tipo II	Glucosa, ramnosa, A. glucurónico		
	Tipo III	Glucosa, A. glucurónico	$-(3\text{-}\beta\text{-glucuronil } 1\rightarrow 4 \text{ }\beta\text{-glucosil)-}$	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Tipo XIX	Glucosa, ramnosa, N-acetil-manosamina, fosfato			
Tipo XXXIV	Glucosa, galactosa, ribitol, fosfato			
Exopolisacáridos sintetizados a partir de sacarosa	Dextranos	Glucosa (fructosa)	$\alpha$ -fru- $\beta$ -glu 1 $\rightarrow$ 6 $\beta$ -glu	<i>Leuconostoc spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i>
	Levanos	Fructosa (glucosa)	$\beta$ -glu- $\alpha$ -fru 2 $\rightarrow$ 6 $\alpha$ -fru	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Xanthomonas spp.</i> <i>Bacillus spp.</i>

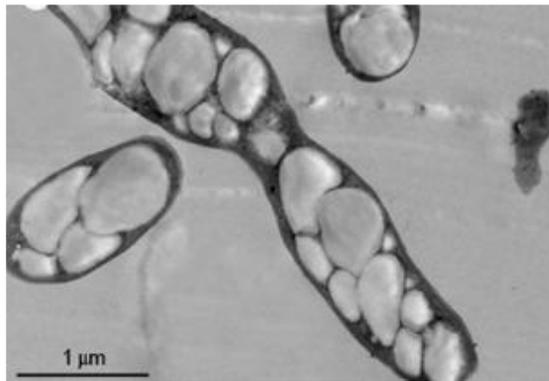
Fuente: Stanier, et al., 1996, p. 176

#### 2.2.4.4 Polímeros intracelulares

Los polímeros intracelulares son macromoléculas que se acumulan en el citoplasma celular, la cantidad de producción de estos compuestos se encuentra limitada por el espacio citoplasmático y su rendimiento es determinado por la densidad celular y la fracción del polímero en la biomasa. La obtención de biopolímeros intracelulares puros requiere su separación de la célula mediante lisis celular, algunos ejemplos de polímeros intracelulares de importancia biotecnológica son polihidroxialcanoatos (PHA's), glicógeno, almidón y polifosfatos. (Steinbüchel, 2001, p. 5)

### 2.2.5 Polihidroxialcanoatos

Los polihidroxialcanoatos son polímeros biodegradables compuestos por varios hidroxialcanoatos y constituyen un material de reserva de energía y carbono para numerosos microorganismos, generalmente son producidos cuando un nutriente esencial de crecimiento como nitrógeno o fósforo está disponible en concentraciones limitadas y la concentración de carbono es elevada, formando inclusiones citoplasmáticas denominadas gránulos de PHA. (Khanna & Ashok, 2005, pp. 607, 608) (Reddy, et al., 2003, p. 138) (Steinbüchel, 2001, p. 6).



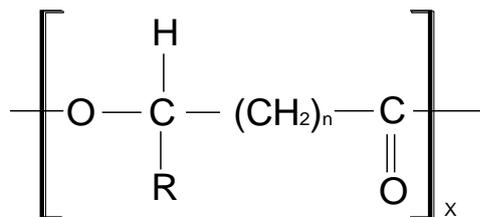
**Figura 2-4** Micrografía de transmisión electrónica de bacterias productoras de PHB

**Fuente:** Berlanga, et al., 2006, p. 98

#### 2.2.5.1 Tipos de Polihidroxialcanoatos

Los polihidroxialcanoatos pueden estar constituidos por más de 100 diferentes unidades de monómeros, cuya fórmula general conformada por átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno se representa en la Figura 2-5. (Braunegg, et al., 1998, p. 132) (Reddy, et al., 2003, p. 138)

Cada polihidroxialcanoato contiene entre 100 y 30.000 monómeros iguales o diferentes, su diferencia radica en el largo de la cadena carbonada, generalmente conformada entre 3 y 14 átomos de carbono, y el grupo radical que lo conforma normalmente hidrón, metil, etil, entre otros, tal como se detalla en la Tabla 2-6. (Lee & Chang, 2006, p. 28). (Khanna & Ashok, 2005, p. 608) (Braunegg, et al., 1998, p. 132)



**Figura 2-5** Fórmula General de Polihidroxicanoatos

Fuente: Lee, 1996, p. 2

Los polihidroxicanoatos generalmente se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus monómeros constituyentes, si la estructura está compuesta exclusivamente por monómeros iguales (homopolímeros) de 3 a 5 átomos de carbono son denominados de cadena corta (PHA-scl por sus siglas en inglés), a su vez, si los monómeros que constituyen el polímero tienen de 6 a 14 átomos de carbono son considerados de cadena media (PHA-mcl), mientras que la composición estructural por monómeros diferentes (heteropolímeros) son denominados de cadena mixta (PHA MCM) (Cardona, et al., 2013, p. 7129). (Khanna & Ashok, 2005, p. 608)

**Tabla 2-6** Principales monómeros constituyentes de polihidroxicanoatos

Símbolo	Nombre	Longitud de cadena	Radical
3HP	Ácido 3-hidroxi-propiónico	(CH <sub>2</sub> )	H
3HB	Ácido 3-hidroxi-butírico	(CH <sub>2</sub> )	CH <sub>3</sub>
3HV	Ácido 3-hidroxi-valérico	(CH <sub>2</sub> )	CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>
3HHx	Ácido 3-hidroxi-hexanoico	(CH <sub>2</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>
3HHp	Ácido 3-hidroxi-heptanoico	(CH <sub>2</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> - CH <sub>3</sub>
3HO	Ácido 3-hidroxi-octanoico	(CH <sub>2</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> - CH <sub>3</sub>
3HN	Ácido 3-hidroxi-nonanoico	(CH <sub>2</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> - CH <sub>3</sub>
3HD	Ácido 3-hidroxi-decanoico	(CH <sub>2</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> - CH <sub>3</sub>
3HUD	Ácido 3-hidroxi-undecanoico	(CH <sub>2</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - CH <sub>3</sub>
3HDD	Ácido 3-hidroxi-dodecanoico	(CH <sub>2</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> - CH <sub>3</sub>
3HTD	Ácido 3-hidroxi-tetradecanoico	(CH <sub>2</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> - CH <sub>3</sub>
3HHxD	Ácido 3-hidroxi-hexadecanoico	(CH <sub>2</sub> )	(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> - CH <sub>3</sub>
4HB	Ácido 4-hidroxi-butírico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
4HV	Ácido 4-hidroxi-valérico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>
4HHx	Ácido 4-hidroxi-hexanoico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>
4HHp	Ácido 4-hidroxi-heptanoico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> - CH <sub>3</sub>
4HO	Ácido 4-hidroxi-octanoico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> - CH <sub>3</sub>
4HD	Ácido 4-hidroxi-decanoico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> - CH <sub>3</sub>
5HV	Ácido 5-hidroxi-valérico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>
5HHx	Ácido 5-hidroxi-hexanoico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>
6HHp	Ácido 6-hidroxi-heptanoico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> - CH <sub>3</sub>
6HDD	Ácido 6-hidroxi-dodecanoico	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> - CH <sub>3</sub>
3HPE	Ácido 3-hidroxi-4-pentenoico	(CH <sub>2</sub> )	CH=CH <sub>2</sub>

Fuente: Steinbüchel, 2001, pp. 220 - 223

Realizado por: CAMACHO, Christian, 2015

### 2.2.5.2 *Propiedades y aplicaciones de polihidroxialcanoatos*

Los polihidroxialcanoatos en general comparten ciertas características claves para su aplicación en el área industrial, médica, agrícola y farmacéutica, destacando entre las más importantes que son compuestos termoplásticos parcialmente cristalinos, elastómeros biodegradables, biocompatibles, enantioméricamente puros, insolubles en agua, no tóxicos, con alto grado de polimerización por encima de  $10^5$  Da y que exhiben propiedades piezométricas. (Steinbüchel, 2001, p. 7)

De forma específica, dependiendo de su composición monomérica tenemos PHA's de cadena corta como el polihidroxibutirato (PHB) con peso molecular de 10 a 3.000 kDa, polidispersidad cercana a 2, densidad de 1,18 a 1,26 g/cm<sup>3</sup>, temperatura de transición de 453 K, cristalinidad de 55 a 80% y propiedades mecánicas similares al propileno (Módulo de Young y resistencia a tracción), mientras que los de cadena media son elásticos, semicristalinos con elevado alargamiento de rotura, resistencia a la tracción y bajo punto de fusión. (Khanna & Ashok, 2005, pp. 613 - 615) (Sudesh, et al., 2000, pp. 1525 - 1531)



**Figura 2-6** Láminas de PHB extraído de cultivo bacteriano.

**Fuente:** Bernáldez, 2007

Los polihidroxialcanoatos pueden ser utilizados como materia prima para la fabricación de artículos desechables y de embalaje, materiales de osteosíntesis (por su biocompatibilidad y propiedades piezoeléctricas), sistemas de liberación controlada de medicamentos, fertilizantes y biocidas y en ingeniería de tejidos para la producción de parches pericárdicos, pulmonares e injertos vasculares. (Khanna & Ashok, 2005, p. 615).

Actualmente, nuevas investigaciones analizan las propiedades farmacológicas de los polihidroxialcanoatos conformados por monómeros 4-hidroxibutirato para su uso en el

tratamiento del síndrome de abstinencia alcohólica y la narcolepsia, así como su potencial aplicación en esquizofrenia crónica y catatónica, psicosis atípicas, neurosis, síndrome cerebral crónico, enfermedades neurofarmacológicas, drogadicción, hipertensión, Parkinson, exposición a radiación, cáncer e infarto de miocardio. (Rapra Technology, 2005, p. 240)

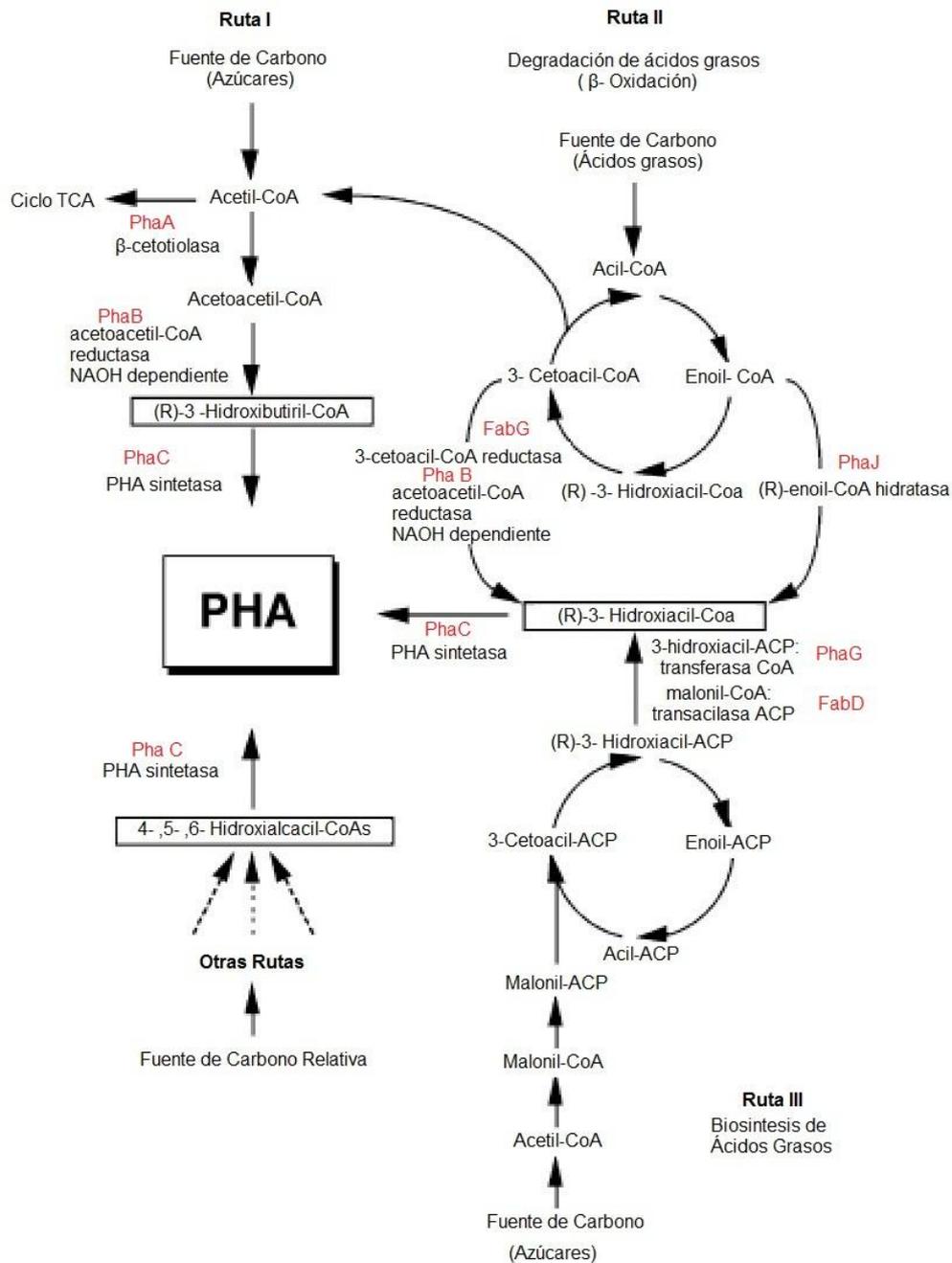
### 2.2.5.3 Bacterias y mecanismos de producción de polihidroxicanoatos

La ruta metabólica para producir polihidroxicanoatos depende en gran parte del sustrato de partida y del tipo de enzima PHA sintasa utilizada como catalizador, que se clasifica de acuerdo a su estructura primaria y al tipo de polihidroxicanoato producido, el detalle de las rutas de producción de PHA se visualiza en la Figura 2-7, mientras que los tipos de PHA sintasa se describen a continuación. (Lee, 1996, pp. 2, 3)

La PHA Sintasa Clase I es una enzima de peso molecular entre 60 a 65 kDa, formada por la subunidad phaC, genera polihidroxicanoatos de cadena corta, es decir, conformados por un número entre 3 y 5 átomos de carbono, algunas de las bacterias representativas de sintasa PHA clase I son *Ralstonia eutropha*, bacterias púrpuras de azufre y cianobacterias. (Khanna & Ashok, 2005, pp. 608-615)

La PHA Sintasa Clase II está conformada por la subunidad phaC pero produce polihidroxicanoatos de cadena mediana cuya cantidad de átomos de carbono varía entre 6 y 14, presentando poca especificidad del grupo radical libre R, la especie bacteriana más característica es *Pseudomonas oleovorans*. (Reddy, et al., 2003, pp. 139-141)

La PHA Sintasa Clase III está formada por las subunidades phaC y phaE, cada una con peso aproximado de 40 kDa, forma polihidroxicanoatos de cadena corta y su bacteria representativa es *Chromatium vinosum*. (Rapra Technology, 2005, pp. 232-235)



**Figura 2-7** Vías metabólicas usuales de biosíntesis de polihidroxicanoatos.

**Fuente:** Rapra Technology, 2005, p. 232

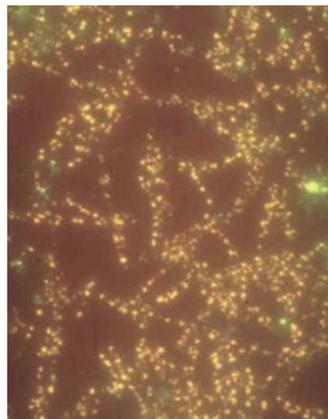
**Realizado por:** CAMACHO, Christian, 2015

#### 2.2.5.4 Métodos de Identificación de polihidroxicanoatos

Existen diversos métodos de análisis de polihidroxicanoatos, entre ellos, las técnicas de tinción de los gránulos de PHA's son muy comunes, habitualmente la tinción por fluorescencia es utilizada para análisis In Vivo, a través de colorantes específicos como Azul Nilo A y Rojo Nilo que son oxazinas básicas hidrófilas con gran afinidad al polímero y cuya reacción expresa un

color naranja fluorescente en una longitud de onda de 460nm, tal como se visualiza en la Figura 2-8. (Anderson & Dawes, 1990, p. 453) (Braunegg, et al., 1998, p. 143)

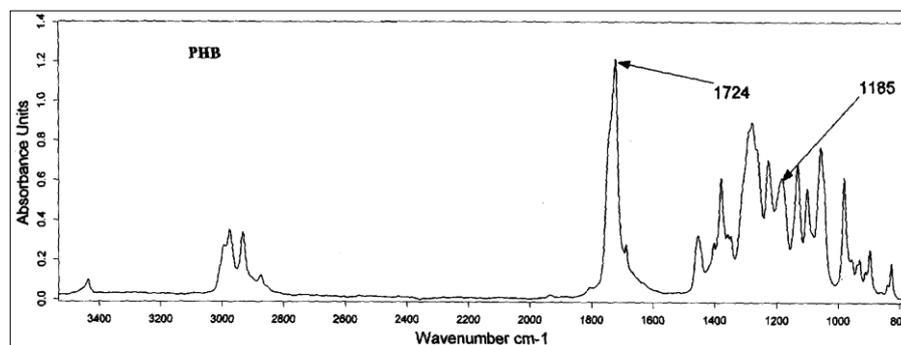
Otra método de tinción para la identificación de polihidroxicanoatos es utilizando el colorante lipofílico Negro Sudan B que permite la coloración en placa de los gránulos de PHA y que debido al carácter lipídico de dichos polímeros forma inclusiones azul y negro dentro de la célula, siendo una técnica ampliamente utilizada por la fácil obtención, manipulación y bajo. (Anderson & Dawes, 1990, p. 453) (Braunegg, et al., 1998, p. 143)



**Figura 2-8** Gránulos de PHA's utilizando Azul de Nilo

Fuente: Berlanga, et al., 2006, p. 97

Cabe destacar que nuevas investigaciones han analizado la utilización de espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier como mecanismo de análisis cualitativo rápido para identificar los polímeros PHA dentro de las células o purificados, mediante la detección de picos de absorbancia característicos, principalmente los producidos por el grupo éster cuya excitación molecular se presenta en longitudes de onda cercanas a 1185 y 1724  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 2-9). (Hong, et al., 1999, pp. 523-525)



**Figura 2-9** Espectro FT-IR de una lámina de PHB

Fuente: Randriamahefa, et al., 2003, p. 1093

## CAPÍTULO III

### 1. METODOLOGÍA

#### 3.1 Metodología de la Investigación

La presente investigación es de tipo Exploratoria-Descriptiva, pues el tema no ha sido abordado anteriormente en nuestro país, generando los resultados de manera descriptiva con la finalidad de detallar los eventos registrados durante la investigación.

#### 3.2 Diseño de la investigación

La investigación tiene un diseño experimental pues ejecuta técnicas de laboratorio y campo, por lo cual ejerce influencia sobre diferentes variables con la finalidad de satisfacer las hipótesis de la investigación.

#### 3.3 Unidad de Análisis

El agua residual generada en la empresa Lácteos Santillán PRASOL, ubicada en la Parroquia San Luis del cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, Ecuador.

#### 3.4 Etapas de la investigación

La investigación se encuentra dividida en tres etapas detalladas a continuación.

##### 3.4.1 *Obtención de clones bacterianos*

Para la obtención de los clones de estudio se realizaron las siguientes técnicas durante la experimentación:

##### 3.4.1.1 *Recolección de las muestras de análisis*

Para la recolección de las muestras de análisis se reconoció la planta de producción de la empresa Lácteos Santillán, así como los puntos de descarga y estancamiento de agua residual utilizando equipo de bioseguridad, con el fin de identificar los lugares que contenían agua residual con un tiempo de estancamiento superior a 48 horas.

Posteriormente se recolectaron entre 25 y 50 ml de muestra de agua residual de los puntos seleccionados en frascos plásticos estériles, siendo conservadas a una temperatura de 4°C hasta su análisis microbiológico. (Jover & García, 2004, pp. 242, 243)

### 3.4.1.2 Criterios para la selección de los clones analizados

La investigación fue desarrollada utilizando dos criterios diferentes para la selección de los clones evaluados para la producción de PHA, el primero denominado Grupo A utiliza bacterias inoculadas directamente en el medio específico de producción detallado en la Tabla 3-1 y el segundo conjunto denominado Grupo B utiliza bacterias con características metabólicas específicas obtenidas de las muestras después de ser sometidas a 45 días de refrigeración, utilizando pruebas de fermentación con Agar MacConkey y oxidación con tiras de oxidasa, comprobando siempre su crecimiento en medio nutritivo para métodos estándar. (Motamedi, et al., 2015, p. 95) (Arroyave, et al., 2013, pp. 71, 72)

**Tabla 1-1** Composición de medio agar para detección de polihidroxialcanoatos (ADP)

Componente	Contenido (g/l)
Glucosa	20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.3
MgSO <sub>4</sub>	1.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
Ac. Cítrico	1.7
Bacto Agar	15
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.0225
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.005
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.02
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	0.0023
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0.001

Fuente: Motamedi, et al., 2015, p. 95

Realizado por: CAMACHO, Christian, 2015

### 3.4.1.3 Recuento bacteriológico

Para el recuento de las bacterias presentes en las muestras se prepararon medios agarizados según cada criterio de selección, luego se realizaron diluciones seriadas de las muestras desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-4</sup> utilizando agua de peptona estéril, se inocularon por triplicado 25µl de cada dilución por

extensión en placa utilizando una espátula de Drigalski y finalmente se pusieron en incubación a una temperatura de 30 grados Celsius por 72 horas. (Negroni, 2009, pp. 557, 558)

Una vez transcurrido el periodo de incubación se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia presentes en cada caja, expresando el resultado en términos de media aritmética y logarítmica con sus principales parámetros estadísticos. (Negroni, 2009, pp. 557, 558)

#### *3.4.1.4 Aislamiento de los clones de las muestras*

Después de realizar el conteo de microorganismos se clasificaron las bacterias según el criterio de selección, las bacterias del grupo A fueron obtenidas del medio específico para producción de polihidroxicanoatos considerando su crecimiento y características macroscópicas como color, gas y forma, mientras que en el grupo B se escogieron bacterias no fermentadoras de lactosa oxidasa positiva, dichas bacterias fueron repicadas a una nueva caja Petri con medio ADP. (Arroyave, et al., 2013, pp. 71, 72)

Cada clon seleccionado fue estabilizado en el medio ADP mediante tres repiques sucesivos cada 72 horas. Posteriormente para asegurar el crecimiento de un solo tipo de colonia se realizó un reaislamiento por agotamiento mediante técnica de estriado. (Alarcón & Olivas, 2001, pp. 17, 18)

#### *3.4.1.5 Tinción Gram*

Cada clon luego de su aislamiento fue analizado mediante Tinción diferencial de Gram analizando su morfología microscópica y el tipo de reacción. (Espinal, 2005, pp. 14-16)

### **3.4.2 *Análisis de producción de polihidroxicanoatos***

Para el análisis de la producción de polihidroxicanoatos en los clones aislados se establecieron las siguientes técnicas de laboratorio:

#### *3.4.2.1 Cultivo de clones en medios específicos para producción de polihidroxicanoatos*

Para estimular la producción de polihidroxicanoatos en los clones aislados se prepararon diferentes variaciones del medio de cultivo ADP como se detalla a continuación.

#### *3.4.2.2 Cultivo de clones en medios suplementados con diferentes azúcares*

Con el fin de estudiar la producción de PHA en medios suplementados con diferentes azúcares se prepararon medios sólidos utilizando el medio de cultivo ADP y reemplazando el azúcar de la formulación inicial por Glucosa, Lactosa y Sacarosa. (Samrot, et al., 2011, p. 197)

Posteriormente se realizaron repiques de cada clon dejando incubar a una temperatura de 30 grados Celsius por 72 horas y analizando la producción de PHA cada 24 horas. Cada prueba fue realizada por triplicado con su control de crecimiento.

#### *3.4.2.3 Cultivo de clones en medios salinos*

Algunas bacterias producen PHA como mecanismo de osmorregulación en condiciones de salinidad elevadas, con tal finalidad, se realizaron medios en placa utilizando una solución de medio ADP suplementado con porcentajes de cloruro de sodio al 2.5, 5, 7.5 y 10 % p/v. (Quillaguamán, et al., 2009, pp. 1688,1689)

Posteriormente se realizaron repiques de cada clon en los diferentes medios, dejando incubar a una temperatura de 30 grados Celsius por 120 horas, luego de comprobar su crecimiento se analizó la producción de PHA cada 24 horas, realizando la prueba por triplicado, así como controles de crecimiento.

#### *3.4.2.4 Cultivo de clones en medios con diferentes concentraciones de lactosa.*

Considerando que la producción de PHA se genera como resultado de una amplia diferencia entre los niveles de carbono y nitrógeno durante el crecimiento bacteriano, se prepararon medios de cultivo cuya relación carbono/nitrógeno sea mayor a 20, utilizando el medio de cultivo ADP suplementado con porcentajes de lactosa al 2, 4, 8 y 16 % p/v como única fuente de carbono. (Samrot, et al., 2011, p. 197)

Posteriormente se realizaron repiques de cada colonia, dejando las cajas inoculadas en incubación a una temperatura de 30 grados Celsius por 72 horas y analizando la producción de PHA cada 24 horas. Cada prueba fue realizada por triplicado efectuando controles de crecimiento.

#### *3.4.2.5 Cultivo de clones a pH ácido.*

Para inducir la producción de PHA en los clones en condiciones ácidas se utilizó medio de cultivo ADP vertido en placa previamente ajustado a pH 4 con ácido clorhídrico 2N. Posteriormente se realizaron repiques de cada colonia y su incubación a una temperatura de 30 grados Celsius por

120 horas, visualizando la producción de PHA de las colonias cada 24 horas. (Naheed & Jamil, 2014, p. 418)

#### *3.4.2.6 Prueba de producción de gránulos de polihidroxialcanoatos con Tinción Negro Sudán*

La tinción con Negro Sudan B permite analizar la producción de polihidroxialcanoatos, para tal finalidad a las colonias inoculadas en cada medio ADP se les realizó un frotis microbiológico, utilizando para su fijación calor o llama permitiendo la coagulación citoplasmática celular.

Posteriormente se colocaron algunas gotas de la solución Negro Sudán (0.3g en 100ml de etanol al 70% en volumen) sobre el frotis, dejándolo reposar por 5 a 15 minutos (tiempo suficiente para la absorción del colorante y la evaporación del alcohol) y se retiró el exceso de solución colorante utilizando papel filtro. (Blanco, 2010, p. 23)

El frotis fue lavado con alcohol etílico al 96% eliminando el exceso de colorante Sudan Black, para un mejor análisis de la muestra se colocó un colorante de contraste (generalmente solución safranina 1% p/v), se lavó el exceso con una corriente ligera de agua y se esperó que la muestra teñida este totalmente seca. (Blanco, 2010, p. 23)

Secuencialmente se añadió una gota de aceite de inmersión sobre la extensión realizada y se visualizó en el microscopio utilizando el lente de inmersión 100X, la observación de incrustaciones azules-oscuras dentro de las células teñidas color rosa determina la presencia de gránulos de PHA's. (Blanco, 2010, p. 23)

#### *3.4.2.7 Determinación de polihidroxialcanoatos mediante espectroscopia Infrarrojo*

Para comprobar los resultados luego de la tinción con Negro Sudan B se realizó un análisis de la presencia de polihidroxialcanoatos por espectroscopia de infrarrojo, para ello se realizó un frotis de cada clon inoculado, se colocó una pequeña cantidad sobre el cristal de ATR y se realizó el barrido de la muestra en una longitud de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , cuyos espectros fueron procesados corrigiendo su línea base y eliminando ruido,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , finalmente se verificó la absorbancia en las longitudes de onda específicas del compuesto, tal como se detalla en la Tabla 3-2. (Randriamahefa, et al., 2003, pp. 1093-1095) (Hong, et al., 1999, pp. 524,525)

Cabe destacar que antes de analizar la muestra en el Espectrofotómetro de Infrarrojo por transformada de Fourier, se limpió el cristal del ATR de Seleniuro de Zinc utilizando alcohol y posteriormente se realizó la eliminación de fondo sin la existencia de muestra.

**Tabla 1-2** Longitudes de onda características de la estructura de polihidroxiácidoalcanoatos

Tipo de Muestra	Tipo de PHA	Grupo Funcional	Enlace	Longitud de Onda (cm <sup>-1</sup> )	Intensidad
Células Intactas	PHB	Éster	C=O	1724-1732	Fuerte y Aguda
			C-O	1180-1185	
	mcl PHA	Éster	C=O	1731-1744	Fuerte y Aguda
			C-O	1163	
PHA purificado	PHB	Éster	C=O	1724-1728	Fuerte y Aguda
			C-O	1185	
	mcl PHA	Éster	C=O	1732-1742	Fuerte y Aguda
			C-O	1165	

Fuentes: Randriamahefa, et al. 2003, pp. 1093-1095. Hong, et al, 1999, pp. 524,525.

Realizado por: CAMACHO, Christian, 2015

### 3.4.3 Caracterización de bacterias

Con la finalidad de analizar las características adaptativas y metabólicas de las bacterias aisladas se realizaron las siguientes pruebas de laboratorio:

#### 3.4.3.1 Prueba de resistencia a metales pesados

Para identificar los clones capaces crecer en presencia de metales pesados se prepararon medios de cultivo utilizando una solución de medio mínimo con la formulación descrita en la Tabla 3-3 suplementado por los metales pesados Arsénico (NaAsO<sub>2</sub>), cadmio (Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O), cobre ((Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*3H<sub>2</sub>O)), mercurio (Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*H<sub>2</sub>O) y plomo (Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>\*3H<sub>2</sub>O) a una concentración de 0.5, 5 y 50 mg/ml. (Moraga, et al., 2003, pp. 92, 93)

**Tabla 1-3** Composición de medio para analizar resistencia a metales pesados

Componente	Contenido (g/l)
Levadura	0.005
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.72
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.45
NH <sub>4</sub> Cl	2.16
MgSO <sub>4</sub>	0.195
Bacto Agar	15
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.01
MnSO <sub>4</sub> .9H <sub>2</sub> O	0.05
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.003

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Posteriormente se realizaron repiques de cada clon dejando las cajas inoculadas en incubación a una temperatura de 30 grados Celsius por 120 horas, comprobando su crecimiento cada 24 horas.

#### 3.4.3.2 Prueba de producción de proteasas

Para el análisis de proteasas, se preparó el medio Agar Leche cuya preparación se efectúa disolviendo 2 g de leche descremada en polvo en 10 mililitros de agua destilada y preparando 90 mililitros de una suspensión de medio nutritivo agarizado. (Malajovich, 2015)

Ambas soluciones se esterilizaron separadamente y fueron mezcladas cuando alcanzaron la temperatura de 60 grados Celsius para posteriormente ser distribuidas en placas de Petri.

Se realizó la inoculación de todas las colonias y se dejó en incubación a una temperatura de 30 grados Celsius por 72 horas, finalmente posterior al crecimiento del clon la formación de un halo transparente alrededor de la colonia permitió verificar la presencia de proteasas. (Malajovich, 2015)

#### 3.4.3.3 Prueba de producción de lipasas

Para analizar la presencia de lipasas en los clones estudiados se preparó un medio que estimule su producción utilizando una solución de agar mínimo con la composición detallada en la Tabla 3-4 para un volumen de 500 mililitros. (Universidad Central de Venezuela, 2009)

**Tabla 1-4** Composición de medio para producción de lipasas

<b>Componente</b>	<b>Contenido (g)</b>
Peptona	20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.5
NaCl	1.0
Glucosa	1.0
Agar	12.5
MgSO <sub>4</sub>	0.0005

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Posteriormente la solución fue calentada, homogenizada y ajustada a pH de 7, así mismo se realizó el lavado y desinfección de la cascara de huevo.

Luego de esterilizar y enfriar el medio a una temperatura de 60 grados Celsius, se añadió de forma aseptica la yema de huevo, agitando de forma constante hasta su homogenización y distribuyendo el medio realizado en cajas Petri.

Las placas agarizadas fueron inoculadas y a continuación incubadas por un periodo de 72 horas a una temperatura de 30 grados Celsius, posterior a su crecimiento la presencia de una zona opaca alrededor de la colonia microbiana demostraba la existencia de lipasas.

#### *3.4.3.4 Prueba de producción de amilasas*

El medio utilizado para la prueba de amilasa es denominado Agar Almidón y fue preparado disolviendo 0.1 g de almidón en 10 mililitros de agua destilada y realizando una suspensión de 90 mililitros de Agar medio nutritivo, ambas soluciones fueron mezcladas para posteriormente esterilizar el resultado y distribuirlo en placas de Petri. (Malajovich, 2015)

Luego se realizó la inoculación de todas las colonias y se dejó en incubación a una temperatura de 30 grados Celsius por 72 horas, posterior al crecimiento de las colonias se adicionó el reactivo Lugol y se visualizó la formación de un halo transparente alrededor de las colonias con resultado positivo para presencia de amilasas (Malajovich, 2015)

#### *3.4.3.5 Pruebas Bioquímicas para identificación bacteriana*

El análisis bioquímico para la identificación de los clones se realizó utilizando las pruebas descritas en la Tabla 3-5.

**Tabla 1-5** Pruebas bioquímicas de identificación

<b>Tipo de Agar o reactivo</b>	<b>Prueba bioquímica</b>
Agar MacConkey	Fermentación de lactosa
Tiras de Oxidasa	Presencia de citocromo oxidasa
Agar SIM e Indol	Movilidad
	Producción de indol
	Producción de sulfuro de hidrógeno
Kligler Hierro Agar	Fermentación de glucosa
	Fermentación de lactosa
	Producción de ácido sulfhídrico.
Lisina Hierro Agar	Decarboxilación de la lisina
	Desaminación de la lisina
	Producción de ácido sulfhídrico.
Agar Urea	Detección de ureasa
Agar Citrato	Capacidad de utilizar citrato

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Posteriormente las características bioquímicas de los clones aislados fueron comparadas con una base de datos preliminar para determinar el grupo taxonómico al que pertenecen. (Forbes, 2009, pp. 216-246)

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Obtención de los clones bacterianos

##### 4.1.1 *Recolección de las muestras*

Las muestras seleccionadas durante el análisis de las aguas residuales del sistema de vertido de la Empresa Lácteos Santillán fueron obtenidas del sistema de trampa de grasas (Muestra 1), del sistema de revisión (Muestra 2 y 4) y del pozo de almacenamiento de agua residual (Muestra 3), como se representa en la Figura 4-1, las cuales tenían un tiempo de reposo estimado mayor a 48 horas, considerado un tiempo idóneo para la adaptación de los microorganismos a las condiciones nutritivas del vertido.



**Figura 4-1** Identificación de los puntos de muestreo

Fuente: Camacho, Christian, 2015

##### 4.1.2 *Recuento Bacteriológico Inicial*

El recuento bacteriológico inicial realizado a las muestras en medio nutritivo, tuvo como resultados cantidades entre  $1.3 \times 10^6$  y  $1.1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro como se detalla en la Tabla 4-1, estos resultados son similares a los datos reportados de lugares cercanos a la zona de muestreo por Valencia (2013, p.92) durante el estudio de las aguas residuales

de la cabecera Parroquial de San Luis, sustentando los datos reportados durante el presente análisis.

**Tabla 4-1** Conteo microbiológico inicial en medio nutritivo

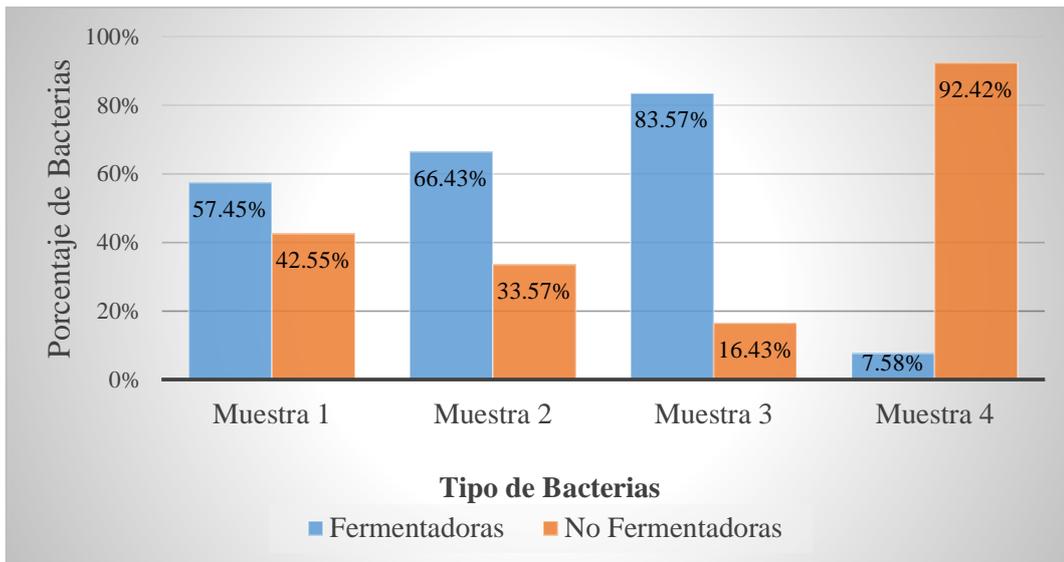
Muestra	UFCx10 <sup>6</sup> /ml	Log UFC/ml		
		$\bar{x}$	$\sigma$	CV
1	45	7.654	0.024	0.0004
2	530	8.728	0.030	0.0006
3	1.3	6.098	0.106	0.0074
4	1100	9.039	0.026	0.0004

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

La diferencia en la cantidad de clones presente entre las muestras analizadas, (Tabla 4-1) según Martínez & García (2003, p. 264) puede deberse fundamentalmente a la existencia en el punto de muestreo de las condiciones óptimas para el crecimiento microbiológico como temperatura, nutrientes y oxígeno, así, las muestras provenientes de lugares con mejores condiciones de crecimiento tendrían una mayor cantidad de colonias, como sería el caso de la Muestra 4 que presenta una mayor cantidad de UFC por mililitro.

#### **4.1.3 Análisis del tipo de bacteria según el metabolismo de lactosa**

El análisis del metabolismo de lactosa realizado en Agar MacConkey permitió conocer el porcentaje de bacterias fermentadoras y no fermentadoras existentes en las muestras, donde se evidenció un mayor porcentaje de bacterias fermentadoras de lactosa en casi todas las muestras como se indica en la Figura 4-2, además, considerando que según Arroyave, et al. (2013, pp. 71, 72) las bacterias no fermentadoras de lactosa son potenciales productoras de polihidroxicanoatos, estos resultados indicarían que solo un grupo limitado de bacterias sería capaz de producir el biopolímero.



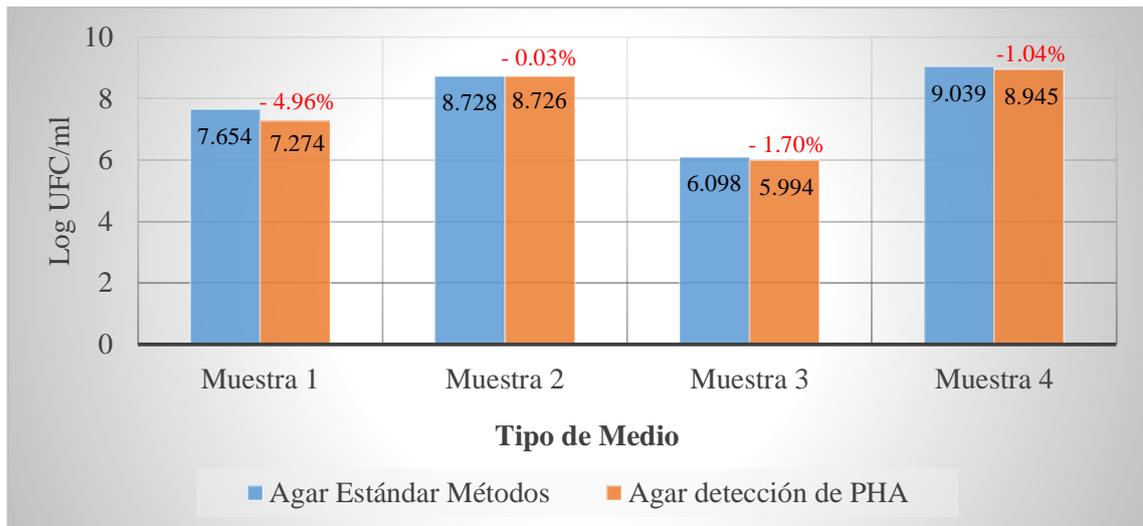
**Figura 4-2** Tipo de bacteria según el metabolismo de lactosa

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

El alto porcentaje de bacterias capaces de fermentar lactosa presentado en la mayoría de las muestras analizadas puede ser originada por la gran cantidad de lactosa presente en los vertidos de la industria de lácteos y a la presencia de este tipo de microorganismos durante la elaboración de productos lácteos, especialmente quesos madurados, como lo explica García (1998, p. 145) en sus estudios sobre la microbiología de los productos lácteos.

#### 4.1.4 *Inhibición del crecimiento bacteriano en el medio específico ADP*

Con el fin de comprobar si la relación 20 a 1 de Carbono-Nitrógeno presente en el medio mínimo para producción de polihidroxialcanoatos (ADP) inhibe el desarrollo microbiano, se realizó una comparación entre el crecimiento presentado en el medio ADP y medio nutritivo, durante el análisis los resultados obtenidos mostraron que la cantidad de UFC por mililitro fue menor en el medio mínimo ADP con un porcentaje entre 0.03 y 4.96% de diferencia en comparación con la cantidad de UFC presente el medio nutritivo, tal como se presenta en la Figura 4-4, demostrando una mínima inhibición, motivo por el cual las inoculaciones posteriores se realizaron en el medio mínimo ADP.



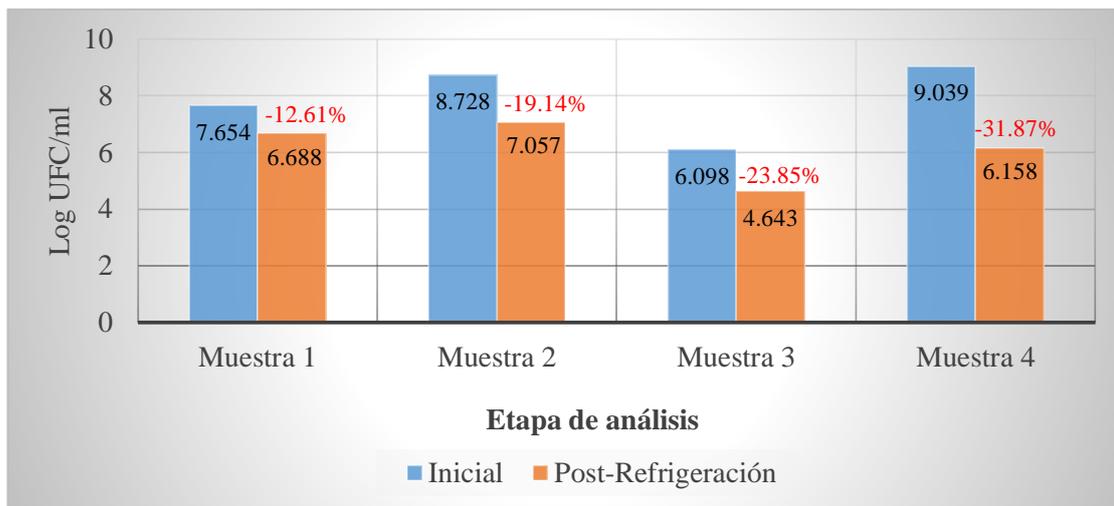
**Figura 4-3** Diferencia de crecimiento bacteriano en medio nutritivo y ADP

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

La similitud entre la cantidad de UFC's por mililitro presente en el medio mínimo ADP y en el medio nutritivo para métodos estándar, según lo explicado por Prieto et al. (2011, pp. 15, 16) durante su estudio de la relación entre las necesidades metabólicas y el crecimiento bacteriano, podría deberse a que las bacterias presentes en las muestras analizadas necesitaron una mínima cantidad de nutrientes para su desarrollo, razón por la cual demostraron un crecimiento similar en ambos medios.

#### 4.1.5 Crecimiento bacteriano post-refrigeración

Las muestras seleccionadas posterior a su análisis fueron sometidas a refrigeración por un periodo de 45 días con la finalidad de obtener bacterias potencialmente más estables a condiciones adversas de crecimiento, para comprobar la inhibición microbiana por efecto de la baja temperatura se realizaron recuentos microbiológicos en medios nutritivos antes y después de su refrigeración, demostrando una disminución del 12.61 al 31.87 por ciento en el crecimiento de los microorganismos como se detalla en la Figura 4-3, tal comportamiento demostraría que el estrés microbiológico generado sobre las bacterias permite la supervivencia de los microorganismos más aptos.



**Figura 4-4** Decrecimiento bacteriano post-refrigeración

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

El decrecimiento de la población microbiana luego de exponer las muestras a bajas temperaturas según lo explicado por Martínez & García (2003, p. 264) durante su estudio de la relación entre la temperatura y el desarrollo bacteriano, pudo ser causado por la disminución del metabolismo de las bacterias y la reducción de nutrientes durante el ensayo.

#### 4.1.6 Selección de clones bacterianos

Los clones bacterianos utilizados durante la investigación fueron seleccionados en dos grupos, el primero obtenido al principio de la investigación basado en las características macroscópicas presentadas por los clones en el medio mínimo ADP, donde se seleccionaron 34 clones (Grupo A) y el segundo proveniente de las muestras luego de un proceso de refrigeración formado por bacterias no fermentadoras de lactosa oxidasa positivo, donde se seleccionaron 33 clones (Grupo B), como se describe en la Tabla 4-2, dando un total de 67 clones seleccionados para el análisis de producción de polihidroxicanoatos.

**Tabla 4-2** Cantidad de clones seleccionados por muestra

Muestra	Clones Seleccionados			
	Grupo A	Porcentaje	Grupo B	Porcentaje
1	13	38.24%	10	30.30%
2	7	20.59%	15	45.45%
3	6	17.65%	5	15.15%
4	8	23.53%	3	9.09%
Total	34	100.00%	33	100.00%

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

#### 4.1.7 Estabilización de clones bacterianos

Las fases de estabilización y reaislamiento realizadas sobre los 67 clones aislados inicialmente permitieron obtener como resultado un total de 52 clones estabilizados en el medio mínimo de producción ADP como se indica en la Tabla 4-3, en donde, los clones del grupo A presentaron menor adaptación al medio mínimo ADP con el 38.24% de clones perdidos durante el ensayo, mientras que en el Grupo B sólo alcanzó un 6.06% de clones no adaptados, demostrando que la adaptación de los clones que fueron obtenidos luego de la etapa de refrigeración, fue mejor que los clones obtenidos al principio de la investigación.

**Tabla 4-3** Cantidad de clones aislados por muestra

Muestra	Clones Grupo A			Clones Grupo B		
	Aislados	Estabilizados	Pérdida	Aislados	Estabilizados	Pérdida
1	13	4	69.23%	10	8	20.00%
2	7	7	0.00%	15	15	0.00%
3	6	5	16.67%	5	5	0.00%
4	8	5	37.50%	3	3	0.00%
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>21</b>	<b>38.24%</b>	<b>33</b>	<b>31</b>	<b>6.06%</b>

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

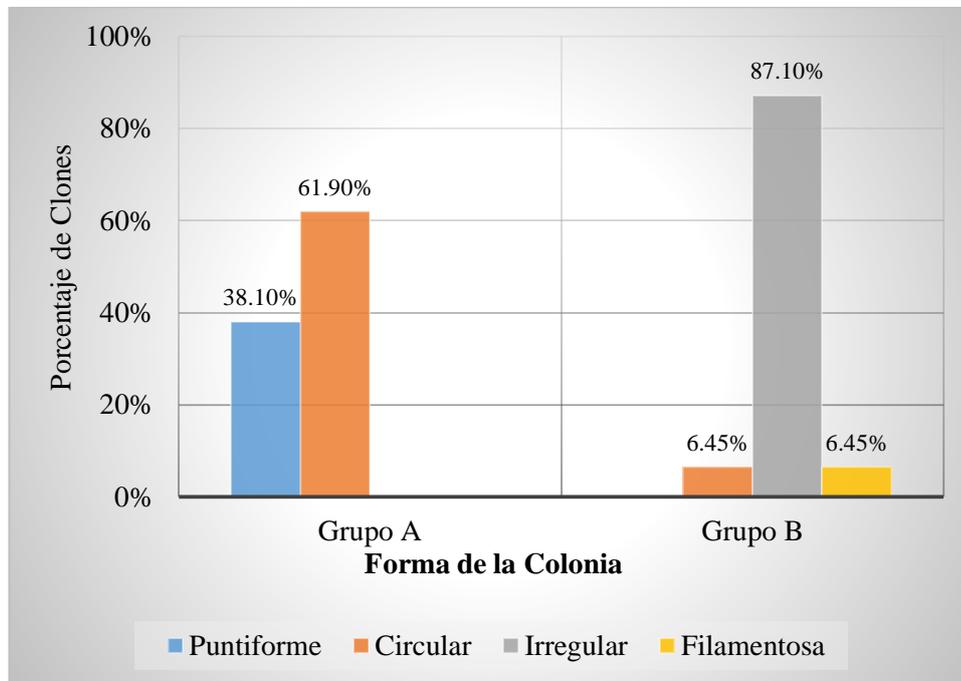
La gran cantidad de clones no adaptados presentada en el Grupo A durante las etapas de estabilización y reaislamiento podría ser causada por las necesidades metabólicas y de crecimiento necesarias para su desarrollo bacteriano, es decir, las bacterias para su desarrollo necesitaron una mayor cantidad y tipo de nutrientes, demostrando un menor crecimiento en cada repique realizado y su pérdida al final de los ensayos, estos ensayos son muy importantes para comenzar el análisis de producción de PHA, pues tal como menciona Stanier et al. (1996) no sólo es imperativo el aislamiento del microorganismo, sino también su mantenimiento en el ambiente artificial seleccionado.

## 4.2 Características Macroscópicas, microscópicas y tinción Gram de los clones

### 4.2.1 Forma

Los clones estabilizados durante el análisis de su forma, presentaron en el Grupo A un porcentaje similar entre dos tipos de morfologías, circular y puntiforme, mientras que en el grupo B existió mayor variación entre las tres morfologías presentadas sobresaliendo la forma irregular con casi el 90 por ciento de los clones analizados, como se detalla en la Figura 4-5.

Los resultados demostraron que durante el principio de la investigación la mayoría de los clones aislados presentaron más semejanza en su forma, mientras que posterior a la refrigeración de las muestras se desarrollaron bacterias con morfologías diferentes, generando una mayor heterogeneidad bacteriana.



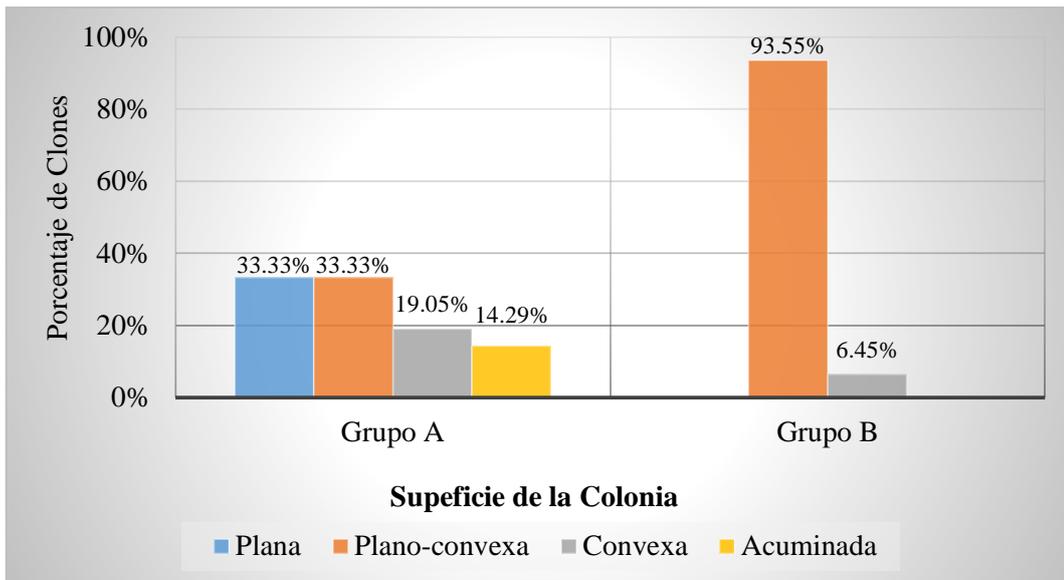
**Figura 4-5** Tipo de forma macroscópica de los clones aislados

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

#### 4.2.2 Superficie

El análisis de la superficie de las colonias bacterianas permitió conocer que los clones del Grupo A mostraban una gran variedad de superficies destacando entre ellas la superficie plana y planoconvexa, mientras que en el Grupo B existió menor variedad de superficies siendo la más expresada la planoconvexa, como se indica en la Figura 4-6.

Los resultados obtenidos demostraron que durante el principio de la investigación los clones presentaron mayor variedad en su superficie, al contrario de los clones obtenidos posterior a la refrigeración de las muestras, donde se observó una mayor similitud en su forma.



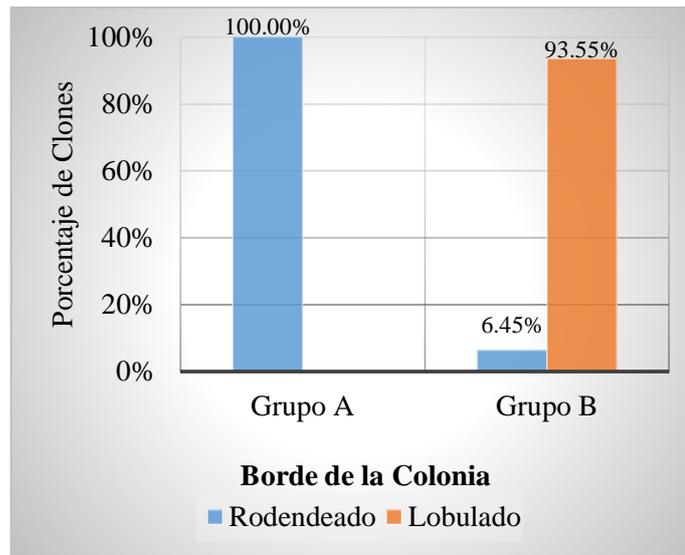
**Figura 4-6** Tipo de superficie presentada por las colonias bacterianas

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

#### 4.2.3 Borde

Al analizar el tipo de borde de cada colonia, los resultados mostraron que en el Grupo A existía únicamente la presencia de bacterias con borde redondeado mientras que en el Grupo B existieron dos bordes diferentes, de los cuales el lobulado fue el dominante, como se indica en la Figura 4-7.

Los resultados obtenidos indican que el borde de las colonias bacterianas fue notablemente diferente entre los grupos A y B, es decir, fue redondeado en los clones analizados al principio del estudio, mientras que las bacterias obtenidas luego de la refrigeración de muestras presentaron una mínima cantidad de bordes redondeados siendo reemplazados por bacterias que presentaron bordes de tipo lobulado, describiendo una diferenciación notable durante el proceso de estrés.



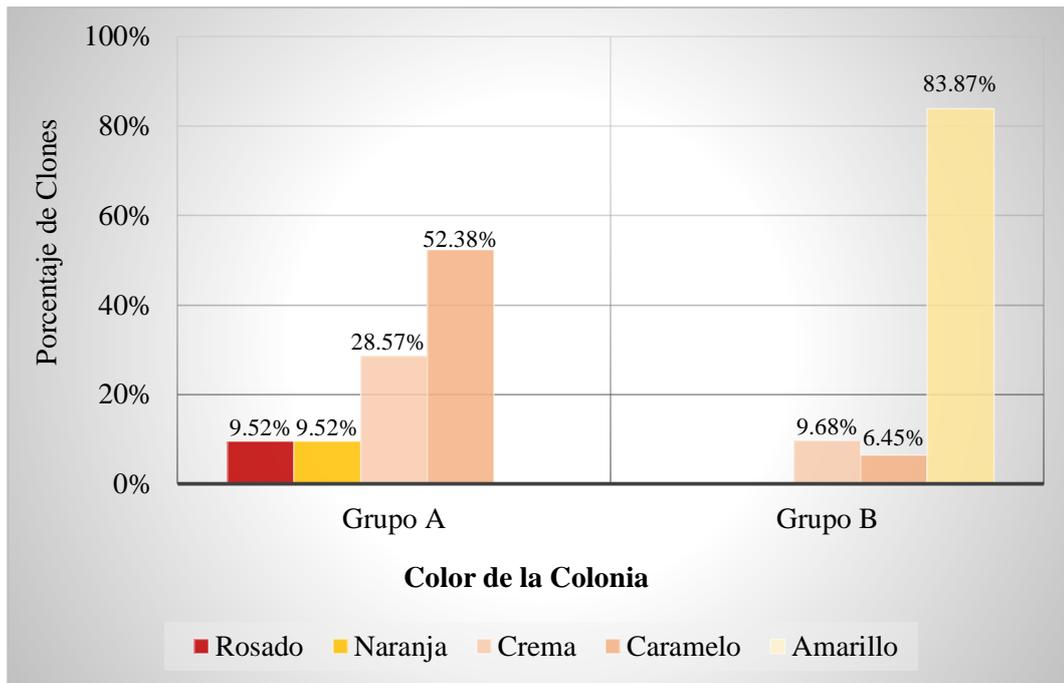
**Figura 4-7** Tipo de borde de las colonias bacterianas

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

#### 4.2.4 Color

La observación de la coloración presentada por los clones durante su análisis, permitió conocer en el Grupo A la presencia de cuatro colores diferentes entre sus clones con mayor presencia de color caramelo, mientras que en el Grupo B existieron colonias con tres colores diferentes de los cuales el amarillo presentaba un mayor porcentaje, tal como se detalla en la Figura 4-8.

Los resultados encontrados demostraron que los clones aislados antes de la refrigeración de las muestras presentaron mayor variedad en su color, que aquellos obtenidos posterior a la etapa de refrigeración, los cuales presentaron mayor similitud, describiendo una disminución de diversidad durante el ensayo.



**Figura 4-8** Color macroscópico de las colonias bacterianas

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

#### 4.2.5 Presencia de Gas

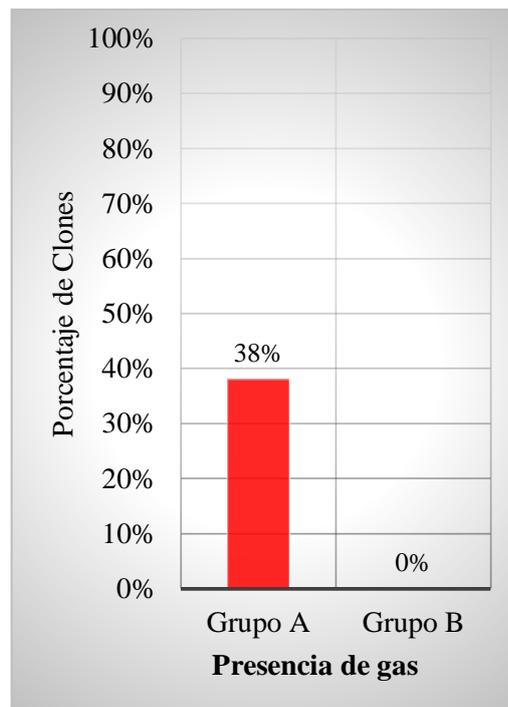
La presencia de gas en los clones fue determinado mediante la observación de burbujas en la superficie de las colonias, conforme a lo presentado en la Figura 4-9, tal observación permitió conocer que únicamente el 38% del total de los clones del Grupo A presentaron formación de gas, mientras que las bacterias del Grupo B no demostraron su presencia, tal como se visualiza en la Figura 4-10



**Figura 4-9** Formación gas en el clon A17

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Los resultados obtenidos indican que la formación de gas presentada en el Grupo A podría deberse a la selección al azar de sus clones, algunos de los cuales podrían fermentar lactosa, pues como señala González (2014) un metabolismo común en la leche es la fermentación de lactosa, cuyos productos más usuales son ácidos, alcoholes y gases, mientras que las bacterias no fermentadoras obtenidas al final de la refrigeración de las muestras, demostraron una posible disminución o ausencia de la expresión de esta característica.

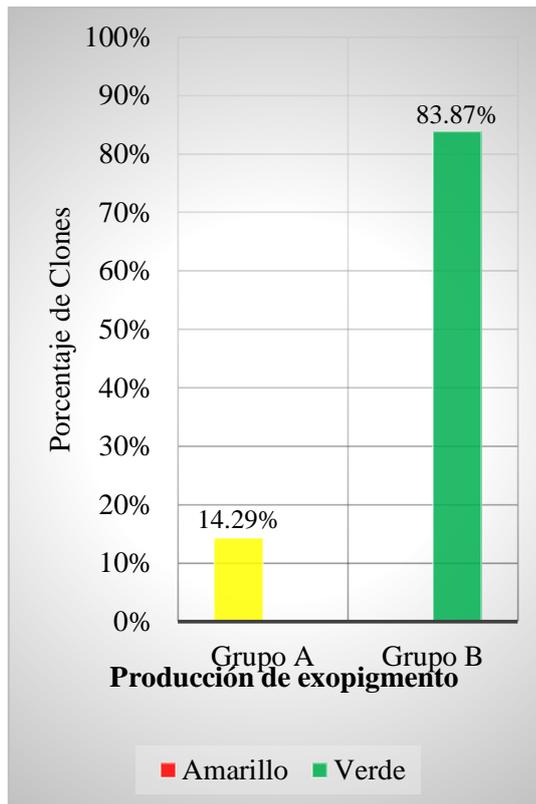


**Figura 4-10** Presencia de gas en las colonias bacterianas

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

#### 4.2.6 Segregación de pigmento en el medio

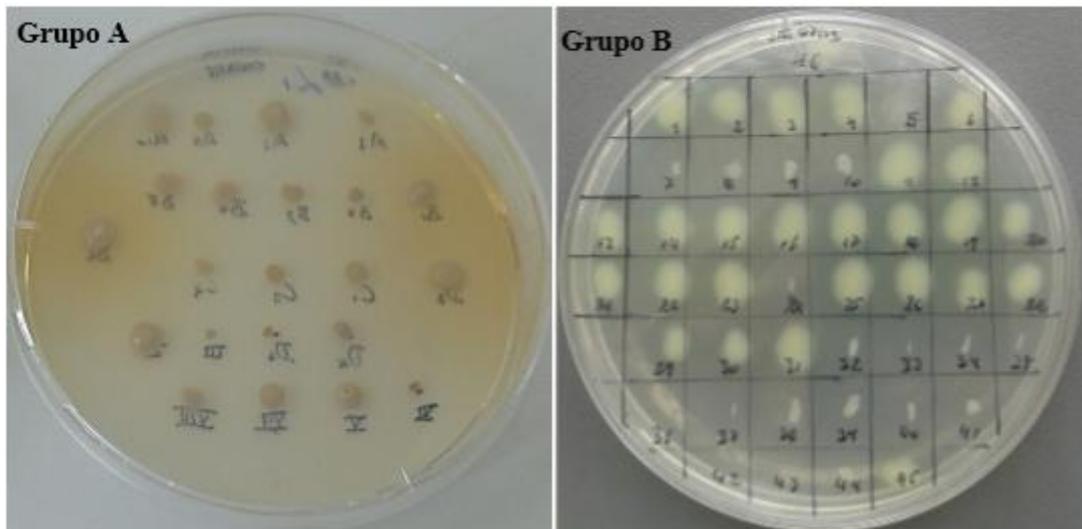
La producción de exopigmento fue examinada mediante la observación de un cambio de coloración en el medio de crecimiento, dicho fenómeno fue expresado en ambos grupos (A y B), como se detalla en la Figura 4-11, sin embargo los pigmentos fueron diferentes en cada grupo, como se visualiza en la Figura 4-12, en donde un 14 % de los clones del Grupo A fueron capaces de producir exopigmento de color amarillo, mientras que un 84% de los clones del Grupo B produjeron exopigmento amarillo verdoso, demostrando con ello, la variabilidad de clones seleccionados durante el análisis microbiológico.



**Figura 4-11** Producción de exopigmento

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

La liberación de pigmentos diferentes entre los Grupos A y B según lo analizado por Des Abbayes (1989, pp. 9, 10) podría ser consecuencia de las diferentes rutas metabólicas utilizadas por cada clon para la producción de pigmentos o de las funciones que el pigmento desempeñe en el microorganismo, permitiendo obtener pigmentos con diferente composición química y diferentes funciones, entre ellas, de protección, vitamínicas, enzimáticas, antibióticas, entre otras, que puede ser de gran importancia para la célula.



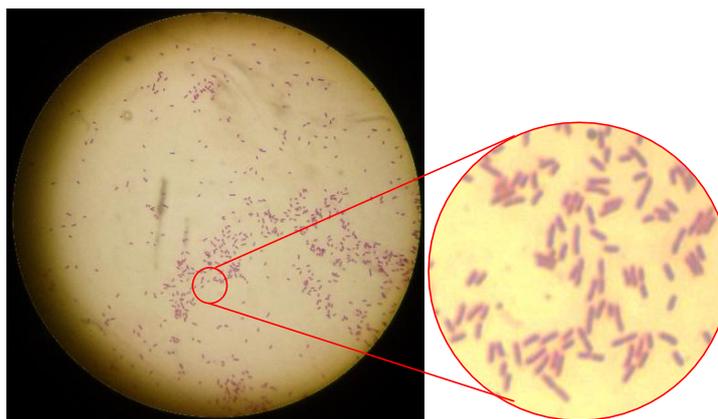
**Figura 4-12** Presencia de exopolímeros en clones del Grupo A y B

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

#### 4.2.7 Tinción Gram

La tinción de Gram permitió analizar las morfologías microscópicas y la composición de la membrana celular de los 52 clones estabilizados, los resultados permitieron conocer que todos los clones analizados pertenecieron al grupo de bacilos Gram negativos, demostrando características similares a las presentadas en la Figura 4-13, es importante resaltar que algunos géneros bacterianos como *Aeromonas*, *Alcaligenes* y *Pseudomonas* pertenecientes al grupo de bacilos Gram negativos son productores de polihidroxiácidoalcanoatos, considerando a los clones aislados como potenciales productores del biopolímero.

La presencia de bacilos Gram negativos observada durante la investigación es normal considerando que este tipo de microorganismos son comunes en productos lácteos y agua residual, destacando entre ellos, el grupo de los coliformes y las bacterias lácticas capaces de producir exoenzimas y antibióticos. (Henry & Heinke, 1999, pp. 273,274) (Rivero, et al., 1994, pp. 11,12)



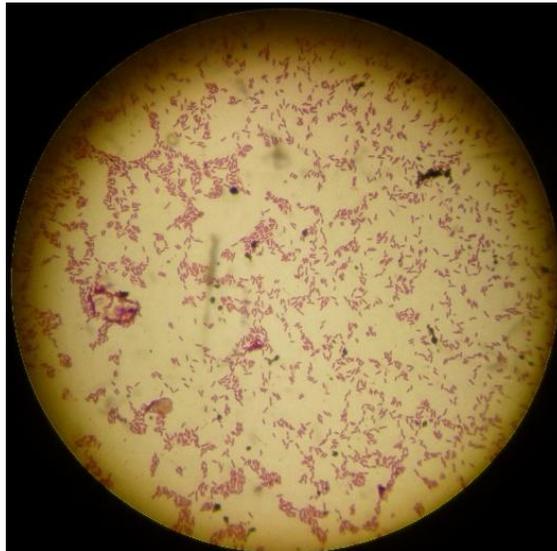
**Figura 4-13** Tinción Gram del Clon A12

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

### 4.3 Análisis de producción de polihidroxialcanoatos

El análisis de la producción de polihidroxialcanoatos en los clones estudiados se realizó en dos etapas, la primera basada en la tinción de gránulos intracelulares de PHA utilizando el colorante Sudan Black y la segunda mediante la excitación de los grupos funcionales del biopolímero PHA utilizando espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, además, se estimuló la producción del biopolímero utilizando diferentes medios de cultivo entre ellos medio mínimo suplementado con diferentes azúcares (Glucosa y Sacarosa) y diferentes concentraciones de lactosa, medio ADP suplementado con diferentes concentraciones cloruro de sodio y medio mínimo ADP estabilizado a pH ácido (pH 4).

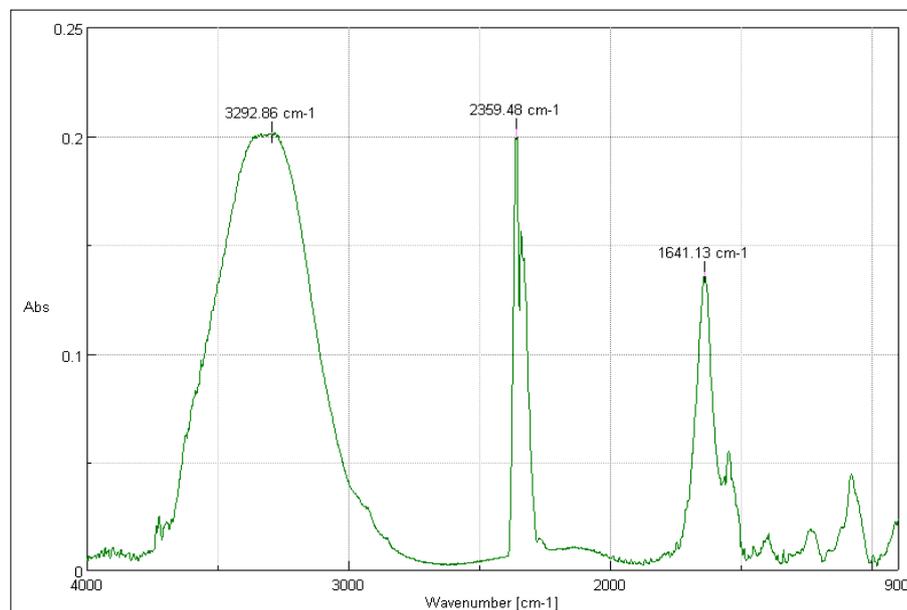
Los resultados obtenidos durante la prueba realizada con Sudan Black no fueron concluyentes pues los controles negativos en todos los ensayos presentaban la misma tinción que los clones analizados, existiendo además la formación de precipitados del colorante, como se visualiza en la Figura 4-14, mientras que el ensayo utilizando espectroscopia Infrarroja dio un resultado negativo en todos casos, debido a que los espectros obtenidos durante el análisis no demostraban niveles de absorbancia en el rango entre  $1724$  y  $1744\text{ cm}^{-1}$ , perteneciente al grupo éster presente en los gránulos intracelulares de PHA's, tal como se representa en la Figura 4-15.



**Figura 4-14** Tinción con Sudan Black del Clon B1

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

La similitud entre la tinción con Sudan Black de los controles negativos y los clones analizados, así como la formación de precipitados del colorante, según lo explicado por Shamala et al (2003) podría deberse a la falta de especificidad de dicho compuesto, el cual puede teñir gránulos de PHA y cuerpos lipofílicos, formando tinciones inespecíficas en las bacterias examinadas.



**Figura 4-15** Espectro infrarrojo por transformada de Fourier del Clon B1

Realizado por: CAMACHO, Christian, 2015

Los resultados negativos presentados al analizar la producción de PHA según Sudesh, et al., (2000) podría deberse a la inexistencia de PHA sintetasa considerada la enzima clave para la

polimerización del biopolímero PHA, los resultados expuestos son contrarios a los reportados por Cardona et al. (2013), que lograron aislar 6 cepas productoras de polihidroxialcanoatos de subproductos lácteos, pertenecientes a los géneros *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas entomophila* y *Paracoccus sp*, lo cual sugeriría que la cantidad de bacterias productoras del biopolímero utilizando derivados lácteos es limitada. (Sudesh, et al., 2000, p. 1510)

#### 4.4 Caracterización bacteriana

Las pruebas realizadas para determinar la producción de PHA permitieron conocer otras características importantes de las bacterias como producción de exopolímeros (EPS), halotolerancia y crecimiento en pH ácido, cuyos resultados se reportan a continuación.

##### 4.4.1 Producción de Exopolímeros

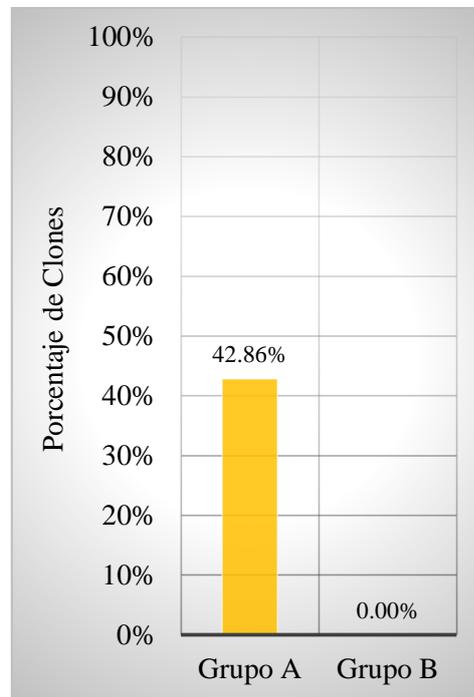
La producción de exopolímeros fue identificada al observar la formación de sustancias viscosas alrededor de la colonia durante el crecimiento de las bacterias en medio mínimo ADP suplementado con diferentes azúcares, tal como lo explica Stainer et al (1996, pp. 177, 178) y como se presenta en la Figura 4-1.

Los resultados obtenidos durante el ensayo demostraron que el 42.86% de los clones aislados del grupo A fueron capaces de producir exopolímeros en el medio ADP, manifestando una mayor síntesis de dichos compuestos en medios suplementados con mayores concentraciones de lactosa, mientras que en el grupo B ningún clon fue capaz de producirlo, como se indica en la Figura 4-17, demostrando una diferencia notable en el mecanismo adaptativo de los clones aislados a medios cuya relación carbono/nitrógeno es superior a 20 .



**Figura 4-16** Formación de exopolímeros en medio suplementado con D-Glucosa

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015



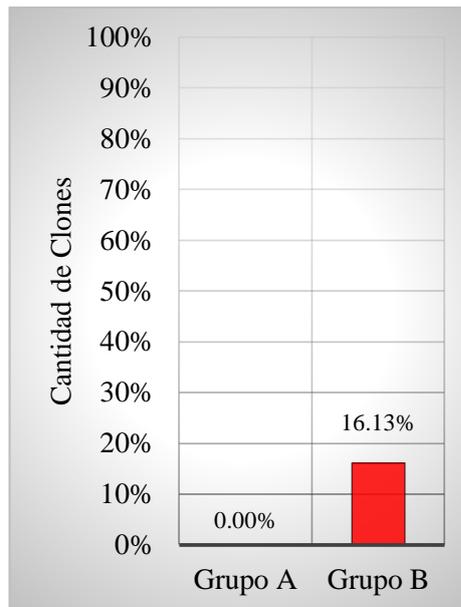
**Figura 4-17** Cantidad de clones capaces de producir exopolímeros

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

La producción de polímeros extracelulares observada en algunos clones del Grupo A podría deberse a que según Stanier (1996) dichos polímeros pueden mejorar las interacciones intercelulares de adherencia, invasión y resistencia en las bacterias, permitiendo un mejor desarrollo microbiano en condiciones adversas.

#### 4.4.2 *Crecimiento en medios ácidos*

El crecimiento de los clones en medio ácido demostró el efecto producido por la disminución de pH sobre el desarrollo bacteriano, los resultados obtenidos demostraron que solamente el 16.13% de los clones del grupo B pudieron desarrollarse en pH ácido, al contrario de los clones del grupo A donde no existió ningún crecimiento, como se representa en la Figura 4-18, demostrando una mayor adaptación de los clones del Grupo B a medios con pH ácido.



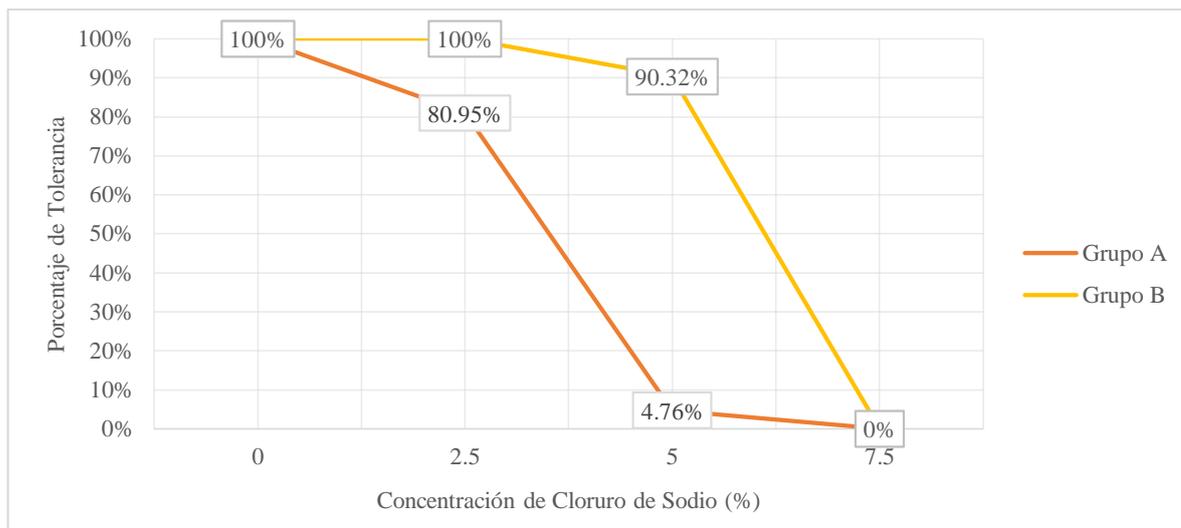
**Figura 4-18** Cantidad de clones capaces de crecer en pH ácido

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Los clones del Grupo B pudieron haberse adaptado al pH ácido del medio por diferentes mecanismos como intercambio de cationes y aniones en la membrana, cambios en su metabolismo que permita generar productos básicos o neutros, así como regulación del pH citoplasmático por acción enzimática, mientras que los clones no desarrollados pudieron haber sufrido cambios en su actividad enzimática o daños en sus proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas biológicas que limitaron su desarrollo, tal como lo describe Slonczewski et al. (2009) en su estudio sobre el efecto del pH sobre el desarrollo microbiano.

#### 4.4.3 Halotolerancia

El crecimiento de los clones en medios suplementados con diferentes concentraciones de cloruro de sodio, fue realizado con la finalidad de estimular la producción de polihidroxicanoatos, sin embargo, este ensayo permitió conocer la capacidad halotolerante de los clones, obteniendo como resultado un 90.32% de clones del Grupo B tolerantes a medios suplementados con 5% de cloruro de sodio, así como un 4.76% de clones del grupo A resistentes a medios suplementados con la misma concentración de sal, tal como se muestra en la Figura 4-19, tales resultados demostraron una mayor adaptación de los clones del Grupo B a medios suplementados con sales.



**Figura 4-19** Capacidad de halotolerancia a diferentes concentraciones

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Los clones del Grupo B que resistieron mejor a medios suplementados con cloruro de sodio según lo explicado por Ramírez, et al. (2006) pudieron haber acumulado una gran cantidad de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo, entre ellos compuestos orgánicos de bajo peso molecular, que se esperaba fueran polihidroxialcanoatos, sin embargo, su presencia no se pudo demostrar en la presente investigación mediante técnicas de tinción o espectrofotometría de infrarrojo.

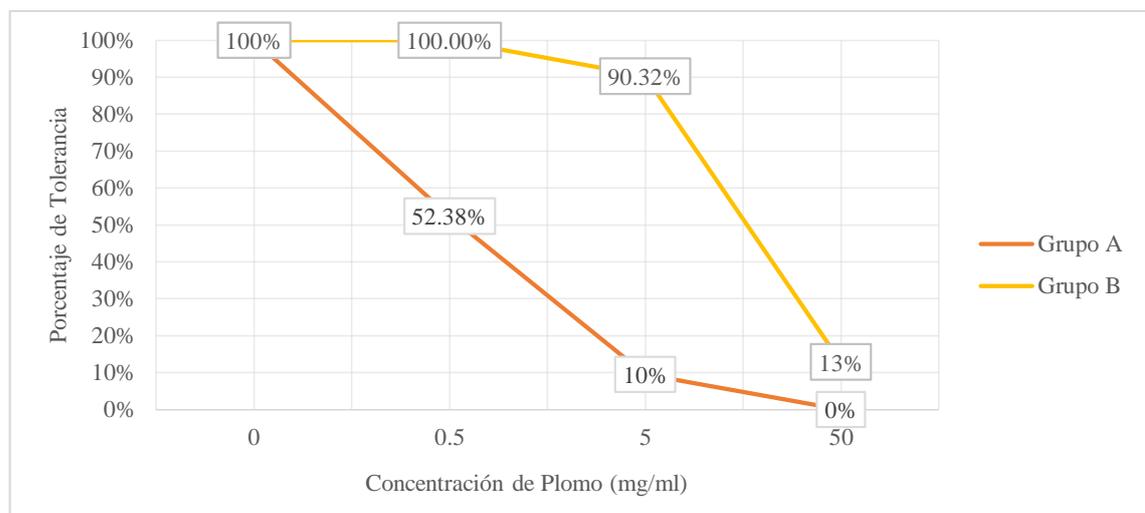
#### 4.4.4 Resistencia a metales pesados

El análisis de la resistencia de los clones analizados a metales pesados fue realizado considerando la constante liberación de estos compuestos tóxicos en el ambiente y su potencial tratamiento utilizando microorganismos.

##### 4.4.4.1 Plomo

Las pruebas de crecimiento en medios suplementados con plomo demostraron un mayor porcentaje de inhibición celular en los clones del Grupo A, los cuales presentaron una disminución en su crecimiento desde bajas concentraciones del tóxico hasta alcanzar la mortalidad absoluta en una concentración de 50mg/ml del metal, mientras que los clones del Grupo B presentaron una ligera disminución en su desarrollo en concentraciones de plomo de 5mg/ml, disminuyendo posteriormente su crecimiento de manera drástica hasta alcanzar un 13% de clones capaces de tolerar una concentración de 50mg/ml de plomo, como se visualiza en la Figura 4-20, tales

resultados demostraron que las condiciones de selección de los clones del Grupo B permitieron aislar bacterias con una mejor adaptación a medios suplementados con plomo



**Figura 4-20** Resistencia a diferentes concentraciones de plomo

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

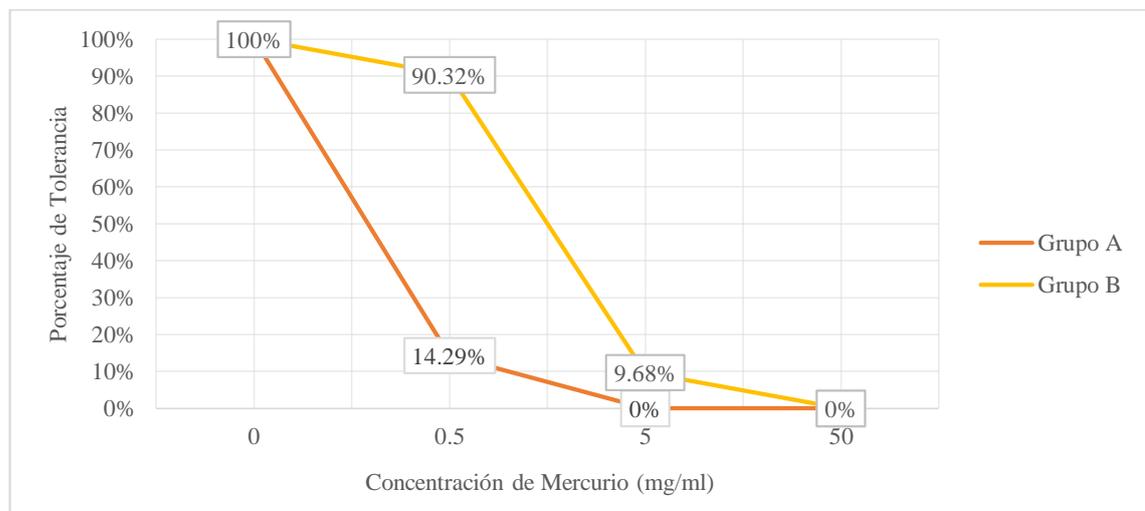
Los resultados obtenidos permitieron conocer que los clones analizados en el presente estudio demostraron un mejor desarrollo en medios suplementados con plomo que los microorganismos analizados por Pérez et al. (2015), los cuales demostraron una notable disminución de su crecimiento en medios suplementados con concentraciones de plomo, en forma de nitrato de plomo entre 0.0075 y 0.01 mg/ml.

El gran porcentaje de clones capaces de tolerar medios suplementados con plomo según lo explicado por Castillo (2005, pp. 227, 228) podría deberse a que este elemento tóxico no interviene de manera directa en ninguna función biológica del desarrollo celular, sin embargo, su exceso en el medio de crecimiento provoca interferencias con algunas metaloproteínas produciendo el reemplazo de metales de utilidad celular como calcio, a pesar de ello, se presume que los clones del presente estudio adaptados a mayores concentraciones de plomo pudieron haber desarrollado estrategias de excreción celular o acumulación en el interior del citoplasma en forma de fosfato de plomo que permitieron su desarrollo en los medios con mayor concentración del tóxico.

#### 4.4.4.2 Mercurio

Las pruebas de crecimiento en medios suplementados con mercurio demostraron una menor adaptación en los clones del Grupo A, presentando una gran disminución en su crecimiento desde

bajas concentraciones del tóxico hasta alcanzar la mortalidad absoluta de sus clones en una concentración de 5mg/ml de mercurio, mientras que los clones del Grupo B presentaron una importante disminución en su crecimiento en medios suplementados con concentraciones entre 0,5 y 5 mg/ml de mercurio, posterior a lo cual se evidenció un 9.68% de bacterias capaces de tolerar el tóxico, alcanzando la mortalidad absoluta en una concentración de 50mg/ml, como se visualiza en la Figura 4-21, tales resultados demostraron que las condiciones de selección de los clones del Grupo B permitieron aislar bacterias con una mejor adaptación a medios suplementados con mercurio que aquellas del Grupo A.



**Figura 4-21** Resistencia a diferentes concentraciones de mercurio

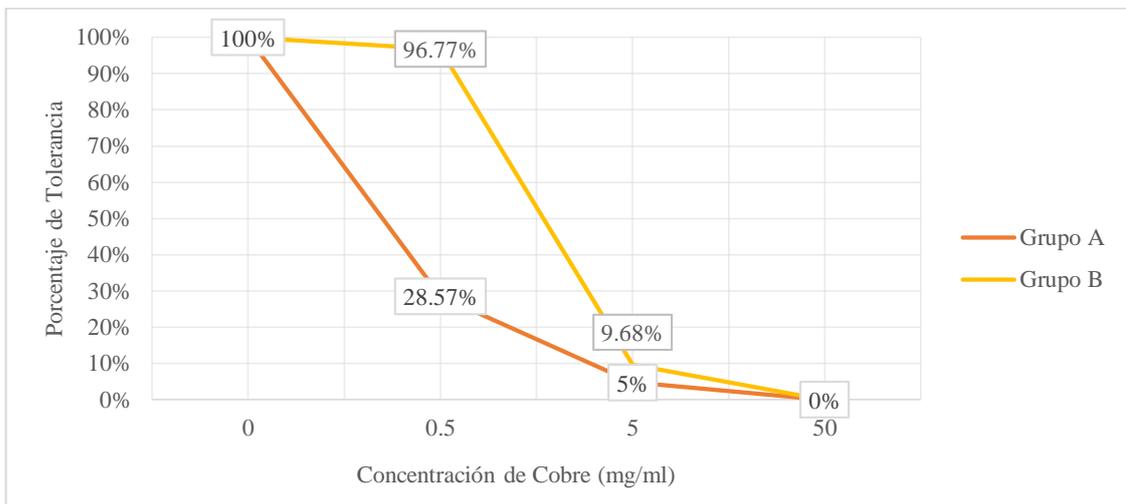
Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por Moraga et al. (2003) donde la tolerancia máxima de los microorganismos a medios suplementados con cloruro de mercurio se encontraba en concentraciones entre 5 y 10 mg/ml de mercurio, demostrando que los clones analizados en el presente estudio tienen igual capacidad de adaptación que otros microorganismos aislados del agua.

El bajo porcentaje de clones capaces de tolerar medios suplementados con altas concentraciones de mercurio según lo explicado por Castillo (2005, pp. 221, 222) podría deberse a que este metal tóxico desnaturaliza las proteínas de los microorganismos, a través de la formación de complejos con constituyentes proteínicos como los grupos tiolíticos e imínicos, interfiriendo de forma directa en el desarrollo celular, sin embargo, se presume que los clones adaptados pertenecientes al Grupo B pudieron desarrollar ciertos mecanismos adaptativos como la reducción de mercurio de  $Hg^{2+}$  a  $Hg^0$  por acción de la flavoproteínas, que permitieron una mayor adaptación a este tipo de medios.

#### 4.4.4.3 Cobre

Las pruebas de crecimiento en medios suplementados con cobre demostraron una mayor inhibición en los clones del Grupo A, los cuales presentaron una disminución en su crecimiento desde bajas concentraciones del tóxico hasta alcanzar la mortalidad absoluta en una concentración de 50mg/ml del metal, mientras que los clones del Grupo B presentaron una mayor disminución en su crecimiento en medios suplementados con concentraciones entre 0,5 y 5 mg/ml de cobre posterior a lo cual se evidenció un 9.68% de bacterias capaces de tolerar el tóxico, alcanzando la mortalidad absoluta en una concentración de 50mg/ml, como se visualiza en la Figura 4-22, tales resultados demostraron que las condiciones de selección de los clones del Grupo B permitieron aislar bacterias con una mejor adaptación a medios suplementados con cobre.



**Figura 4-22** Resistencia a diferentes concentraciones de cobre

**Fuente:** CAMACHO, Christian, 2015

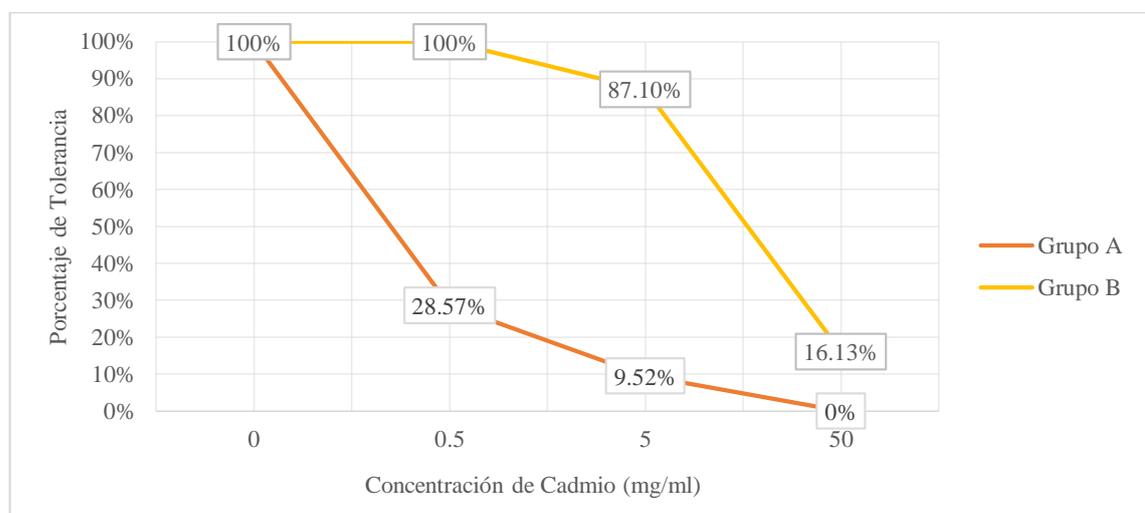
Los resultados obtenidos demostraron que los clones analizados en el presente estudio poseían una menor tolerancia a altas concentraciones de cobre contrario a los datos reportados por Moraga et al. (2003) donde la tolerancia máxima de los microorganismos a medios suplementados con cobre en forma de sulfato de cobre se encontraba en concentraciones entre 1.600 y 3.200 mg/ml, demostrando una menor capacidad adaptativa por los clones analizados en comparación con otros obtenidos de agua.

El alto porcentaje de clones capaces de tolerar medios suplementados con bajas concentraciones de cobre según lo explicado por Cervantes (2000) es normal debido a que dicho elemento es considerado un micronutriente esencial para algunas funciones celulares, sin embargo, su alta

concentración genera toxicidad celular causando en algunos casos la muerte del microorganismo, como se presume fue el caso de algunos clones durante la presente investigación, aunque los clones pertenecientes al Grupo A y B adaptados a mayores concentraciones de cobre se cree pudieron desarrollar mecanismos de expulsión de cobre o de transporte y almacenamiento intracelular mediante proteínas, con el fin de adaptarse a altas dosis de dicho metal.

#### 4.4.4.4 Cadmio

Las pruebas de crecimiento en medios suplementados con cadmio demostraron una mayor inhibición en el desarrollo de los clones del Grupo A, los cuales presentaron una disminución en su crecimiento desde bajas concentraciones del tóxico hasta alcanzar la mortalidad absoluta en una concentración de 50mg/ml de cadmio, mientras que los clones del Grupo B presentaron leves alteraciones en su desarrollo hasta concentraciones de cadmio de 5mg/ml, disminuyendo posteriormente su crecimiento de manera drástica hasta alcanzar un 16.13% de clones capaces de desarrollarse en una concentración de 50mg/ml de cadmio, como se visualiza en la Figura 4-23, tales resultados demostraron que las condiciones de selección de los clones del Grupo B permitieron aislar bacterias con una mejor adaptación a medios suplementados con cadmio.



**Figura 4-23** Resistencia a diferentes concentraciones de cadmio

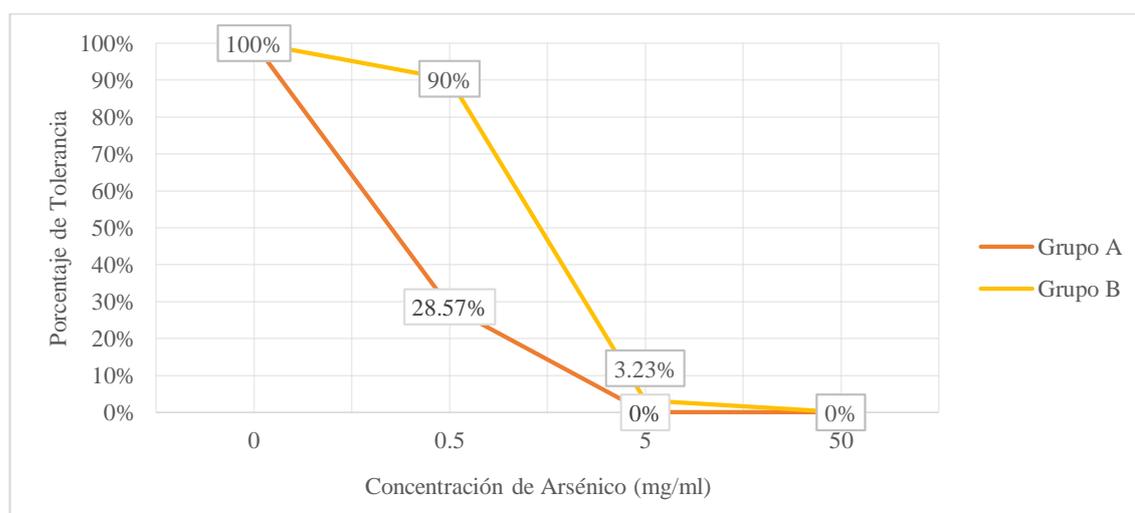
Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Los resultados obtenidos demostraron una tolerancia a cadmio similar a la reportada por Moraga et al. (2003), quienes encontraron una tolerancia máxima de los microorganismos a medios suplementados con cadmio en concentraciones entre 50 y 100 mg/ml, demostrando que los clones analizados en el presente estudio poseen una capacidad adaptativa similar a otros clones obtenidos de una fuente de agua.

El alto porcentaje de clones capaces de tolerar medios suplementados con diferentes concentraciones de cadmio según lo explicado por Cervantes (2010) podría deberse a que el cadmio es un metal tóxico que no interviene de forma directa en ninguna función biológica del microorganismo, sin embargo, su afinidad a grupos sulfhidrilos genera la inactivación de ciertas enzimas, así como, la desnaturalización de algunas proteínas, generando dificultades en el desarrollo de los microorganismos como se presenta en la presente investigación, aunque se presume que los clones pertenecientes al Grupo B adaptados a mayores concentraciones del metal pudieron desarrollar mecanismos de expulsión o de almacenamiento intracelular de cadmio que permitieron una mayor adaptación de dichos microorganismos a altas dosis de cadmio.

#### 4.4.4.5 Arsénico

Las pruebas de crecimiento en medios suplementados con arsénico demostraron una menor adaptación en los clones del Grupo A, presentando una gran disminución en su crecimiento desde bajas concentraciones del tóxico hasta alcanzar la mortalidad absoluta de sus clones en una concentración de 5mg/ml de arsénico, mientras que los clones del Grupo B presentaron una mayor disminución en su crecimiento en concentraciones entre 0,5 y 5 mg/ml del tóxico, posterior a lo cual sólo un 3.23% de clones se había desarrollado, alcanzando la mortalidad absoluta en una concentración de 50mg/ml de arsénico, como se visualiza en la Figura 4-24, tales resultados demostraron que las condiciones de selección de los clones del Grupo B permitieron aislar bacterias con una mejor adaptación a medios suplementados con arsénico.



**Figura 4-24** Resistencia a diferentes concentraciones de arsénico

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

Los resultados obtenidos demostraron que los clones analizados en el presente estudio presentaron una menor tolerancia a arsénico que los microorganismos analizados por Moraga et al. (2003) los cuales se desarrollaron en medios suplementados con concentraciones de arsénico mayores a 3 g/ml.

El bajo porcentaje de clones capaces de tolerar medios suplementados con altas concentraciones de arsénico según lo explicado por Castillo (2005, pp. 239, 240) podría deberse a que el arsénico al reaccionar con los grupos sulfhidrilo presentes en las proteínas provoca su desnaturalización dificultando las funciones celulares, sin embargo, se presume que los clones pertenecientes al Grupo B tolerantes a mayores concentraciones de arsénico pudieron desarrollar mecanismos de óxido-reducción o formación de compuestos de detoxificación como metilarsénico con el fin de adaptarse mejor a mayores concentraciones de dicho metal.

Los clones analizados durante el ensayo de resistencia a metales pesados presentaron un mayor nivel de adaptación a medios suplementados con altas concentraciones de plomo y cadmio, considerando el potencial tratamiento de dichos compuestos por los clones más adaptados, mientras que los metales mercurio, arsénico y cobre presentaron un mayor nivel de inhibición celular, considerándose compuestos tóxicos para las bacterias analizadas.

Cabe resaltar que la resistencia bacteriana a metales pesados según Martínez et al. (2010) constituye un fenómeno de selección natural en el ambiente que permite conocer la capacidad biológica de sobrevivencia de un microorganismo, durante el presente estudio se demostró que las bacterias obtenidas luego de un periodo de refrigeración presentaron una mayor tolerancia a todos los metales tóxicos examinados, desarrollando un nuevo mecanismo de selección capaz de obtener bacterias con mayor adaptación.

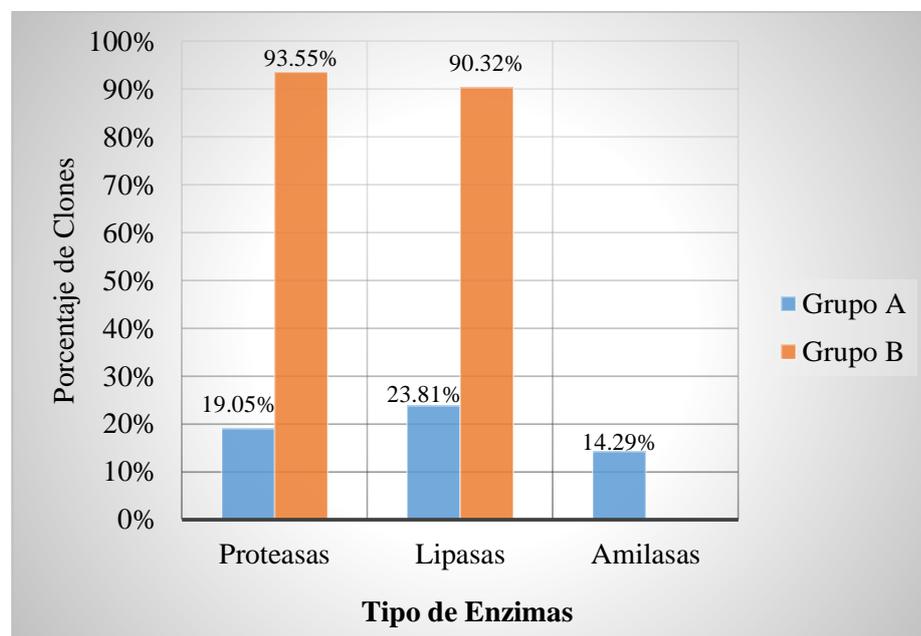
Algunas de las bacterias aisladas podrían haber presentado, además de los mecanismos de adaptación descritos para cada metal una resistencia a través de otros sistemas de tolerancia como los descritos por Sueiro (2012, pp. 12-15) que se basan en limitar el acceso del metal a la célula por una barrera de permeabilidad o bombas de eflujo, transformándolos en moléculas menos tóxicas, alterando componentes celulares para disminuir su sensibilidad o mediante el secuestro intra o extracelular.

#### **4.4.5 Producción de enzimas**

El análisis de la actividad enzimática de los clones, fue realizado con la finalidad de identificar microorganismos capaces de degradar compuestos orgánicos existentes en aguas residuales de la

industria de lácteos, específicamente proteínas, lípidos y azúcares complejos, los resultados obtenidos demostraron que en el Grupo B existe más del 90% de clones capaces de producir proteasas y lipasas en el medio, mientras que en el Grupo A un porcentaje menor al 24% es capaz de producir las mismas enzimas y un 14.29% es capaz de producir amilasas, como se muestra en la Figura 4-25.

Los resultados obtenidos demuestran que los clones seleccionados en el Grupo B son más idóneos para degradar proteínas y lípidos en los residuos lácteos que los clones pertenecientes al Grupo A, los cuales presentaron una mayor capacidad de degradar azúcares complejos permitiendo su aprovechamiento en la degradación de glucógeno y almidón.



**Figura 4-25** Producción de diferentes tipos de enzimas

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

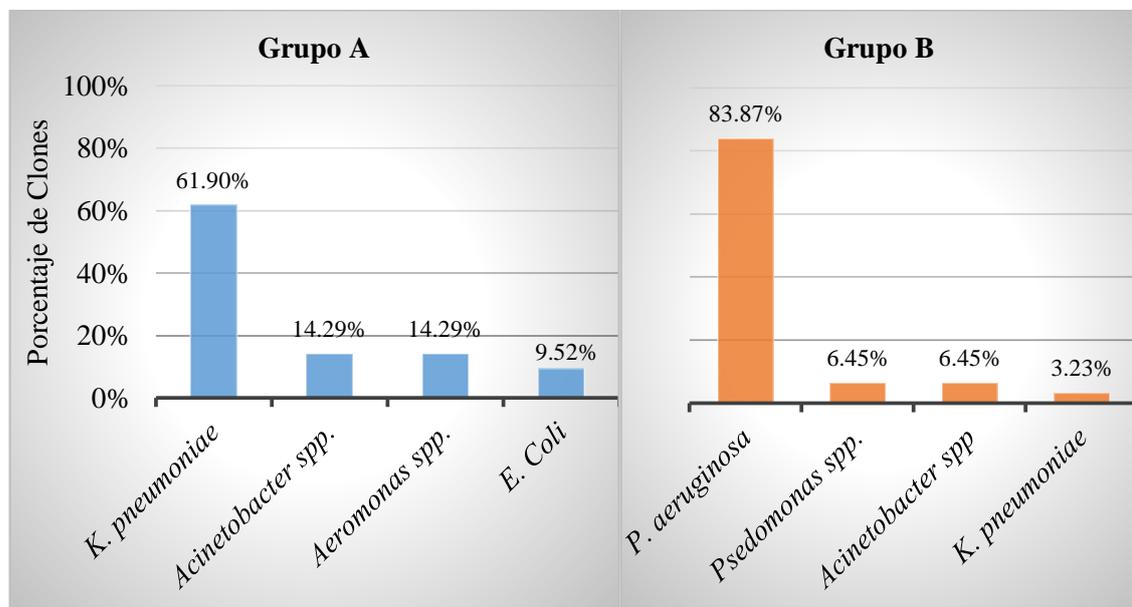
El porcentaje de bacterias productoras de proteasas obtenido en el Grupo B fue similar al reportado por Guerrero et al. (2003) y Román et al. (2003) al trabajar con leche cruda refrigerada donde un 80% de las bacterias presentaba actividad proteolítica, mientras que la cantidad de bacterias productoras de lipasas fue mayor en la presente investigación con respecto al 23% de bacterias lipolíticas reportado en las anteriores investigaciones.

La expresión enzimática presentada por los clones del Grupo A y B según Bachmann (1979, p. 143) podría ser resultado de la codificación genética del ADN microbiológico que determina los patrones metabólicos de las bacterias y permite adaptar a los microorganismos a las condiciones nutritivas del medio.

#### 4.4.6 Identificación bacteriana

La identificación de los géneros microbianos desarrollada a través de pruebas bioquímicas obtuvo como resultado bacterias de los géneros *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Enterobacter* en el Grupo A y los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Klebsiella* en el Grupo B, destacando entre los géneros mencionados *Klebsiella* y *Pseudomonas* en el Grupo A y B respectivamente con porcentajes superiores al 50 por ciento, como muestra la Figura 4-26.

Los resultados obtenidos demuestran que los métodos de selección realizados durante la investigación permitieron aislar diferentes tipos de bacterias, demostrando la gran variedad microbiológica presente en las aguas residuales de la industria láctea.



**Figura 4-26** Identificación bacteriana de los clones aislados

Fuente: CAMACHO, Christian, 2015

La presencia de los géneros reportados en la presente investigación es usual considerando que son géneros microbianos habituales en productos lácteos y agua residual, por ejemplo, los géneros *Klebsiella* y *Escherichia* son parte del grupo coliformes totales comúnmente analizados en la calidad del agua, mientras que *Pseudomonas* es un género muy estudiado por sus características psicrófilas y su influencia en las características de la leche y sus derivados, fundamentos que permiten validar los datos obtenidos. (Henry & Heinke, 1999, pp. 273,274) (Guerrero, et al., 2003, pp. 187, 188)

## CONCLUSIONES

- En la presente investigación se aislaron 68 clones a partir de muestras de agua residual de la industria láctea, de los cuales se lograron reaislar y estabilizar 52 clones adaptados al medio mínimo de producción de polihidroxicanoatos.
- El análisis de polihidroxicanoatos realizado mediante tinción con Sudán Black e Infrarrojo por transformada de Fourier permitió conocer que los clones seleccionados no producían el biopolímero, incluso utilizando diferentes sustratos o bajo diferentes condiciones de estrés.
- La caracterización bacteriana demostró que los clones seleccionados en el grupo A son capaces de producir exopolímeros, mientras que los clones presentes en el Grupo B demostraron una mejor adaptación a medios suplementados con cloruro de sodio y ajustados a pH ácido.
- Las pruebas de tolerancia a metales pesados demostraron que los clones analizados presentaban una mayor adaptación a medios suplementados con plomo y cadmio, mientras que en medios suplementados con mercurio, cobre y arsénico se observó mayor inhibición en su crecimiento, lo cual permite identificar los diferentes ambientes tóxicos que podrían ser aptos para su desarrollo.
- El análisis de producción de enzimas demostró la presencia de proteasas y lipasas en un mayor porcentaje de los clones del Grupo B, demostrando su potencial utilización en la degradación de proteínas y lípidos, mientras que los clones presentes en el Grupo A presentaron mayor capacidad de producir amilasas, permitiendo su potencial utilización durante la degradación de almidón y glucógeno.
- Las pruebas de identificación bioquímica mostraron un mayor porcentaje de clones pertenecientes a los géneros *Pseudomonas spp.* y *Klebsiella spp.*, sin embargo, también se encontró la presencia en menor porcentaje de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Enterobacter*.
- El esquema de aislamiento y selección de los microorganismos, utilizado en la presente investigación permite afirmar que sometiendo las muestras a un periodo de refrigeración,

se indujo un proceso de enriquecimiento de microorganismos capaces de resistir condiciones extremas, entre ellas, metales pesados, salinidad y pH ácido.

## RECOMENDACIONES

- El estudio de polihidroxialcanoatos como alternativa a plásticos derivados de hidrocarburos es reciente en el Ecuador y un campo de estudio no explorado ni explotado a nivel local, recomendando su análisis, con el fin de mejorar su investigación y proyectar su aplicación.
- Para el proceso de identificación de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos se sugiere la utilización de oxazinas básicas como Azul Nilo A y Rojo Nilo para análisis In vivo por fluorescencia, pues según referencias bibliográficas demuestra mayor especificidad al compuesto descartando problemas de incertidumbre y mejorando el tiempo de análisis.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **INSTITUTO TECNOLÓGICO DEL PLÁSTICO (AIMPLAS).** *Biopolímeros: Procesabilidad y Casos de Estudio.* Valencia – España. 2011. [En línea] Disponible en: [http://www.academia.edu/6210384/Biodegradaci%C3%B3n\\_por\\_microorganismos\\_PO\\_L%C3%8DMEROS\\_BIODEGRADABLES](http://www.academia.edu/6210384/Biodegradaci%C3%B3n_por_microorganismos_PO_L%C3%8DMEROS_BIODEGRADABLES) [Consulta: 28 de diciembre de 2015].
2. **ALARCÓN, Luis, & OLIVAS, Evangelina.** *Manual de practicas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición.* 1<sup>ra</sup> ed. Juarez - México. UACJ, 2001. pp. 17, 18.
3. **ANDERSON, Alistair, & DAWES, Edwin.** Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews.* Yorkshire-Inglaterra (1990). [En línea]. 54(4), pp. 450-472. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372789/> [Consulta: 20 de noviembre de 2015].
4. **ARROYAVE, Ana, CARDONA, Mariana, & AGUDELO, Lina.** Identificación de cepas nativas con potencial para obtención de polihidroxicanoatos – (PHAs) en lodos activados. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* Antioquia-Colombia (2013) [En línea]. 11 (2). pp. 69-76. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11nspe/v11nespa08.pdf> [Consulta: 25 de septiembre de 2015].
5. **BABEL, Wolfgang, & STEINBÜCHEL, Alexander.** *Biopolyesters.* Nueva York - Estados Unidos de América. Springer, 2001. pp. 52-55
6. **BACHMANN, Konrad.** *Biología para médicos: conceptos básicos para las facultades de medicina, farmacia y biología.* 1<sup>ra</sup> ed. Barcelona - España: Reverte. 1979. p. 143
7. **BELGACEM, Mohamed Naceur, & GANDINI, Alessandro.** *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources.* 1<sup>ra</sup> ed. Oxford – Inglaterra. Elsevier. 2011. pp. 452, 453
8. **BENGTSSON, Simon, WERKER, Alan, & WELANDER, Thomas.** Production of polyhydroxyalkanoates by glycogen accumulating organisms treating a paper mill

wastewater. *Water Science & Technology*. Lund - Suecia (2008) [En línea]. 58(2). pp. 323-330. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18701781>  
[Consulta: 28 de septiembre de 2015].

9. **BERLANGA, Mercedes, MONTERO, María Teresa, et al.** Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate producing bacteria from microbial mats. *International Microbiology*. Barcelona - España (2006) [En línea] 9 (2). pp. 95-102. Disponible en: <http://www.im.microbios.org/0902/0902095.pdf>.  
[Consulta: 2 de octubre de 2015].
10. **BERNÁLDEZ, Virginia.** *Polímeros biodegradables ¿realidad o ficción?* Valladolid – España 2007. [En línea]. Disponible en: <http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/virginia/index.html>  
[Consulta: 2 de enero de 2016].
11. **BLANCO, Marina.** *Detección de gránulos de polihidroxialcanoatos en la cepa USBA 355 Tistlia consotensis.* (Tesis de pregrado) Pontificia Universidad Javeriana. Bogota - Colombia. 2010 p. 23
12. **BOSCO, Francesca, & CHIAMPO, Fulvia.** Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge Production of bioplastics using dairy residues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Torino - Italia (2010) 109(4), pp. 418–421. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226388>  
[Consulta: 13 de octubre de 2015].
13. **BRAUNEGG, Gerhart, LEFEBVRE, Gilles, & GENSER, Klaus.** Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. Graz – Austria. (1998). [En línea], 65(2-3), pp. 127 - 161. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9828458>  
[Consulta: 26 de Octubre de 2015].
14. **CÁMARA DE INDUSTRIAS DE GUAYAQUIL.** *Importaciones de materias primas plásticas.* Guayaquil- Ecuador. 2012. [En línea] Disponible en: [http://www.industrias.ec/archivos/file/INFORMACION%20PARA%20AFILIADOS/Import\\_m\\_primas\\_plast\\_corregida03\\_100212.pdf](http://www.industrias.ec/archivos/file/INFORMACION%20PARA%20AFILIADOS/Import_m_primas_plast_corregida03_100212.pdf) [Consulta: 22 de septiembre de 2015].

15. **CARDONA, Ana, MORA, Amanda, & MARÍN Mauricio.** Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxicanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. Medellín-Colombia. 2013. [En línea] 66 (2), pp. 7129 - 7140. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1799/179930031013.pdf> [Consulta: 26 de Octubre de 2015].
16. **CASTILLO, Francisco.** *Biotecnología ambiental* 1ra ed. Madrid – España. Editorial Tebar. 2005. pp. 221, 240
17. **CELIS, Mauricio, & JUÁREZ, Daniel.** *Microbiología de la leche*. Buenos Aires-Argentina: Universidad Tecnológica Nacional, 2009 [En línea] Disponible en: [http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem\\_fi\\_qui\\_micrb\\_09/microbiologia\\_leche.pdf](http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_micrb_09/microbiologia_leche.pdf) [Consulta: 12 de enero de 2016].
18. **CERVANTES, Carlos.** Mecanismos de expulsión de metales tóxicos en bacterias. *BEB. Boletín de educación bioquímica*. Michoacán – México. 2000. [En línea]. 19 (1), pp. 24-31. Disponible en: <http://www.smb.org.mx/smb-anterior/text/beb/beb001912431.pdf> [Consulta: 26 de Enero de 2016].
19. **CHAKRAVARTY, Partha, MHAISALKAR, Vasant, & CHAKRABARTY, Tapan.** Study on poly-hydroxyalkanoate (PHA) production in pilot scale continuous mode wastewater treatment system. *Bioresource Technology*. Hyderabad – India. 2010. [En línea]. 101(8), pp. 2896-2899. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045314> [Consulta: 26 de Noviembre de 2015].
20. **CHEN, Guo-Qiang.** *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. Münster – Alemania. Springer. 2010. pp. 122-129
21. **DELGADILLO, Oscar, CAMACHO, Alan, et al.** *Depuración de aguas residuales por medio de humedales artificiales*. 2ª ed. Cochabamba – Bolivia. Universidad Mayor de San Simó. 2010. pp. 61-66.
22. **DES ABBAYES, Henry.** *Botánica: vegetales inferiores*. 2ª ed. Barcelona – España. Reverté S.A. 1989. pp. 9, 10.

23. **ELLNER, Richard, & SCHULZ, Rodrigo.** *Preguntas y respuestas sobre la microbiología de la leche y los productos lácteos*. 1ra ed. Madrid, España. Ediciones Díaz de Santos. 2000. pp. 37-40.
24. **ESCUELA DE ORGANIZACIÓN INDUSTRIAL DE SEVILLA.** *Los vertidos del Sector Lácteo*. Sevilla – España. 2008. [En línea]. Disponible en: [http://api.eoi.es/api\\_v1\\_dev.php/fedora/asset/eoi:48159/componente48157.pdf](http://api.eoi.es/api_v1_dev.php/fedora/asset/eoi:48159/componente48157.pdf) [Consulta: 20 de septiembre de 2015].
25. **ESPINAL, Georgina.** *Manual de prácticas de microbiología I*. Santo Domingo-República Dominicana. INTEC. 2005. pp. 14-20.
26. **Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.** *Informativo Curricular 2012: Ingeniería en Biotecnología Ambiental*. Riobamba – Ecuador. 2013. [En línea]. Disponible en: [http://www.esPOCH.edu.ec/Descargas/Pensum/ING\\_BIOTEC\\_AMBIENTAL\\_d17d6.pdf](http://www.esPOCH.edu.ec/Descargas/Pensum/ING_BIOTEC_AMBIENTAL_d17d6.pdf) [Consulta: 22 de septiembre de 2015].
27. **FORBES, Betty.** *Diagnostico Microbiologico*. 12ª ed. Madrid – España. Editorial Médica Panamericana. 2009. pp. 216, 246.
28. **GAMAZO, Carlos, LÓPEZ-GOÑI, Ignacio, & DÍAZ, Ramón.** *Manual práctico de microbiología*. 3ª ed. Barcelona – España. Masson. 2005. p. 1.
29. **GARCÍA, Antonia.** *Estudio estadístico para precedir el tiempo de maduración del queso manchego, e identificación de la microbiota*. (Tesis doctoral) Universidad de Castilla- La Mancha. Cuenca – España. 1998. p. 145.
30. **GARCÍA, Mariano, QUINTERO, Rodolfo, & LÓPEZ, Agustín.** *Biotecnología alimentaria*. 2ª ed. México D.F., México: Limusa, 1993. pp. 423-424
31. **GONZÁLEZ, Yolanda, MESA, Juan, et al.** Síntesis y degradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de Origen Microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*. Guadalajara - México. 2013. [En línea] 29(1), pp. 77-115. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v29n1/v29n1a7.pdf> [Consulta: 4 de octubre de 2015].

32. **GUERRERO, Lourdes, ROMÁN, Sol, & PACHECO, Lidis.** Proteólisis de la leche cruda almacenada en frío. Efecto de las enzimas proteolíticas sobre la integridad de las caseínas. *Revista Científica-Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*. Trujillo- Venezuela (2003) [En línea]. 13(3), pp. 187-192. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16636/1/proteolisis.pdf>  
[Consulta: 17 de febrero de 2016].
33. **HENRY, Glynn, & HEINKE, Gary.** *Ingeniería ambiental*. 2ª ed. México D.F. - México. Pearson Educación. 1999. pp. 273, 274.
34. **HERNÁNDEZ, Alicia.** *Microbiología Industrial*. 2ª ed. San José - Costa Rica. EUNED. 2003. pp. 16-67.
35. **HONG, Keum-Shik, SUN, Shu Qiang, et al.** A rapid method for detecting bacterial polyhydroxyalkanoates in intact cells by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Beijing - China (1999) [En línea] 51(4), pp. 523-526. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs002530051427>  
[Consulta: 29 de septiembre de 2015].
36. **INSTITUTO DE ACADEMIAS DE ANDALUCÍA.** *Contaminación en la Industria Láctea*. Andalucía – España. 1995. [En línea] Disponible en: <http://www.insacan.org/racvao/anales/1995/articulos/08-1995-02.pdf>  
[Consulta: 27 de septiembre de 2015].
37. **INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS.** *Datos estadísticos agropecuarios*. Quito- Ecuador. INEC. 2011 [En línea]. Disponible en: [http://www.inec.gob.ec/espac\\_publicaciones/espac-2011/INFORME\\_EJECUTIVO%202011.pdf](http://www.inec.gob.ec/espac_publicaciones/espac-2011/INFORME_EJECUTIVO%202011.pdf)  
[Consulta: 30 de septiembre de 2015].
38. **JOVER, Alejandro, & GARCÍA, María José.** *Manual de Auxiliar de Farmacia Temario General Modulo II. Farmacia Practica*. Sevilla – España. MAD. 2004. pp. 242-243.
39. **KHANNA, Shilpi, & ASHOK, Srivastava.** Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*. New Delhi - India (2005) [En línea]. 40(2), pp. 607- 619. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959204000949>

[Consulta: 3 de noviembre de 2015].

40. **KHARDENAVIS, Anshuman, KUMAR, Suresh, et al.** Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly b-hydroxybutyrate. *Bioresource Technology*. Nagpur - India 2007 [En línea]. 98(18), pp. 3579–3584. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17207999>  
[Consulta: 19 de noviembre de 2015].
41. **LEE, Sang Yup.** Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. Taejon - Korea (1996). [En línea] 49(1), pp. 1 – 14 Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18623547> . [Consulta: 25 de noviembre de 2015].
42. **LEE, Sang Yup, & CHANG, Ho Nam.** Production of Poly(hydroxyalkanoic acid). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Taejon – Korea. (1996) [En línea] 52, pp. 27 - 58. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7484359>  
[Consulta: 11 de diciembre de 2015].
43. **OÑATE, Leonor.** *Biología I con enfoque por competencias* México D.F. – México. Cengage Learning Editores. 2010. pp. 212, 213.
44. **MALAJOVICH, Maria Antonia.** *BioTecnología: Enseñanza y divulgación*. Brasilia – Brasil. 2015 [En línea] Disponible en: [http://www.bteduc.bio.br/guias\\_es/79\\_Preparacion\\_del\\_medio\\_de\\_agar-leche.pdf](http://www.bteduc.bio.br/guias_es/79_Preparacion_del_medio_de_agar-leche.pdf)  
[Consulta: 20 de diciembre de 2015].
45. **MALAJOVICH, Maria Antonia..** *Guías de actividades Biotecnología: enseñanza y divulgación*. Brasilia – Brasil. 2015 [En línea] Disponible en: [http://www.bteduc.bio.br/guias\\_es/78\\_Preparacion\\_del\\_medio\\_de\\_agar-almidon.pdf](http://www.bteduc.bio.br/guias_es/78_Preparacion_del_medio_de_agar-almidon.pdf)  
[Consulta: 18 de diciembre de 2015].
46. **MARTÍNEZ, Armando., CRUZ, Mario, et al.** Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*. La Habana – Cuba. 2010. [En línea] 41, pp. 1-10. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509038.pdf> [Consulta: 11 de febrero de 2016].

47. **MARTÍNEZ, Carlos, & GARCÍA, Alavaro.** *Perímetros de protección para captaciones de agua subterránea destinada al consumo humano: metodología y aplicación al territorio.* 10ª ed. Madrid – España. IGME. 2003. pp. 264.
48. **MINISTERIO DEL AMBIENTE ECUADOR.** *Acuerdo 019 Políticas Generales para la Gestión Integral de Plásticos en el Ecuador.* Quito - Ecuador: Ministerio del Ambiente. 2014 [En línea]. Disponible en: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/04/AM-019-PLA%CC%81STICOS.pdf> [Consulta: 28 de septiembre de 2015].
49. **MORAGA, Rubén, MERINO, Carlos, & MONDACA, María Angélica.** Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Investigaciones Marinas.* Iquique - Chile (2003) [En línea] 31(1), pp. 91-95. Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/imar/v31n1/art10.pdf> [Consulta: 15 de febrero de 2016].
50. **MORCILLO, Gloria, CORTÉS, Estrella, & GARCÍAS, José Luis.** *Biotecnología y alimentación.* 1ª ed. Madrid – España. Editorial UNED. 2013. pp. 39, 40
51. **MOTAMEDI, Hossein, ARDAKANI, Mohammad Roayae, & MAYELI, Nasim.** Isolation and screening of native polyhydroxyalkanoate producing bacteria from oil contaminated soils of Abadan refinery. *Biological Journal of Microorganism.* Abadan - Irán (2015) [En línea]. 3(12). pp. 93-104. Disponible en: [http://uijs.ui.ac.ir/bjm/browse.php?a\\_code=A-10-310-3&slc\\_lang=en&sid=1](http://uijs.ui.ac.ir/bjm/browse.php?a_code=A-10-310-3&slc_lang=en&sid=1) [Consulta: 18 de noviembre de 2015].
52. **NAHEED, Nighat, & JAMIL, Nazia.** Optimization of biodegradable plastic production on sugar cane molasses in Enterobacter sp. SEL2. *Brazilian Journal of Microbiology.* Lahore - Pakistán (2015) [En línea] 45(2), pp. 417-426. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166265/> [Consulta: 17 de diciembre de 2015].
53. **NEGRONI, Marta.** *Microbiología Estomatológica.* 2ª ed. Buenos Aires – Argentina. Médica Panamericana. 2009. pp. 557, 558.
54. **NEMEROW, Nelson, & DASGUPTA, Avijit.** *Tratamiento de vertidos industriales y peligrosos.* 1ª ed. Madrid – España. Ediciones Díaz de Santos. 1998 pp. 448, 449

55. **ORTIZ, María.** *El impacto de los plásticos en el ambiente.* México D.F. - México. 2013. [En línea]. Disponible en: <http://www.jornada.unam.mx/2013/05/27/eco-f.html> [Consulta: 27 de octubre de 2015]
56. **PIÑERO, Judith.** Importancia biotecnológica de la biodiversidad. Los nuevos cazadores de microbios . *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.* Carabobo - Venezuela (2013) [En línea] 4(2), pp. 284-317. Disponible en: <http://150.185.136.71:82/repo/ArchivoDocumento/rvcta/v4n2/art10.pdf> [Consulta: 02 de octubre de 2015].
57. **Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA-DEAT).** *Anuario Pnuma: Temas Emergentes en Nuestro Medio Ambiente Global 2011.* 1ª ed. Nairobi – Kenia. UNEP/Earthprint. 2011. pp. 21-26
58. **PRIETO, José, DE LA ROSA, Manuel, & NAVARRO, José María.** *Microbiología en ciencias de la salud : conceptos y aplicaciones.* 3ª ed. Barcelona – España. Elsevier España. 2001. pp. 15, 16
59. **QUILLAGUAMÁN, Jorge, GUZMÁN, Hector, et al.** Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology.* Cochabamba - Bolivia. (2009) [En línea]. 85(6), pp. 1687-1696. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-009-2397-6> [Consulta: 27 de enero de 2016].
60. **RAMÍREZ, Ninfa, SERRANO, José, & SANDOVAL, Horacio.** Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* México D.F. - México (2006) [En línea] 37(3), pp. 56-71. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf> [Consulta: 21 de enero de 2016].
61. **RANDRIAMAHEFA, Solo, RENARD, Estel, et al.** Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Screening and Quantifying Production of PHAs by Pseudomonas Grown on Sodium Octanoate. *Biomacromolecules.* Thiais - Francia (2003) [En línea]. 4(4), pp. 1092-1097. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857097> [Consulta: 21 de octubre de 2015].
62. **RAPRA TECHNOLOGY.** *Handbook of Biodegradable Polymers.* Shrewsbury – Inglaterra. Rapra Technology Limited. 2005. pp. 232-240

63. **REDDY, C., GHAI, Rashmi., et al.** Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. Delhi - India (2003) [En línea] 82(2), pp. 137–146. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852402002122> [Consulta: 25 de octubre de 2015].
64. **RIVERO, Zulbey, FARÍA, José, & SANTORO, Rosa.** Aislamiento de Gram Negativas en leches crudas con antibióticos. *Revista científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*. Maracaibo - Venezuela (1994) [En línea]. 4(1), pp. 11-16. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/26868/1/articulo2.pdf> [Consulta: 05 de marzo de 2016].
65. **ROMÁN, Sol, GUERRERO, Lourdes, & PACHECO, Lidis.** Evaluación de la calidad físico-química, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío. *Revista Científica - Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*. Maracaibo - Venezuela (2003) [En línea]. 13(2), pp. 146-152. Disponible en: [http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16646/1/evaluacion\\_fisicoquimica.pdf](http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/16646/1/evaluacion_fisicoquimica.pdf) [Consulta: 25 de octubre de 2015].
66. **SAMROT, Antony, REDDY, Avinesh R., et al.** Accumulation of Poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Enterobacter cloacae* SU-1 During Growth with Two Different Carbon Sources in Batch Culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Chennai - India (2011) [En línea]. 163(1), pp. 195-203. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12010-010-9028-7> [Consulta: 25 de noviembre de 2015].
67. **SÁNCHEZ, Manuel.** *Población y ambiente: Serie sociedad y recursos naturales*. México D.F - México. UNAM. 2005. pp. 162-182
68. **SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO.** *Plan Nacional de Desarrollo / Plan Nacional para el Buen Vivir 2013-2017*. Quito - Ecuador: Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo – Senplades. 2013 [En línea]. Disponible en: <http://documentos.senplades.gob.ec/Plan%20Nacional%20Buen%20Vivir%202013-2017.pdf> [Consulta: 27 de septiembre de 2015].
69. **SHAMALA, Tumkur., CHANDRASHEKAR, Arun, et al.** Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain

- reaction (PCR). *Journal of Applied Microbiology*. Karnataka - India (2003) [En línea] 94(3), pp. 369–374. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588544> [Consulta: 12 de noviembre de 2015].
70. **SLONCZEWSKI, Joan, FUJISAWA, Makoto, et al.** Cytoplasmic pH Measurement and Homeostasis in Bacteria and Archaea. *Advances in Microbial Physiology*. Ohio - Estados Unidos de América. (2009) [En línea] 55, pp. 1-79. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19573695> [Consulta: 03 de febrero de 2016].
71. **STANIER, Roger., INGRAHAM, Jhon., et al.** *Microbiología*. 2ª ed. Barcelona – España. Reverte. 1996. pp. 177, 178.
72. **STEINBÜCHEL, Alexander.** Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. *Macromolecular Bioscience*. Münster-Alemania (2001) [En línea] 1(1), pp. 1 - 24. Disponible en: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1616-5195\(200101\)1:1%3C1::AID-MAB11%3E3.0.CO;2-B/epdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1616-5195(200101)1:1%3C1::AID-MAB11%3E3.0.CO;2-B/epdf) [Consulta: 07 de noviembre de 2015]
73. **SUDESH, Kumar, ABE, H., & DOI, Yoshiharu.** Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyester. *Progress in Polymer Science*. Saitama - Japón (2000) [En línea] 25(10), pp. 1503–1555. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670000000356> [Consulta: 03 de noviembre de 2015].
74. **SUEIRO, Fabiana.** *Caracterización de la resistencia a metales pesados y búsqueda de integrones en cepas de Deiftia sp.* (Tesis de pregrado). Universidad de la República. Facultad de Ciencias. Montevideo - Uruguay. 2012. pp. 12-15
75. **TEEGARDEN, David.** *Polymer chemistry: introduction to an indispensable science*. 1ª ed. Virginia - Estados Unidos de América. National Science Teachers Association Press. 2004. pp. 5-13
76. **TORTORA, Gerard, FUNKE, Berdell, & CASE, Christine.** *Introducción a la microbiología*. 9ª ed. Madrid – España. Editorial Médica Panamericana. 2007. pp. 292-297

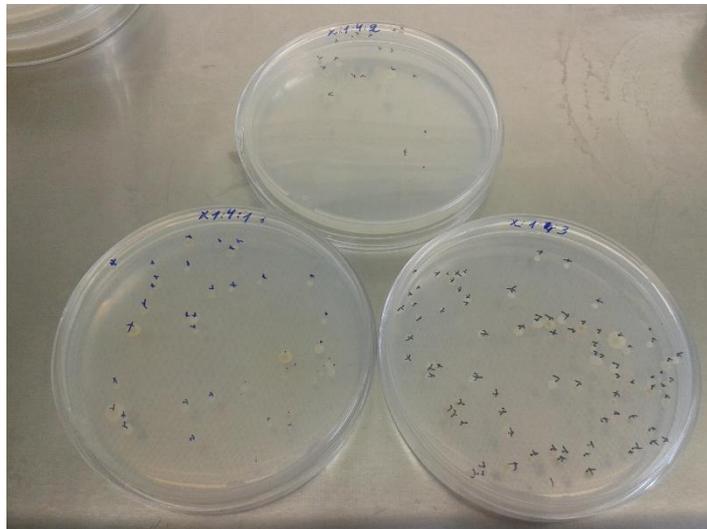
77. **UNITED NATIONS.** *Convention on Biological Diversity*. Rio de Janeiro - Brasil: CBD-UN. 1992. p. 3
78. **UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA.** *Lecitinasa*. Caracas – Venezuela. Universidad Central de Venezuela, 2009 [En línea]. Disponible en: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/lecitinasa.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/lecitinasa.pdf) [Consulta: 11 de enero de 2016].
79. **UR-REHMAN, Shafiq., JAMIL, Nazia., & HUSSNAIN, Shahida.** Characterization and Optimization of Antibiotic Resistant Bacterial strains for Polyhydroxyalkanoates (PHA) production. *Pakistan journal of agricultural research*. Lahore - Pakistan (2006) [En línea] 19(4), pp. 81-86. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670000000356> [Consulta: 28 de diciembre de 2015].
80. **VALENCIA, Adriana.** *Diseño de un sistema de tratamiento para las aguas residuales de la cabecera parroquial de San Luis-Chimborazo*. (Tesis de pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba - Ecuador. 2013. p. 92
81. **VALENCIA, Elizabeth., & RAMÍREZ, María.** La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos*. Puebla - México (2009) [En línea] 16(73) pp. 27-31 Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/294/29411996004.pdf> [Consulta: 13 de octubre de 2015].

## ANEXOS

### ANEXO A Obtención de los clones de experimentación

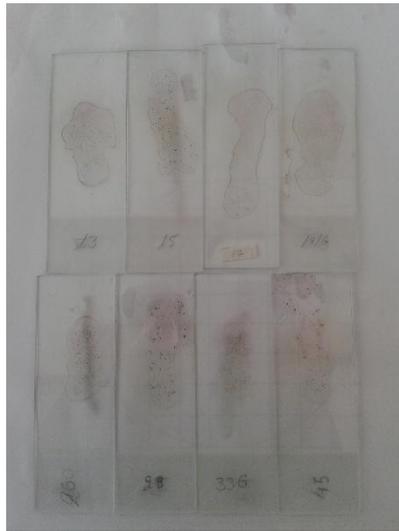


**Fotografía 1.** Recolección de las muestras en la Empresa Lácteos Santillán



**Fotografía 2** Conteo de Microorganismos presentes en las muestras

ANEXO B Pruebas de producción de polihidroxialcanoatos



**Fotografía 3** Tinción de bacterias utilizando el colorante Sudan Black



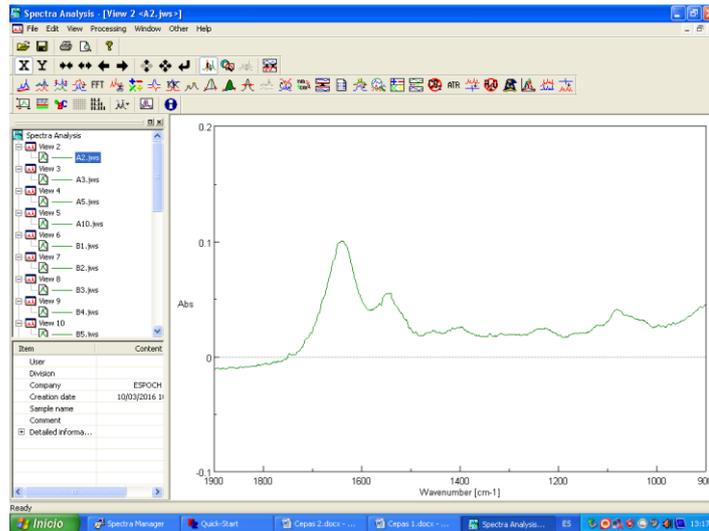
**Fotografía 4** Observación en el microscopio de bacterias teñidas con Sudan Black



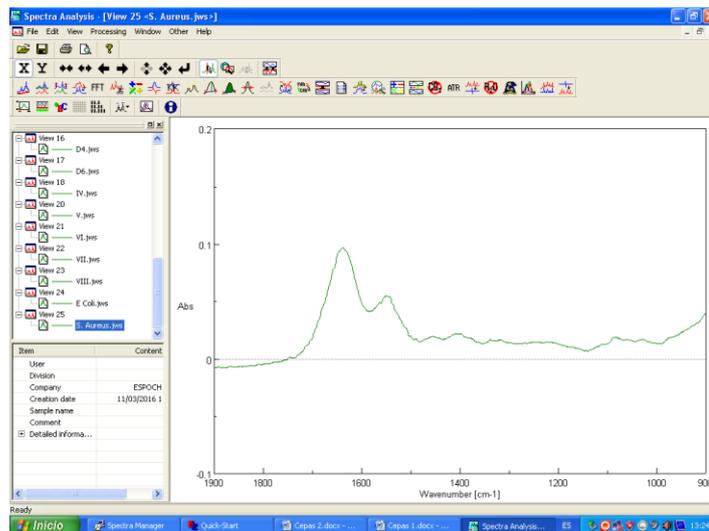
**Fotografía 5** Bacterias teñidas con Sudan Black y Safranina en lente 100X



**Fotografía 6** Prueba de producción de PHA utilizando Infrarrojo por Transformada de Fourier



**Fotografía 7** Espectro de Infrarrojo por Transformada de Fourier de las bacterias analizadas



**Fotografía 8** Espectro de Infrarrojo por Transformada de Fourier del control negativo