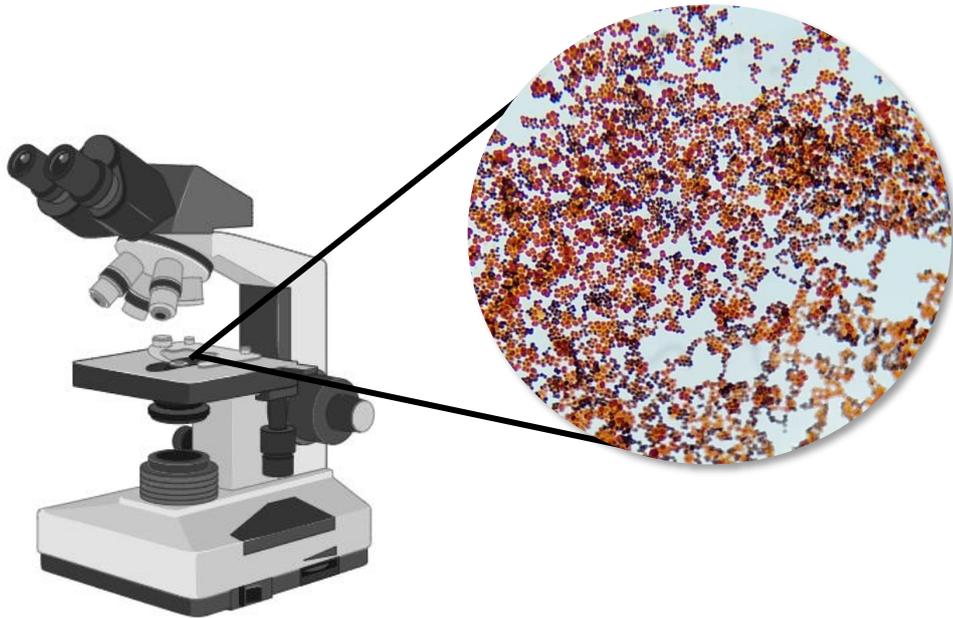


BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE POLI-HIDROXIALCANOATOS



Autora:

María Martínez Maqueda

Directores:

José Joaquín Moreno Casco

Macarena del Mar Jurado Rodríguez

Universidad de Almería
Departamento de Biología y Geología
Área de Microbiología

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biotecnología
Curso: 2019/2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a todos los profesores que me han acompañado durante estos cuatro años de carrera, por todo su trabajo, dedicación y esfuerzo. En concreto quiero agradecer a todo el personal del departamento de Microbiología su acogida, durante la realización del presente trabajo, ya que ha sido durante seis meses mi segunda casa.

Por supuesto quiero hacer una mención especial a mi tutor y cotutora del trabajo final de grado. A Joaquín ante todo por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su departamento, por toda su dedicación y paciencia con nosotros, por su capacidad para transmitirnos todos sus conocimientos y por hacer que tengamos inquietudes y sobre todo que luchemos por aquello que queremos. Además, siempre está dispuesto a hablar y ayudarte en lo que necesites, sea en el ámbito académico o en algo más personal. Sin duda ha sido un profesor determinante en hacerme ver lo increíble que es la microbiología y lo mucho que me gusta. Por supuesto dar las gracias a mi cotutora Macarena, que ha estado conmigo mano a mano en el laboratorio. Por todas las horas trabajadas, las alegrías cada vez que nos salía un experimento, las risas, las videollamadas en tiempo de cuarentena, que servían tanto para avanzar como para tomar un respiro y coger más fuerza para seguir, por hacerme ver la luz en mis momentos de agobio y bloqueo mental donde pensaba que no iba a poder seguir y sobre todo por ser tan cercana conmigo y confiar en mí; has hecho que me guste aún más estar en un laboratorio. No me puedo olvidar de Juan (con su infinito positivismo y felicidad) y de Paqui (por tener siempre todo bajo control), que, junto con Macarena, me han acompañado durante estos años, que nunca han dudado en ayudar si en cualquier momento lo necesitabas y me han enseñado continuamente desde que entramos por primera vez a un laboratorio. Muchísimas gracias a todos, porque habéis sido profesores que me habéis marcado de por vida.

No me puedo olvidar de los compañeros con los que he tenido la oportunidad de trabajar en el laboratorio, porque en todo momento hemos estado para ayudarnos. Por supuesto, tengo que mencionar a Ana y Celia, con las que he trabajado codo con codo, hemos llorado de la risa, nos hemos tenido las unas a las otras y en las situaciones de más agobio nos hemos apoyado sin dudar. Ninguna se iba del laboratorio hasta que todas hubiésemos terminado, y si había que hacer medios de cultivo, tinciones, verter en placa, recoger muestras de aire, envolver eppendorfs con papel de aluminio o fregar, se hacía.

Por último, tengo que dar las gracias a mis padres y familia, que siempre han confiado en mí, en ocasiones, más que yo misma. Me han apoyado en todas mis decisiones y me han hecho sacar fuerzas de donde parecía no haberlas para no darme por vencida en los momentos más difíciles de la carrera, además de alegrarse por cada logro que he ido consiguiendo. Finalmente, gracias a mis amigos, tanto de la carrera como de fuera, queriendo destacar a Laura, quien ha sido un redescubrimiento tras

habernos reencontrado después de 6 años sin vernos estudiando algo que a las dos nos apasiona; hemos vivido el día a día juntas y hemos estado la una para la otra.

En general, agradecer a todas las personas que de alguna manera u otra han formado parte de mi vida durante estos maravillosos cuatro años de carrera. Ojalá poder volver a mi segunda casa lo antes posible.

Muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Problemática ambiental debida a la generación masiva de residuos plásticos	3
1.2. Alternativas al uso de plásticos: biomateriales y materiales biodegradables	7
1.3. Microorganismos productores de Polihidroxialcanoatos (PHAs).....	10
1.4. Objetivos	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1. Diseño experimental	16
2.2. Medios de cultivo generales	16
2.3. Colección de cepas del género <i>Pseudomonas</i>	18
2.4. Caracterización de bacterias productoras de PHAs	20
2.4.1. Identificación de cepas productoras de PHAs.....	21
2.4.2. Observación de gránulos de PHAs.....	22
2.5. Ensayo <i>in vitro</i> de generación de bioplásticos	24
2.6. Análisis estadístico	25
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1. Cribado de cepas potencialmente productoras de PHAs.....	25
3.2 Visualización de gránulos de PHA	30
3.3. Producción de bioplásticos a partir de cepas de <i>Pseudomonas</i>	36
4. CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

Los productos plásticos y sus derivados, supone un problema ambiental y de salud pública, debido a que acaban encontrándose en la cadena trófica, de gran relevancia en la actualidad. Su capacidad de propagación y su dificultad para retirarlos de los ambientes ha propiciado la necesidad de buscar nuevos materiales que los reemplacen, para mejorar procesos industriales de un modo sostenible, ambiental y económico. Las bacterias del género *Pseudomonas* conforman un grupo potencial para la producción de estos nuevos materiales, al tener la capacidad de acumular en su interior polihidroxicanoatos.

En este trabajo se partió de 61 cepas bacterianas obtenidas de un proceso de compostaje de restos vegetales. Cada una de ellas fue sometida a distintas pruebas con el fin de comprobar su capacidad para producir y acumular gránulos de PHA. Tras un primer cribado bajo el transiluminador de luz UV, aquellas cepas que originaron resultados favorables fueron sometidas a nuevas pruebas que permitieran una caracterización más eficiente de las mismas, centradas en observar tanto microscópicamente como macroscópicamente los gránulos procedentes del interior de las células.

El 53% de las cepas evaluadas en el ensayo del transiluminador fueron positivas para acumular PHAs en su citoplasma y de estas cepas alrededor de un 48% mostraron bajo el microscopio gránulos. Las especies de las bacterias más prometedoras correspondieron con: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas formosensis*, *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas bauzanensis*. Este trabajo sitúa el compostaje como un ambiente idóneo para el aislamiento de microorganismos con interés industrial, siendo a su vez éste una materia prima excelente para la producción de biopolímeros por parte de tales microorganismos.

Palabras clave: Polihidroxicanoatos, PHAs, *Pseudomonas*, Bioplásticos, Compostaje, Residuos lignocelulósicos.

ABSTRACT

Plastic products and by-products pose an environmental and public health problem, since they end up in the food chain, of great relevance today. Its ability to spread and its difficulty in removing them from the environment has led to the need to find new materials to replace, to improve industrial processes in a sustainable, environmental and economic way. Bacteria of the *Pseudomonas* genus form a potential group for the production of these new materials, since they have the ability to accumulate polyhydroxyalkanoates within them.

This work began with 61 bacterial strains obtained from a composting process of plant remains. Each one of them underwent different tests in order to verify their ability to produce and accumulate PHA granules. After a first screening under the UV light transilluminator, those strains that gave favourable results were subjected to different trials, focused on both microscopic and macroscopic observation of the granules within the cells.

A 53% of the strains evaluated in the transilluminator assay were positive to accumulate PHAs in their cytoplasm and of these strains around 48% showed granules under the microscope. The most promising species of bacteria corresponded to: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas balearica*, *Pseudomonas formosensis*, *Pseudomonas mendocina* and *Pseudomonas bauzanensis*. This work located composting as an ideal environment for the isolation of microorganisms with industrial interest, being in turn an excellent raw material for the production of biopolymers by these microorganisms.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, PHAs, *Pseudomonas*, Bioplastics, Composting, Lignocellulosic wastes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática ambiental debida a la generación masiva de residuos plásticos

Los plásticos han cambiado la vida cotidiana de las sociedades actuales. Su uso se está incrementando cada vez más, ya que es evidente que aportan muchos beneficios para la tecnología y la ciencia, así como para la vida diaria de la actual sociedad de consumo. De hecho, en casi todos los aspectos de la vida cotidiana el uso de plásticos está normalizado, para el transporte, ropa, calzado y para el embalaje de numerosos productos como comida, bebida y otros bienes. Esto se debe a que el plástico es un material económico, ligero, robusto, duradero, resistente a la corrosión y con propiedades de aislamiento térmico, entre otras muchas interesantes características (Thompson *et al.*, 2009).

No obstante, la producción masiva de este tipo de materiales conlleva a su vez una potencial generación de residuos de enorme magnitud, capaces de impactar negativamente sobre los ecosistemas. De hecho, como otros contaminantes, los plásticos se han convertido en residuos ubicuos comprometiendo de esta manera los sistemas ecológicos (Shen *et al.*, 2019). Con los avances tecnológicos y el incremento mundial de la población, se han buscado aplicaciones alternativas de éstos, en diferentes ámbitos de trabajo, que permitan su reutilización. Sin embargo, estos plásticos convencionales no son biodegradables, lo cual dificulta su gestión, y es una de las razones por las que se han ido acumulando de manera creciente en el medio ambiente, suponiendo un grave problema para el planeta (Tokiwa *et al.*, 2009).

Los monómeros más utilizados para fabricar plásticos derivan de los hidrocarburos fósiles y en lugar de descomponerse se acumulan en el ambiente (Geyer *et al.*, 2017). Predominan los siguientes tipos de materiales plásticos: polietileno (PE), poliéster (PES), polietilentereftalato (PET), polieterimida (PEI), poliestireno (PS), polipropileno (PP), polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno de alta densidad (HDPE), cloruro de polivinilo (PVC), cloruro de polivinilideno (PVDC), policarbonato (PC), poliestireno de alto impacto (HIPS), poliamidas (PA o nylon), acrilonitrilo butadieno estireno (ABS), poliuretanos (PU), urea formaldehído (UF), melamina formaldehído (MF), polimetilmetacrilato (PMMA), politetrafluoroetileno (PTFE) y ácido poliláctico (PLA), entre muchos otros. De todos estos, los producidos en el mundo de manera mayoritaria son aquellos que se definen como termoplásticos, entre los que se encuentran: PP, LDPE, PVC y HDEP (Wang *et al.*, 2020).

Sólo en Europa, en el año 2018, la producción de plásticos alcanzó casi 62 millones de toneladas, cifra que asciende a 360 millones de toneladas a nivel mundial (PlasticsEurope, 2019). Teniendo en cuenta todos estos datos, se espera que la producción mundial supere los mil millones de toneladas en 2050 (FAO, 2019). Los datos de producción de plásticos primarios muestran una tendencia temporal sólida a lo largo de toda su historia como se muestra en la Figura 1, de manera que, si esta curva continúa, la población mundial habría producido 26000 millones de toneladas de resinas, 6000 millones de toneladas de fibras plásticas y 2000 millones de toneladas de aditivos para finales de 2050. A pesar de que parte de estos plásticos se reciclarán, se prevé que 12000 millones de toneladas serán desechadas en vertederos o en el entorno natural (Geyer *et al.*, 2017).

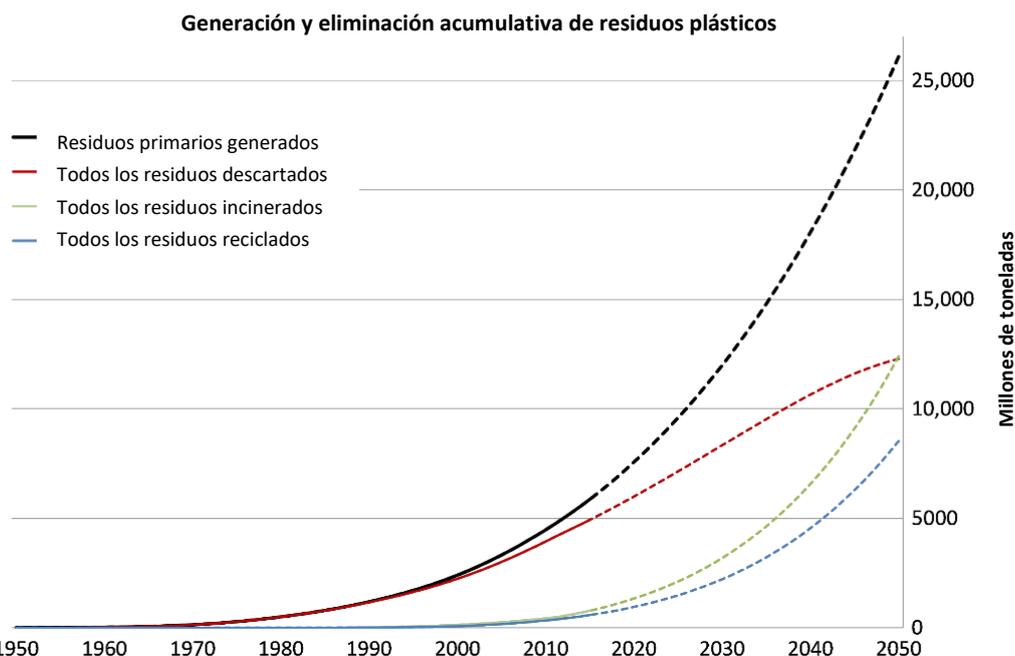


Figura 1. Generación y eliminación acumulativa de residuos plásticos (en millones de toneladas métricas). Las líneas continuas muestran los datos históricos desde 1950 a 2015 y las líneas discontinuas muestran proyecciones de tendencias hasta 2050 (modificado de Geyer *et al.*, 2017).

Una de las mayores problemáticas de los residuos plásticos es que se distribuyen globalmente en el medio marino debido a las características de estos materiales, pues flotan y persisten mucho tiempo en el entorno (Eriksen *et al.*, 2014). No sólo por esta razón se han convertido en una gran preocupación, sino también porque comprometen la salud humana y la de otros animales (Lebreton *et al.*, 2017).

Los residuos plásticos se encuentran en las costas, el hielo del Ártico, en la superficie y en el fondo del mar. La continua erosión de estos desechos hace que se fragmenten en diminutas partículas que pueden ser ingeridas por pequeños invertebrados marinos. Su discreto tamaño contribuye a dificultar la posibilidad de conocer su procedencia exacta, así como a conseguir una adecuada eliminación, por lo que se piensa que una de las mejores estrategias para mitigar este problema es, directamente, reducir los insumos para que no se conviertan en residuos incontrolados. Se entiende por residuos mal administrados (o incontrolados) aquellos materiales que se eliminan o vierten inadecuadamente, que no se gestionan oficialmente y acaban en vertederos abiertos no controlados, donde no quedan contenidos de forma segura. De esta manera, estos residuos mal gestionados, pueden entrar al océano por vías navegables, corrientes de aguas residuales y transporte por viento o mareas (Jambeck *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente, los plásticos son materiales construidos a base de polímeros con diferentes propiedades, los cuales se mezclan con aditivos para mejorar su rendimiento en función de las propiedades del producto final. Por tanto, dentro de éstos, los microplásticos son pequeñas partículas y fibras de dichos plásticos. Las pequeñas partículas son el resultado de la liberación directa al medio ambiente, ya como microplásticos o nanoplásticos derivados de productos

de cuidado personal, pellets de reproducción y cosméticos; mientras que las fibras microscópicas son consecuencia del desgaste o fragmentación gradual de residuos más grandes (Barboza *et al.*, 2020). Asimismo, los microplásticos se pueden encuadrar en dos categorías generales (FAO, 2019):

- Microplásticos primarios, se fabrican de un cierto tamaño, como granulados, polvos y abrasivos domésticos e industriales.
- Microplásticos secundarios, se originan a partir de la degradación de materiales más grandes.

Aunque no se ha determinado el tamaño máximo para considerar a una de estas partículas como “micro”, se suelen estimar así aquellas cuyo diámetro es menor de cinco milímetros. Se pueden clasificar estas partículas respecto a sus características morfológicas de tamaño, forma y color. De hecho, los impactos negativos sobre los organismos acuáticos se deben a sus características físicas y químicas, además, éstas últimas se ven agravadas por la presencia de aditivos incorporados durante la fabricación de los plásticos (Barboza *et al.*, 2020). En cualquier caso, una de las características más importantes para el estudio de los microplásticos es el tamaño, ya que éste nos indica en qué medida los organismos se pueden ver afectados (Figura 2).

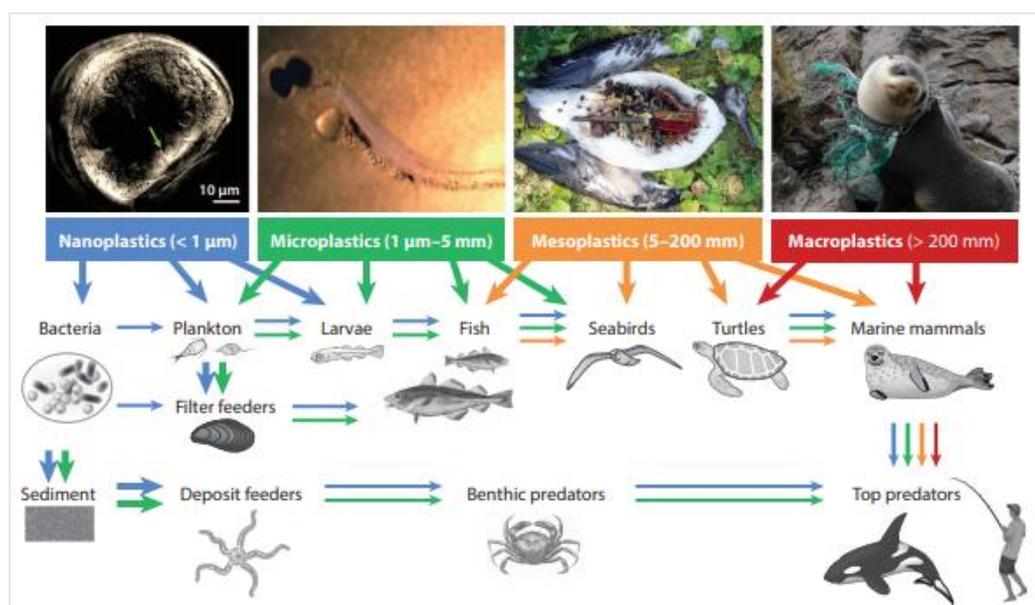


Figura 2. Posible transferencia trófica de contaminación plástica en redes alimentarias marinas. Se ha demostrado que los residuos plásticos de diferente tamaño afectan a las especies directamente por ingestión o enredo (flechas gruesas) o indirectamente a través de la absorción junto a fuentes de alimentos (flechas finas).

La fauna de diferentes tamaños y posiciones tróficas estará expuesta, a su vez, a partículas de diferentes tamaños (de menor a mayor tamaño, de azul a rojo, respectivamente) (Worm *et al.*, 2017).

Debido a su pequeño tamaño, los microplásticos son ingeridos por muchos organismos marinos. Como se mencionó en la leyenda de la imagen anterior (Figura 2), esta ingestión puede ser directa o indirecta (si es mediante la cadena trófica) y se ha encontrado en muchas especies destinadas

al consumo humano, incluidos invertebrados, crustáceos y peces. Estas micropartículas se concentran en el tracto digestivo, por lo que los bivalvos y pequeños peces que son consumidos enteros presentan una mayor probabilidad de exponer los microplásticos a la dieta humana. Como ejemplo de esto, en la Figura 3 se muestra el movimiento del plástico desde que entra en contacto con los moluscos bivalvos hasta que llega a ser consumido (Smith *et al.*, 2018).

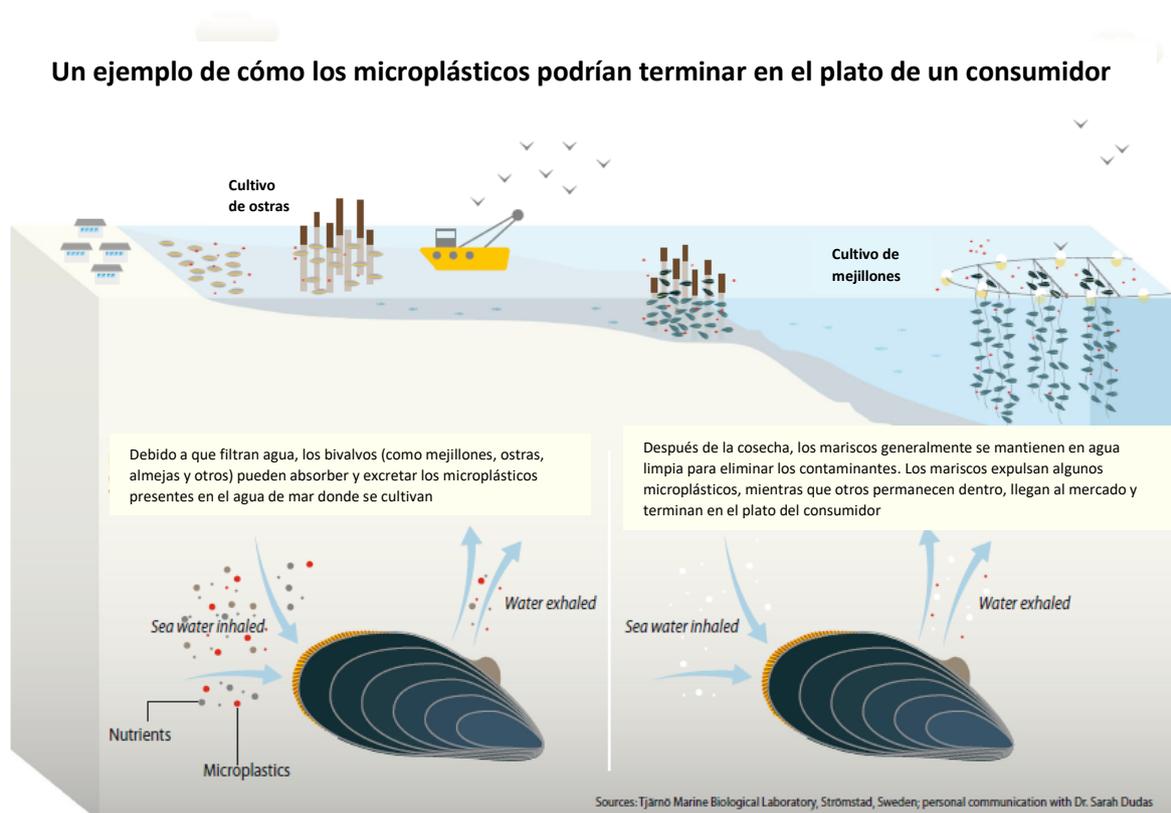


Figura 3. Ciclo de vida de los microplásticos, desde su vertido en el mar hasta su contacto con el consumidor (modificado de Smith *et al.*, 2018).

La cantidad de residuos plásticos generados ha sufrido un incremento considerable en la última década, lo cual presenta amenazas identificadas para la salud. Por ejemplo, experimentos con bisfenol A (BPA), un compuesto orgánico muy presente en materiales plásticos, mostraron que su presencia causa, o al menos contribuye potencialmente, al cáncer en muchas especies, incluyendo en los humanos (Erren *et al.*, 2009).

Los microplásticos causan efectos tóxicos *per se*, y la presencia de aditivos, como anteriormente se ha mencionado, conduce a una mayor acumulación de estas sustancias en las redes alimentarias. Entre los efectos adversos que se han encontrado destacan: disminución del rendimiento depredador, trastornos endocrinos, estrés hepático, alteraciones intestinales y estrés oxidativo, entre otros. Uno de los problemas asociados a estos materiales es su capacidad de absorber e interactuar con otros contaminantes en el ambiente (Barboza *et al.*, 2018).

Teniendo todo esto en cuenta, la necesidad de buscar alternativas al uso de estos materiales plásticos, que sean respetuosas con el medio ambiente y que no comprometan la vida de los animales y de las personas, parece completamente justificada.

1.2. Alternativas al uso de plásticos: biomateriales y materiales biodegradables

La problemática actual asociada con la acumulación de materiales plásticos derivados del petróleo en el medio ambiente y el rápido agotamiento de los recursos naturales que se utilizan para llevar a cabo su producción, hacen que se propicie la investigación de fuentes y herramientas alternativas a estos polímeros. Por todo esto, los plásticos biodegradables y/o los bioplásticos (Tabla 1) son la mejor solución a todos los inconvenientes que presentan los plásticos convencionales (Muhammadi *et al.*, 2015).

Tabla 1. Categorización de los tipos de biopolímeros (Álvarez da Silva, 2016).

Categoría	Ejemplos	Obtención	Biodegradabilidad
POLÍMEROS BIO-QUIMIOSINTÉTICOS	Poli(ácido láctico) (PLA)	Síntesis del monómero biológica y polimerización química	Degradación hidrolítica Excepciones: ·PLA cristalino ·Politioésteres
	Poli(succinato de butileno) (PBS)		
	Alcohol polivinílico (PVA)		
	Poli(ácido glicólico)		
	Politioésteres		
POLÍMEROS BIOSINTÉTICOS	Polihidroxialcanoatos (PHAs)	Biosíntesis del polímero por microorganismos	Degradación enzimática y/o hidrolítica
POLÍMEROS NATURALES MODIFICADOS	Polímeros a base de almidón	Modificación química del polímero natural	Degradación enzimática Excepciones: ·Derivados de celulosa
	Derivados de celulosa		
	Proteínas		

Estos materiales son biodegradables, provienen de biomasa y tienen una durabilidad menor que los plásticos tradicionales. Los poliésteres termoplásticos de base biológica (como por ejemplo el ácido poliláctico (PLA), el succinato de polibutileno (PBS) y los polihidroxialcanoatos (PHAs) entre otros, que se obtienen a partir de la fermentación de algunas materias primas, son materiales biodegradables y están disponibles actualmente en escalas comerciales (Hwang *et al.*, 2020).

Por ejemplo, el PLA está disponible en el mercado a un precio similar al de los plásticos convencionales y se ha promovido su utilización para aplicaciones relacionadas con envases de un solo uso, aprovechando su corto ciclo de vida por su naturaleza compostable. La creciente preferencia por “carbono renovable” en vez del fósil, proviene de la propia comprensión de la necesidad de reducir el consumo de recursos no renovables y las emisiones de gases de efecto invernadero (Nagarajan *et al.*, 2016).

El PBS, por su parte, posee propiedades mecánicas muy similares a las del propileno en cuanto a resistencia y flexibilidad, además, su uso es alentador ya que tiene una baja temperatura de procesamiento, no es peligroso y es fácil de procesar (Shamsuri y Jamil, 2020). Asimismo, el PBS puede procesarse utilizando técnicas convencionales como extrusión por fusión, fundición, moldeo por compresión e inyección y prensado en caliente. Debido a su flexibilidad, la aplicación comercial se limita al envasado, la agricultura y la biomedicina (Lule *et al.*, 2020).

En cuanto al alcohol polivinílico (PVA), es un polímero cristalino, biodegradable, biocompatible, soluble en agua y, lo más importante, no tóxico. Presenta interesantes propiedades tanto físicas como químicas y puede formar películas debido a la abundancia de grupos hidroxilo que lo conforman. El PVA es prometedor en virtud de sus potenciales aplicaciones en la administración de fármacos y envasados, así como por su fácil obtención y su bajo coste de producción (Choo *et al.*, 2016).

Entre los polímeros naturales modificados, el almidón es una prometedora alternativa por su amplia disponibilidad, bajo coste y funcionalidad, además puede ser procesado utilizando la tecnología desarrollada para los polímeros sintéticos. Cierto es que el almidón no es un material termoplástico, pero su procesamiento a elevadas temperaturas, altos esfuerzos de corte y en presencia de plastificantes, da lugar a almidón termoplástico (López *et al.*, 2018). La celulosa es uno de los polímeros naturales más abundante y se puede obtener de diferentes fuentes: tejidos vegetales, algas, microorganismos y como parte del caparazón de algunos animales marinos. Posee una estructura semicristalina variable dependiendo de la fuente de la que se aisló; además, una de las ventajas que se le atribuyen es que posee una alta resistencia térmica, pudiendo soportar un amplio rango de temperaturas. Todo esto ha permitido su aplicación en la industria farmacéutica, alimenticia o textil, adquiriendo en los últimos años, los polímeros derivados de la celulosa, un importante papel debido a su elevado potencial para ser biodegradados (Gañán *et al.*, 2017).

La diversidad de los plásticos biodegradables reside en la variación de las rutas de biodegradación. La característica que éstos presentan para poder ser degradados por microorganismos permite una gestión alternativa al final de su vida útil, como el compostaje a escala industrial (y doméstica) o la digestión anaerobia, facilitando el desarrollo de la economía circular. Aunque los bioplásticos siguen siendo un nicho con sólo el 1% de la producción total de plástico, se prevé un despliegue más amplio, esperándose que el mercado mundial de plásticos biodegradables alcance los 6,73 mil millones de dólares para 2025, siendo los principales impulsores India, Brasil y China, debido a la demanda en las economías emergentes de estos países (Narancic *et al.*, 2020). El aumento del uso de bioplásticos en todos los sectores de mercado se ve impulsado por la demanda de

productos sostenibles, debido a la creciente concienciación de reducir el impacto ambiental y la dependencia de los recursos no renovables. Gracias a todos los avances realizados, hoy día existe una alternativa real para los plásticos convencionales (Figura 4) (European Bioplastics, 2020).

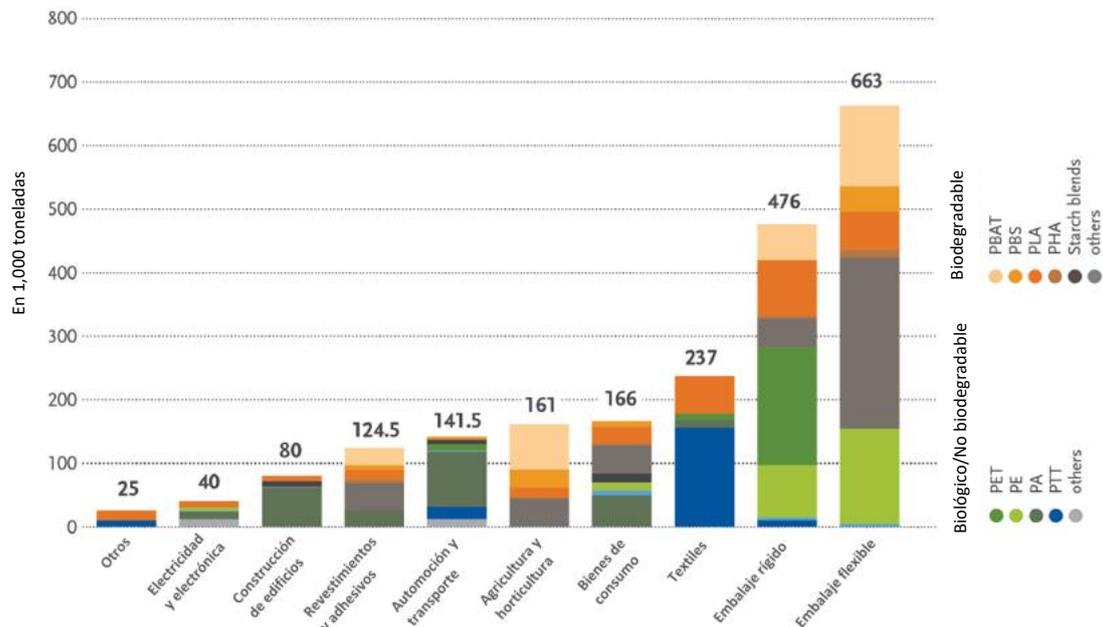


Figura 4. Capacidades de producción global de bioplásticos 2019 (por segmento de mercado) (modificado de European Bioplastics, 2020).

La economía circular ha ido ganando importancia como una extensión de la sostenibilidad al abordar la implementación ambiental y proporcionar aplicaciones comerciales útiles. En este sentido, la producción de bioplásticos (y/o plásticos biodegradables) ha sido reconocida como una innovación de “productos verdes” (entendiendo como productos verdes aquellos productos que son ecológicos, no contaminantes y reciclables) (Nguyen *et al.*, 2020); además, estos “biomateriales” están pensados para reducir el impacto ambiental y controlar la forma en la que se fabrican dichos productos (Rex y Baumann, 2007) como uno de los factores claves de la sostenibilidad, fomentando el desarrollo de productos ecológicos y mejorando así la imagen de las empresas que los suministran. Definitivamente, los bioplásticos se plantean como una innovación ecológica debido a sus características, ya mencionadas, y por ser una potente alternativa de los plásticos fósiles (Confente *et al.*, 2020).

En resumen, la utilización de alternativas plásticas es una realidad creciente en nuestra sociedad que poco a poco se está desarrollando y que pretende desbancar el uso de los plásticos convencionales para así lograr una mejor gestión de los recursos no renovables que pase, esencialmente, por no explotarlos en exceso. Relacionado con todo lo mencionado, para el desarrollo de dichas alternativas, se pone el foco en la biotecnología blanca, que permite un reemplazo de las tecnologías contaminantes por otras más sostenibles basadas en el uso de microorganismos y los productos obtenidos en base a éstos.

1.3. Microorganismos productores de Polihidroxicanoatos (PHAs)

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son polímeros termoplásticos biosintetizados naturalmente, que tienen un origen microbiano. Estos polímeros son sintetizados en condiciones de estrés de nutrientes, normalmente en presencia de un nutriente limitante (generalmente suele ser nitrógeno) y una fuente abundante de carbono. Los microorganismos utilizan los PHAs como reservas de energía y carbono para poder superar condiciones desfavorables, como pueden ser cambios de temperatura, presencia de peróxido de hidrógeno, irradiación ultravioleta, elevada presión osmótica o deficiencia de nutrientes entre otros (Subin y Bhat, 2014; Kalia, 2019). Son fuertes candidatos para el reemplazo de los polímeros derivados del petróleo, ya que pueden ser sintetizados por microorganismos a partir de sustratos de bajo valor y fuentes renovables, y presentan características similares al polipropileno o el polietileno. Además, pueden ser degradados en condiciones aerobias, hasta dióxido de carbono y agua, o en condiciones anaerobias hasta metano (Lemos y Mina, 2015).

Estos PHAs han llamado la atención debido a propiedades como: biocompatibilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad, citotoxicidad y carcinogénesis, en comparación con el plástico sintético (Kalia, 2019). Se trata de compuestos similares a lípidos que sintetizan muchos microorganismos como una forma de almacenamiento de energía. Cuando se sintetizan, los polihidroxicanoatos se acumulan en el citoplasma de las células bacterianas en forma de gránulos, que tienen un tamaño promedio de aproximadamente 0,2-0,5 μm , como se observa en la Figura 5 (Kunasundari y Sudesh, 2011).

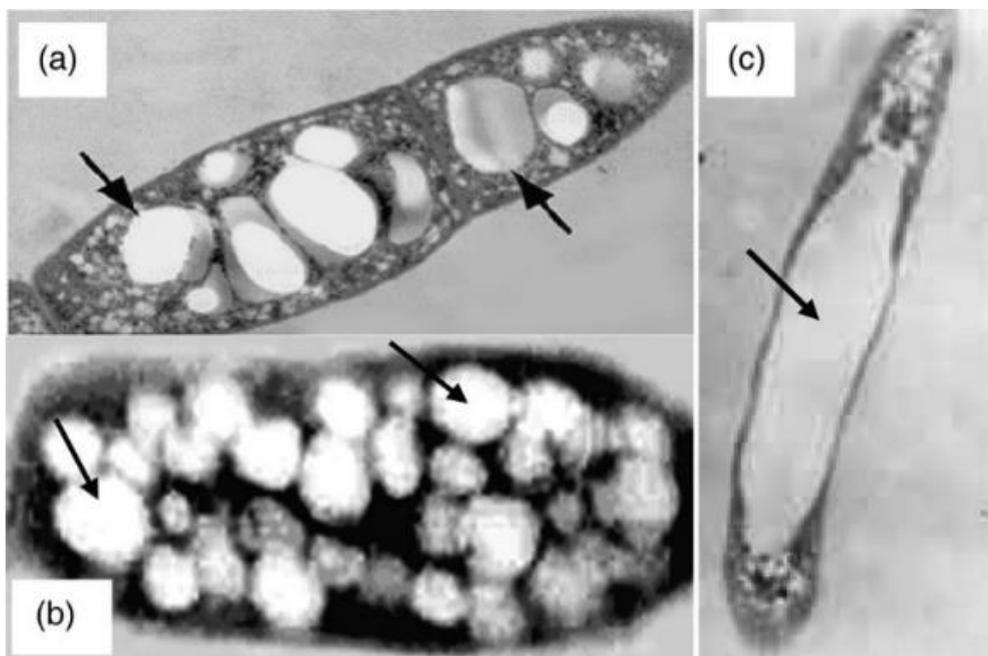


Figura 5. Visión de células bacterianas con gránulos de PHA intracelular a través de micrografía electrónica de transmisión. Las imágenes (a) y (b) se corresponden con células de las cepas bacterianas *Bacillus* sp. y *R. eutropha*, respectivamente, y la imagen (c) muestra una célula de *R. eutropha* mutante que contiene un solo gránulo de PHA grande (Muhammadi *et al.*, 2015).

En cuanto a la estructura de los gránulos, se acumulan como polímeros, líquidos, móviles y amorfos, que se instalan en el citoplasma microbiano cubiertos por una monocapa de fosfolípidos que contiene enzimas polimerasas y despolimerasas (Figura 6). Los estudios sobre el proceso de acumulación indican que el número de gránulos por célula se establece durante las primeras fases del proceso de acumulación y la producción acaba cuando su contenido alcanza alrededor del 80% del peso celular en base seca (González-García *et al.*, 2013).

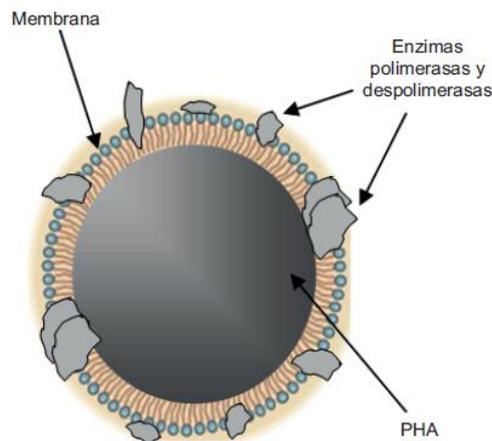


Figura 6. Esquema de la estructura del gránulo de PHA acumulado (González-García *et al.*, 2013).

La formación de gránulos de PHA depende de la presencia de vías metabólicas adecuadas. Después, para recuperar los gránulos es necesario romper la célula y eliminar una capa proteica que recubre a los mismos; de manera alternativa, los gránulos tienen que disolverse selectivamente en un disolvente adecuado. La Figura 7 muestra una ruta simplificada para la biosíntesis de poli 3-hidroxibutirato (P3HB) que es el tipo más común de PHA (Kunasundari y Sudesh, 2011).

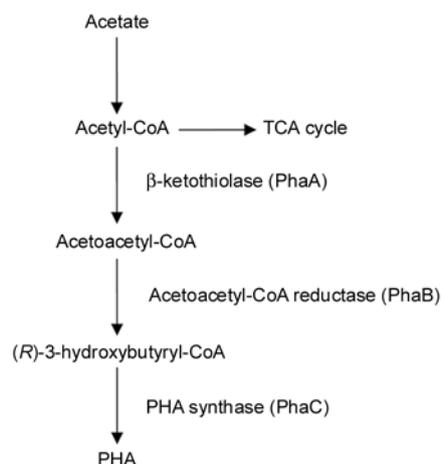


Figura 7. Vía metabólica más estudiada para la biosíntesis de polihidroxicanoatos (PHA) (Kunasundari y Sudesh, 2011).

Los PHAs se clasifican en tres tipos: de cadena corta, de cadena media o de cadena larga, según el número de átomos de carbono que tengan en las cadenas laterales. Los de cadena corta están compuestos por menos de 5 átomos de carbono, los de cadena media entre 5-14 átomos y los de cadena larga por más de 15 átomos, aunque estos últimos son menos comunes, por lo que han sido menos estudiados (Raza *et al.*, 2018). La estructura molecular general de los polihidroxicanoatos se presenta en la Figura 8 y en la Tabla 2 se muestran los tipos de monómeros que pueden ser polimerizados por microorganismos (Li *et al.*, 2016).

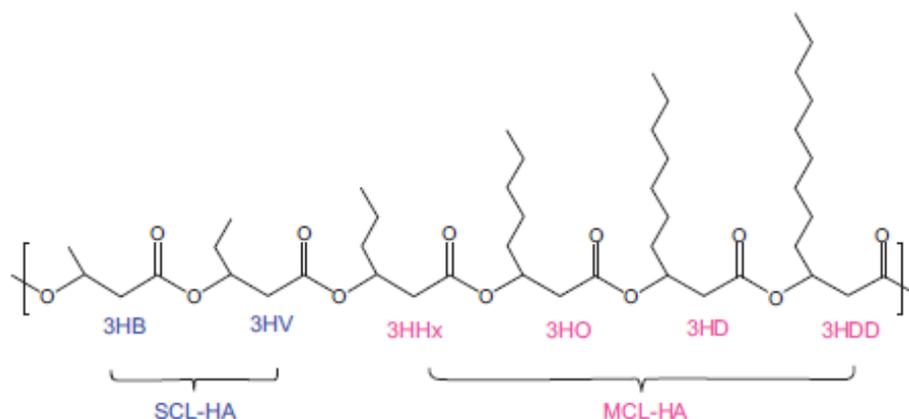


Figura 8. Algunos monómeros de PHA de cadena corta y cadena media sintetizados comúnmente (Li *et al.*, 2016).

Tabla 2. Monómeros típicos que pueden ser polimerizados por microorganismos (Zheng *et al.*, 2020).

TIPOS	MONÓMEROS	MICROORGANISMOS	FUENTES DE CARBONO
scl-PHA	3HB	<i>Bacillus megaterium</i>	/
	3HP	<i>Escherichia coli</i>	Glicerol
	3HV	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Ácido pentanoico
	4HB	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa
	LA	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa
	GA	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa
	2HB	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa
	2HIV	<i>Escherichia coli</i>	Glucosa
	5HV	<i>Ralstonia eutropha</i>	Ω-PDL
mcl-PHA	3HHx	<i>Pseudomonas putida</i>	Heptanoato
	3HHp	<i>Pseudomonas putida</i>	Heptanoato
	3HO	<i>Pseudomonas putida</i>	Octanoato
	3HD	<i>Pseudomonas putida</i>	Ácido decanoico
	3HDD	<i>Pseudomonas entomophila</i>	Ácido dodecanoico
	3HTD	<i>Pseudomonas putida</i>	Ácido tetradecanoico
	3HPhP	<i>Ralstonia eutropha</i>	Fenilpropioato
	3HPhB	<i>Ralstonia eutropha</i>	Fenilbutirato
	3HPhV	<i>Pseudomonas entomophila</i>	Fenilvalerato
	3HMOV	<i>Ralstonia eutropha</i>	Fructosa
	3HPE	<i>Burkholderia cepacia</i>	Pentenoato
	3HU	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Ácido 10-undecanoico
	3HPHx	<i>Pseudomonas putida</i>	Ácido 6-fenilhexanoico
	6HHx	<i>Bacillus cereus UW85</i>	ε-caprolactona

Puesto que hay numerosas variaciones estructurales en los monómeros que componen los PHAs, se encuentran diferencias en las propiedades y composición química. En general, los PHAs son insolubles en agua y solubles en solventes clorados, resistentes al ataque hidrolítico y los rayos UV, se hunden en el agua, facilitando así su biodegradación anaeróbica en los sedimentos, pero también se degradan en suelos y se comportan como materiales piezoeléctricos (lo que quiere decir que, al ser sometidos a tensiones mecánicas, producen en su superficie cargas eléctricas) (Raza *et al.*, 2018).

Tras el descubrimiento del polihidroxibutirato (PHB) en la bacteria *Bacillus megaterium*, se ha observado la capacidad para acumular PHAs en una amplia gama de bacterias (más de 300) fisiológica y taxonómicamente diferentes. Hasta la fecha, la mayoría de estas bacterias productoras de PHA se clasifican como gramnegativas, aunque se ha descrito un número limitado de bacterias grampositivas productoras de PHAs correspondientes a los géneros: *Bacillus*, *Caryophanon*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Microlunatus*, *Microcystis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus* y *Streptomyces*. En relación con las arqueas, la producción de PHAs se ha limitado a las especies haloarqueales: *Haloferax*, *Halalkalicoccus*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halobiforma*, *Halococcus*, *Halopiger*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Halorubrum*, *Halostagnicola*, *Haloterrigena*, *Haloterrigena*, *Haloterrigena*, *Haloterrigena*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Natronomonas* y *Natronorubrum* (Muhammadi *et al.*, 2015).

A nivel global, las bacterias gramnegativas productoras de PHAs a las que más se recurre se corresponden con las especies: *Cupriavidus necator* (antes *Ralstonia eutropha*), *Aegialites latus*, *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* recombinante y *Azotobacter vinelandii* (Cardona-Echevarría *et al.*, 2013).

Hasta la fecha *Cupriavidus necator* es el microorganismo más ampliamente estudiado para la producción rentable de PHA.

Por su parte, algunas cepas recombinantes de *Escherichia coli* sintetizan PHA a un alto nivel intracelular y otras son susceptibles de facilitar genéticamente la liberación de los gránulos (Kunasundari y Sudesh, 2011).

Respecto a *Azotobacter vinelandii*, la primera vez que se describió la acumulación de gránulos de PHA por parte de esta bacteria (1992) fue a partir de la utilización de residuos de melaza de remolacha azucarera, logrando una concentración de 19-22 g/L, pero tiempo después (1997), la producción fue mejorada mediante una fermentación en dos etapas llegando hasta una concentración de 36 g/L (Kaur *et al.*, 2017).

Las bacterias del género *Pseudomonas* son productoras naturales de PHAs de cadena media, ya que tienen toda la maquinaria para sintetizar estos poliésteres a partir de diferentes fuentes de carbono (Figura 9) (Borrero-de Acuña *et al.*, 2014). Este género bacteriano ha sido elegido, al ser metabólicamente versátil y tolerar, ampliamente, diferentes fuentes de carbono, como una fábrica celular eficiente para la producción de PHAs. Los estudios recientes se centran en el diseño de cepas con una capacidad aumentada para acumular PHAs, modificando sus vías biosintéticas y mejorándolas,

ya que esta especie es un microorganismo de importancia a escala industrial (Mozejko-Ciesielska *et al.*, 2019).

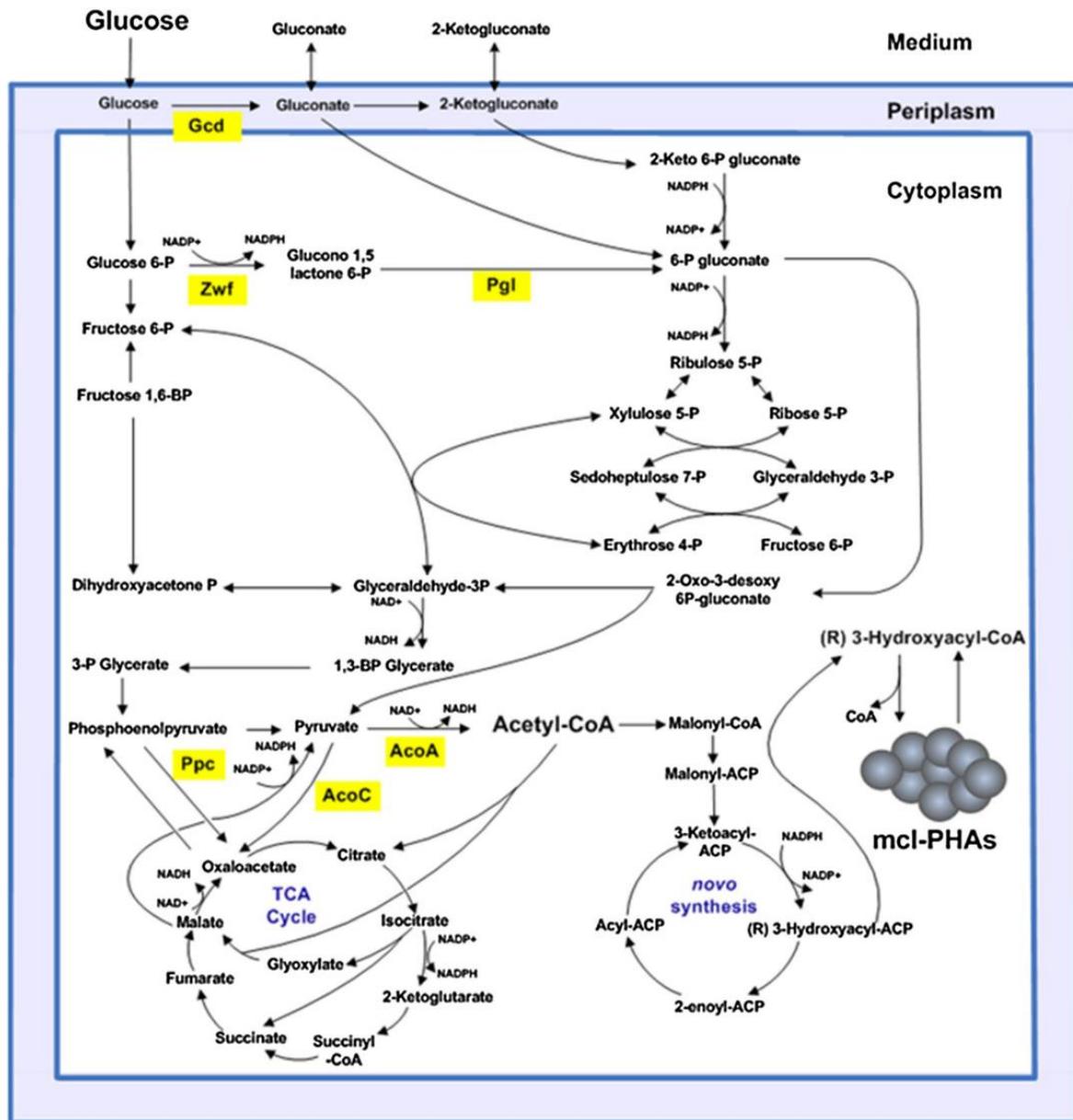


Figura 9. Metabolismo central de *Pseudomonas putida* (Borrero-de Acuña *et al.*, 2014).

Las recientes legislaciones y regulaciones contra el uso de productos plásticos han propiciado la búsqueda de nuevos materiales y aplicaciones de los mismos, dentro de los PHAs podemos encontrar multitud de usos en diversas disciplinas (Choi *et al.*, 2020):

- Aplicaciones alimentarias. La industria del embalaje de alimentos consume más del 40% del total de los plásticos producidos. Como se ha mencionado anteriormente, los PHAs son hidrófobos, activos ópticamente, termoplásticos, piezoeléctricos, no tóxicos para la naturaleza y los humanos, además de tener buenas características de barrera para los gases y el agua. Todo esto hace que los PHAs sean idóneos para fabricar

materiales de embalaje, así como productos relacionados con los alimentos (pajitas, botellas...).

- Aplicaciones cosméticas. En el campo cosmético, los PHA son utilizados para mascarillas y parches de base biológica. Otra de las aplicaciones es el uso de microplásticos de PHAs, desarrollándose recientemente una serie de productos de protección solar con micropolvos de PHA. Éstos son los primeros ingredientes derivados de biomasa renovable y son biodegradables.
- Aplicaciones médicas. Los PHAs han recibido mucha atención en la elaboración de materiales médicos y terapéuticos, al ser biocompatibles y biodegradables. Presentan una ventaja sobre otros materiales, ya que, al ser menos ácidos, son menos propensos a causar necrosis local e inflamación. Hasta la fecha se han aplicado los PHA para: suturas quirúrgicas, parches, material ortopédico, dispositivos de reparación de tejidos, soportes de andamiaje de células y tejidos, apósitos para heridas y portadores para la administración de fármacos.

Teniendo en cuenta lo expuesto, los PHAs como materiales, tienen cada vez más importancia sobre un amplio rango de disciplinas, lo cual contribuye a acrecentar la necesidad de seguir investigando sobre estos materiales, con el fin de poder reducir y acabar eliminando el consumo de plásticos de fuentes fósiles.

1.4. Objetivos

Teniendo en cuenta la problemática ambiental actual en cuanto al uso masivo de materiales plásticos, derivado del elevado índice de persistencia y, por ende, de la contaminación que entrañan en el ambiente donde impactan, es necesario buscar alternativas a dichos materiales, que no comprometan la salud del entorno y que sean sencillos de eliminar. Por tanto, contando con estos antecedentes, se planteó como objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado, la caracterización de bacterias productoras de PHAs, partiendo de una colección de 61 cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* y aisladas previamente de un proceso de compostaje de residuos vegetales, con potencial para ser empleadas como agentes productores de biomateriales, competitivos en el contexto actual de economía circular.

Se tuvieron en cuenta una serie de objetivos específicos para poder llevar a cabo el objetivo principal:

1. Hacer un cribado presuntivo de bacterias productoras de PHAs.
2. Seleccionar las bacterias productoras de PHAs más prometedoras.
3. Producir PHAs a partir de las cepas seleccionadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño experimental

Los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo siguieron el desarrollo experimental que se muestra (Figura 10) y describe a continuación:

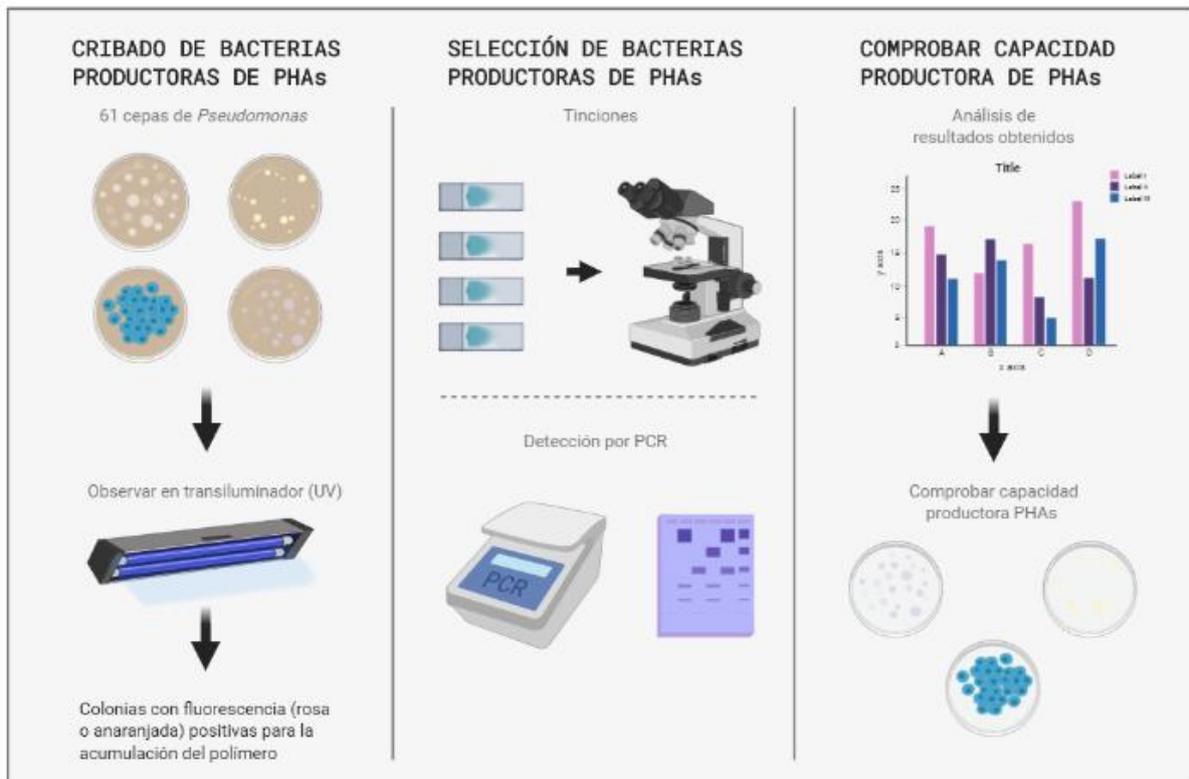


Figura 10. Diseño experimental de la metodología llevada a cabo en el trabajo.

2.2. Medios de cultivo generales

Como medio de cultivo general, tanto para cultivo en placa como para tubos de agar inclinado se utilizó APHA (receta comercial, 23 g/L; Panreac), añadiendo como refuerzo agar bacteriológico (receta comercial, 5 g/L; Panreac) y usando como disolvente agua destilada (Tabla 3). Para la elaboración del medio en placas de Petri, se llevó a cabo la mezcla de los componentes anteriormente mencionados en un matraz de vidrio que posteriormente fue autoclavado (1 atmósfera de presión y 20 minutos de tratamiento) y vertido en placas manteniendo condiciones de asepsia. Para la elaboración de los tubos inclinados, el medio se vertió en un vaso de precipitado y se calentó hasta llevarlo a ebullición, empleando un embudo, se llenó cada uno de los tubos. Antes de autoclavarlos (1 atmósfera de presión y 20 minutos de tratamiento) se les puso un tapón de celulosa y, una vez autoclavados, se dejaron solidificar en una posición que permitió la obtención del medio en “slant”.

Tabla 3. Composición medio APHA.

APHA	
Agar Bacteriológico	15 g/L
Digerido Enzimático de Caseína	5 g/L
Extracto de Levadura	2,5 g/L
Anhidro (D+) Glucosa	1 g/L
pH	7,0 ± 0,2

Además, se utilizó Triptona-Soja-Agar (TSA) como medio rico en nutrientes para cultivo en placa (receta comercial, 40 g/L; Panreac), añadiendo como refuerzo agar bacteriológico (receta comercial, 5 g/L; Panreac) y usando como disolvente agua destilada (Tabla 4). Para ello se preparó la mezcla de componentes en un matraz de vidrio y fue autoclavado con un tapón de papel de aluminio (1 atmósfera de presión, 121 °C de temperatura y 20 minutos de tratamiento), para finalmente verterlo en las placas y esperar su solidificación.

Tabla 4. Composición medio TSA.

APHA	
Digerido Papaínico de Soja	5 g/L
Digerido Pancreático de Caseína	15 g/L
Cloruro de Sodio	5 g/L
Agar	15 g/L
pH	7,3 ± 0,2

En la Figura 11 se muestra de manera esquemática el procedimiento seguido para la elaboración de los medios de cultivo, desde el pesaje de los ingredientes requeridos, hasta su esterilización mediante autoclave y posterior dispensación o vertido en condiciones de asepsia, es decir, en el entorno del mechero Bunsen.



Figura 11. Proceso para la preparación de medios de cultivo en placa (APHA y TSA).

Por último, para hacer suspensiones de la colección de bacterias se preparó solución salina (SS) al 0,9%, esto es, 9 g de NaCl en 1000 mL de H₂O destilada.

Los medios se conservaron hasta su uso en cámara fría, a 4 °C.

2.3. Colección de cepas del género *Pseudomonas*

En este estudio se emplearon 61 cepas, identificadas como pertenecientes al género *Pseudomonas* incluidas en una colección del grupo de investigación BIO-175 (Tabla 5), que fueron previamente aisladas a lo largo de distintas etapas de un proceso de compostaje de residuos vegetales, en concreto, residuos de plantas de tomate secadas al sol y astillas de pino en una proporción de 1:1 (p/p) durante un período de 189 días. Los muestreos a partir de los que se aislaron los distintos grupos microbianos a lo largo de las sucesivas fases térmicas ocurridas durante el proceso se llevaron a cabo según lo indicado por Jurado *et al.* (2014). Finalmente, se obtuvo una colección total de 1475 cepas tipo, de las cuales 61 fueron identificadas como pertenecientes al género *Pseudomonas*. Las etapas en las que se aislaron los microorganismos se corresponden con los distintos rangos de temperatura observados, desde la constitución de las pilas con la mezcla de materiales a temperatura ambiente (Materia Prima), el ascenso térmico (Mesófila), alcanzando temperaturas superiores a 45 °C que permiten la higienización del material (Termófila), el descenso de la temperatura, debido al agotamiento de los nutrientes, hasta alcanzar nuevamente un rango ambiental (Enfriamiento) y el mantenimiento previo a la salida del compost final (Maduración).

Tabla 5. Código de las cepas utilizadas en este trabajo e identidad de cada una de ellas.

Código	Etapas de aislamiento	Identidad	%Identidad (Blast)	Nº Acceso (Blast)
204	Termófila	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	99	JX845726.1
208	Termófila	<i>Pseudomonas formosensis</i>	99	JF432053.1
216	Termófila	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99	FJ393302.1
362	Mesófila	<i>Pseudomonas formosensis</i>	99	JF432053.1
384	Mesófila	<i>Pseudomonas formosensis</i>	99	JF432053.1
416	Termófila	<i>Pseudomonas formosensis</i>	99	JF432053.1
1852	Maduración	<i>Pseudomonas brenneri</i>	99	HQ824991.1
1984	Materia Prima	<i>Pseudomonas seleniipraeceptans</i>	99	FJ422810.1
1998	Materia Prima	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2005	Materia Prima	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2010	Materia Prima	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	99	NR_041044.1
2020	Materia Prima	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2032	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2052	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	KC253270.1
2072	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	98	CP003725.1
2075	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2076	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2082	Termófila	<i>Pseudomonas putida</i>	100	AB680123.1
2086	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2090	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2092	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2095	Termófila	<i>Pseudomonas balearica</i>	99	AM905859.1
2107	Termófila	<i>Pseudomonas balearica</i>	99	KC514126.1
2108	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	KC253270.1
2115	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2148	Termófila	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	99	NR_041044.1
2158	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2165	Mesófila	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	99	HQ848111.1
2185	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	GU396288.1
2196	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	CP003725.1
2208	Mesófila	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99	HQ407244.1
2213	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	KC253270.1
2229	Mesófila	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99	HQ407244.1
2246	Termófila	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99	HQ407244.1
2248	Termófila	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99	HQ407244.1
2258	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	KC253270.1
2261	Termófila	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99	HQ407244.1

2269	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2283	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	HQ189757.1
2299	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	CP003725.1
2305	Termófila	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	99	GQ161991.1
2308	Termófila	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	99	GQ161991.1
2314	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	HQ189757.1
2323	Termófila	<i>Pseudomonas putida</i>	100	AY395005.1
2326	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2361	Mesófila	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	98	KC210861.1
2401	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2406	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	CP003725.1
2416	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	KC253270.1
2437	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	KC796787.1
2443	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	KC253270.1
2462	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	98	DQ518613.1
2464	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	100	CP003725.1
2481	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003071.1
2483	Termófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	CP003725.1
2491	Mesófila	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	99	EU603457.1
2533	Mesófila	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99	FJ393302.1
2544	Mesófila	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	KC253270.1
2659	Enfriamiento	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	99	JX971551.1
2668	Enfriamiento	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	KC253270.1
2725	Enfriamiento	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	98	GQ161991.1

2.4. Caracterización de bacterias productoras de PHAs

Para la caracterización de bacterias productoras de PHAs, se llevó a cabo la recuperación de la colección desde el formato de crioperlas utilizado para la conservación de cepas microbiológicas, llamadas CRYOINSTANT (Deltalab). Una vez sacados los botes con las crioperlas de la cámara de – 80 °C, en condiciones estériles, en el entorno del mechero Bunsen, se extrajo una crioperla, como muestra de cada cepa, con unas pinzas (también estériles) y se depositó en una placa de APHA, que se llevó a incubación, hasta su crecimiento, en las siguientes condiciones: 30 °C, 48 horas.

Pasado el periodo de incubación y crecidas las bacterias, se procedió a hacer una resiembra en una placa nueva (también de APHA) seleccionándose una colonia bien aislada con un asa de platino, previamente flameada. Se dejaron en la cámara de incubación durante 48 horas a 30 °C. La siembra en la nueva placa fue en estrías con el objetivo de obtener colonias aisladas de un cultivo axénico (Figura 12).

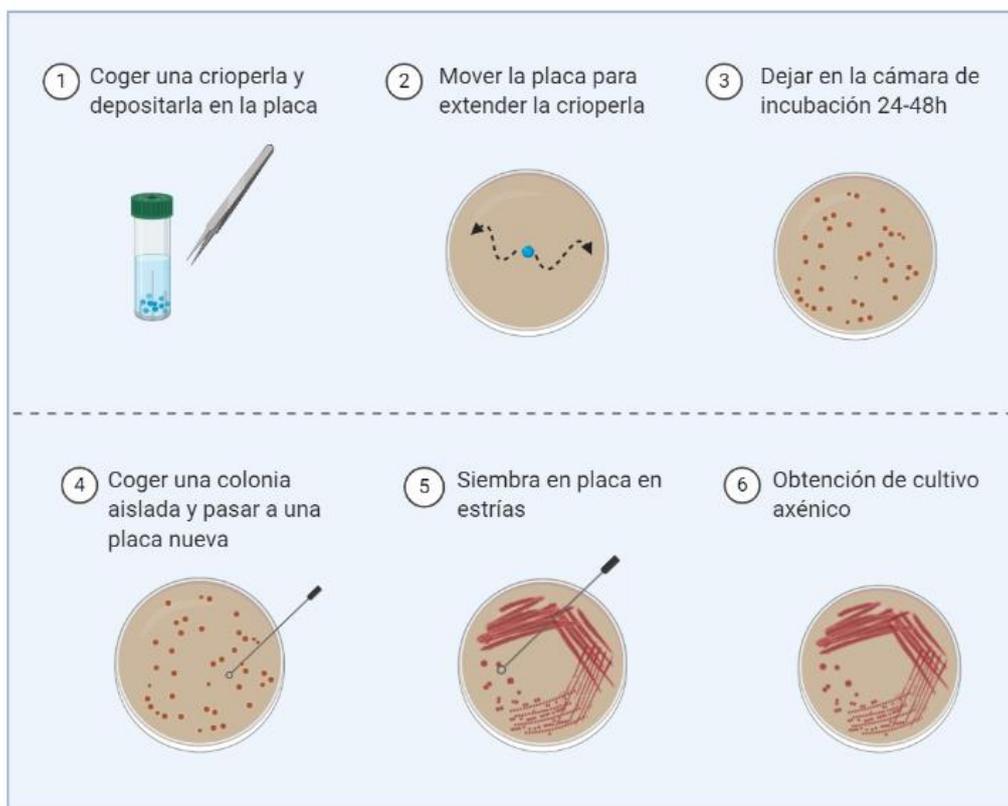


Figura 12. Procedimiento seguido para caracterizar y obtener la colección de cepas de *Pseudomonas*.

2.4.1. Identificación de cepas productoras de PHAs

Para la identificación de bacterias productoras de PHAs, se utilizó un medio selectivo suplementado con Rojo Nilo y glucosa. En un matraz de 1 L se adicionaron 20 g de glucosa, 2 g de levadura, 20 g de agar bacteriológico y 700 mL de agua destilada, se homogeneizó la suspensión y se autoclavó a 1 atmósfera de presión, 121 °C de temperatura y 20 minutos de tratamiento. El colorante Rojo Nilo se disolvió en proporción: 0,001 g en 1 mL de acetona pura (Rojo Nilo al 0,1% en acetona). Terminado el autoclavado, en un entorno estéril (mechero Bunsen), se adicionó el Rojo Nilo y 300 mL de medio mínimo de sales Janshekar (MMS) (100 mL de cada sal) (Tabla 6) al matraz de 1 L y se vertió el medio en placas.

Tabla 6. Medio mínimo de sales Janshekar (MMS) (Janshekar *et al.*, 1982).

Solución A		Solución B		Solución C	
K ₂ HPO ₄	16 g	NaCl	2,5 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	12,5 g
K ₂ HPO ₄	5 g	MgSO ₄ 7·H ₂ O	5,8 g	(NH ₄)NO ₃	10 g
H ₂ O dest	1000 mL	CaCl ₂ 2·H ₂ O	0,13 g	FeCl ₃ 6·H ₂ O	0,025 g
		H ₂ O dest	1000 mL	H ₂ O dest	1000 mL

Para hacer la siembra en este medio se realizaron suspensiones de las bacterias en agua destilada estéril con el objetivo de eliminar posibles restos de nitrógeno, puesto que procedían de siembras en medio TSA. Cada una de las cepas, fue resuspendida en un eppendorf con 900 μL de agua destilada y se centrifugó a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos (Centrífuga Eppendorf, modelo 5424). Se descartó el sobrenadante y se volvió a resuspender el pellet con la biomasa celular en 900 μL de agua destilada para volver a hacer otro ciclo de centrifugación (5000 rpm y 5 minutos). Para finalizar, se descartó el sobrenadante, se adicionaron 900 μL de agua destilada para resuspender el pellet y, con dicha suspensión, se realizó la siembra en las placas usando una micropipeta (tres gotas de 20 μL por cepa). Las placas se dejaron en la cámara de incubación durante 48 horas, a 30 °C (Figura 13).

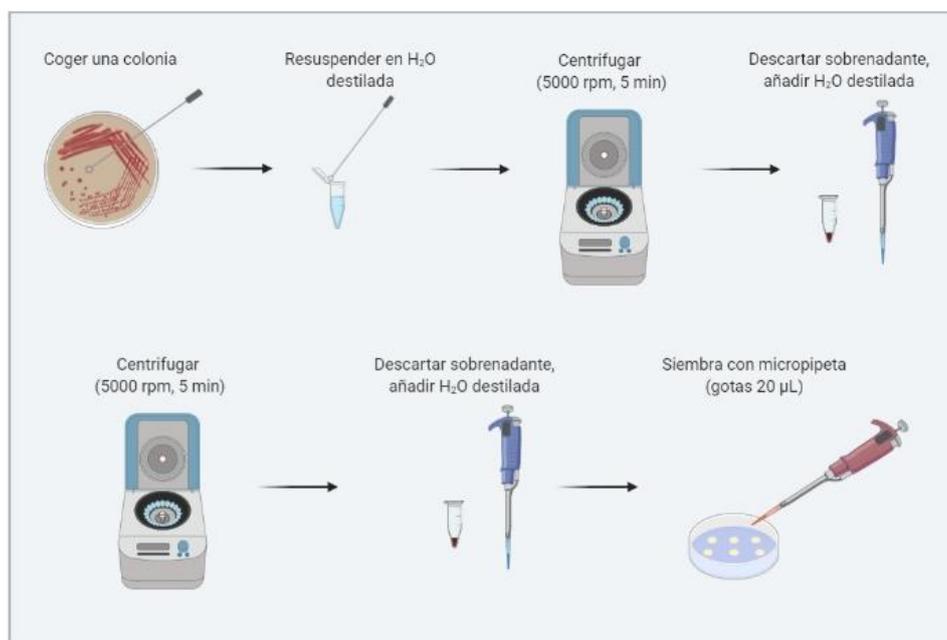


Figura 13. Procedimiento de siembra en medio selectivo de PHAs.

Por último, las placas fueron evaluadas mediante observación de los cultivos bajo luz ultravioleta en el equipo Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-rad), de manera que aquellas cepas que presentaron una fluorescencia rosada o anaranjada se seleccionaron como positivas para la producción de PHAs (Otero-Ramírez y Fernández, 2013).

2.4.2. Observación de gránulos de PHAs

Se llevaron a cabo diferentes protocolos con el fin de poder visualizar los gránulos de PHAs y ver posibles cepas productoras, en ambos casos empleando como base el colorante Negro Sudán.

En primer lugar, se realizaron tinciones. Para teñir selectivamente los gránulos de PHBs (Figura 14), previamente las cepas fueron aisladas en placas de TSA, al ser un medio rico en nutrientes permite la acumulación de sustancias de reserva. Se realizaron extensiones de las bacterias en portaobjetos y se fijaron previamente a la tinción. En 75 mL de etanol (95%) se disolvieron 0,3 g del colorante Negro

Sudán y se enrasó hasta 100 mL con agua destilada, y cada uno de los portaobjetos se cubrió con la solución durante 15 minutos. Pasado el tiempo se retiró el exceso de colorante con un papel de filtro y se decoloraron las bacterias durante 20 segundos con xileno. Para detener la decoloración, las preparaciones se lavaron con agua destilada. Por último, se tiñeron con safranina durante 1 minuto, se volvieron a lavar con agua y se dejaron secar para su visualización posterior. Los gránulos de PHB se colorean de gris-negro y la célula vegetativa de rosa (Cerrone, 2011).



Figura 14. Procedimiento para tinción con Negro Sudán.

Paralelamente, se realizó una prueba de detección rápida de PHBs sobre medio de cultivo sólido (Figura 15). Para ello se aislaron en estrías las cepas en medio TSA y se dejaron crecer en cámara de incubación, a 30 °C y durante 48 horas. Una vez crecidas, se adicionó sobre las colonias una solución etanólica al 0,3% (p/v en etanol al 70%) de Negro Sudán y se dejaron reposar durante 30 minutos. Pasado el tiempo las placas se tiñeron y se lavaron con etanol al 96% para eliminar el exceso de colorante sobre las colonias, de manera que aquellas que conservaron el color negro después de la decoloración se asociaron a cepas productoras de PHB, sobre las que quedaron teñidos los lípidos intracelulares (Lathwal *et al.*, 2015).

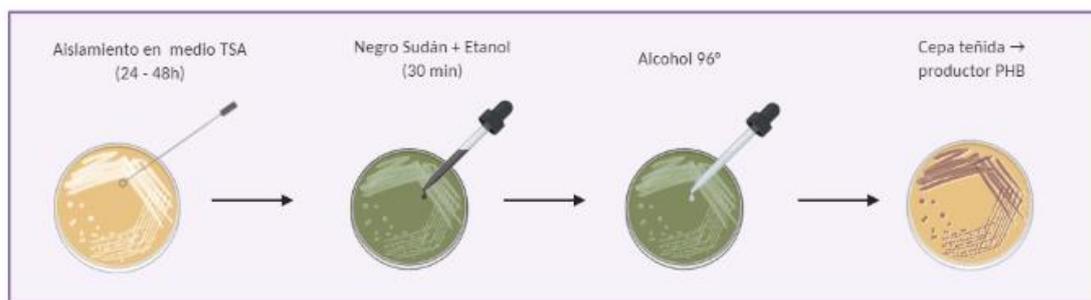


Figura 15. Detección rápida de cepas productoras de PHBs con Negro Sudán.

2.5. Ensayo *in vitro* de generación de bioplásticos

Para comprobar la capacidad productora de PHAs por parte de las cepas seleccionadas a partir de los datos obtenidos en los experimentos anteriores, se llevó a cabo la siembra de las cepas más prometedoras en medio Burk sin Nitrógeno, para la obtención de los preinóculos empleados a continuación.

Se seleccionó un método con una ejecución rápida y sencilla. Este experimento se llevó a cabo con las cepas presuntamente productoras de PHAs. Se cultivaron las bacterias en caldo HM₂ (Halophile Microorganisms) (Tabla 7) suplementado con glucosa (10 g·L⁻¹) (Guzmán *et al.*, 2017) para favorecer la acumulación de los gránulos, y una vez crecidas las bacterias, se centrifugó el cultivo (7500 rpm durante 15 minutos) para separar la biomasa bacteriana. El precipitado se recogió, se depositó en tubos de ensayo y éstos se dejaron secar en estufa a 80 °C, durante 24 horas. La biomasa seca se molió y se adicionó 1 mL de hipoclorito de sodio al 15% con el objetivo de debilitar la membrana celular y facilitar el proceso posterior de extracción. A las 2 horas se le añadió 1 mL de cloroformo para separar la biomasa del polímero y pasados 20 minutos los tubos se centrifugaron (3500 rpm durante 5 minutos), obteniéndose dos fases: una fase superior con el hipoclorito de sodio junto con los restos celulares y una fase inferior con el cloroformo y los PHAs. Seguidamente se extrajo con una pipeta el cloroformo con el polímero de la fase inferior y se traspasó a un nuevo tubo de ensayo, que se llevó nuevamente a la estufa (40 °C durante 24) para acelerar la evaporación del cloroformo. El polímero obtenido se depositó sobre papel de aluminio para determinar su peso (Guzmán *et al.*, 2017; García-Chumillas, 2019).

Tabla 7. Composición caldo HM₂ (Halophile Microorganisms) modificado (Flores-Vásquez e Idrogo-Baigorria, 2015).

HM ₂	
MgCl ₂	16,000 g/L
MgSO ₄	24,000 g/L
CaCl ₂	1,000 g/L
KCl	5,000 g/L
NaHCO ₃	0,200 g/L
NaBr	0,500 g/L
NH ₄ Cl	2,000 g/L
KH ₂ PO ₄	0,400 g/L
FeCl ₃	0,005 g/L
Glucosa	30,000 g/L
Extracto de levadura	0,750 g/L
Agua destilada	1 L
pH final	7,0

2.6. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron procesados mediante el programa Microsoft Office Excel 2010 para Windows, para la obtención de las tablas y gráficas representadas en este trabajo. Además, se realizó un Dendograma y un Análisis de Componentes Principales con todas las variables estudiadas, aplicando un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$), para lo que se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVIII. Asimismo, se construyó un árbol filogenético con el método del vecino más cercano (Neighbor-Joining / NJ) utilizando el programa MEGA X.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según los objetivos propuestos en el trabajo, y de acuerdo con el desarrollo presentado en el diseño experimental, a continuación, se muestran los resultados obtenidos en cada etapa de los experimentos, así como la discusión de los mismos.

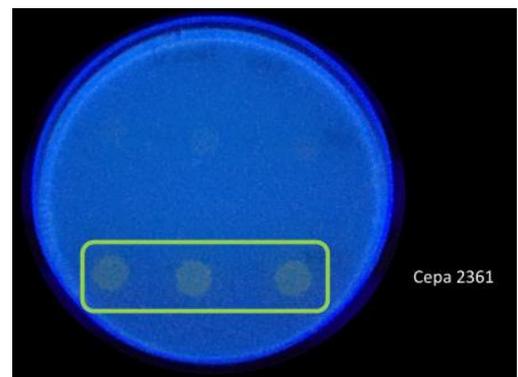
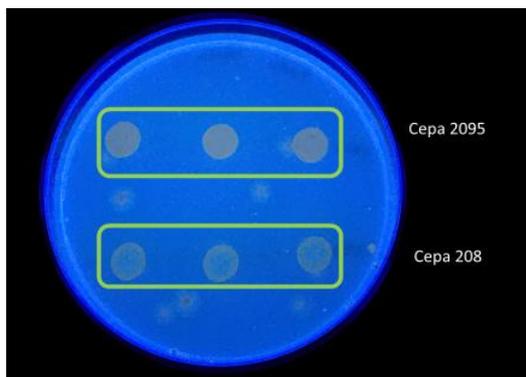
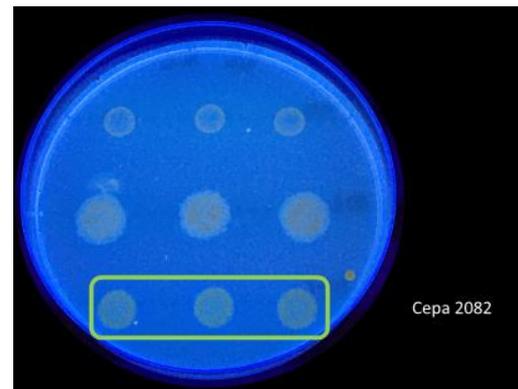
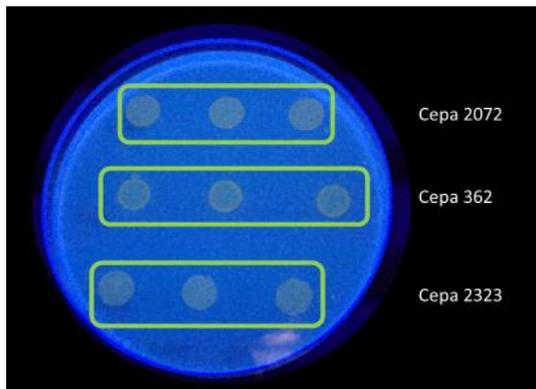
3.1. Cribado de cepas potencialmente productoras de PHAs

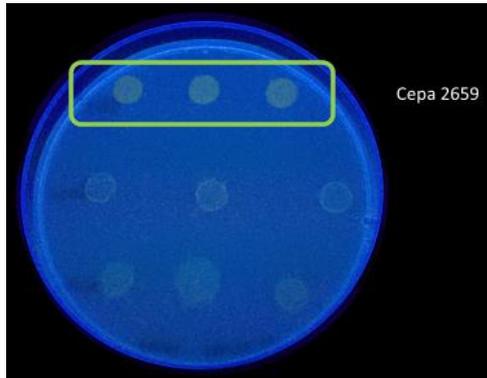
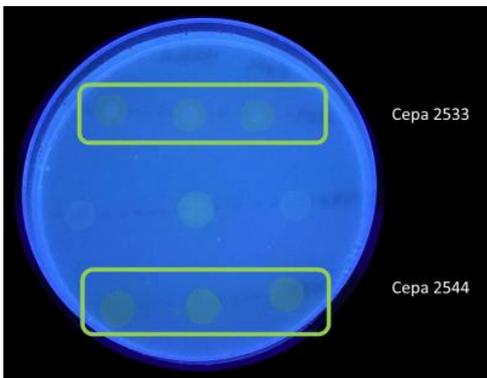
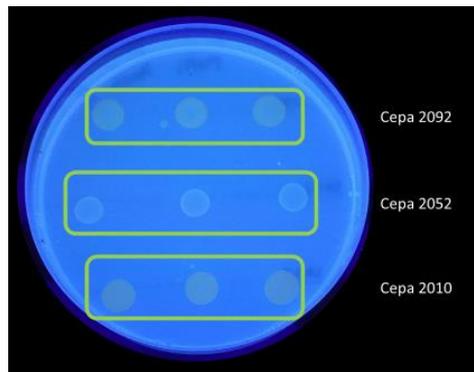
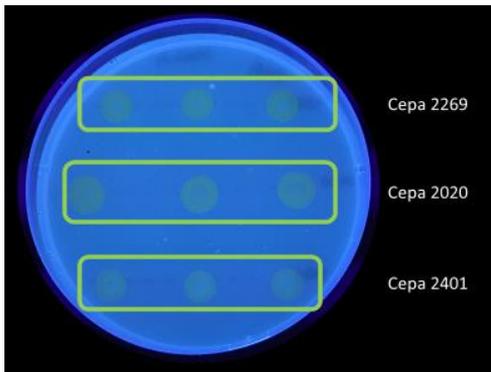
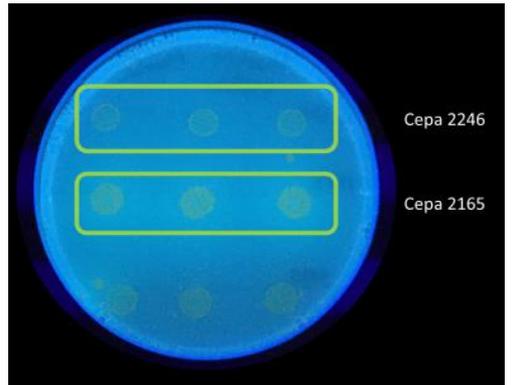
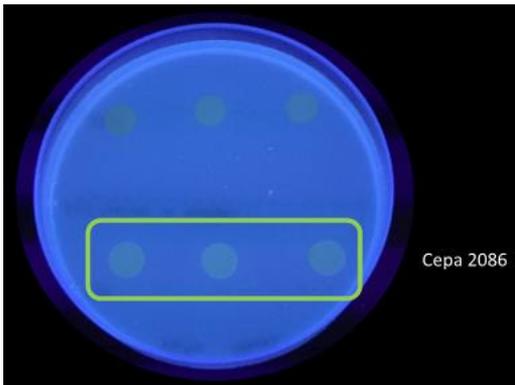
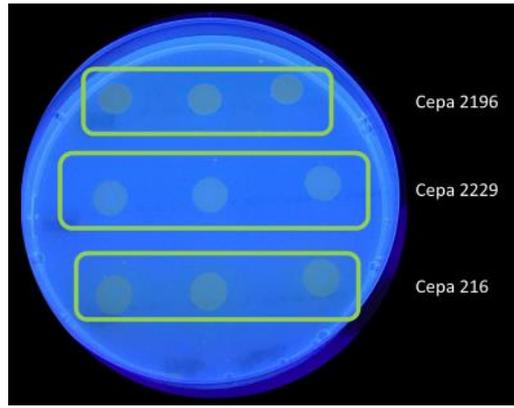
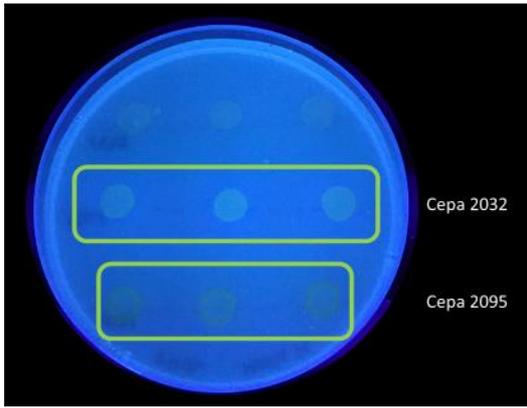
Para llevar a cabo un cribado inicial de las 61 cepas de la colección se utilizó el medio suplementado con Rojo Nilo y glucosa (ver apartado 2.4.1.). En la Tabla 8 se recogen los resultados obtenidos para todas las bacterias ensayadas y en la Figura 16 se muestran las imágenes correspondientes a algunas de las cepas positivas que mostraron una fluorescencia más notable al ser sometidas a la radiación ultravioleta aplicada con el transiluminador. En cada una de las placas se sembraron tres cepas diferentes y de cada una se hicieron tres réplicas.

Tabla 8. Cribado de cepas de *Pseudomonas* potencialmente productoras de PHAs cultivadas en medio adicionado con Rojo Nilo.

Código	Identidad	UV	Código	Identidad	UV
204	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	-	2213	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
208	<i>Pseudomonas formosensis</i>	+	2229	<i>Pseudomonas mendocina</i>	+
216	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	+	2246	<i>Pseudomonas mendocina</i>	+
362	<i>Pseudomonas formosensis</i>	+	2248	<i>Pseudomonas mendocina</i>	-
384	<i>Pseudomonas formosensis</i>	-	2258	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
416	<i>Pseudomonas formosensis</i>	+	2261	<i>Pseudomonas mendocina</i>	-
1852	<i>Pseudomonas brenneri</i>	+	2269	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+
1984	<i>Pseudomonas seleniipraecipitans</i>	-	2283	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
1998	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	2299	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+
2005	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2305	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	+
2010	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	+	2308	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	-
2020	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2314	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
2032	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2323	<i>Pseudomonas putida</i>	+
2052	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2326	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-

2072	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2361	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	+
2075	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	2401	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+
2076	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	2406	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
2082	<i>Pseudomonas putida</i>	+	2416	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
2086	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2437	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+
2090	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2443	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+
2092	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2462	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
2095	<i>Pseudomonas balearica</i>	+	2464	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
2107	<i>Pseudomonas balearica</i>	-	2481	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
2108	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	2483	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
2115	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	2491	<i>Pseudomonas pachastrellae</i>	-
2148	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	-	2533	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	+
2158	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-	2544	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+
2165	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	+	2659	<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	+
2185	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2668	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	-
2196	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	2725	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	-
2208	<i>Pseudomonas mendocina</i>	-			





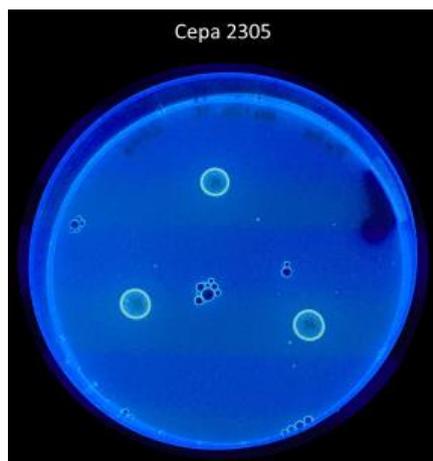


Figura 16. Fotografías de los resultados positivos tras observar las placas bajo el transiluminador.

Del total de cepas observadas, un 53% de las bacterias mostraron fluorescencia evidente, lo cual indicaría su capacidad potencial para producir PHAs. De esas 32 bacterias consideradas positivas (Tabla 8), 16 correspondieron a la especie *Pseudomonas stutzeri*, 3 a *Pseudomonas xanthomarina*, 3 a *Pseudomonas formosensis*, 2 a *Pseudomonas plecoglossicida*, 2 a *Pseudomonas putida*, 2 a *Pseudomonas mendocina*, 1 a *Pseudomonas balearica*, 1 a *Pseudomonas bauzanensis*, 1 a *Pseudomonas brenneri* y 1 a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. De entre todas las cepas positivas, cabe destacar la 2305 (*Pseudomonas bauzanensis*) que presentó una fluorescencia muy intensa (Figura 16).

Teniendo en cuenta que el coste de la obtención de PHAs actualmente no es completamente competitivo con el precio de la producción de plásticos procedentes de fuentes no renovables, la investigación se enfoca en la búsqueda de alternativas que permitan mejorar su rentabilidad. Para ello, el uso de microorganismos “silvestres”, procedentes de ambientes complejos, como el que se da en una pila de compostaje, ofrece una disyuntiva atractiva para aprovechar la microbiota ambiental autóctona, aplicando una menor inversión que si se emplean, por ejemplo, organismos mejorados. Además, algunos autores han señalado el estrés generado por el ambiente como responsable del aumento, en un porcentaje muy elevado, de la capacidad de producción de PHAs de la población bacteriana autóctona (Foster *et al.*, 2001). Esto corroboraría la presencia de este tipo de microorganismos, con un potencial industrial interesante, en hábitats donde las condiciones varían, llegando en ocasiones a ser limitantes, y donde se observan interacciones muy competitivas entre distintos grupos microbianos. El compostaje se plantea, por tanto, como un escenario atractivo para la búsqueda de cepas productoras de biopolímeros con aplicaciones tan dispares como la obtención de biomateriales empleados en el campo de la biomedicina, la agricultura o la alimentación (Borrero-de Acuña *et al.*, 2014).

En la Figura 17 se muestra la proporción de cepas de *Pseudomonas* que corresponden a las distintas etapas del proceso de compostaje, así como el porcentaje de positivas, según la prueba anteriormente descrita, en cada una de las fases contempladas.

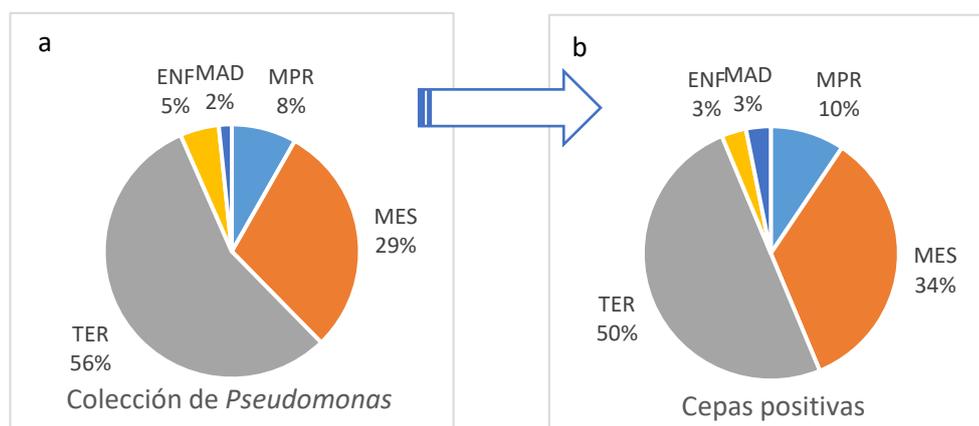


Figura 17. Proporción de cepas de *Pseudomonas* aisladas en distintas etapas del proceso de compostaje: a) Colección completa de cepas estudiadas (61); b) Cepas positivas tras el primer cribado (32). Abreviatura de las etapas del compostaje: MPR (Materia Prima), MES (Mesófila), TER (Termófila), ENF (Enfriamiento), MAD (Maduración).

Como se muestra en la Figura 17a, del total de cepas de la colección de *Pseudomonas*, el mayor porcentaje fueron aisladas en la etapa Termófila, seguido de la etapa Mesófila, ambas conforman la fase del proceso con mayor actividad microbiana, conocida como bio-oxidativa. Del mismo modo, en la Figura 17b se observa como la proporción de cepas *a priori* capaces de producir gránulos, según la emisión de fluorescencia a partir de su crecimiento en el medio selectivo en placa adicionado con Rojo Nilo, se mantiene más numerosa en la misma fase, respecto a la proporción de cepas positivas.

En el caso de la etapa Termófila cabe destacar que está gobernada por microorganismos capaces de crecer en condiciones de temperatura limitantes para una gran mayoría de bacterias, lo que coincide con el hecho de que muchas de las cepas presuntamente positivas fueran halladas en dicha etapa considerada más inhóspita y restrictiva, lo cual obligaría, como se mencionó anteriormente, al desarrollo de una capacidad, por parte de estas bacterias, de acumular reservas de carbono en forma de inclusiones citoplasmáticas, es decir, polihidroxicanoatos (PHAs) (Cardona-Echevarría et al., 2013).

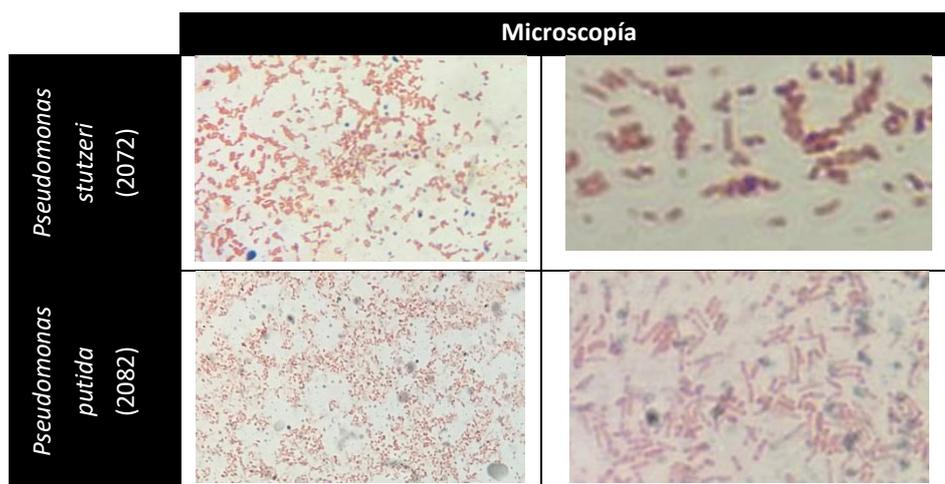
Dentro de la enorme diversidad que presenta el microbioma del compostaje, el hecho de estudiar esta condición en concreto sobre cepas identificadas como *Pseudomonas*, responde al interés que despiertan estas bacterias como productoras naturales de PHAs, ya que este género ha sido descrito por poseer cepas con toda la maquinaria necesaria para sintetizar poliésteres a partir de diferentes fuentes de carbono. Estas bacterias, utilizan los gránulos de PHAs que acumulan como reservas de carbono y energía frente a condiciones ambientales desfavorables (Borrero-de Acuña et al., 2014). Sin embargo, a pesar de la capacidad implícita de estas bacterias silvestres como productoras de PHAs, se debe tener en cuenta que las concentraciones naturales de este polímero bacteriano son significativamente bajas en función del ambiente y de los sustratos disponibles (Labuzek y Radecka, 2001). Esto explicaría porque no toda la colección de *Pseudomonas* ensayada, mostró esta característica. Por ello, las estrategias de búsqueda del potencial carácter productor de

polihidroxicanoatos deben ser diversas, con objeto de convenir un resultado más certero sobre las habilidades reales de los microorganismos presentes en un determinado ambiente. Por otro lado, el hecho de, a pesar de las limitaciones, observar claramente dicha habilidad en algunas de las bacterias de la colección empleada, permite confirmar con mayor rotundidad cuál de ellas se postulan como prometedoras herramientas biotecnológicas, puesto que sin necesidad de optimizar las condiciones son capaces de sintetizar el polímero de reserva, lo que, además, les confiere una mayor supervivencia y capacidad de competir con otras bacterias autóctonas en el ambiente natural estudiado.

3.2 Visualización de gránulos de PHA

Para evaluar la capacidad de almacenamiento de PHAs por parte de las cepas bacterianas consideradas más prometedoras para esta actividad, se llevó a cabo el protocolo de tinción explicado en el apartado 2.4.2. para evaluar nuevamente mediante microscopía aquellas cepas que resultaron positivas en la prueba anterior. Se observaron las tinciones con el microscopio óptico, en la Figura 18 se muestran algunos ejemplos, dando como resultado un 46,9% de cepas positivas (15 del total de 32 procedente del ensayo anterior), como se muestra en la Tabla 9.

Paralelamente, a partir de las cepas en cuya preparación se observaron claramente los gránulos se realizó un test rápido de detección de dichas estructuras (apartado 2.4.2.), metodología que no confirmó completamente el resultado anterior, ya que sólo 9 de las 15 cepas cuyos gránulos fueron observados con la tinción de Negro Sudán, se revelaron como positivas con esta nueva metodología en placa. Estos resultados también aparecen recogidos en la Tabla 9. En la Figura 19 se muestran algunos de los ejemplos más representativos.



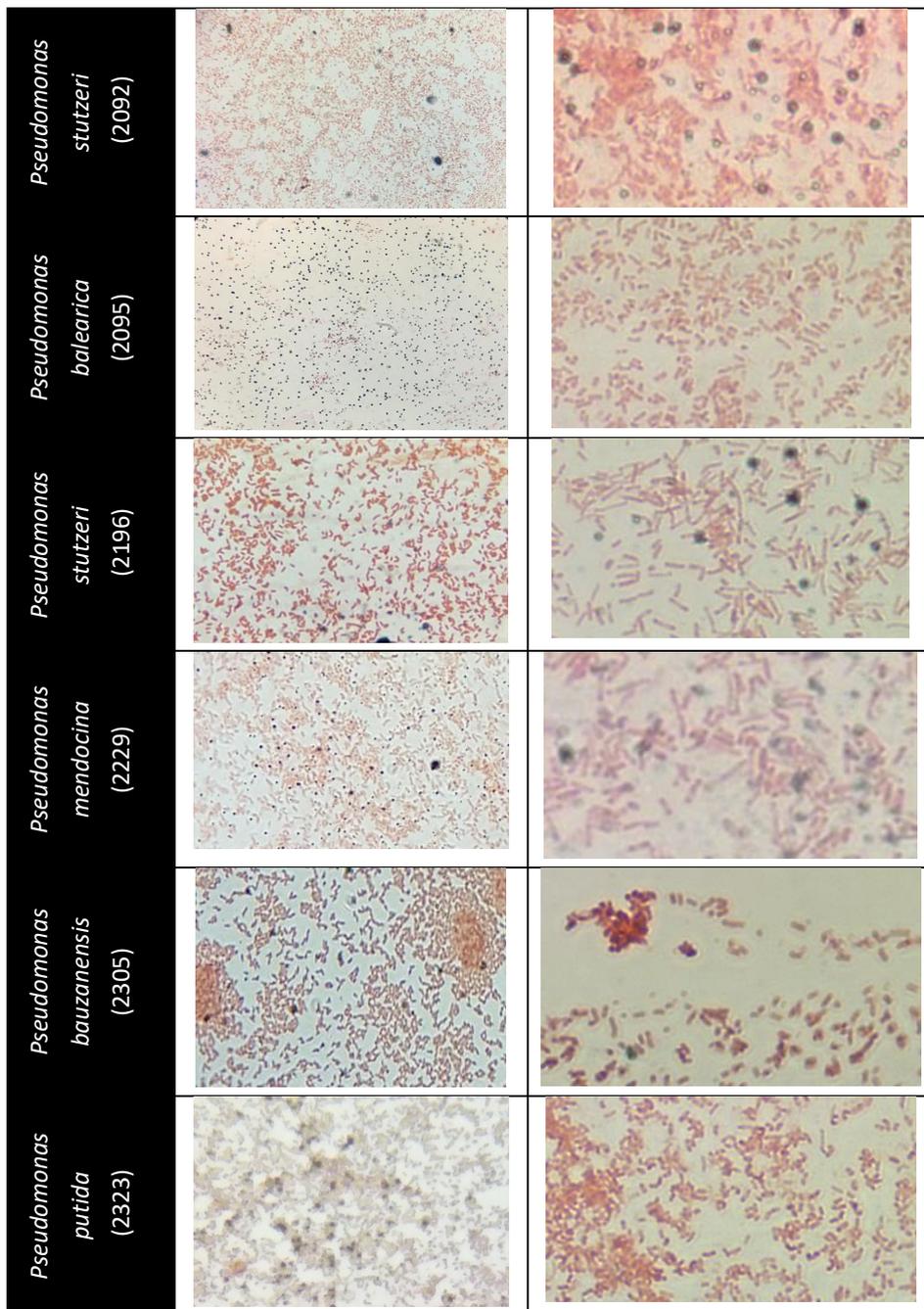


Figura 18. Visualización de gránulos de PHB al microscopio óptico mediante tinción con Negro Sudán.

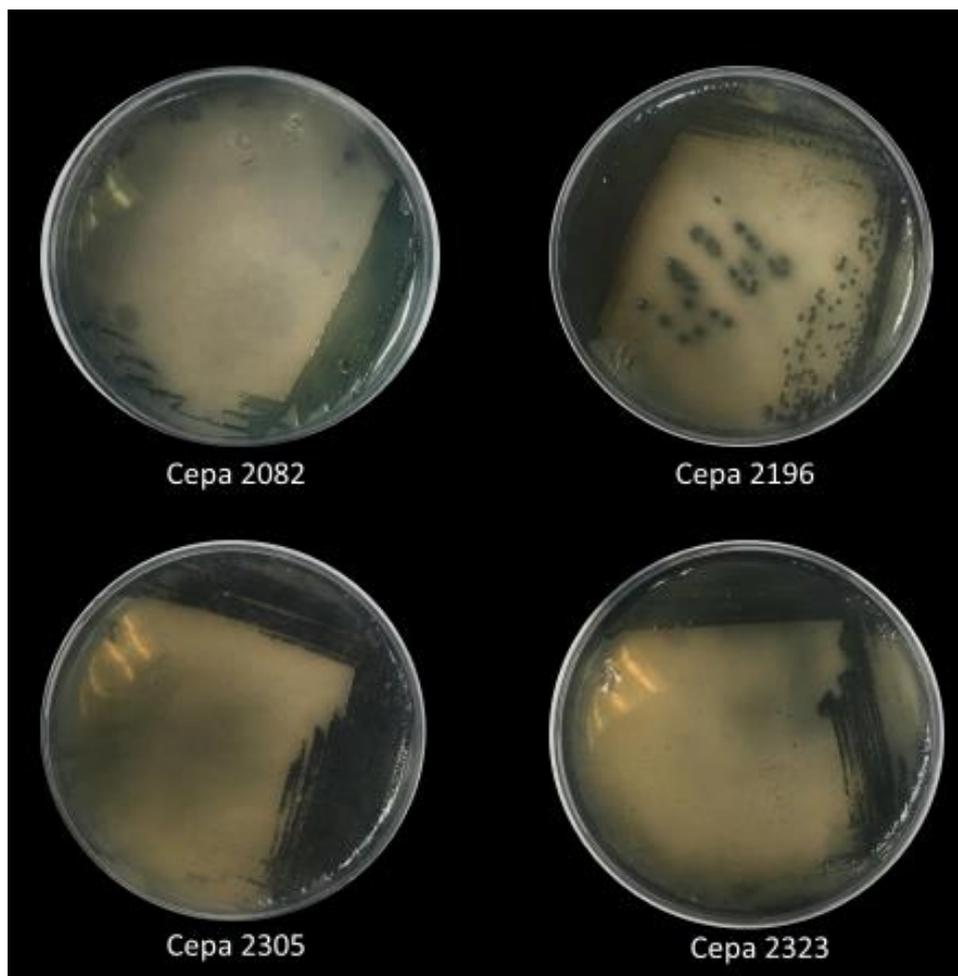


Figura 19. Visualización de cepas productoras de PHB en placa mediante método de Negro Sudán.

Tabla 9. Cepas de *Pseudomonas* con capacidad para formar gránulos intracelulares de PHAs.

Id general	Identidad	Microscopía	Placa
416	<i>Pseudomonas formosensis</i>	+	+
1852	<i>Pseudomonas brenneri</i>	+	-
2005	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-
2072	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+
2082	<i>Pseudomonas putida</i>	+	+
2092	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+
2095	<i>Pseudomonas balearica</i>	+	+
2185	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-
2196	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	+
2229	<i>Pseudomonas mendocina</i>	+	+
2299	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-
2305	<i>Pseudomonas bauzanensis</i>	+	+
2323	<i>Pseudomonas putida</i>	+	+
2437	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-
2443	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	+	-

Teniendo en cuenta todos los resultados mostrados en la Tabla 9, y visualizados en las Figuras 18 y 19, se puede confirmar que las 9 cepas más prometedoras de la colección ensayada (es decir, un 14,8% del total) pertenecieron a las especies *Pseudomonas stutzeri* (2072, 2092 y 2196), *Pseudomonas putida* (2082 y 2323), *Pseudomonas balearica* (2095), *Pseudomonas mendocina* (2229), *Pseudomonas bauzanensis* (2305) y *Pseudomonas formosensis* (416). El análisis estadístico confirma el similar comportamiento de la mayoría de estas cepas, quedando 8 de ellas agrupadas en el mismo clúster, salvo la cepa 2323, dentro del dendograma mostrado en la Figura 20, así como en el análisis de componentes principales (Figura 21), donde se deduce asimismo el mayor poder de detección mediante la primera de las técnicas empleadas (método en placas de medio adicionado con Rojo Nilo), ya que este parámetro aparece con una distribución opuesta al resto.

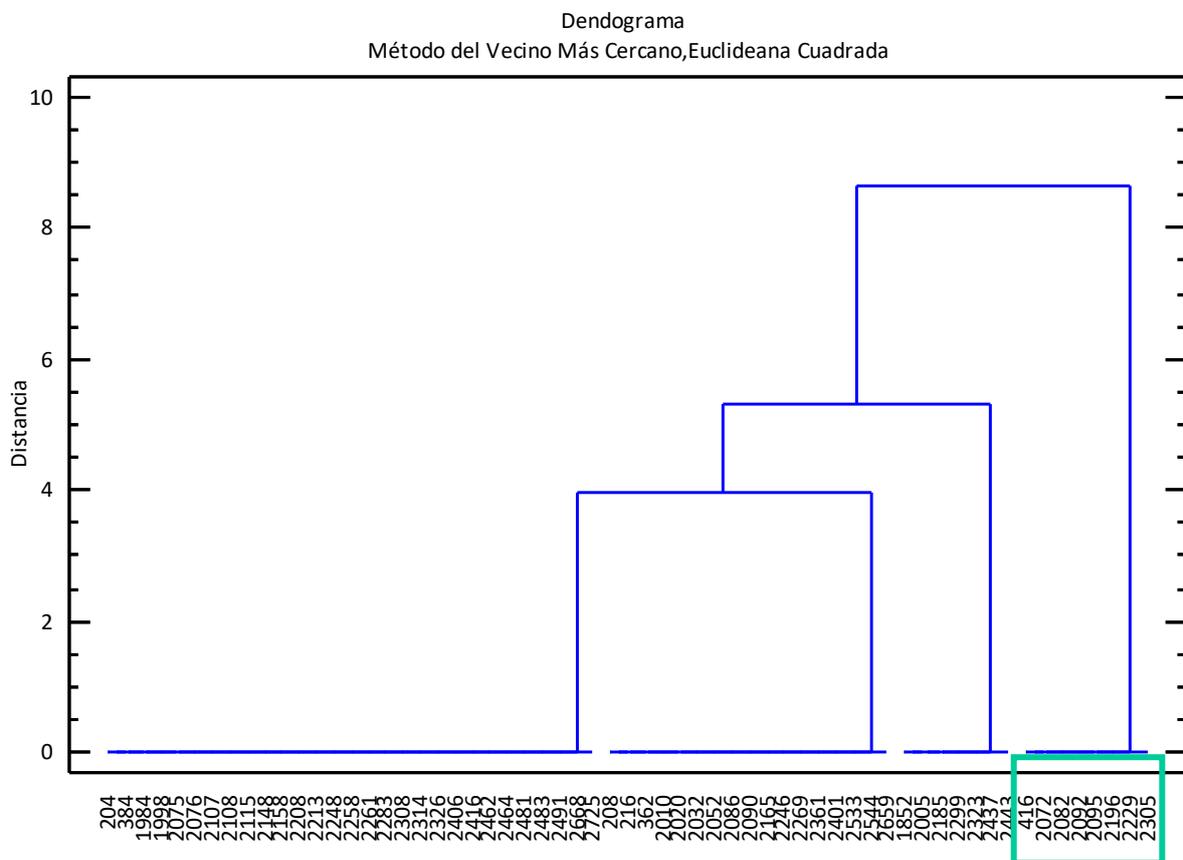


Figura 20. Dendograma en el que se visualizan diferentes agrupaciones de cepas de la colección de *Pseudomonas* estudiada, en función de los resultados mostrados por cada una de ellas en los distintos parámetros estudiados.

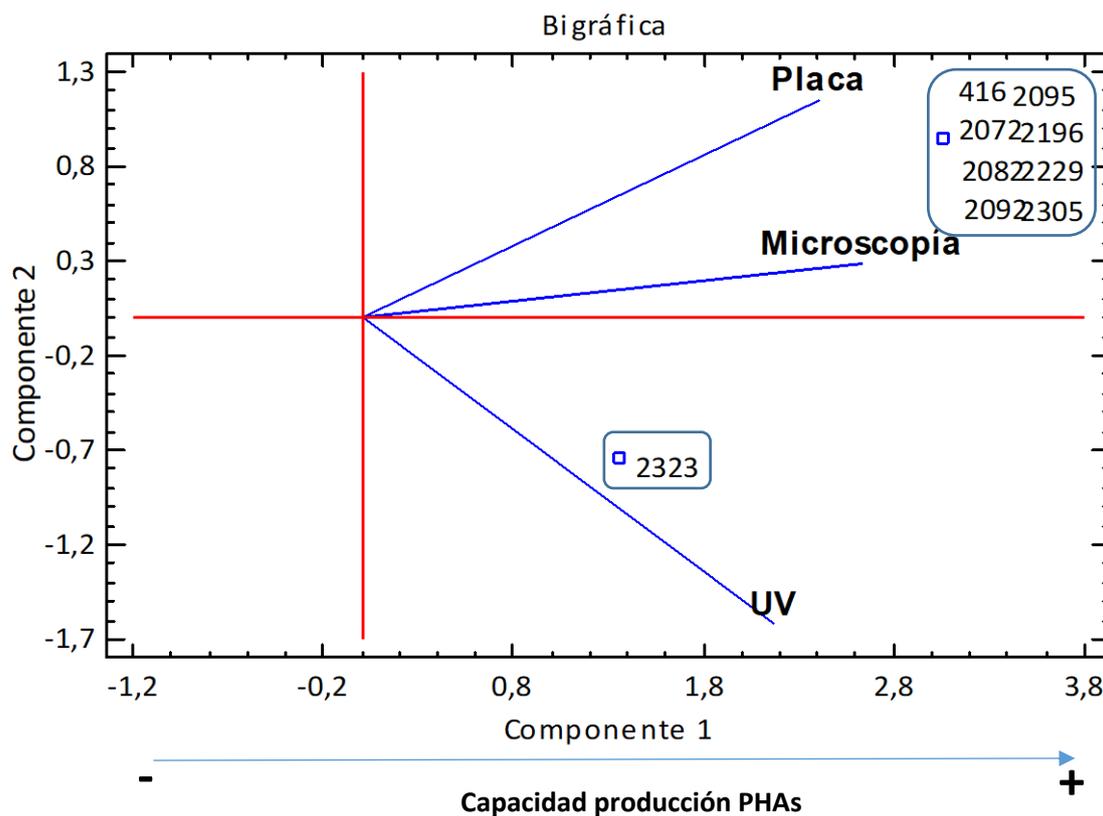


Figura 21. Análisis de Componentes Principales que muestra la distribución de las cepas y de las diferentes variables estudiadas.

Los resultados obtenidos demuestran el potencial de las 9 cepas seleccionadas, no obstante, el uso de las técnicas empleadas, rápidas y sencillas para un primer contacto con la capacidad de la colección de estudio, pueden proveer de resultados “falsos positivos” debido a la inespecificidad de los colorantes tradicionales, que pueden llegar a teñir también lípidos celulares (Sheu *et al.*, 2000), en este caso, y dado que las 9 cepas resultaron positivas en todas las pruebas realizadas, esta no es una posibilidad real. Por otra parte, la producción de PHAs depende de las condiciones nutricionales del medio de crecimiento, especialmente de las relaciones C/N (carbono/nitrógeno) y C/P (carbono/fósforo), de manera que, aunque los genes del operón de biosíntesis de PHAs existan, no logran expresarse, dando lugar a resultados confusos, en este caso, a “falsos negativos” (Solaiman *et al.*, 2000; Shamala *et al.*, 2003). Esta opción sí es probable respecto a las cepas de la colección que no resultaron positivas bien desde el principio o a partir del primer cribado llevado a cabo.

Debido a estos inconvenientes, un complemento interesante en caracterizaciones como la aquí presentada pasaría por la detección directa mediante PCR y secuenciación del gen *phaC* y/o de otros componentes del operón bacteriano, ya que podría ofrecer un mayor soporte a las evaluaciones fenotípicas estudiadas (Sánchez-Moreno *et al.*, 2012).

Debido a las circunstancias acontecidas durante la última etapa de este curso, por la evolución de la pandemia de Covid-19, el desarrollo experimental del presente TFG no pudo culminarse, por lo

que la detección mediante PCR de phaC quedó inacabada. De modo que, basándonos exclusivamente en la bibliografía consultada, así como en base a la identidad de las cepas, podemos afirmar, presuntamente, que las cepas que fueron seleccionadas como potencialmente productoras de PHAs presentaron los genes involucrados en la biosíntesis de dichos polímeros naturales, puesto que el sistema denominado de tipo II para la síntesis de PHAs, consistente en dos genes sintasa (phaC1 y phaC2) separados por el gen que codifica para la despolimerización de PHAs (phaZ), es comúnmente encontrado en bacterias del género *Pseudomonas*. (McCool y Cannon, 2001). Así lo corroboran también las investigaciones llevadas a cabo por Sheu *et al.* (2000), quienes detectaron la presencia de estos genes en cepas de la especie *Pseudomonas putida*. Serrano-Riaño *et al.* (2011) también señalaron la presencia de los ocho residuos conservados para las enzimas sintasas (S229; C287; G290; D319; W388; D442; G469; H470) en el genoma de cepas identificadas como *Pseudomonas fluorescens*. La maquinaria genética, en cuanto a la formación de las sintasas se refiere de esta cepa, es muy similar a las de otras especies empleadas para la producción de PHA utilizadas en cepas recombinantes (Serrano-Riaño *et al.*, 2011).

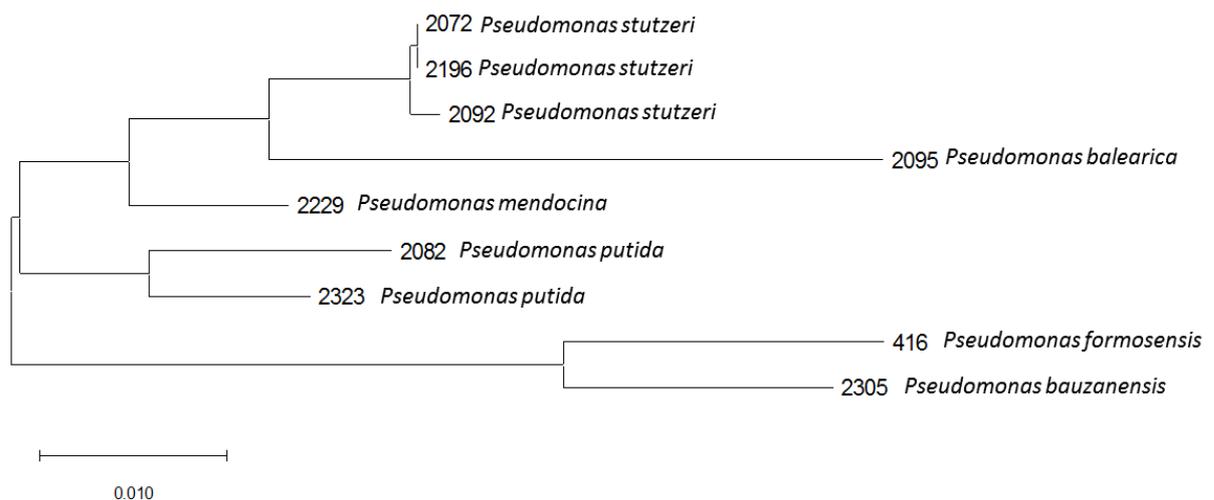


Figura 22. Árbol filogenético elaborado en base a las secuencias en base al gen 16s ribosomal de las 9 cepas preseleccionadas, empleando el método del vecino más cercano.

Teniendo en cuenta la cercanía de las cepas, al fin y al cabo, pertenecientes al mismo género, y los resultados compartidos por todas ellas, en principio no se descartaría ninguna para el ensayo de simulacro de producción de biopolímeros previsto en el siguiente apartado. Aun así, en caso de tener que seleccionar una única bacteria, entre las candidatas más prometedoras estaría la cepa 2305, no sólo por sus llamativos resultados (ver Figura 16, 18 y 19), sino por la novedad de emplear esta cepa como herramienta biotecnológica, ya que pertenece a una especie que no ha sido previamente estudiada como productora de polihidroxialcanoatos. Esta especie ha sido aislada de suelos, especialmente de zonas industriales, cuyas características y contaminación potencial podrían determinar las habilidades adaptativas de este microorganismo y, con ellas, su capacidad para producir

PHAs (Zhang *et al.*, 2011). Asimismo, cualquiera de las cepas identificadas como *Pseudomonas putida*, sería una buena candidata, dados los antecedentes atribuidos a esta cepa (Salvachúa *et al.*, 2020).

3.3. Producción de bioplásticos a partir de cepas de *Pseudomonas*

Teniendo en cuenta las diferentes pruebas realizadas a la colección de *Pseudomonas*, cabría esperar que alguna de las cepas que han dado positivo, sino todas, tuviera la capacidad de producir bioplásticos. No obstante, para comprender los mecanismos moleculares que sustentan esta estrategia desarrollada por los microorganismos para sobrevivir en ambientes cambiantes es conveniente determinar las diferentes condiciones en las que una bacteria sintetiza PHA, además de necesario para optimizar los métodos de producción de bioplásticos competitivos a escala industrial.

Precisamente, empleando el protocolo propuesto en la metodología de este trabajo, Guzmán *et al.* (2017) y García-Chumillas (2019) recuperaron gránulos de biopolímeros a partir de cepas de *Pseudomonas putida*, cuya identidad coincide con dos de las cepas aquí preseleccionadas (2082 y 2323).

Por su parte, Salvachúa *et al.* (2020) mostraron la capacidad de una cepa identificada como *Pseudomonas putida* y autóctona de residuos lignocelulósicos, como los empleados en el proceso de compostaje que sirvió para el aislamiento de las bacterias utilizadas en el desarrollo del presente trabajo, para producir oleoquímicos, por ejemplo, los polihidroxialcanoatos de cadena media, polímeros de interés porque pueden ser utilizados en la producción de plásticos biodegradables, dispositivos médicos y precursores químicos y de materiales. Esto se debe a que estos microbios del suelo albergan de forma constitutiva rutas catabólicas para la conversión de compuestos aromáticos y lignina, recalcitrantes y, por ende, difícilmente degradables, en productos con valor añadido.

En definitiva, la biomasa lignocelulósica no sólo ofrece una fuente de carbono renovable que puede reducir la dependencia de los combustibles fósiles y las emisiones de gases de efecto invernadero, sino que las mejores cepas bacterianas para llevar a cabo dicha tarea son aquellas procedentes de esa misma materia prima, lo cual permite construir una base para una bioeconomía sostenible en la que los residuos son, a su vez, fuente de herramientas biotecnológica útiles y sustrato para emplearlas.

4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permitieron extraer las siguientes conclusiones:

1. El compostaje de residuos lignocelulósicos constituye un ambiente naturalmente enriquecido en microorganismos con interés industrial como las bacterias productoras de gránulos intracelulares de polihidroxicanoatos (PHAs).
2. Las especies del género *Pseudomonas*, *P. stutzeri* (2072, 2092 y 2196), *P. putida* (2082 y 2323), *P. balearica* (2095), *P. mendocina* (2229), *P. bauzanensis* (2305) y *P. formosensis* (416) se presentan como prometedoras candidatas para la obtención de polímeros procedentes de fuentes naturales.
3. Las técnicas de caracterización empleadas determinan la enorme capacidad del género *Pseudomonas* como productor de PHAs, a su vez, confirman la mayor habilidad que unas especies presentan frente a otras.
4. Las cepas del género *Pseudomonas* presentan una diversidad metabólica y capacidad de adaptación que les confiere una ventaja competitiva, así como un amplio interés desde el punto de vista biotecnológico, para ser aplicadas como herramientas en biorrefinerías.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez da Silva, L. 2016. Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxialcanoatos. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Sevilla. Sevilla, España.
- Barboza, L. G. A., Lopes, C., Oliveira, P., Bessa, F., Otero, V., Henriques, B., Raimundo, J., Caetano, M., Vale, C., Guilhermino, L. 2020. Microplastics in wild fish from North East Atlantic Ocean and its potential for causing neurotoxic effects, lipid oxidative damage, and human health risks associated with ingestion exposure. *Science of the total environment* 717, 134625.
- Barboza, L. G. A., Vieira, L. R., Branco, V., Figueiredo, N., Carvalho, F., Carvalho, C., Guilhermino, L. 2018. Microplastics cause neurotoxicity, oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquatic toxicology* 196, 49-57.
- Borrero-de Acuña, J. M., Bielecka, A., Haussler, S., Schobert, M., Jahn. M., Wittman, C., Jahn, D., Poblete-Castro, I. 2014. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microbial cell factories* 13 (88).
- Cardona-Echevarría, A. C., Mora-Martínez, A. L., Marín-Montoya, M. 2013. Molecular identification of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria isolated from dairy and sugarcane residues. *Revista facultad nacional de agronomía Medellín* 66 (2), 7129-7140.
- Cerrone, F. 2011. Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alperujo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Granada, España.
- Choi, S. Y., Cho, I. J., Lee, Y., Kim, Y-J., Kim, K-J., Lee, S. Y. 2020. Microbial polyhydroxyalkanoates and nonnatural polyesters. *Advanced materials*, e1907138.
- Choo, K., Ching, Y. C., Chuah, C. H., Julai, S., Liou, N. S. 2016. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-chitosan composite films reinforced with cellulose nanofiber. *Materials* 9 (8), 644.
- Confente, I., Scarpi, D., Russo, I. 2020. Marketing a new generation of bio-plastics products for a circular economy: the role of green self-identity, self-congruity, and perceived value. *Journal of business research* 112, 431-439.
- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borrero, J. C., Galgani, F., Ryan, P. G., Reisser, J. 2014. Plastic Pollution in the World's Oceans: more than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *Plos one* 9 (12), e111913.
- Erren, T., Zeuss, D., Steffany, F., Meyer-Rochow, B. 2009. Increase of wildlife cancer: an echo of plastic pollution?. *Nature reviews cancer* 9 (11), 517–526.
- European Bioplastics. 2020. Bioplastics market data 2019. Recuperado de <https://www.european-bioplastics.org/news/publications/>. Consultado en mayo 2020.

- FAO (Food and Agriculture Organization). 2019. Los microplásticos en los sectores de pesca y acuicultura. Recuperado de <http://www.fao.org/3/ca3540es/ca3540es.pdf>. Consultado en abril 2020.
- Flores-Vásquez, A. P., Idrogo-Baigorria, E. 2015. Rendimiento de polihidroxicanoatos, PHA, de bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambayeque, 2014. Tesis Doctoral. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque, Perú.
- Foster, L., Saufi, A., Holden, P. 2001. Environmental concentrations of polyhydroxyalkanoates and their potential as bioindicators of pollution. *Biotechnology Letters* 23, 893-898.
- Gañán, P., Zuluaga, R., Castro, C., Restrepo, A., Velásquez, J., Osorio, M., Montoya, U., Vélez, L., Álvarez, C., Correa, C., Molina, C. 2017. Celulosa: un polímero de siempre con mucho futuro. *Revista colombiana de materiales (Simposio Nacional de Biopolímeros)*, 01-04.
- García-Chumillas, S. 2019. Producción de biopolímeros a partir de residuos Trabajo Fin de Grado. Universidad de Almería. Almería, España.
- Geyer, R., Jambeck, J. R., Law, K. L. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science advances* 3 (7), e1700782.
- González-García, Y., Meza-Contreras, J. C., González-Reynoso, O., Cordova-López, J. A. 2013. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental* 29 (1), 77-115.
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreno, C., Caos, I. 2017. Production of polyhydroxyalkanoates by native halophilic bacteria using *Solanum tuberosum* L. shell starch. *Scientia agropecuaria* 8 (2), 109-118.
- Hwang, K. R., Jeon, W., Lee, S. Y., Kim, M. S., Park, Y. K. 2020. Sustainable bioplastics: Recent progress in the production of bio-building blocks for the bio-based next-generation polymer PEF. *Chemical engineering journal* 390, 124636.
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., Law, K. L. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347 (6223), 768-771.
- Janshekar, H., Haltmeier, R., Brown, C. 1982. Fungal degradation of pine and straw alkali lignins. *European journal of applied microbiology and biotechnology* 14 (3), 174-181.
- Kalia, V. C. 2019. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Springer Nature. Singapur.
- Kaur, L., Khajuria, R., Parihar, L., Singh, G. D. 2017. Polyhydroxyalkanoates: biosynthesis to commercial production - a review. *Journal of microbiology biotechnology and food sciences* 6 (4), 1098-1106.
- Kunasundari, B., Sudesh, K. 2011. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express polymer letters* 5 (7), 620-634.

- Labuzek, S., Radecka, I. 2001. Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85.J. Applied Microbiology 90, 353-357.
- Lathwal, P., Nehra, K., Singh, M., Jamdagni, P., Rana, J. S. 2015. Optimization of culture for maximum polyhydroxybutyrate production by selected bacterial strains isolated from rhizospheric soils. Polish journal of microbiology 64 (3), 227-239.
- Lebreton, L. C. M., Van der Zwet, J., Damsteeg, J. M., Slat, B., Andrady, A., Reisser, J. 2017. River plastic emissions to the world's oceans. Nature communications 8, 15611.
- Lemos, A.C., Mina, A. 2015. Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. Informador Técnico (Colombia) 79 (1), 93-101.
- Li, Z. B., Yang, J., Loh, X. J. 2016. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. NPG Asian Materials 8, e265.
- López, O. V., Castillo, L. A., Farenzena, S., Pintos, E., Rodriguez, M. S., Garcia, M. A., Villar, M. A. 2018. Biodegradable films based on thermoplastic starch and chitosan with antimicrobial activity employed as active packaging. Matéria (Rio de Janeiro) 23 (2), e12088.
- Lule, Z. C., Shiferaw, E. W., Kin, J. 2020. Thermomechanical properties of SiC-filled polybutylene succinate composite fabricated via melt extrusion. Polymers 12 (2), 418.
- McCool, G. J., Cannon, M. C. 2001. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. Journal of bacteriology 183(14), 4235-43.
- Mozejko-Ciesielska, J., Szacherska, K., Marciniak, P. 2019. *Pseudomonas* species as producers of eco-friendly Polyhydroxyalkanoates. Journal of polymers and the environment 27 (6), 1151-1166.
- Muhammadi, Shabina, Afzal, M., Hameed, S. 2015. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. Green chemistry letters and reviews 8 (3-4), 56-77.
- Nagarajan, V., Mohanty, A. K., Misratt, M. 2016. Perspective on Polylactic Acid (PLA) based Sustainable Materials for Durable Applications: Focus on Toughness and Heat Resistance. ACS sustainable chemistry & engineering 4 (6), 2899-2916.
- Narancic, T., Cerrone, F., Beagan, N., O'Connor, K. E. 2020. Recent advances in bioplastics: application and biodegradation. Polymers 12 (4), 920.
- Nguyen, T. K. C., Nguyen, D. M., Trinh, V. T., Tran, T. P. D., Cao, T. P. 2020. Factors affecting intention to purchase green products in Vietnam. Journal of Asian economics and business 7 (4), 205-211.
- Ostle, A. G., Holt, J. G. 1982. Nile Blue- a as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. Applied and environmental microbiology 44 (1), 238-241.

- Otero-Ramírez, I. D., Fernández-I., P. 2013. Bioprospección de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA's) en el departamento de Nariño. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial* 11, 12-20.
- PlasticsEurope. 2019. *Plastics – The Facts 2019*. Recuperado de <https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>. Consultado en abril 2020.
- Raza, Z. A., Abid, S., Banat, I. M. 2018. Polyhydroxyalkanoates: characteristics, production, recent developments and applications. *International biodeterioration & biodegradation* 126, 45-46.
- Rex, E., Baumann, H. 2007. Beyond ecolabels: what green marketing can learn from conventional marketing. *Journal of cleaner production* 15 (6), 567-576.
- Salvachúa, D., Rydzak, T., Auwae, R., De Capite, A., Black, B. A., Bouvier, J. T., Cleveland, N. S., Elmore, J. R., Furches, A., Huenemann, J. D., Katahira, R., Michener, W. E., Peterson, D. J., Rohrer, H., Vardon, D. R., Beckham, G. T., Guss, A. M. 2020. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for increased polyhydroxyalkanoate production from lignin. *Microbial biotechnology* 13, 290-298.
- Sánchez-Moreno, S. A., Marín-Montoya, M. A., Mora-Martínez, A. L., Yepes-Pérez, M, S. 2012. Identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista colombiana de biotecnología* 14 (2), 89-100.
- Serrano-Riaño, J., Sastoque-Rivera, L. A., Montoya-Castaño, D., Moreno-Sarmiento, N. 2011. Análisis de las polihidroxicanoato sintasas (PhaC1 y PhaC2) en una cepa de *Pseudomonas fluorescens* IBUN S1602, aislada en suelos colombianos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13 (2).
- Shamala, T. R., Chandrashekar, A., Vijayendra, S. V. N., Kshama, L. 2003. Identification of polyhydroxyalkanoate (PHA)-producing *Bacillus* spp. using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of applied microbiology* 94 (3), 369-374.
- Shamsuri, A. A., Jamil, S. N. A. M. 2020. Compatibilization effect of ionic liquid-based surfactants on physicochemical properties of PBS/rice starch blends: an initial study. *Materials (Basel)* 13 (8), 1885.
- Shen, M. C., Zeng, G. M., Zhang, Y. X., Wen, X. F., Song, B., Tang, W. W. 2019. Biodegradability of Plastics. Can biotechnology strategies effectively manage environmental (micro) plastics?. *Science of the total environment* 697, 134200.
- Sheu, D. S., Wang, Y. T., Lee, C. Y. 2000. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiology-UK* 146, 2019-2025.
- Smith, M., Love, D. C., Rochman, C. M., Neff, R. A. 2018. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Current environmental health reports* 5 (3), 375-386.

- Solaiman, D. K. Y., Ashby, R. D., Flogia, T. A. 2000. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Applied microbiology and biotechnology* 53 (6), 690-694.
- Subin, R., Bhat, S. G. (2014) Bacterial Polyhydroxyalkanoates production and its applications. En: Bhat, S. G., Nambisan, P. (Eds), *Microbial Bioproducts*. pp 70–96. Directorate of Public Relations and Publications for Department of Biotechnology, Kochi University of Science and Technology. Cochín, India.
- Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S., Swan, S. H. 2009. Plastics, the environment and human health. *Philosophical transactions of the royal society b-biological sciences* 364 (1526), 2153-2166.
- Tokiwa, Y., Calabia, B. P., Ugwu, C. U., Aiba, S. 2009. Biodegradability of plastics. *International Journal of molecular sciences* 10 (9), 3722-3742.
- Wang, Y. L., Lee, Y. H., Chiu, I. J., Lin, Y. F., Chiu, H. W. 2020. Potent impact of plastic nanomaterials and micromaterials on the food chain and human health. *International journal of molecular sciences* 21 (5), 1727.
- Worm, B., Lotze, H. K., Jubinville, I., Wilcox, C., Jambeck, J. 2017. Plastic as a persistent marine pollutant. *Annual Review of Environment and Resources* 42, 1-26.
- Zhang, D-C., Liu, H-C., Zhou, Y-G., Schinner, F., Margesin, R. 2011. *Pseudomonas bauzanensis* sp. nov., isolated from soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 61, 2333-2337.
- Zheng, Y., Chen, J. C., Ma, Y. M., Chen, G. Q. 2020. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering* 58, 82-93.