



ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar

ISSN: 0138-6204

revista@icidca.edu.cu

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar  
Cuba

Bello Gil, Daniel; Brandl, Helmut

Selección de bacterias productoras de Poli-hidroxibutirato

ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XLI, núm. 2, 2007, pp. 10-18

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar

Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223114970003>

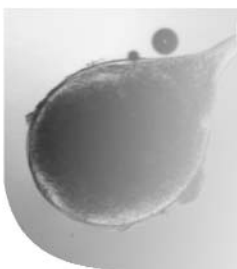
- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



## Selección de bacterias productoras de Poli-hidroxibutirato

Daniel Bello Gil<sup>1</sup> y Helmut Brandl<sup>2</sup>

1. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)  
e.mail: daniel.bello@icidca.edu.cu
2. Instituto de Ciencias Medioambientales, Universidad de Zurich, Suiza

### RESUMEN

*Se propone una metodología para seleccionar bacterias productoras de Poli-hidroxibutirato (PHB). Se evaluó la capacidad de almacenar PHB como material de reserva en cepas pertenecientes a los géneros de Bacillus, Pseudomonas, Rhizobium y Azospirillum. Se utilizaron medios sólidos con altas relaciones C/N y previo a la inoculación de las placas se le añadió a las mismas Nilo Rojo, en DMSO, a una concentración final de 0,5 µg/ml. Después de 5 días de cultivo a 30 °C, 10 cepas emitieron fluorescencia bajo Lámpara UV (λ excit. 312 nm) como resultado de la combinación del colorante con los polímeros de PHB. Se verificó la producción de PHB en cultivo líquido utilizando microscopía de fluorescencia y se cuantificaron los niveles de acumulación del polímero por HPLC. Cuatro cepas del género Bacillus acumularon significativas cantidades del polímero (% de PHB/Peso seco): Bacillus subtilis 23444: 50.6, Bacillus licheniformis 23263: 29.6, Bacillus licheniformis 23264: 34.8 y Bacillus megaterium: 26.8.*

**Palabras clave:** poli-hidroxibutirato, PHB, polímeros de reserva, selección de bacterias, Bacillus, reacciones de tinción, Nilo Rojo

### ABSTRACT

*A methodology for selecting Poly-hydroxybutyrate-producing bacteria is proposed. Various strains of Bacillus, Pseudomonas, Rhizobium, and Azospirillum were screened for their ability to form the intracellular storage polymer polyhydroxybutyrate (PHB). Solid media with high C/N ratios were used. Nile red dye (in DMSO; final concentration 0.5 µg/ml), was directly added to agar plates prior to inoculation. After 5 days of culture at 30 °C, 10 strains emitted fluorescence under UV lamp (λ excitation at 312 nm) as a result of the combination of the dye with the PHB. In liquid cultures, PHB formation was determined qualitatively by fluorescence microscopy and quantitatively by HPLC. Significant amounts of PHB were mainly formed by Bacillus strains (in % of dry weight):*

*Bacillus subtilis* 23444: 50.6, *Bacillus licheniformis* 23263: 29.6, *Bacillus licheniformis* 23264: 34.8 y *Bacillus megaterium*: 26.8.

**Key words:** *poly-hydroxybutyrate*, PHB, storage polymers, screening of bacteria, *Bacillus*, staining reactions, Nile Red

## INTRODUCCIÓN

La década de 1940 significó el despegue en la industria de los plásticos sintéticos, desplazando así al metal, el vidrio y la madera de varias aplicaciones industriales, domésticas y medioambientales. Su estructura estable, aceptables propiedades térmicas y mecánicas, y bajos costos de producción han garantizado su permanencia en el mercado mundial. La durabilidad de los plásticos sintéticos en el medio ambiente y el aumento de los desechos sólidos producto del desarrollo de las sociedades de consumo están generando grandes problemas medioambientales [1]. La acumulación de plásticos sintéticos en basureros genera emisiones de gases tóxicos, epidemias y constituye un problema estético para muchas ciudades. Por otra parte, los plásticos convencionales son producidos a partir de reservas fósiles de energía, las cuales se agotan progresivamente. Un por ciento de los plásticos sintéticos puede reciclarse, lo cual genera emisiones de gases tóxicos de efecto invernadero [1].

Consecuentemente, existe un marcado interés científico en el desarrollo de plásticos biodegradables a partir de fuentes renovables de energía, con el objetivo fundamental de sustituir a los plásticos convencionales en aplicaciones de vida corta. Las altas de biodegradabilidad de estos plásticos (6-12 meses), en ambientes biológicamente activos los hacen una alternativa ecológicamente viable. Su descomposición por microorganismos incorpora al medio ambiente sustancias que no son nocivas a éste: agua, dióxido de carbono y humus [2].

El principal problema que afronta en la actualidad la producción de este tipo de polímero es su alto costo de producción (10-15 USD/Kg). Una alternativa que ha contribuido a disminuir estos costos la constituye la utilización de biomasa renovable y de los

"residuos" agroindustriales. Los residuos agrícolas de la industria azucarera y alimenticia constituyen la opción de suministro más prometedora; no sólo son baratos, sino que su conversión resuelve problemas medioambientales, convirtiendo "desechos" en productos útiles [3].

Con estas características se han descrito los siguientes plásticos biodegradables: poli-hidroxiclcanoatos (PHAs), poli-lactatos (PLA), poliésteres alifáticos, polisacáridos y los copolímeros resultantes de sus mezclas. De éstos, los PHAs son uno de los que más actividad investigativa generan en la actualidad.

### Poli-hidroxiclcanoatos

Los Poli-hidroxiclcanoatos son polímeros biodegradables de naturaleza lipídica que se acumulan en el citoplasma de algunos microorganismos cuando éstos son sometidos a ciertas condiciones de cultivo [2,3]. Los mismos son el producto de la polimerización/condensación de unidades monoméricas que difieren en el número de átomos de carbono de la cadena principal y en la naturaleza de radicales sustituidos en la misma. Se ha descrito que estos gránulos intracelulares funcionan como almacén energético para la célula, que lo puede reconvertir en material carbonado cuando las condiciones ambientales varían [3].

La mayoría de los PHAs están compuestos por ácidos R(-)-3- hidroxiclcanoicos (C3-C14) como unidad repetitiva. Hasta el momento se han descrito más de cien unidades monoméricas. La forma más simple y estudiada de los PHAs es el poli b-hidroxibutirato, o PHB. El PHB fue descrito por primera vez en 1923 por Maurice Lemoigne. Más tarde, Lemoigne caracterizó químicamente el PHB y observó que estaba involucrado en la esporulación de algunos bacilos [2,3].

El PHB, además de poseer elevadas tasas de biodegradabilidad, ha resultado ser un

termoplástico con propiedades físico-mecánicas muy similares a las reportadas para poliésteres producidos a partir de petroquímicos como el polipropileno [3].

En la actualidad, varias compañías extranjeras comercializan el PHB o la mezcla de este con otros polímeros. La compañía inglesa ICI (del inglés: Imperial Chemical Industries) produce BIOPOL (mezcla de Butirato con Valerato) a partir de azúcar de remolacha con un costo de producción aproximado de 10-15 USD/ Kg de plástico [3]. Los brasileños también le han apostado a la producción de PHB invirtiendo 14 millones de USD en el 2002 para la construcción de PHB Industrial S.A. En sus inicios, la fábrica tenía una capacidad de producción de 60 t anuales de Biocycle a partir de sacarosa de caña de azúcar. El costo promedio de su producción era de 5 USD/Kg de plástico. Para el 2008 aumentarán sus capacidades de producción de PHB hasta 10 000 t anuales con la habilitación de una nueva planta [4].

El principal problema para la producción de estos plásticos sigue siendo sus altos costos de producción, teniendo en cuenta que la producción de los plásticos convencionales a partir de petroquímicos no supera 1USD/Kg de plástico [2,3]. Es por esto, que la mayoría de la actividad de investigación sobre el tema que se discute esta dirigida a la reducción de los costos de producción de los plásticos biodegradables. Para esto, la comunidad científica internacional ha enfocado sus investigaciones en tres líneas fundamentales: la búsqueda de nuevas cepas salvajes capaces de acumular mayores niveles de PHB, el desarrollo de procesos fermentativos más eficientes utilizando materias primas más baratas y la implementación de procesos de recobrado del polímero más sencillos y económicos.

El presente trabajo considera estas líneas de trabajo y específicamente tiene como objetivo el aislamiento de cepas bacterianas salvajes que acumulen elevados niveles de PHB en el citoplasma.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Varias cepas de los géneros de *Bacillus* (10), *Pseudomonas* (4), *Rhizobium* (2), y

*Azospirillum* (2) provenientes de la colección del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) y del Instituto de Ciencias Medioambientales de la Universidad de Zurich fueron utilizadas para determinar sus capacidades para acumular PHB como polímero de almacenamiento celular.

### Medios para el crecimiento y conservación

#### • Medio Manitol

Manitol 10 g/L  
Extracto de levadura 1g/L  
Agar 15 g/L  
pH 7.0 ± 0.1

#### • Caldo nutriente

Peptona 5 g/L  
Extracto de levadura 2 g/L  
NaCl 5 g/L  
Extracto de carne 1g/L  
Agar 15 g/L  
pH 7.0 ± 0.1

Las cepas fueron cultivadas en placas a 30 °C por 24 h y conservadas a 4 °C durante 6 meses. Para la preparación de los inóculos se tomaron dos asas de microorganismos de las placas conservadas a 4 °C y se transfirieron a los medios líquidos. Los inóculos se cultivaron en Erlenmeyer (250 ml) con un volumen de trabajo de 50 ml.

### Medios para la producción de PHB

Los siguientes medios fueron utilizados para promover la producción de PHB en placas o cultivos líquidos:

#### Medio 1 [5]

Sacarosa 20 g/L  
(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g/L  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1g/L  
MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L  
CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.02 g/L  
FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L  
Agar 15 g/L  
pH 7.0 ± 0.1

#### Medio 2 [6]

Glucosa 10 g/L  
MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L  
CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.07 g/L  
FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L  
EDTA 0.01 g/L  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.6 g/L  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.9 g/L

Extracto de Levadura 1.0 g/L  
Agar 15 g/L  
pH 7.0  $\pm$  0.1

#### **Medio 3 [7]**

Fructosa 20 g/L  
NH<sub>4</sub>Cl 0.5 g/L  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.3 g/L  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.3 g/L  
MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L  
NaHCO<sub>3</sub> 0.5 g/L  
Cittrato Férrico 0.05 g/L  
CaCl<sub>2</sub> 0.01 g/L  
Agar 15 g/L  
pH 7.0  $\pm$  0.1

#### **Medio 4 [8]**

Glucosa 20 g/L  
MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.4 g/L  
CaCl<sub>2</sub> 0.11 g/L  
FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.012 g/L  
Na MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.01g/L  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g/L  
NaCl 0.4 g/L  
Agar 15 g/L  
pH 7.0  $\pm$  0.1

#### **Medio 5 [9]**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 6.7 g/L  
NaCl 10 g/L  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/L  
NH<sub>4</sub>Cl 0.1 g/L  
MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/L  
CaCl<sub>2</sub> 0.01 g/L  
Cittrato ferroso de amonio 0.06 g/L  
Agar 15 g/L  
pH 7.0  $\pm$  0.1

#### **Medio 6 Glucosa-Caldo nutriente [10]**

Glucosa 10 g/L  
Peptona 2.5 g/L  
Extracto de levadura 1.0 g/L  
NaCl 2.5 g/L  
Extracto de carne 0.5 g/L  
Agar 15 g/L.  
pH 7.0  $\pm$  0.1

### **Detección cualitativa de la producción de PHB**

#### *Procedimiento de tinción en placas*

Los colorantes lipofílicos Nilo Azul A y su oxazona fluorescente Nilo Rojo, fueron usados para desarrollar un simple y sensible método de tinción para detectar Ácido Polihidroxibutírico en colonias bacterianas en

crecimiento. Los colorantes se disolvieron en DMSO y fueron directamente adicionados al medio fundido previo a la inoculación a una concentración final en el medio de 0.5 µg/ml [11]. Las cepas fueron "plaqueadas", crecidas por 5 días a 30°C y la fluorescencia resultante fue visualizada bajo Lámpara UV ( $\lambda$ excit. 312 nm). Las cepas que mostraron fluorescencia como resultado de la posible combinación de los colorantes con material lipofílico fueron seleccionadas como cepas positivas para la producción de PHB.

#### *Tinción en medios líquidos. Microscopía de Fluorescencia*

- Se toman 100 µl de cultivo líquido y se adicionan 100 µl del colorante Nilo Azul en DMSO a una concentración final de 2 µg/ml.
- Se agita en Vortex 1 min.
- Se incuba a 55 °C, 30 min.

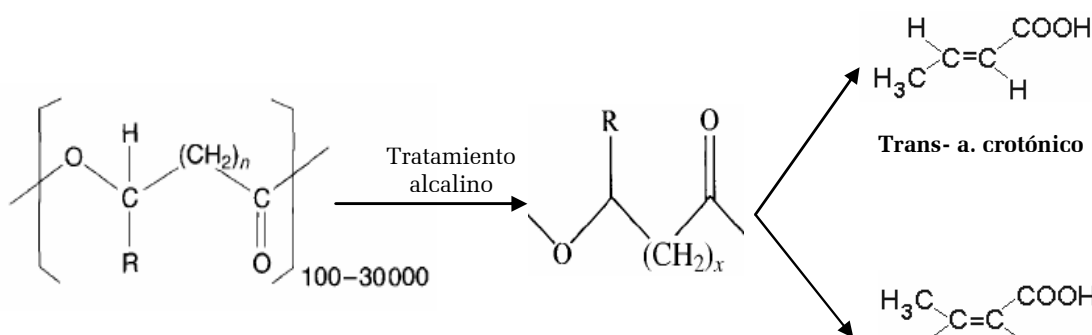
Los cuerpos de inclusión fueron visualizados, con un aumento de 1000 X bajo luz fluorescente, como gránulos naranjas brillantes (550 nm para la excitación y 580 nm para la emisión) [6].

### **Cuantificación de la producción de PHB**

#### *Preparación de las muestras para HPLC (tratamiento alcalino)*

El tratamiento alcalino rompe el polímero de PHB en unidades pequeñas de hidroxibutirato (Figura 1). Bajo estas condiciones, las unidades monoméricas continúan su oxidación hasta rendir ácido crotónico que tiene un máximo de absorción a los 210 nm [12].

- Muestras de 2 ml de cultivos líquidos fueron congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas
- Se pesaron 5-10 mg de células liofilizadas y se le adicionó 0.5 ml de NaOH 2N
- Se incubaron las muestras a 100 °C durante 30 min y cada 10 min se agitaron en Vortex por 30 segundos
- Las muestras se enfriaron en hielo y posteriormente se neutralizaron con 0.5 ml de HCl 2N
- Se agitaron en Vortex por 30 segundos y se centrifugaron a 1000 rpm por 30 min.
- Se tomaron los sobrenadantes y se filtraron por filtros de Nylon de 0.45 µm



**Figura 1.** Tratamiento alcalino practicado a las muestras liofilizadas. Los polímeros de PHB se rompen y las unidades monoméricas se oxidan hasta ácido crotonico

**Tabla 1.** Crecimiento y emisión de fluorescencia bajo lámpara UV (  $\lambda_{excit.}$  312 nm) en medios sólidos con altas relaciones C/N

Cepa	Crecimiento en medios con alta relación C/N	Fluorescencia bajo UV_Lamp ( $\lambda_{excit.}$ 312 nm)
<i>Bacillus subtilis</i> 23441, Cuba	Si	No
<i>Bacillus subtilis</i> 23442, Cuba	Si	No
<i>Bacillus subtilis</i> 23443, Cuba	Si	No
<i>Bacillus subtilis</i> 23444, Cuba	Si	Si
<i>Bacillus subtilis</i> 23445, Cuba	No	No
<i>Bacillus subtilis fitasa</i> , China	Si	No
<i>Bacillus licheniformis</i> 23263, Cuba	Si	Si
<i>Bacillus licheniformis</i> 23 264, Cuba	Si	Si
<i>Bacillus cereus</i> , Cuba	Si	No
<i>Bacillus megaterium</i> , Suiza	Si	Si
<i>Pseudomonas</i> G1, México	Si	Si
<i>Pseudomonas</i> G2, México	Si	Si
<i>Pseudomonas</i> G3, México	Si	Si
<i>Pseudomonas</i> G4, México	Si	Si
<i>Rhizobium</i> sp., Cuba	Si	Si
<i>Rhizobium tropici</i> 3, UH Cuba	Si	Si
<i>Azospirillum</i> 8i, Cuba	Si	No
<i>Azospirillum</i> cd, Cuba	No	No

#### Condiciones para HPLC

- Columna: Fast Acid 10 cm (Biorad)  
Tamaño 2.0 x 60 mm  
Flujo 1,2 ó 1,5 ml/min  
Tamaño de partícula: 5.0  $\mu$ m  
Temperatura: 40 ° C
- Eluente: Ácido Sulfúrico 5 mM.
- Detector UV-VIS, 210 nm

La calibración fue llevada a cabo usando ácido crotonico comercial. Se utilizó PHB comercial de Aldrich® como patrón para cuantificar los niveles de PHB en las muestras. Al patrón de PHB se le realizó el mismo tratamiento que a las muestras [12].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

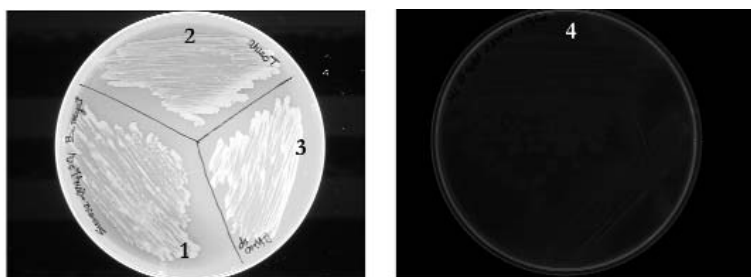
La utilización de medios sólidos que contienen colorante Nilo Rojo es un procedimiento conveniente cuando se quieren seleccionar cepas productoras de PHB partiendo de un número elevado de microorganismos. El procedimiento de tinción con Nilo Rojo es económico, rápido y fácil de realizar. Usando esta metodología y después de 5 días de cultivo a 30 °C se observó emisión de fluorescencia bajo Lámpara UV en 10 de las 18 cepas bacterianas utilizadas. (tabla 1).

Se comprobó que el Nilo Rojo no afectó el crecimiento de las bacterias a la concentración que fue utilizada en el medio (0.5 µg/ml). Spiekerman y colaboradores (1999) reportaron el procedimiento de tinción con Nilo Rojo para bacterias Gram negativas [11]. Sin embargo, en este trabajo se demuestra que el procedimiento de tinción ensayado es también efectivo para bacterias Gram positivas. En adición se utilizó la oxazina Nilo Azul para desarrollar el procedimiento de tinción. La intensidad de la fluorescencia fue menor, dificultando el procedimiento de selección (resultados no mostrados). Este resultado fue obtenido también por Spiekerman y colabo-

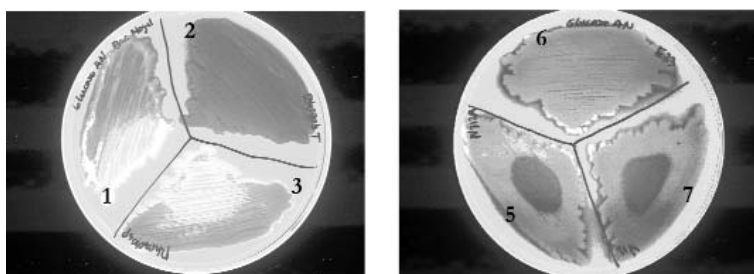
radores, los cuales necesitaron incrementar la concentración del Nilo Azul en el medio para poder detectar producción de PHB por emisión de fluorescencia bajo Lámpara UV [11].

También Spiekerman y colaboradores describen que usando el procedimiento de tinción con Nilo Rojo es posible detectar la producción de PHB en las células después de un período de incubación de 48 h [11]. Sin embargo, en nuestros ensayos detectamos fluorescencia sólo a partir del quinto día de incubación (Figura 2). Además, se comprobó que concentraciones mayores de Nilo Rojo en los medios de cultivo (1.0 µg/ml) no afectaron el crecimiento de los microorganismos.

#### Medio Sacarosa-Amonio



#### Medio Glucosa-AN



1. *Bacillus megaterium*
2. *Rhizobium tropici* 3
3. *Rhizobium* sp.
4. *Bacillus subtilis* 23 441
5. *Pseudomonas* G1
6. *Pseudomonas* G2
7. *Pseudomonas* G3

**Figura 2.** Emisión de fluorescencia bajo Lámpara UV (lexcit. 312 nm) producto de la combinación del Nilo Rojo con el PHB. Se emplearon medios con elevada relación C/N

**Tabla 2.** Análisis cualitativo del crecimiento (visual) y de la producción de PHB por Microscopía de Fluorescencia (ëexcitación 550 nm, ëemisión 580 nm).

Cepa	Crecimiento visual (medios con ↑ C/N)	Emisión de Fluorescencia (naranja brillante)
<i>Bacillus subtilis</i> 23444, Cuba	Si	Si
<i>Bacillus licheniformis</i> 23 263, Cuba	Si	Si
<i>Bacillus licheniformis</i> 23 264, Cuba	Si	Si
<i>Bacillus megaterium</i> , ZH	Si	Si
<i>Pseudomonas</i> G1, Cuba	Si	No
<i>Pseudomonas</i> G2, Cuba	Si	No
<i>Pseudomonas</i> G3, Cuba	Si	No
<i>Pseudomonas</i> G4, Cuba	Si	No
<i>Rhizobium tropici</i> 3, UH, Cuba	Si	Si
<i>Rhizobium</i> sp., Cuba	Si	No

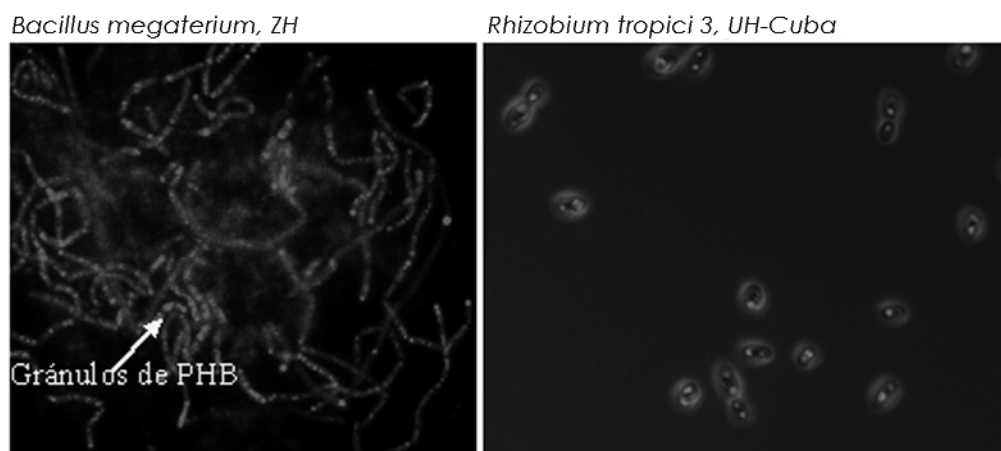
Seis medios diferentes descritos en la literatura fueron utilizados para promover la producción de PHB [5-10]. Solamente se observó emisión de fluorescencia en dos de los medios ensayados: Medio 1 y Medio 6 [5,10]. Cuando se trabajó con el medio libre de nitrógeno no hubo producción de PHB. Con relación a esto, Berlanga y colaboradores sí lograron detectar producción de PHB utilizando este tipo de medio [9].

Las 10 cepas que resultaron positivas después de la selección por tinción fueron cultivadas en medio líquido. Los medios 1 y 6 fueron utilizados con este objetivo. El análisis cualitativo de la producción de PHB por microscopía de fluorescencia se muestra en la tabla 2.

Los polímeros de PHB se pudieron observar por Microscopía de Fluorescencia como gránulos citoplasmáticos de color naranja bri-

llante (Figura 3). Se utilizó como colorante para la tinción de los gránulos de PHB el Nilo Azul en lugar del Nilo Rojo. El Nilo Rojo produjo una fuerte interferencia a las concentraciones ensayadas; lo que imposibilitó detectar, visualmente, la producción del polímero.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Microscopía de Fluorescencia la selección de bacterias productoras de PHB en placas con el colorante lipofílico Nilo Rojo generó resultados falsos positivos. Las cuatro cepas de *Pseudomonas* no parecen ser productoras de PHB bajo las condiciones ensayadas. Está descrito en el Manual de Bergey que algunas especies de *Pseudomonas* que producen pigmentos fluorescentes no tienen la capacidad de acumular PHB en su interior [10]. Es posible que estas *Pseudomonas* bajo las condiciones ensayadas produzcan metabolitos fluorescentes del tipo pioverdin, piochelin, que pue-



**Figura 3.** Microscopía de Fluorescencia practicada a células de *Bacillus megaterium* y *Rhizobium Tropici 3* cultivadas en medios líquidos que promueven la producción de PHB. Los gránulos de PHB se observan como pequeños puntos de fluorescencia naranja brillante en el interior de las células.

**Tabla 3.** Análisis cuantitativo de la producción de PHB por HPLC

Cepa	Peso seco celular (mg)	mg PHB	% PHB/Peso seco
<i>Bacillus subtilis</i> 23444, Cuba	6.6	3.337	50.6
<i>Bacillus licheniformis</i> 23 263, Cuba	8.2	2.43	29.6
<i>Bacillus licheniformis</i> 23 264, Cuba	5.6	1.95	34.8
<i>Bacillus megaterium</i> , ZH	6.5	1.74	26.8
<i>Pseudomonas</i> G1, Cuba	7.0	nd	-
<i>Pseudomonas</i> G2, Cuba	7.6	nd	-
<i>Pseudomonas</i> G3, Cuba	7.1	nd	-
<i>Pseudomonas</i> G4, Cuba	6.4	nd	-
<i>Rhizobium tropici</i> 3, UH, Cuba	8.0	nd	-
<i>Rhizobium sp.</i> , Cuba	5.1	0.2	3.9

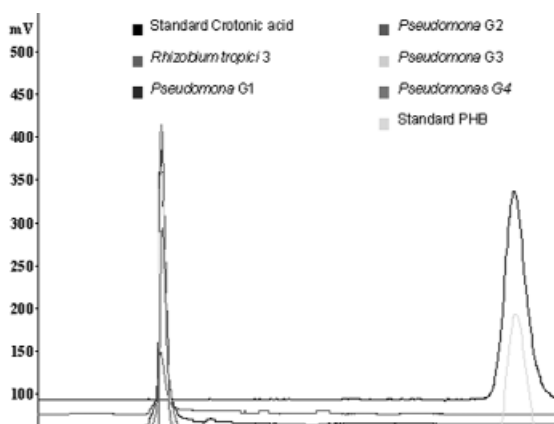
nd: no detectable



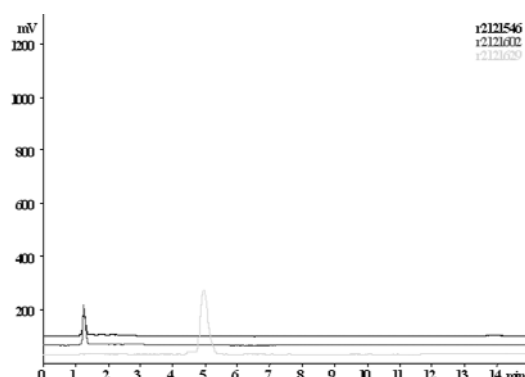
den producir fluorescencia cuando se excitan a una longitud de onda de 312 nm [13].

Fue verificado por HPLC que las cuatro cepas de *Pseudomonas* no producían PHB bajo las condiciones ensayadas. Adicionalmente la cepa de *Rhizobium tropici* 3 tampoco produce PHB bajo estas condiciones (Tabla 3 y Figura 4). Esta cepa de *Rhizobium* había resultado positiva en las pruebas cualitativas, sin embargo en la cuantificación por HPLC resultó negativa. Es probable que esta cepa produzca otro tipo de polímero de naturaleza lipofílica diferente al PHB y mediante esta técnica no se pudo cuantificar ya que la misma fue estandarizada solo para el PHB. Se decidió prolongar el tiempo de análisis por HPLC hasta 14 min, en busca de nuevas señales que indicaran la posible presencia en estas células de polímeros diferentes al PHB. La figura 5 muestra que no hay ninguna señal durante el tiempo de análisis.

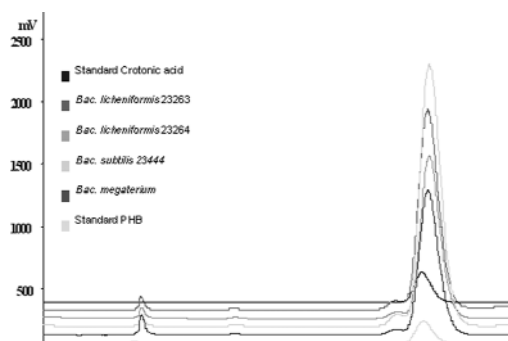
Usando las mismas condiciones se detectó producción de PHB en cinco de las diez cepas que resultaron positivas en las pruebas cualitativas (Tabla 3): *Bacillus licheniformis* 23263, *Bacillus licheniformis* 23264, *Bacillus subtilis* 23444, *Bacillus megaterium* y *Rhizobium sp* (Figura 6). Los niveles de acumulación de PHB en *Rhizobium sp* fueron casi indetectables. Se decidió continuar el trabajo con las cepas que tuvieran acumulados superiores al 20 % de PHB/Peso seco celular.



**Figura 4.** Perfil cromatográfico obtenido después de realizarle el tratamiento alcalino a las células liofilizadas de *Pseudomonas* y *Rhizobium tropici* 3. Se utilizó ácido crotonico comercial para la calibración (Tr 4 min) y para la cuantificación se utilizó un patrón de PHB de Aldrich® (Flujo volumétrico: 1.5 ml/min)



**Figura 5.** Perfil cromatográfico obtenido después de realizarle tratamiento alcalino a las células liofilizadas de *Rhizobium tropici* 3. Se utilizó ácido crotonico comercial para la calibración y para la cuantificación se utilizó un patrón de PHB de Aldrich® (Flujo volumétrico: 1.2 ml/min)



**Figura 6.** Perfil cromatográfico obtenido después de realizarle tratamiento alcalino a las células liofilizadas de *Bacillus licheniformis*, *subtilis* y *megaterium*. Se utilizó ácido crotonico comercial para la calibración (Tr 4 min) y para la cuantificación se utilizó un patrón de PHB de Aldrich® (Flujo volumétrico: 1.5 ml/min)

## CONCLUSIONES

- El procedimiento de tinción en placas desarrollado para seleccionar bacterias Gram negativas productoras de PHB puede ser aplicado también para bacterias Gram positivas.
- La técnica de tinción desarrollada en placas es sencilla y rápida de hacer, sin embargo, genera resultados falsos positivos debido a la tinción de materiales lipofílicos diferentes al PHB.

- El Nilo Rojo es un colorante conveniente para detectar producción de PHB en bacterias Gram positivas. El mismo puede añadirse directamente a los medios fundidos hasta concentraciones de 1.0 µg/ml sin afectación aparente del crecimiento de las bacterias. El Nilo Azul necesita ser utilizado a una mayor concentración que el Nilo Rojo para poder detectar producción de PHB.
- El Nilo Azul fue más efectivo para la tinción de los gránulos de PHB en medios líquidos. El Nilo Rojo produjo una fuerte interferencia a las concentraciones ensayadas, lo que imposibilitó detectar por Microscopía de Fluorescencia la producción del polímero.
- Se comprobó por HPLC que el género *Bacillus* puede acumular cantidades significativas de PHB en el citoplasma (% PHB/ Peso seco): *Bacillus subtilis* 23444 (50.6), *Bacillus licheniformis* 23263(29.6), *Bacillus licheniformis* 23264(34.8) y *Bacillus megaterium* (26.8).

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean dejar constancia de su gratitud al Dr. Jorge Martínez y a la Comisión Federal de Becas Suizas por el soporte financiero para esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bello, D.; Ortega, G.; Otero, M.A.; Saura, G. y Martínez, J. Poli-hidroxibutiratos. Generalidades, aislamiento y cuantificación. Revista de Plásticos Modernos, 91 (595), p. 81-84, 2006.
2. Anderson, A.J. and Dawes, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiological Reviews 54: p. 450-472, 1990.
3. Lee, S.Y. Plastic bacteria Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. Trends in Biotechnology 14: p. 431-438, 1996.
4. Velho, L. The Development of a Sugar-Based Plastic in Brazil. The Role of Government Schemes in Fostering Public Sector Research-Industry Relations. Article presented at the Technology

- Transfer Society Conference, Atlanta, Georgia, USA, 2006.
5. Borah, B.; Thahur, P.S. and Nigam, J.N. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-β-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. Journal of Applied Microbiology 92: p. 776-783, 2002.
6. Bänzinger, S.; Tobler, N. and Brandl, H. The formation of reserve polymers in *Bacillus megaterium*. Microbial Ecology Course, University of Zurich, WS 2001/02, Project Nr. 5, 2001.
7. Gouda, M.K.; Swellam, A.E. and Omar, S.H. Production of PHB by *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. Microbiol. Res. 156: p. 201-207, 2001.
8. Senior, P.J.; Beech, G.A.; Ritchie, G.A. and Dawes, E.A. The role of oxygen limitation in the formation of poly-β-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. 128: p. 1193-1201, 1972.
9. Berlanga, M.; Montero, M.T.; Fernandez-Borrel, J. and Guerrero, R. Rapid spectrofluorometric screening of poly-hydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. International Microbiology 9: p. 95-102, 2006.
10. Bergey, D.H. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th edition), Editors: John G. Holt, Noel R. Krieg and Peter H. A. Sneath, 1994.
11. Spiekermann, P.; Kalscheuer, B.; Baumeister, D. and Steinbüchel, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. Arch. Microbiol. 171: p. 73-80, 1999.
12. Brandl, H. A sensitive method for the detection of short-side-chain poly(3-hydroxyalkanoates). In: Schlegel HG, Steinbüchel A. (Ed.) Proceedings of the International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Golze-Druck, Göttingen, p. 441-442, 1993.
13. Meyer, J.M. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. Archives of Microbiology 174: p. 135-142, 2000.