



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA



**Rendimiento de polihidroxicanoatos de
bacterias halófilas extremas aisladas de salinas en
Lambayeque, 2012**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA - MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

PRESENTADA POR:

Br. Merly Elizabeth Llontop Gonzales

LAMBAYEQUE, PERÚ

2012

**Rendimiento de polihidroxicanoatos de
bacterias halófilas extremas aisladas de salinas en
Lambayeque, 2012**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA
MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA

APROBADA POR:

Dr. Jorge Oliva Núñez

PRESIDENTE

Dr. César García Espinosa

SECRETARIO

Lic. Julio Silva Estela

VOCAL

Dra. Carmen Carreño Farfán

PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2012

AGRADECIMIENTOS

Estas líneas servirán para expresar mi más grande y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me apoyaron para poder lograr elaborar este presente trabajo.

Un agradecimiento especial a mi asesora la Dr. Carmen Rosa Carreño Farfán quién se comprometió desde el inicio transmitiéndome sus conocimientos y sobre todo por su paciencia y dedicación, por ser una gran persona y amiga, por forjarnos para dar por terminado nuestros objetivos.

Especial reconocimiento a mis padres que son el motor y motivo de hacer que mis metas se cumplan una tras otra.

DEDICATORIA

A Dios por haberme acompañado y guiado en todo este tiempo de mi vida y a la realización de la tesis.

A mis padres por haberme brindado la mejor educación y lecciones de la vida e impulsarme a seguir siendo mejor persona, los amo infinitamente.

A mis compañeros de tesis por su apoyo y su compañía en momentos muy importantes.

Índice

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II.MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes de la investigación.....	4
2.1.1. Bacterias halófilas.....	4
2.1.2. Polihidroxicanoatos (PHA).....	6
2.1.3. Estrategias de cultivo.....	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1. Materiales.....	9
3.1.1. Material biológico.....	9
3.1.2. Población y muestra.....	9
3.2. Métodos.....	9
3.2.1. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	9
3.2.2. Primer ensayo: Aislamiento y detección de bacterias halófilas extremas productoras de polihidroxicanoatos.....	9
a) Zona de muestreo.....	9
b) Obtención y enriquecimiento de las muestras.....	12
c) Aislamiento de bacterias halófilas extremas.....	12
d) Detección de bacterias halófilas extremas productoras de polihidroxicanoatos.....	15
3.2.3. Segundo ensayo: Rendimiento de polihidroxicanoatos (PHA) de bacterias halófilas extremas en Lambayeque, 2012.....	21
a) Cuantificación de biomasa y PHA.....	21
b) Calculo de rendimiento Y (p/x).....	21
3.2.4. Análisis de los datos.....	23
IV. RESULTADOS.....	24
4.1. Bacterias halófilas aisladas de aguas de salinas de los distritos San José y Santa Rosa, en Lambayeque, 2012.....	24
4.2. Bacterias halófilas extremas nativas productoras de PHA.....	30
4.3. Rendimiento Y (p/x) de bacterias halófilas extremas.....	30
V. DISCUSIÓN.....	36
VI. CONCLUSIONES.....	41
VII.RECOMENDACIONES.....	42

VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS.....	48

Índice de tablas

Tabla 1.	Características fisicoquímicas de aguas de salinas de San José y Santa Rosa en Lambayeque, febrero 2012.....	25
Tabla 2.	Tiempo requerido para observar turbidez y coloración anaranjado – rojiza en el enriquecimiento de muestras de aguas de salinas en Lambayeque.....	26
Tabla 3.	Tiempo requerido para el desarrollo de bacterias halófilas extremas en medio sólido.....	27
Tabla 4.	Absorbancia a 235 nm de PHA producido por bacterias halófilas extremas con glucosa como fuente de carbono.....	32
Tabla 5.	Biomasa de bacterias halófilas extremas nativas productoras de PHA.....	34
Tabla 6.	Rendimiento Y (p/x) de polihidroxicanoatos de bacterias halófilas extremas nativas.....	34

Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación geográfica de las zonas de muestreo correspondiente a los distritos San José (a) y Santa Rosa (b), en Lambayeque, 2011....	10
Figura 2.	Salinas de los distritos San José (a) y Santa Rosa (b) en Lambayeque, 2011.....	11
Figura 3.	Toma de muestra de agua de salina en San José.....	13
Figura 4.	Enriquecimiento de muestra de agua de salina en caldo específico para halófilos extremos.....	13
Figura 5.	Colonias de bacterias halófilas desarrolladas en agar específico para halófilos extremos.....	14
Figura 6.	Siembra de bacteria nativa en caldo halófilos extremos modificado...	16
Figura 7.	Tinción con Sudan Negro B, (a) adición del colorante, (b) fijación, (c) decoloración con xilol, (d) tinción con safranina, (e) lavado con agua.....	17
Figura 8.	Cultivo de bacteria halófila extrema lista para centrifugación.....	18
Figura 9.	Biomasa de bacteria halófila extrema sedimentada después de centrifugación.....	18
Figura 10.	Adición de hipoclorito de sodio en la biomasa de bacteria halófila extrema.....	19
Figura 11.	Adición de cloroformo para separar la biomasa del polímero.....	19
Figura 12.	Observación de dos fases, en biomasa de bacterias halófilas extremas tratada con hipoclorito de sodio (a) y cloroformo (b).....	20
Figura 13.	Recuperación del cloroformo con el polímero PHA.....	20
Figura 14.	Adición del inóculo bacteriano en caldo halófilos extremos modificado.....	22
Figura 15.	Peso de la biomasa seca de bacterias halófilas extremas.....	22
Figura 16.	Coloración anaranjado – rojiza observada en el enriquecimiento de muestras de aguas de salinas en Lambayeque.....	26
Figura 17.	Colonias mucosas (40x) de bacterias halófilas extremas desarrolladas en medio sólido.....	27
Figura 18.	Colonias anaranjado rojizas de bacterias halófilas extremas desarrolladas en medio sólido.....	28

Figura 19. Observación microscópica (400 X) de bacterias halófilas extremas.....	28
Figura 20. Cultivos puros de bacterias halófilas extremas nativas.....	29
Figura 21. Porcentaje de bacterias halófilas extremas aisladas de aguas de salinas de San José y Santa Rosa, en Lambayeque, 2012.....	29
Figura 22. Corrida espectral (200 – 300 nm) de polímero recuperado con pico máximo de absorbancia a 235 nm.....	31
Figura 23. Porcentaje de bacterias halófilas extremas productoras de PHA aisladas de aguas de salinas en San José y Santa Rosa, Lambayeque, 2012.....	33
Figura 24. Polihidroxicanoato producido por una bacteria halófila extrema nativa.....	35

RESUMEN

Los plásticos provenientes del petróleo no son biodegradables, por lo que se acumulan, generando contaminación. La alternativa viable para reemplazarlos es el uso de bioplásticos, entre los que se incluyen los polihidroxicanoatos (PHA).

La presente investigación se realizó con el objetivo de aislar bacterias halófilas extremas de aguas de las salinas de los distritos San José y Santa Rosa en Lambayeque, así como detectar los gránulos de PHA y determinar el rendimiento Y (p/x) e identificar las bacterias halófilas extremas con el mayor valor. Las muestras de agua fueron enriquecidas en caldo específico para halófilos extremos, con glucosa como fuente de carbono y 24% de sales, a 42°C por 3 días. Las bacterias se aislaron en agar, obteniendo 154 cultivos puros de bacterias, que formaron colonias mucosas, anaranjadas constituidas por bacilos pleomórficos. En el 9 % de bacterias se detectó gránulos de PHA utilizando la tinción de Sudan Negro B. El rendimiento Y (p/x) osciló entre 0,0924 y 0,4601gg⁻¹, equivalentes a 9,24 y 46,01%. La bacteria con el mayor rendimiento fue identificada como *Haloferax* sp.UNPRG M7. Se demostró la presencia de bacterias halófilas extremas productoras de PHA en las salinas de Lambayeque.

Palabras clave: Polihidroxicanoatos, Halófilas.

ABSTRACT

Plastics from petroleum are not biodegradable, so they accumulate, generating pollution. The viable alternative to replace them is the use of bioplastics, including polyhydroxyalkanoates (PHA).

The present investigation was carried out with the objective of isolating extreme halophilic bacteria from the saline waters of the San José and Santa Rosa districts in Lambayeque, as well as detect the PHA granules and determine the yield $Y (p / x)$ and identify the bacteria extreme halophiles with the greatest value. The water samples were enriched in specific broth for extreme halophiles, with glucose as carbon source and 24% salts, at 42°C for 3 days. The bacteria were isolated on agar, obtaining 154 pure cultures of bacteria, which formed mucous, orange colonies constituted by pleomorphic bacilli. In 9% of bacteria, PHA granules were detected using Sudan Black B stain. $Y (p / x)$ yield ranged between 0.0924 and 0.4601gg⁻¹, equivalent to 9.24 and 46.01%. The bacteria with the highest yield was identified as *Haloferax* sp.UNPRG M7. The presence of extreme halophilic bacteria producing PHA was demonstrated in the Lambayeque saltpans.

Key words: Polyhydroxyalkanoates, Halophiles.

I. INTRODUCCIÓN

Los plásticos son polímeros orgánicos, generalmente de origen petroquímico, que debido a su estructura pueden ser manipulados y moldeados con facilidad. Son usados en la vida diaria principalmente porque son resistentes, ligeros, baratos, químicamente inertes y ofrecen un amplio rango de aplicaciones, por lo que en el mundo actualmente se producen en promedio 100 millones de toneladas de plásticos; sin embargo, el 75% tiene una vida útil muy corta y es descartado en grandes cantidades, acumulándose en el suelo y vertederos municipales, donde permanece entre 200 a 400 años sin degradarse (Vieyra, 2011) y en muchos casos termina en el mar causando la muerte de peces, aves y mamíferos. El reciclaje y la incineración son los métodos actualmente utilizados como una alternativa de solución a la acumulación de los plásticos; no obstante, cuando se reciclan los polímeros, pierden parte de sus propiedades químicas, físicas y mecánicas, siendo necesario incrementar un porcentaje de material virgen en el procesamiento y en el caso de los plásticos halogenados no pueden ser incinerados debido a que generan gases con flúor y cloro que afectan negativamente el ozono.

Los polímeros biodegradables surgen como una alternativa a los plásticos derivados del petróleo, que atrae el interés de investigadores de todos los campos, debido a la diversidad de aplicaciones en la biotecnología, medicina y agricultura. Con este propósito, diferentes tipos de poliésteres, polihidroxicanoatos (PHA), polilácticos, poliésteres alifáticos y polisacáridos han sido estudiados durante los últimos 80 años. Los PHA son polímeros termoplásticos que presentan, en general, características físico-químicas similares a los polímeros petroquímicos, por lo que constituyen potenciales materiales para su reemplazo. Son poliésteres

biodegradables acumulados por diversas bacterias como *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, y bacterias halófilas, en forma de gránulos intracelulares, que alcanzan hasta el 80% de la masa seca celular, bajo ciertas condiciones desbalanceadas de crecimiento con un exceso de fuente de carbono disponible y limitación, de por lo menos, un nutriente esencial para la multiplicación celular (Formolo, 2006).

Las bacterias halófilas extremas son microorganismos que muestran una estricta dependencia por altas concentraciones de sal para su crecimiento y estabilidad estructural. Abundan en las salinas y lagos hipersalinos como el Mar Muerto y el Gran Lago Salado. Requieren por lo menos 1,5 M de NaCl para su crecimiento, muchas especies crecen de manera óptima en medios con 3,5 – 4,5 M de NaCl, mientras que otras crecen en medios saturados de NaCl (5,2 M). Producen colonias con pigmentos rojos o anaranjados, debido a la presencia de bacteriorodopsinas y carotenoides, que son particularmente responsables de la típica coloración anaranjado – rojizo de los ambientes en los que estos microorganismos se desarrollan.

Se ha detectado la acumulación de PHA en cerca de 300 especies bacterianas; sin embargo, el rendimiento es muy bajo en muchas de ellas, por lo cual se rechazan ante la imposibilidad de industrializar el proceso. Las bacterias halófilas extremas han sido consideradas para la presente investigación, debido a su capacidad de acumular grandes cantidades de PHA, en sustratos simples, con fuentes de carbono económicas o residuos industriales. Asimismo, la salinidad en la que se desarrollan y sintetizan los PHA disminuye los requerimientos de esterilidad y problemas de contaminación durante el proceso fermentativo con una reducción de los costos de producción. En Lambayeque existen salinas o ambientes extremos, donde es posible encontrar bacterias con un elevado rendimiento en PHA, que podrían ser utilizadas para la producción de estos biopolímeros, como una solución pertinente e innovadora al problema de los petroplásticos contaminantes del ambiente.

Bajo este enfoque, se formuló el siguiente problema ¿Cuál es el rendimiento de polihidroxialcanoatos producidos por bacterias halófilas extremas aisladas de salinas en Lambayeque? La hipótesis planteada fue: El rendimiento de PHA

producido por bacterias halófilas extremas aisladas será mayor de 40%. Los objetivos fueron, aislar bacterias halófilas extremas de muestras de aguas de las salinas ubicadas en los distritos San José y Santa Rosa de la región Lambayeque; detectar mediante la tinción con Sudan Negro B la presencia de gránulos de PHA, determinar el rendimiento Y (p/x) e identificar la bacteria halófila extrema con el mayor valor.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Bacterias halófilas

Las bacterias halófilas así como las halotolerantes son aquellas que se encuentran en ambientes hipersalinos; no obstante, las halófilas son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de altas concentraciones de sal que en su ausencia. Es posible distinguir diferentes grupos de bacterias halófilas según los requerimientos de sal para sus actividades metabólicas. Así, las halófilas débiles, como la mayoría de los organismos marinos, requieren 3%, (p/v) de NaCl; las halófilas moderadas presentan un crecimiento óptimo en un rango de 3 – 15%, (p/v) de NaCl y las halófilas extremas se desarrollan mejor a 25% (p/v) de NaCl (Ramírez et al., 2004). Entre los halófilos extremos se encuentran principalmente bacterias de la familia *Halobacteriaceae*. A su vez, los halófilos moderados son filogenéticamente diversos incluyendo bacterias Gram positivas y Gram negativas, algunos de ellos metanogénicas (Castro et al., 2011).

El hábitat natural de las bacterias halófilas extremas está constituido por salinas marinas y lagos hipersalinos de todo el mundo, en lugares en donde la salinidad es diez veces superior al agua de mar (Ventosa, 2006). Todos los halófilos caracterizados son aerobios obligados o anaerobios facultativos, desde el punto de vista morfológico son cocos (0,2 – 2,0 μ m) dispuestos individualmente, en parejas, tétradas o racimos en los que es difícil distinguir cada uno de los cocos y bacilos que adoptan multitud de formas: rectángulos, triángulos irregulares, discos y muchos de los cuales tienen aspecto pleomórfico (Dyall, 2008). Algunos géneros son móviles,

mientras que otros carecen de movimiento, las colonias presentan coloración rojiza por la producción de carotenoides, que llegan a ser rosas o blancas y además poseen vacuolas de gas que les permiten flotar en la superficie. Los carotenoides están incorporados en la membrana y protegen a la célula de la acción fotooxidadora de la luz solar (Quillahuaman et al, 2004; Ventosa, 2006).

La temperatura óptima de crecimiento de muchas especies halófilas se encuentra entre 40 – 50 °C, aunque temperaturas inferiores (37 – 42 °C) son empleadas para el cultivo de estos microorganismos en el laboratorio, con el fin de incrementar la solubilidad del oxígeno en medios de cultivo líquidos (Dyall, 2008). Los halófilos crecen bien como quimioorganótofos, muchos tienen requerimientos nutricionales sencillos y pueden desarrollar con una fuente de carbono y energía, amonio como fuente de nitrógeno y fosfato como fuente de fósforo (Rodríguez & García, 1990). Aminoácidos como el glutamato o ácidos orgánicos como el succinato son fuentes de energía para estos microorganismos. También se ha comprobado que el glicerol producido por algas verdes como *Dunaliella* es una importante fuente de carbono y energía para los halófilos quedando así conectados los metabolismos autotróficos y heterotróficos en los medios hipersalinos (Díaz, 2007).

Diversos estudios sobre la composición del citoplasma de halófilos obligados muestran elevadas cantidades de sales intracelulares (4 M K⁺, 1M Na), esenciales para ser iso - osmóticos con su habitat. Algunas bacterias halófilas no solo han desarrollado mecanismos de transporte activo de sales como la bomba electrogénica de Cloro (Cl⁻) conducida por la luz: bacteriorodopsina, sino que además exhiben un metabolismo y una maquinaria biosintética dependiente de la sal. Con esta adaptación, los halófilos consiguen evitar la desnaturalización o precipitación de las proteínas producidas por elevadas concentraciones de sal (Ramírez et al, 2004; Ventosa, 2006).

Los microorganismos halófilos tienen dos estrategias diferentes para desarrollarse en los ambientes extremos, la primera consiste en la acumulación citoplasmática de solutos compatibles (glicerol, ectoína o sacarosa), propios de las bacterias halófilas y en la segunda estrategia se acumulan sales inorgánicas en el citoplasma, como en el caso de las haloarqueas (Díaz, 2007). Las bacterias halófilas

ofrecen muchas aplicaciones en la biotecnología, por su diversidad metabólica en la síntesis de diversos tipos de bacteriorodopsinas, solutos compatibles, biopolímeros, biosurfactantes y exopolisacáridos (Margesin & Schinner, 2001). Algunas bacterias halófilas como *Halomonas boliviensis* y *Haloferax mediterranei* acumulan grandes cantidades de polihidroxicanoatos, que se investigan intensamente para su producción a gran escala (Rodríguez & García, 1990; Quillahuaman et al., 2008).

2.1.2 Polihidroxicanoatos (PHA)

La familia de los poliésteres microbiológicos clasificada como polihidroxicanoatos (PHA) ha recibido considerable atención, debido a sus características como termoplásticos biodegradables y constituye una clase de polímeros producidos y acumulados por varios microorganismos (Formolo, 2006). La estructura, propiedades físico – químicas y composición monomérica varía dependiendo del microorganismo y de la fuente de carbono utilizada para el crecimiento (Salmiati et al., 2009).

Según el número de carbonos en el monómero, los PHA pueden ser divididos en dos grupos; PHA de cadena corta que contienen entre tres a cinco átomos de carbono y PHA de cadena media constituidos por seis a catorce átomos de carbono (Lee et al., 1995). Todos los PHA comparten propiedades que son recomendables para algunas aplicaciones y las hace interesantes para la industria. Son termoplásticos, elastoméricos, no tóxicos, biocompatibles, insolubles en agua y presentan un alto rango de polimerización (Grigull et al., 2008).

Se han desarrollado procesos para la producción de una gran variedad de PHA y se han incorporado alrededor de 100 monómeros bajo diferentes condiciones controladas de fermentación; sin embargo, actualmente hay solo dos compuestos de PHA disponibles comercialmente, el polihidroxibutirato PHB y polihidroxibutirato – co – hidroxivalerato, PHBV (Martin et al., 2007). El poli (3 hidroxibutirato), es sintetizado y acumulado en el interior de diversas células microbianas en forma de gránulos intracelulares con diámetro de 100 – 800nm (Formolo, 2006). El peso molecular del PHB difiere acorde al microorganismo, condiciones de crecimiento y método de extracción y puede variar entre 50 000 hasta 1 millón (Dawes, 1988).

Las propiedades del PHB como el grado de cristalinidad y temperatura de transición vítrea son muy similares al polipropileno; sin embargo, el PHB es más rígido y quebradizo que el polipropileno lo que reduce su gama de aplicaciones (Marchessault & Yu, 2002). El PHB es un material termoplástico. Se trata de una resina que se convierte en un líquido altamente viscoso y modelable en las proximidades del punto de fusión (Carrasco et al., 2004), pero debido a su alto costo se intenta incorporar materiales como, almidón, madera en polvo u otros componentes de bajo costo y buena degradabilidad (Saad et al., 2001). También se pueden agregar polímeros denominados Blenda, lo que amplía su rango de aplicaciones (Formolo, 2006).

El PHB puro es altamente cristalino y termoplástico y en consecuencia, es muy quebradizo y no lo suficientemente flexible para algunos propósitos. Para asegurar una mayor flexibilidad, el grado de cristalinidad tiene que ser disminuido, por lo que, se han obtenido copolímeros basados en 3 – hidroxibutirato (HB) e hidroxivalerato (HV), que tienen características más deseables (Dawes, 1988). El copolímero P (3HB – co – 3HV) consiste en unidades de 3 – hidroxibutirato y 3 – hidroxivalerato que son incorporados aleatoriamente a lo largo de la cadena. Desde el punto de vista comercial este copolímero es más útil y aumentando la relación HV/HB se disminuye el punto de fusión con la consecuente mejora de sus características térmicas y propiedades mecánicas (Carrasco et al., 2004; Formolo, 2006). En 1981, la Imperial Chemical Industries (ICI, UK) encontró que el copolímero P (3HB – co – 3HV) puede ser sintetizado por *Alcaligenes eutrophus* (ahora *Cupriavidus necator*) a partir de glucosa y ácido propiónico. Desde entonces, una variedad de copolímeros han sido sintetizados por *A. eutrophus* de varias fuentes de carbono (Lee et al., 1995).

2.1.3 Estrategias de cultivo

Las especies productoras de PHA deben satisfacer algunas demandas, como tener rápido crecimiento, ser capaces de utilizar fuentes de carbono baratas y tener un alto índice de producción (Tian et al., 2009). Para que los costos de producción no sean tan altos, es necesario que la bacteria sea capaz de acumular más de 40% de su masa celular en polímero. De esta forma, son eliminadas las bacterias Gram positivas y aquellas que no acumulan alta cantidad de polímero necesario para la producción industrial (Formolo, 2006).

Numerosos microorganismos acumulan PHA, pero solo un número limitado son considerados como buenos candidatos para su producción, como por ejemplo, *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* y *Escherichia coli* recombinante. Estas bacterias pueden ser cultivadas eficientemente con alta densidad celular y contenido de PHA en un corto periodo cuando es utilizada una estrategia de síntesis adecuada (Quillahuaman et al., 2008).

Cuando en el ambiente próximo al microorganismo escasea algún nutriente esencial como nitrógeno, azufre, fósforo, pero hay exceso de carbono, la célula sintetiza PHA. De esta manera, si el carbono se agota o se suministra el nutriente faltante, el PHA es utilizado como fuente de carbono y energía en diferentes procesos vitales. Determinar las diferentes condiciones en las que una bacteria sintetiza PHA, no solo permite conocer los mecanismos moleculares que sustentan esta estrategia desarrollada por los microorganismos para sobrevivir, sino también, brinda el conocimiento necesario para optimizar los métodos de producción de PHA (Cholula, 2005).

Para obtener una alta concentración celular necesaria para una mayor productividad, con el cultivo alimentado o “fed – batch” se han obtenido mejores resultados. El sistema de cultivo continuo puede ofrecer más alta productividad que el cultivo alimentado, pero solo cuando puede ser mantenido sin contaminación y además debe garantizarse la estabilidad de la bacteria (Lee et al., 1995). Estos dos requerimientos se cumplen en la fermentación de *H. mediterranei*. Para el cultivo de esta bacteria se requiere una condición salina extrema que evita una posible contaminación. Asimismo, se ha demostrado que la producción de PHA en cultivo continuo es constante por un periodo de 3 meses, en donde el rendimiento se mantiene estable (Dong et al., 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo conformado por las muestras de aguas de salinas y por los aislamientos de bacterias halófilas extremas.

3.1.2 Población y muestra

La población estuvo constituida por las bacterias halófilas extremas productoras de polihidroxialcanoatos (PHA) presentes en las aguas de las salinas de los distritos San José y Santa Rosa en la región Lambayeque y se trabajó con las bacterias aisladas de 54 muestras en febrero de 2012. El número de muestras fue calculada según la fórmula mencionada por Alvitres, 2000 (Anexo 1) con una prevalencia de 10 % (determinada en un estudio piloto por la autora).

3.2 Métodos

3.2.1 Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación descriptivo se ejecutó en dos fases, utilizando en ambas un diseño no experimental transeccional (Hernández et al., 2003). En la primera fase se realizó el aislamiento y detección de bacterias halófilas extremas productoras de PHA. En la segunda fase, se determinó la concentración de biomasa y PHA producidos por las bacterias halófilas extremas y se calculó el rendimiento Y p/x. Para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla mencionado por Alvitres (2000).

3.2.2 Primera fase: Aislamiento y detección de bacterias halófilas extremas productoras de polihidroxialcanoatos

a) Zona de muestreo

Para aislar bacterias halófilas extremas productoras de PHA durante febrero de 2012 se colectaron aleatoriamente 54 muestras de agua debajo de la superficie, de doce salinas de los distritos San José y Santa Rosa en la región Lambayeque (Figuras 1 y 2).

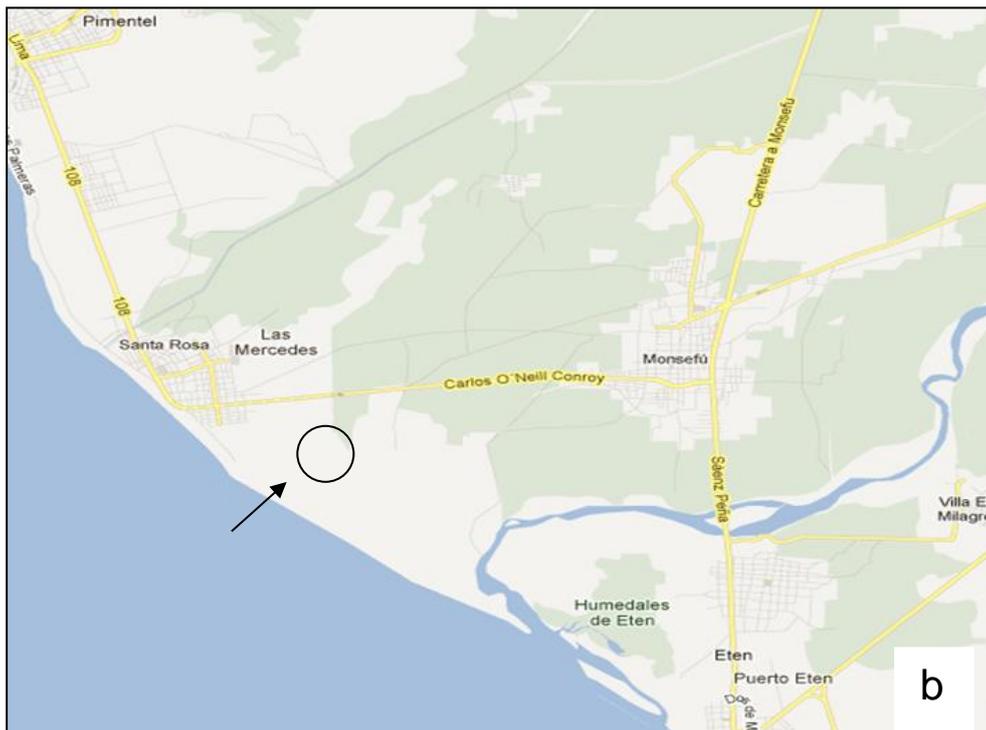
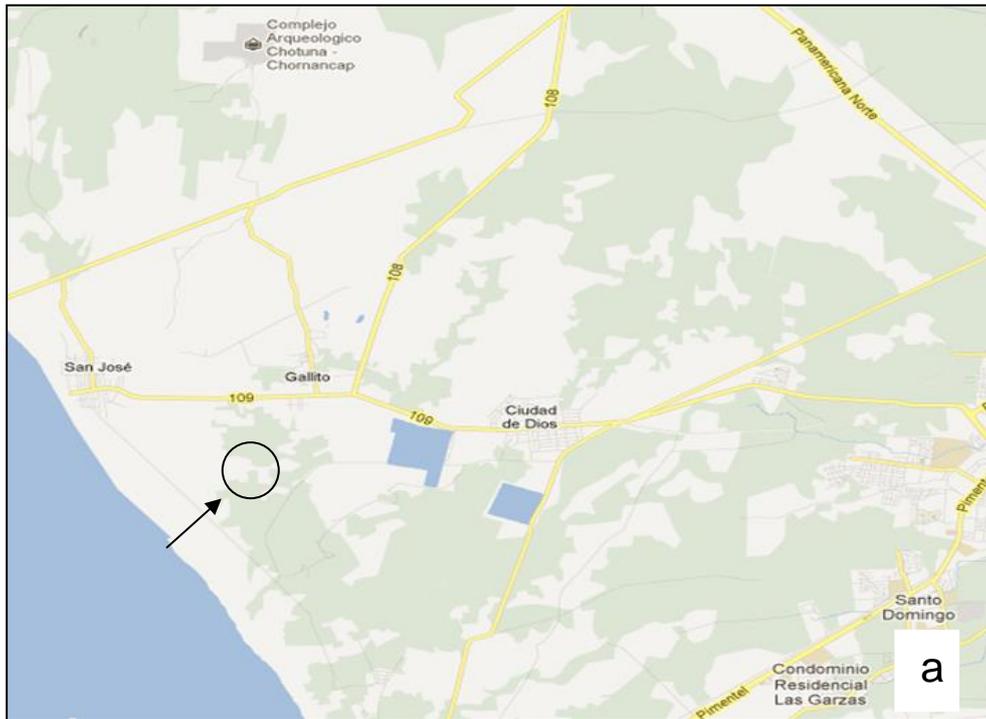


Figura 1. Ubicación geográfica de las zonas de muestreo correspondiente a los distritos San José (a) y Santa Rosa (b), en Lambayeque, 2011.



Figura 2. Salinas de los distritos San José (a) y Santa Rosa (b) en Lambayeque, 2011.

Las salinas del distrito San José están ubicadas a 6°46'8.26" latitud sur y 79°56'56.78" longitud oeste; mientras que, las salinas del distrito Santa Rosa están ubicadas a 6°53'34.87" latitud sur y 79°54'33.08" longitud oeste (Guzmán & Hurtado, 2011).

b) Obtención y enriquecimiento de las muestras

Para aislar bacterias halófilas extremas se colectaron muestras de aguas de salinas (Figura 3), 27 en el distrito San José y 27 en el distrito Santa Rosa. Cada una de las muestras en cantidad de 200mL fueron recolectadas en frascos de vidrio de boca ancha previamente esterilizados y rotulados con la identificación correspondiente. Inmediatamente después, se midió la temperatura y el pH de la muestra y a continuación se guardaron en un cooler a 4°C y se llevaron para su procesamiento al laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Para incrementar la población de bacterias halófilas se realizó el enriquecimiento de las muestras de agua, depositando 4mL en Erlenmeyers de 125mL de capacidad conteniendo 40mL del medio de cultivo: caldo específico para halófilos extremos según Rodríguez & García, 1990 (Figura 4, anexo 2) y se realizó la incubación a 42°C durante 3 días.

c) Aislamiento de bacterias halófilas extremas

Se tomó una alícuota de cada una de las muestras de agua enriquecidas y se sembró por duplicado sobre placas de Petri conteniendo agar específico para halófilos extremos (Anexo 2). A continuación, se incubó a 42°C hasta observar el desarrollo de colonias (4 – 5 días), las que se seleccionaron según su color, forma, tamaño y aspecto (Figura 5) y se cultivaron en viales con agar específico para halófilos extremos a 42°C, por tiempo suficiente para observar crecimiento bacteriano. Los cultivos puros de bacterias obtenidos se guardaron en refrigeración 4°C para su mantenimiento y a -20°C con 25% de glicerol para su conservación (Anexo 3).



Figura 3. Toma de muestra de agua de salina en San José.



Figura 4. Enriquecimiento de muestra de agua de salina en caldo específico para halófilos extremos.

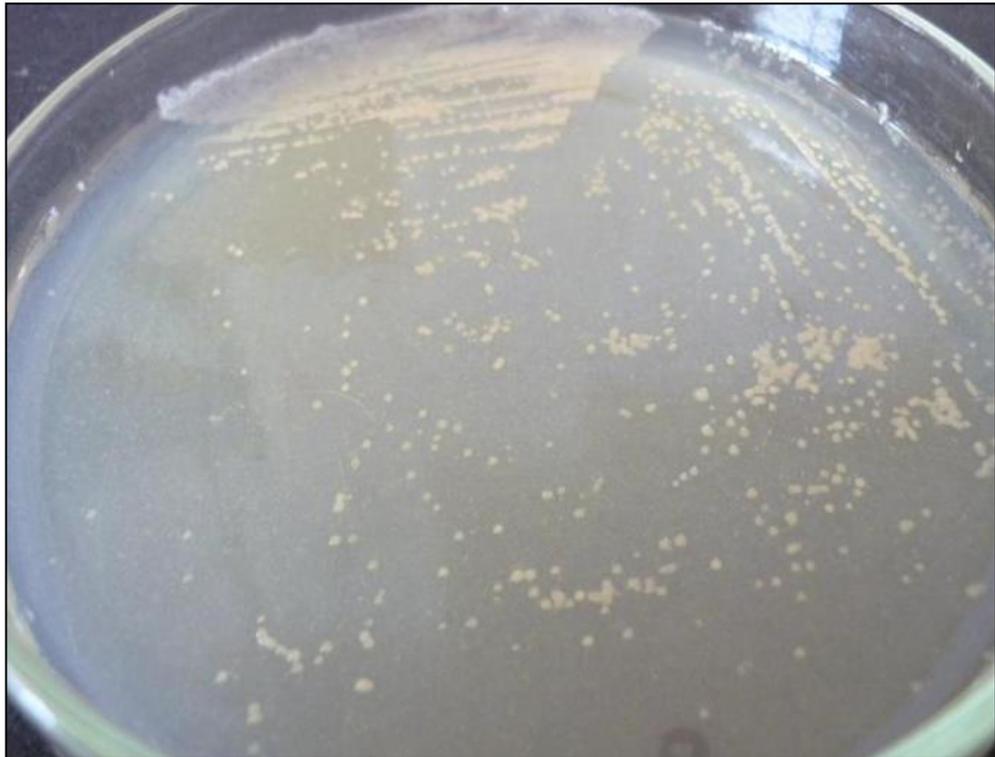


Figura 5. Colonias de bacterias halófilas desarrolladas en agar específico para halófilos extremos.

d) Detección de bacterias halófilas extremas productoras de polihidroxialcanoatos

Cada bacteria halófila extrema se sembró en tubos con 5mL de caldo específico para halófilos extremos modificado (Figura 6, anexo 4) y se incubaron a 42°C por 96 horas. Posteriormente, se realizaron tinciones con Sudan Negro B (Figura 7, anexo 5). La presencia de gránulos negros o grisáceos en el interior de las células vegetativas rosadas se consideró como positivo para la detección de PHA en bacterias halófilas extremas.

Para recuperar la biomasa según Guzmán & Hurtado (2011) cada uno de los cultivos de bacterias halófilas extremas se centrifugó a 4500rpm durante 20 minutos y el sedimento o paquete celular obtenido (Figuras 8, 9) se lavó con solución salina al 10% esterilizada y se deshidrató en estufa a 40°C, hasta obtener un peso constante.

Para recuperar el PHA según el protocolo de Law & Slepecky (1961) mencionado por Cholula (2005) al tubo que contenía la biomasa deshidratada se le agregó 1mL de hipoclorito de sodio al 5%, para debilitar la membrana celular y después de 15 minutos se agregó 1mL de cloroformo para separar la biomasa del polímero (Figuras 10, 11). Los tubos se agitaron fuertemente por 5 minutos y se dejaron reposar durante 10 minutos, obteniendo dos fases; una superior conteniendo hipoclorito más restos celulares y una inferior con cloroformo y polímero (Figura 12). Inmediatamente después, con una pipeta Pasteur se extrajo el cloroformo con el polímero (Figura 13), se depositó en un tubo y se llevó a estufa a 45°C por 24 horas para acelerar la evaporación del cloroformo.

Para verificar la naturaleza del PHA, el polímero obtenido fue digerido con ácido sulfúrico concentrado durante 10 minutos a 90 – 95°C en baño María, se dejó enfriar a temperatura ambiente (28°C) y luego se realizó una corrida en un espectrofotómetro marca UNICO (190 – 1100nm en celda de cuarzo) en un rango de 200 a 300nm, considerando un pico máximo de absorbancia a 235nm como positivo a la presencia de PHA (Anexo 6).



Figura 6. Siembra de bacteria nativa en caldo halófilos extremos modificado.

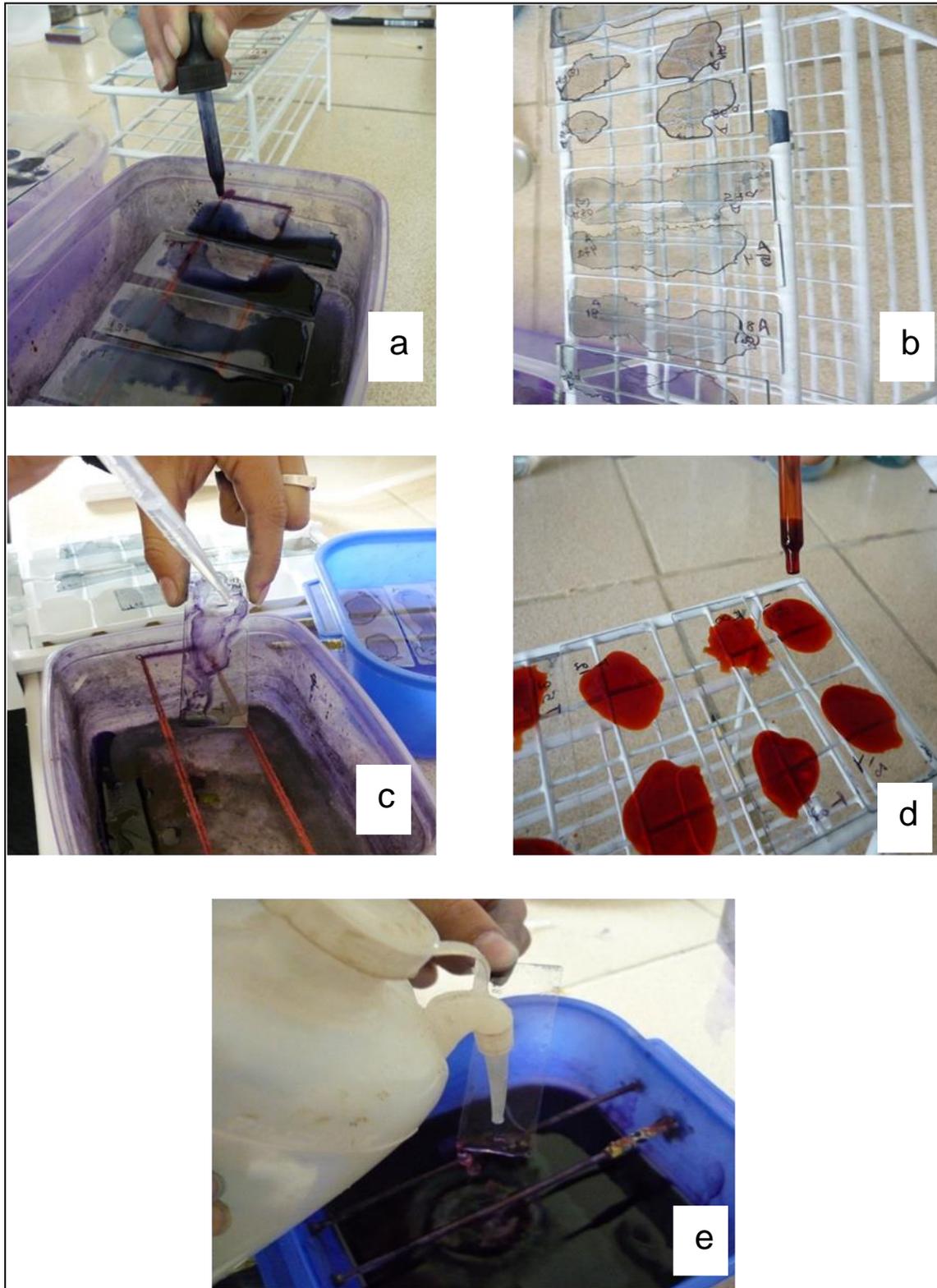


Figura 7. Tinción con Sudan Negro B, (a) adición del colorante, (b) fijación, (c) decoloración con xilol, (d) tinción con safranina, (e) lavado con agua.

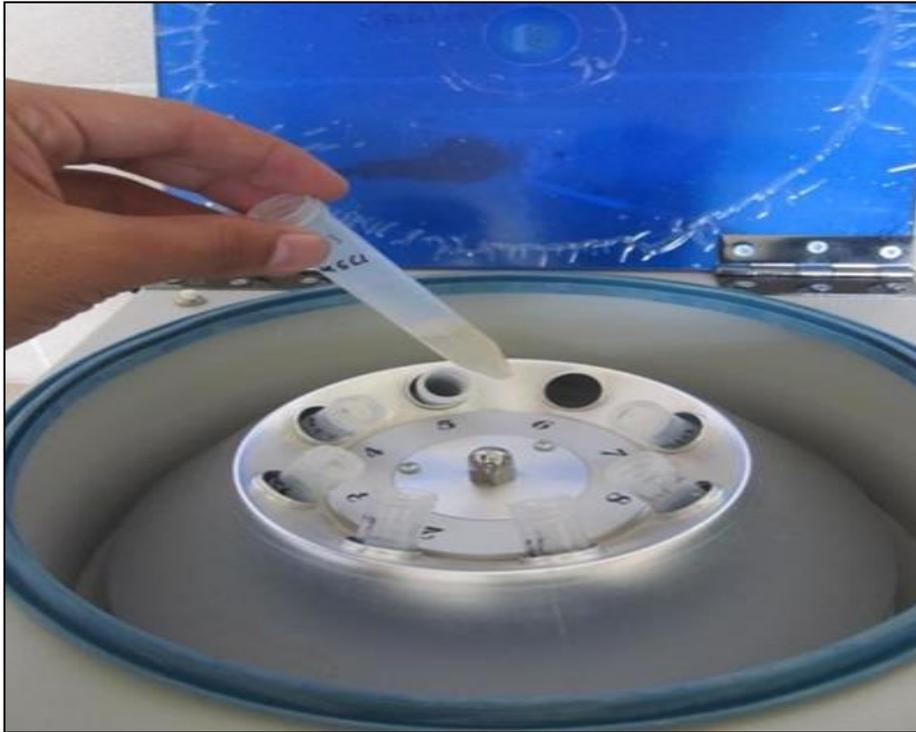


Figura 8. Cultivo de bacteria halófila extrema lista para centrifugación.



Figura 9. Biomasa de bacteria halófila extrema sedimentada después de centrifugación.



Figura 10. Adición de hipoclorito de sodio en la biomasa de bacteria halófila extrema.



Figura 11. Adición de cloroformo para separar la biomasa del polímero.

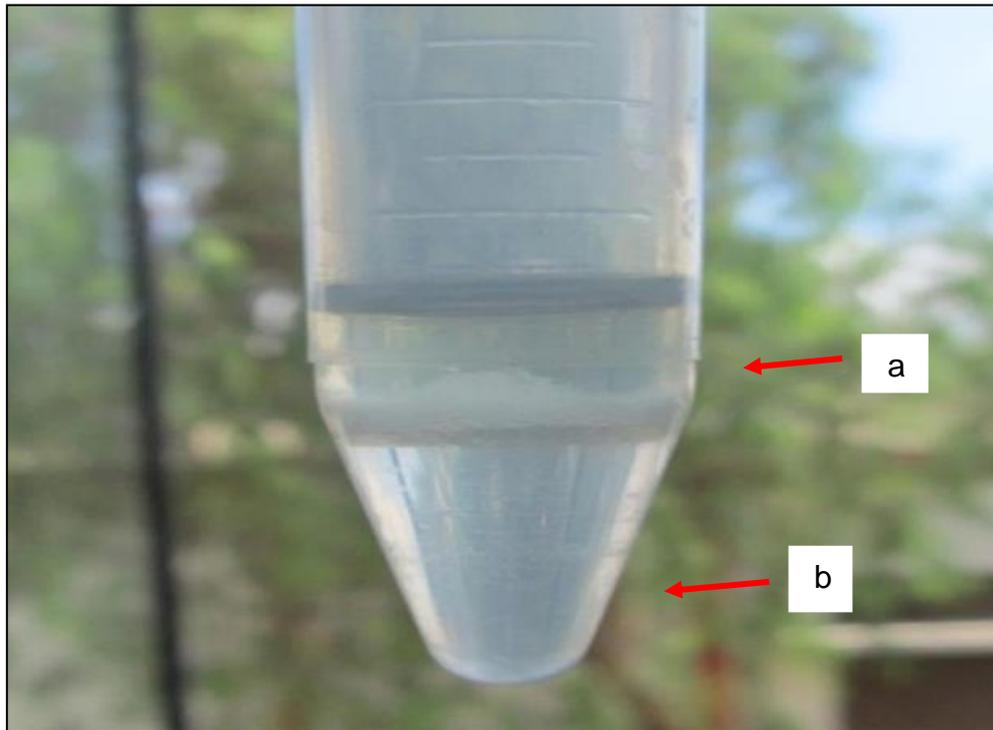


Figura 12. Observación de dos fases, en biomasa de bacterias halófilas extremas tratada con hipoclorito de sodio (a) y cloroformo (b).



Figura 13. Recuperación del cloroformo con el polímero PHA.

3.2.3 Segundo ensayo: Rendimiento de polihidroxialcanoatos (PHA) de bacterias halófilas extremas en Lambayeque, 2012

Con las bacterias halófilas extremas se llevó a cabo un proceso fermentativo en sistema discontinuo recuperando la biomasa y el PHA para calcular el rendimiento $Y (p/x)$.

a) Cuantificación de biomasa y PHA

Según la metodología de Guzmán & Hurtado (2011), cada bacteria halófila extrema productora de PHA se cultivó por triplicado en 10mL de caldo halófilos extremos modificado, a 42°C, por 48 horas, hasta alcanzar una concentración de 107cel.mL^{-1} . A continuación, el cultivo se inoculó en erlenmeyers de 500mL de capacidad conteniendo 90mL (10% v/v) de caldo halófilos extremos modificado (Figura 14), por 96 horas, hasta alcanzar una concentración celular entre 2,4 a $2,7 \times 10^9 \text{cel.mL}^{-1}$ (tubos 8 y 9 del Nefelómetro de Mcfarland). Posteriormente, se cuantificó la biomasa y PHA producidos por bacterias halófilas extremas.

Para cuantificar la biomasa, cada uno de los cultivos se centrifugó (4500rpm durante 20 minutos) y el sedimento o paquete celular se lavó dos veces con solución salina al 10% esterilizada. Después se deshidrató en estufa a 40°C hasta alcanzar peso constante y la biomasa obtenida fue depositada en papel aluminio y se pesó en una balanza digital (Figura 15). La extracción del PHA se realizó según el protocolo anteriormente descrito (ítem 3.2.2-d) y posteriormente el polímero obtenido se pesó en una balanza digital.

b) Cálculo del rendimiento $Y (p/x)$

El $Y (p/x)$ es el coeficiente de rendimiento de producto en relación a la biomasa, o cantidad de producto obtenido por cantidad de biomasa formada (gg^{-1}) y se calculó dividiendo los gramos de PHA entre los gramos de biomasa obtenidos (Dorán, 1998).

$$Y (p/x) = \frac{P - P_0}{X - X_0} = \frac{P}{X}$$



Figura 14. Adición del inóculo bacteriano en caldo halófilos extremos modificado.



Figura 15. Peso de la biomasa seca de bacterias halófilas extremas.

3.2.4 Análisis de los datos

Los datos obtenidos en la cuantificación de biomasa y PHA de bacterias nativas halófilas extremas se ordenaron en tablas y figuras, con ayuda de programas Microsoft Office Word y Microsoft Office Excel 2007.

IV. RESULTADOS

4.1 Bacterias halófilas aisladas de aguas de salinas de los distritos San José y Santa Rosa, en Lambayeque, 2012

El valor promedio en concentración de NaCl de las muestras de aguas de las salinas fue 25,64 g/100mL en San José y 18,29 g/100mL en Santa Rosa, con una temperatura que osciló entre 23,8 y 26°C en San José, así como 25,5 y 26,5°C en Santa Rosa. A su vez el rango de pH fue de 8,30 a 9,01 en San José y entre 8,69 a 8,86 en Santa Rosa (Tabla 1).

El 100% (54) de las muestras de aguas fue positivo para el enriquecimiento de bacterias, observándose turbidez y una coloración anaranjado - rojiza del medio (Figura 16), en un tiempo que osciló entre 2 y 3 días (Tabla 2). El 100% de las muestras enriquecidas fue positivo para el aislamiento de bacterias halófilas extremas, en un tiempo que osciló entre 4 a 6 días (Tabla 3). Las colonias observadas en el medio sólido fueron de consistencia mucosa y con una coloración anaranjada (Figuras 17, 18). A su vez, en cuanto a la morfología celular las bacterias fueron pleomórficas en forma de triángulos, rectángulos, bacilos y cocos (Figura 19).

A partir de muestras de aguas de salinas se obtuvieron 154 cultivos puros de bacterias halófilas extremas (Figura 20), 35% (54) de San José y 65% (100) de Santa Rosa (Figura 21).

Tabla 1. Características fisicoquímicas de aguas de salinas de San José y Santa Rosa en Lambayeque, febrero 2012

Salina	Ubicación	Temperatura (°C)	pH	NaCl (g/100mL)
1	San José	24,1	8,46	25,94
2	San José	23,8	8,93	25,63
3	San José	25,1	8,93	25,88
4	San José	24,0	9,01	25,70
5	San José	25,5	8,30	25,35
6	San José	26,0	8,66	25,35
7	Santa Rosa	26,0	8,69	18,73
8	Santa Rosa	25,5	8,72	18,96
9	Santa Rosa	26,1	8,75	17,62
10	Santa Rosa	26,0	8,80	17,75
11	Santa Rosa	26,5	8,84	18,88
12	Santa Rosa	26,4	8,86	17,80



Figura 16. Coloración anaranjado – rojiza observada en el enriquecimiento de muestras de aguas de salinas en Lambayeque.

Tabla 2. Tiempo requerido para observar turbidez y coloración anaranjado – rojiza en el enriquecimiento de muestras de aguas de salinas en Lambayeque

Número de muestras	Salina de procedencia	Tiempo de incubación (días)
1 – 5	San José	3
6 – 10	San José	3
11 – 15	San José	3
16 – 20	San José	3
21 – 25	San José	2
26 – 30	San José	3
31 – 35	Santa Rosa	2
36 – 39	Santa Rosa	2
40 – 43	Santa Rosa	2
44 – 47	Santa Rosa	2
48 – 51	Santa Rosa	2
52 – 54	Santa Rosa	2

Tabla 3. Tiempo requerido para el desarrollo de bacterias halófilas extremas en medio sólido

Salina de procedencia	Tiempo de incubación (días)	Aislamientos (número)
1	4	16
2	4	9
3	4	14
4	4	15
5	5	16
6	4	18
7	5	11
8	5	5
9	6	18
10	5	9
11	4	18
12	4	5

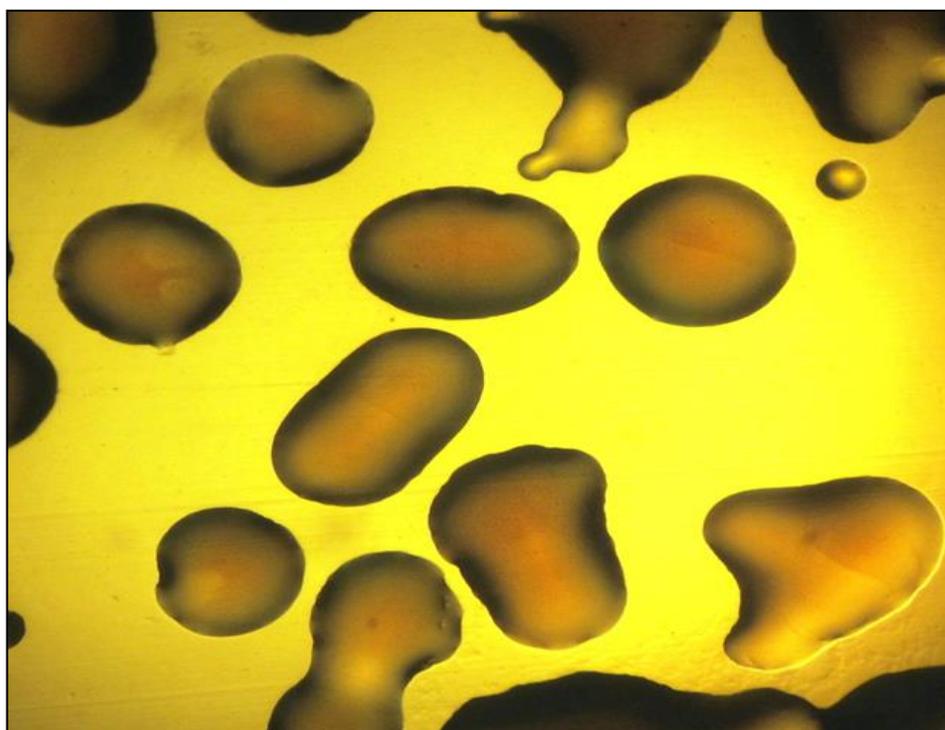


Figura 17. Colonias mucosas (40x) de bacterias halófilas extremas desarrolladas en medio sólido.

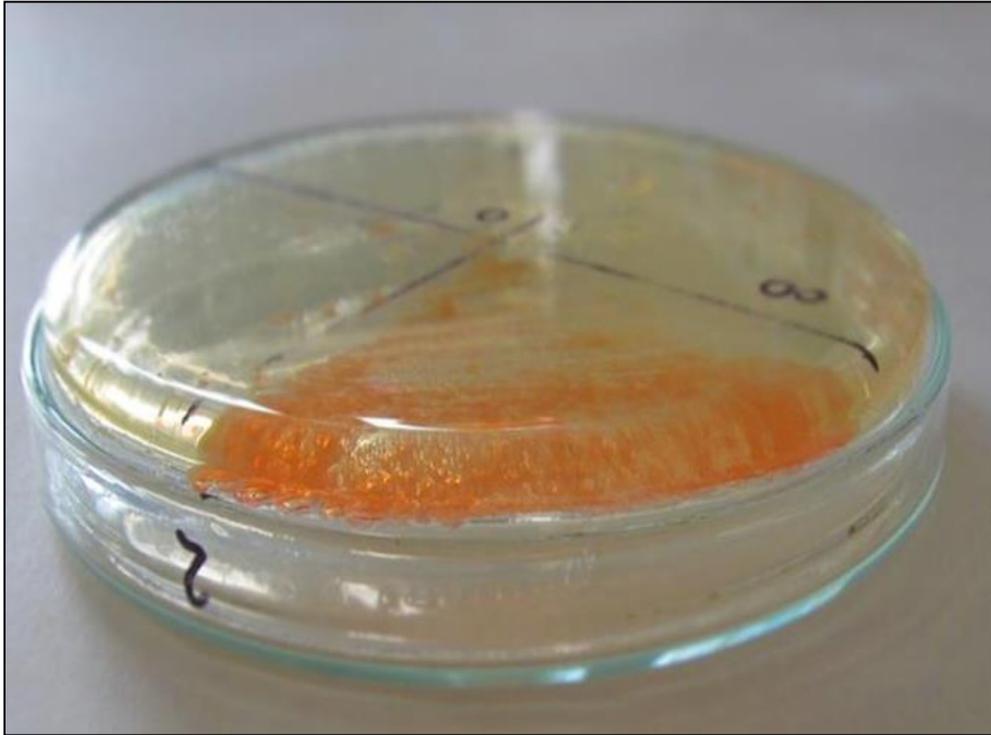


Figura 18. Colonias anaranjado rojizas de bacterias halófilas extremas desarrolladas en medio sólido.

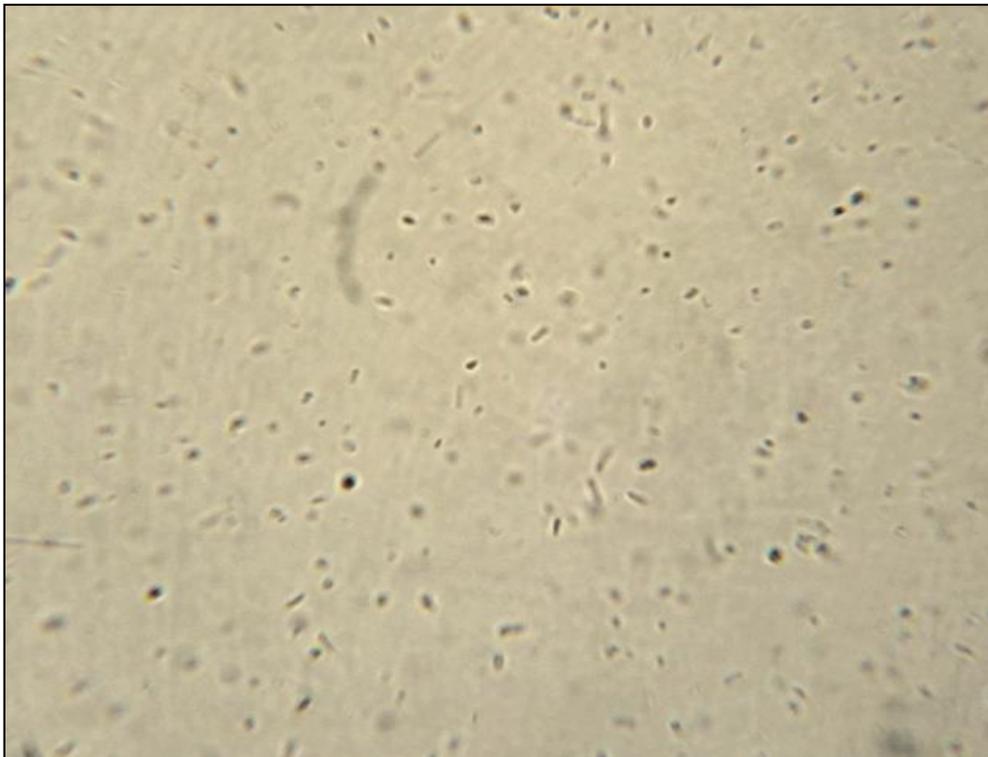


Figura 19. Observación microscópica (400 X) de bacterias halófilas extremas.



Figura 20. Cultivos puros de bacterias halófilas extremas nativas.

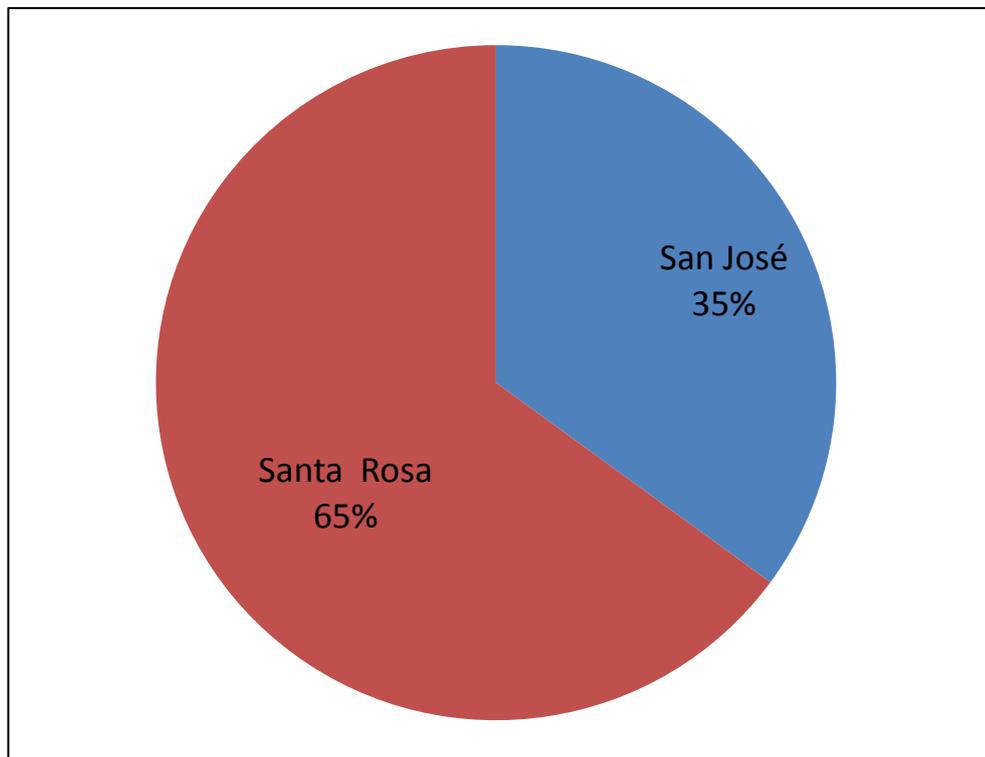


Figura 21. Porcentaje de bacterias halófilas extremas aisladas de aguas de salinas de San José y Santa Rosa, en Lambayeque, 2012.

4.2 Bacterias halófilas extremas nativas productoras de PHA

En el 9 % (14) de bacterias halófilas extremas nativas se detectó la presencia de PHA mediante la tinción lipofílica de Sudan Negro B (Anexo 5). Los gránulos de PHA se encontraron distribuidos en los contornos internos de la célula, ubicación que dificultó su observación. Por su parte, la naturaleza del polímero fue confirmada con un pico máximo de absorbancia a 235nm (Figura 22) y la concentración se estimó por la absorbancia a 235nm, alcanzando valores que oscilaron entre 0,009 a 0,414 (Tabla 4). En cuanto a la procedencia de las bacterias nativas productoras de PHA (Figura 23) en San José se obtuvo el 43% (6), mientras que en Santa Rosa el 57% (8).

4.3 Rendimiento Y (p/x) de PHA en bacterias halófilas extremas

La concentración de biomasa de las bacterias halófilas extremas nativas productoras de PHA osciló entre 0,0254 a 0,0877g/100mL para M11C7 y M3C6, respectivamente (Tabla 5). En cuanto al PHA, se cuantificó en cuatro de las bacterias halófilas nativas, oscilando entre 0,0048 y 0,0144 g/100mL (Tabla 6). En las diez bacterias nativas restantes la concentración de PHA fue menor de 0,0001g, por lo que no pudo ser cuantificada en las condiciones de la presente investigación.

El polímero producido por las bacterias halófilas extremas nativas se observó como un polvo blanco de consistencia quebradiza (Figura 24). Respecto al rendimiento Y (p/x), osciló entre 0,0924 y 0,4601gg⁻¹, equivalentes a 9,24 y 46,01%. La bacteria con el mayor rendimiento (46,01%) fue identificada como *Haloferax* sp. UNPRG M7.

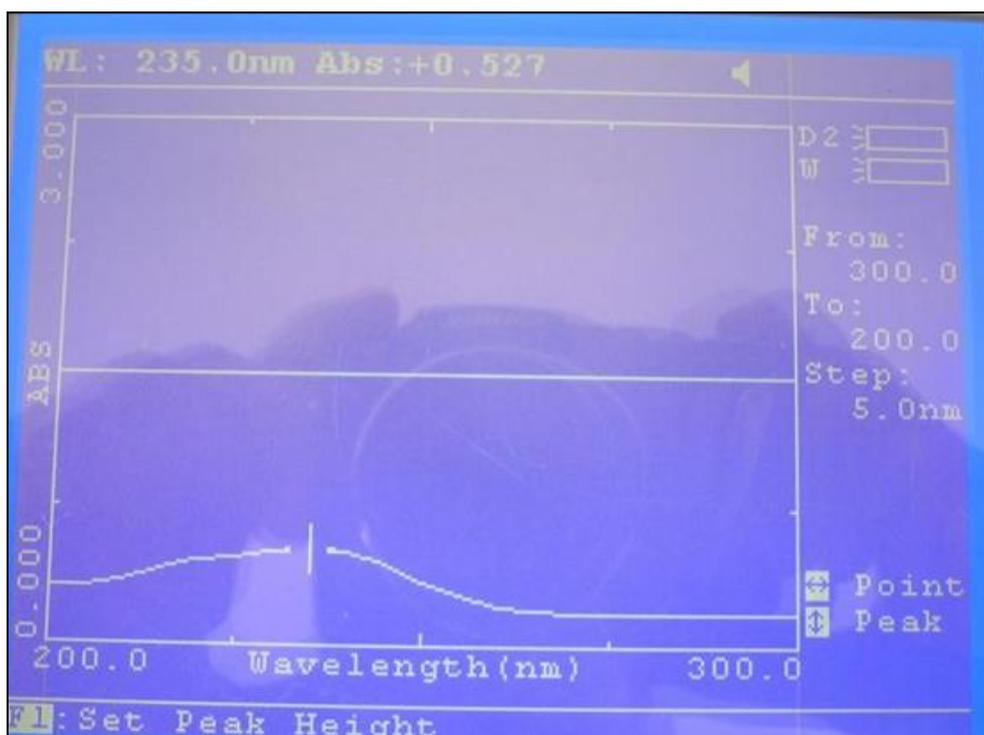


Figura 22. Corrida espectral (200 – 300 nm) de polímero recuperado con pico máximo de absorbancia a 235 nm.

Tabla 4. Absorbancia a 235 nm de PHA producido por bacterias halófilas extremas con glucosa como fuente de carbono

Código bacteria	Absorbancia (235 nm)
M7C8	0,414
M9C8	0,234
M2C6	0,162
M3C6	0,143
M11C7	0,029
M4C2	0,027
M12C2	0,026
M8C4	0,024
M3C6	0,022
M6C5	0,017
M2C6	0,016
M9C1	0,011
M8C7	0,014
M1C6	0,009

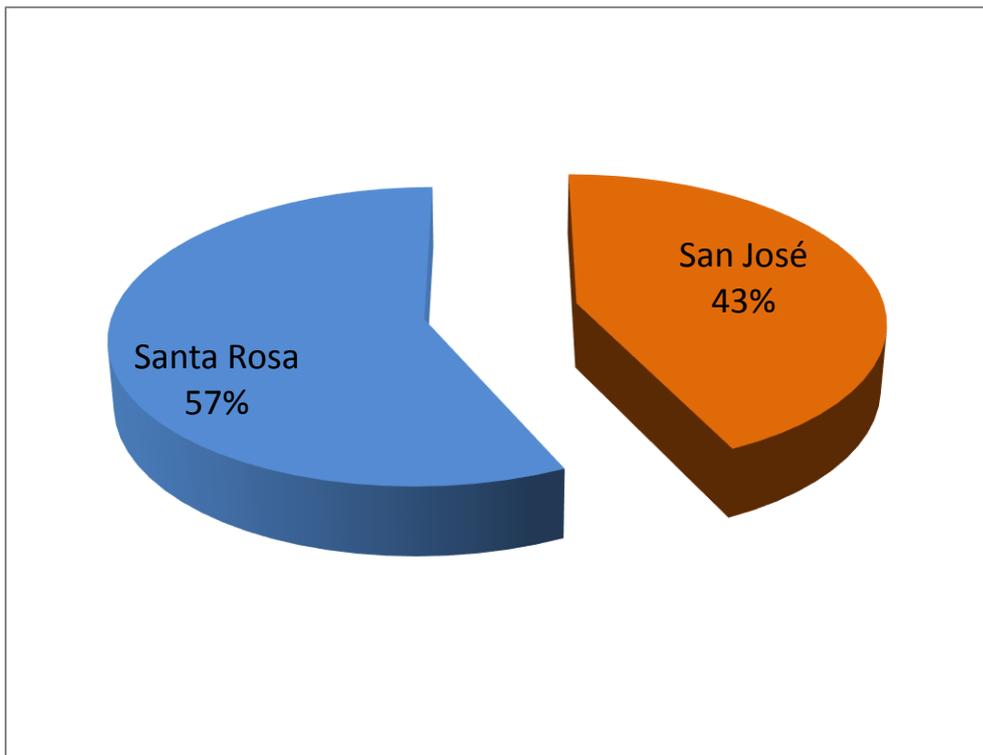


Figura 23. Porcentaje de bacterias halófilas extremas productoras de PHA aisladas de aguas de salinas en San José y Santa Rosa, Lambayeque, 2012.

Tabla 5. Biomasa de bacterias halófilas extremas nativas productoras de PHA

Código bacteria	Biomasa (g/100 mL)
M3C6	0,0877
M1C6	0,0782
M3C6	0,0766
M8C4	0,0641
M8C7	0,0583
M8C6	0,0551
M4C2	0,0532
M9C8	0,0444
M6C5	0,0415
M2C6	0,0378
M12C2	0,0364
M9C1	0,0342
M7C8	0,0313
M11C7	0,0254

Tabla 6. Rendimiento Y (p/x) de polihidroxialcanoatos de bacterias halófilas extremas nativas

Código bacteria	Biomasa (g/100 mL)	PHA (g/100 mL)	Rendimiento Y (p/x)	
			(g g⁻¹)	(%)
M7C8	0,03130	0,0144	0,4601	46,01
M9C8	0,04435	0,0057	0,1285	12,85
M2C6	0,03768	0,0048	0,1274	12,74
M3C6	0,08770	0,0081	0,0924	9,24



Figura 24. Polihidroxicanoato producido por una bacteria halófila extrema nativa.

V. DISCUSIÓN

Las salinas son aguas de mar estancadas que se evaporan lentamente por acción del sol (Ramírez et al., 2004), constituyendo hábitats que contienen una elevada concentración de sal (Mata, 2006). Las muestras de aguas de las salinas de San José y Santa Rosa en Lambayeque, presentaron hasta 25,94 g/100mL de NaCl y un rango de pH entre 8,30 – 9,01, coincidiendo con Guzmán & Hurtado (2011) y Fuentes (2011), quienes reportaron 25,00 – 28,05 g/100mL de NaCl y un pH de 7,99 – 8,03 como valores máximos para las salinas investigadas. Éstas son consideradas como ambientes extremos caracterizados por presentar temperatura, pH, presión, nutrientes o concentraciones de sales muy altas o bajas, por lo que un número muy limitado de microorganismos pueden crecer. Específicamente debido a la concentración elevada de NaCl las salinas son ambientes hipersalinos, donde esta característica no es el único factor ambiental que limita la biodiversidad sino también una mínima concentración de oxígeno, bajas o altas temperaturas, mínima disponibilidad de nutrientes, radiación solar y algunas veces una elevada alcalinidad (Ventosa, 2006).

Todas las muestras de aguas de las salinas fueron positivas para el enriquecimiento de bacterias, técnica que permite incrementar los microorganismos investigados y disminuir los contaminantes no deseados que existen en una muestra biológica (Madigan et al., 2004). A su vez en el 100% de las muestras se aislaron bacterias, consideradas según su procedencia como halófilos extremos. Similarmente Quillahuamán et al. (2004), Guzmán & Hurtado (2011) y Fuentes (2011) obtuvieron aislamientos de bacterias de lagos salinos y salinas. Por su parte,

Margesin & Schinner (2001) mencionaron que los tres dominios Archaea, Bacteria y Eukarya existen microorganismos halotolerantes capaces de vivir en presencia de sales; sin embargo, en los ambientes de salinidad extrema (>10%) los Archaea son los predominantes y debido a que requieren entre 2,5 a 5,2 M NaCl (15 – 32% p/v) para su crecimiento óptimo, son considerados halófilos extremos (Kushner & Kamekura, 1988). A medida que la concentración de sal disminuye las Bacteria aumentan, siendo mayoritarios a una concentración de sal inferior al 10%. A su vez, los Eukarya son escasos o minoritarios cuando la concentración de sal supera el 5% (Margesin & Schinner, 2001).

Considerando que el medio de aislamiento MY tiene 24% de sales, las bacterias obtenidas son haloarqueas. Al respecto, Ventosa (2006) determinó que en los ambientes hipersalinos con una concentración de salinidad que excede 1,5 M (10%) los dos principales grupos de microorganismos que predominan son las bacterias halófilas moderadas (3 – 15% p/v NaCl) y las arqueas halófilas extremas o haloarqueas (15 – 25% p/v NaCl). Estas últimas son conocidas como halobacterias, debido al organismo modelo *Halobacterium salinarum* y pertenecen al orden Halobacteriales y familia *Halobacteriaceae* que incluye un promedio de 20 géneros (Falb et al., 2008).

Las halobacterias aisladas desarrollaron colonias mucosas y anaranjadas, coincidiendo con Flores et al. (2010) quien aisló bacterias halófilas que presentaron colonias de coloraciones naranja, crema, blanca, melón y roja, prevaleciendo (69%) las cremas y las de consistencia mucosa (80%). Las haloarqueas forman colonias rosadas a rojas, debido a que sintetizan carotenoides que son parcialmente responsables de la típica coloración de muchos ambientes naturales en los que se desarrollan en grandes cantidades (Ventosa, 2006; Dyll, 2008; Fab et al., 2008). En laboratorio tienen óptimo crecimiento y buen rendimiento en la producción de carotenoides en presencia de 25% p/v de NaCl (Castillo & Barragán, 2011).

En cuanto a la morfología las células bacterianas fueron pleomórficas, observándose formas de triángulos, rectángulos, bacilos y cocos, condición que puede ser explicada porque las halobacterias son procariotas, que a excepción de Halococcus carecen de una pared celular rígida y solo tienen una capa simple de glicoproteínas denominada capa "S", que no mantiene una forma rígida, por lo que

ésta puede variar considerablemente, observándose formas bacilares, discoideas, cocoides, triangulares, bacilos largos achatados y cuadrados delgados, entre las más comunes (Ventosa 2006; Dyll, 2008).

El aislamiento de las halobacterias se realizó a 42°C, en un tiempo que osciló entre 2 – 6 días, por cuanto Dyll (2008) determinó que un rango de temperatura entre 42 – 45°C permite a las haloarqueas duplicar su tasa de crecimiento. Este investigador observó que *Haloferax volcanii* desarrolló colonias visibles después de 5 días a 37°C y el tiempo se redujo a 2 días cuando la incubación fue a 42°C. Guzmán & Hurtado (2011) observaron crecimiento de bacterias a los 13 – 18 días en medio líquido y sólido respectivamente, con 25% de NaCl p/v, a 30°C. Al respecto, Ramírez (2004) concluyó que la velocidad de crecimiento de las bacterias halófilas extremas es lenta y es influenciada por la concentración de sales y temperatura, tal que a mayor concentración de sales menor es la velocidad y a mayor temperatura mayor es la velocidad de crecimiento. Según Margesin & Schinner (2001) el incremento de temperatura en un rango de 40 – 45°C permite que aumente la solubilidad del oxígeno y favorece el crecimiento de las halobacterias, que son aerobias.

En el 9% de las haloarqueas nativas se detectó la presencia de PHA mediante la tinción con Sudan Negro B. Este porcentaje es superior a 4,17% reportado por Guzmán & Hurtado (2011) para bacterias productoras de PHA aisladas de salinas en un medio con 25% p/v de sales a 30°C. La técnica de Sudán Negro B resultó adecuada para la tinción de los gránulos de PHA, que se observaron grisáceos o negruzcos, frente a las células vegetativas rosadas, como lo manifestaron Martínez et al. (2004), Moreno et al. (2005) y Guzmán & Hurtado (2011). La observación de los gránulos de PHA teñidos fue dificultosa porque éstos se ubicaron en posición parietal junto a las vesículas de gas que según Ventosa (2006) fácilmente pueden colapsar por la presión de los gránulos de PHA. Además, las células de las arqueas halófilas extremas son muy frágiles y rápidamente se lisan con la disminución de la sal en el medio externo (Chen et al., 2006; Castillo & Barragán, 2011).

Las haloarqueas nativas sintetizaron PHA, cuya naturaleza fue confirmada con el método espectrofotométrico, observando un pico máximo de absorbancia a 235nm. De igual forma Meseguer (2004), Luque et al. (2010) y Castillo & Barragán (2011)

demonstraron que las bacterias halófilas producen PHA. Por su parte, Grant (2001) y Legat et al. (2010) detectaron PHA en las arqueas *Halorubrum*, *Haloarcula* y *Halococcus*, considerando a *Haloferax mediterranei* como la mayor haloarquea productora de este biopolímero. Según Legat et al. (2010) varias especies de la familia *Halobacteriaceae* producen PHA; sin embargo, esta característica no es diferencial del grupo.

Los PHA son poliésteres sintetizados y acumulados en forma de gránulos intracelulares por una variedad de procariotas, siendo utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes, por lo que constituyen una estrategia desarrollada por los microorganismos para incrementar su supervivencia. De esta manera, en ambientes extremos como las salinas se aislaron bacterias productoras de PHA, al igual que Guzmán & Guz (2008) y Guzmán & Hurtado (2011).

Diversas investigaciones sugieren que los gránulos de PHA son formados por las haloarqueas durante la fase de crecimiento en medios simples y complejos. Especies como *Haloarcula marismortui* (Han et al., 2007) tienen enzimas constitutivas para la síntesis de PHA y acumulan bajos niveles de este polímero continuamente, independientemente de la concentración de nutrientes. La acumulación del PHA como material de reserva les concedería una ventaja de respuesta rápida a los cambios en las condiciones ambientales.

Concluido el proceso fermentativo y debido a que los gránulos de PHA son intracelulares, se realizó la extracción a través de una digestión química de la membrana celular, utilizando hipoclorito de sodio. Se coincide con Salmiati et al. (2009), quienes demostraron que este agente químico en bajas concentraciones (< 10%) disuelve los compuestos celulares, excepto los gránulos de PHA y permite alcanzar 86 % de pureza. Al respecto, Margesin & Schinner (2001) mencionaron que la recuperación del PHA en las haloarqueas se facilita con su exposición a una baja concentración de sales, que causa rápidamente lisis celular. A continuación, para facilitar la recuperación del PHA se utilizó cloroformo como solvente orgánico, que solubiliza el polímero, siendo preferido por su rapidez y eficacia en la extracción del polímero (Naranjo, 2010; Cerrone, 2011).

El polímero producido por las halobacterias se observó como un polvo blanco de consistencia quebradiza. Al respecto, Legat et al. (2010) determinaron que el polihidroxibutirato, PHB es el principal PHA producido por las haloarqueas, aunque también se obtiene polihidroxivalerato, PHBV, en menores porcentajes. Éstos investigadores cuantificaron entre 0,05 a 0,44% del peso celular para el PHB y entre 0,03 a 0,18% de PHBV. Según Carrasco et al. (2004) el PHB es muy cristalino y de alto peso molecular. Su fragilidad se debe principalmente a la presencia de grandes cristales en forma de esferitas que se producen por enfriamiento del producto fundido, por lo que para mejorar sus propiedades debe ser copolimerizado con el polihidroxivalerato.

Según Grant (2001); Margesin & Schinner (2001) y Chen et al. (2006) las haloarqueas que no son estimuladas por los carbohidratos producen poco PHA; sin embargo, las especies que metabolizan los azúcares como fuente de carbono y energía como *Haloferax mediterranei* acumulan 50,8% del peso de la célula en PHB en medios con 20,23% p/v de sales.

El uso de las haloarqueas como *Haloferax* sp.UNPRG M7 para la obtención de PHB presenta ventajas, debido a que la salinidad (2 – 5 M NaCl) requerida para su crecimiento disminuye notablemente los problemas de contaminación inherentes a los procesos fermentativos, incrementado la rentabilidad (Castillo & Barragán, 2011). Además, las haloarqueas crecen rápidamente en el laboratorio y a diferencia de otras arqueas extremófilas no requieren condiciones especiales de cultivo (Ventosa, 2006).

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Se aislaron bacterias halófilas extremas a partir de muestras de aguas de las salinas de los distritos San José y Santa Rosa en Lambayeque.
- ✓ En el 9% de las bacterias halófilas extremas nativas se detectaron gránulos de polihidroxialcanoatos, PHA, utilizando la tinción de Sudán Negro B.
- ✓ El rendimiento $Y (p/x)$ osciló entre 0,0924 y 0,4601 gg^{-1} , equivalentes a 9,24 y 46,01%.
- ✓ La bacteria halófila extrema nativa con el mayor rendimiento $Y (p/x)$ fue identificada como *Haloferax* sp.UNPRG M7.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Caracterizar mediante técnicas moleculares Haloferax sp.UNPRG M7.
- ✓ Purificar y caracterizar el PHA producido por Haloferax sp.UNPRG M7.
- ✓ Investigar sustratos económicos, de fácil disponibilidad y propios de la región para la producción de PHA por Haloferax sp.UNPRG M7.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvitres, V. (2000). Método Científico. Planificación de la investigación. Lambayeque, Perú: Editorial Ciencia.
- Bayona, A. (2003). Conservación y mantenimiento de cepas microbianas con fines docentes e investigativos. *Laboratorio Actual*, 20(36), 35-39.
- Carrasco, F., Majone, M., Dionisi, D., Petrangeli, M., Carucci, G. & Beccari, M. (2004). Los polihidroxicanoatos: Plásticos biodegradables producidos por microorganismos. Ingeniería Química. Universidad de Girona, Italia.
- Carreño, C. & Muñoz, V. (2012). Manual de Prácticas Microbiología Industrial. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Castro, L., Flores, A., Rodríguez, A., Aguilar, M., Aguilar, C. & Rodríguez, R. (2011). Aislamiento y caracterización de microorganismos halófilos de suelos salinos de cuatro ciénagas Coahuila. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3, 5-8.
- Castillo, L. & Barragán, B. (2011). Aplicaciones biotecnológicas de microorganismos halófilos. *Revista Sistemas ambientales*. 4(2), 45-56
- Cerrone, F. (2011). Producción de poliésteres biopoliméricos (PHAs) desde alpeorajo por medio de bacterias fijadoras de nitrógeno. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- Chen, W., Trong, D. & Hsiao, Y. (2006). Enzymatic extruded starch as a carbon source for the production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *Process Biochemistry*, 41, 2289-2296.
- Cholula, L. (2005). Estudio de la producción de poli-hidroxi-butilato (PHB) en *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis de grado. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Díaz, S. (2007). NAD – glutamato deshidrogenasa de *Haloferax mediterranei*: clonaje, secuenciación y expresión. Purificación y propiedades de la enzima nativa y recombinante. Tesis de doctorado. Universidad de Alicante, España.

- Dawes, E. (1988). Polyhydroxybutyrate: An intriguing biopolymer. *Bioscience Reports*, 8 (6), 537-547.
- Dong, C., Chen, T. & Chang, T. (2006). Preparation and characterization of poly (hydroxyalkanoates) from the fermentation of *Haloferax mediterranei*, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 12, 1425 – 1438.
- Dorán, P. (1998). *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. España: Ed. Acribia. S.A.
- Dyall, M. (2008). *The Halohandbook: Protocols for haloarchaeal genetics*. 7ma Ed. Australy.
- Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., von Gronow, (...) & Oesterhelt, D. (2008). Metabolism of halophilic Archaea. *Extremophiles*, 12, 177-196.
- Flores, M., Zavaleta, A., Zambrano, Y., Cervantes, L. & Izaguirre, V. (2010). Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e Investigación*, 13(1), 42-46.
- Formolo, M. (2006). Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero. Tesis de Maestría. Universidad Federal de Santa Catalina, Florianópolis, Brasil.
- Fuentes, J. (2011). Exopolisacáridos con actividad emulgente sintetizados por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de melaza de caña. (*Saccharum officinarum* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Grant, W. (2001). Genus I. *Halobacterium* Elzari-Volcani 1957, 207,AL emend. Larsen and Grant 19889, 22222. In: Boone DR, Castenholz Rw, Garrity GM (eds) *Bergey's manual of Systematic bacteriology*, vol. I, 2nd edn. New York: Springer Verlag.
- Grigull, V., Da Silva, D., Formolo, M., Aparecida, S., Pezzin, A., Schneider, A. & Facao, G. (2008). Production and Characterization of poly (3-hydroxybutyrate) from oleica cid by *Ralstonia eutropha*. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2), 221-226.

- Guzmán, C. & Hurtado, A. (2011). Producción de polihidroxicanoatos por bacterias halófilas nativas en diferentes concentraciones de almidón contenido en cáscaras de *Solanum tuberosum* L. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Guzmán, M. & Guzmán, H. (2008). Producción de plásticos biodegradables obtenidos de bacterias halófilas aisladas de Laguna Blanca, Potosí. Tesis de maestría. Universidad Mayor de San Simón, Bolivia.
- Han, J., Lu, Q., Zhou, L., Zhou, J. & Xiang, H. (2007). Molecular characterization of the *phaEChm* genes, required for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 6058-6065.
- Hernández, R.; Fernández, C. & Baptista, P. (2003). Metodología de la investigación. México: Editorial Mc Graw. Hill Interamericana.
- Huang, T, Duan, K., Huang, S. & Chen, W. (2006). Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 701-706.
- Kushner, D. & Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic bacteria, *Halophilic Bacteria*, 1, 109 – 138.
- Law, J. & Slepecky, R. (1961). Assay of poly- β -hydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology*, 82, 33-36.
- Lee, S.,Yup, S. & Nam, H. (1995). Production of Poly(hydroxyalkanoic acid). *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 52, 27-55.
- Legat, A., Gruber, C., Zangger, K., Wanner, G. & Stan-Lotter, H. (2010). Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other haloarchaeal species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 1119-1127.
- Luque, R., Quesada, E., Bejar, V. & Llamas, J. (2010). Aislamiento de cepas del género *Halomonas* con interés biotecnológico en Rambla Salada (murcia). *ARS Pharmaceutica*, 51(3), 453-462.

- Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. 10ma ed. Madrid: Pearson Educación, S.A.
- Marchessault, R. & Yu, G. (2002). Crystallization and material properties of polyhydroxyalkanoates. Research Center, 1, 157-166.
- Margesin, R. & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. Extremophiles, 5(2), 73-83.
- Martínez, J., Rodríguez, M., Fernández, Villaverde, M., López L., Marín. D., Núñez, R. & Carballo, E. (2004). Producción de polihidroxicanoatos en bacterias diazotrofas. 1. Influencia de la aireación en la síntesis de poliβ-hidroxi-butilato en *Azospirillum brasilense* cepa 7. Revista Biología, 18 (1), 87-95.
- Martin, D., Skraly, F. & Simon, F. (2007). Composición de polihidroxicanoatos con tasas controladas de degradación. Traducción de Patente Europea. Nº 2281147, Madrid.
- Mata, J. (2006). Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Meseguer, I. (2004). Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. Ciencia e Investigación, 2(2), 13-17.
- Moreno, N., Barbosa, M., Espinoza, A. & Malagón, D. (2005). Producción de Poli-β-hidroxi-butilato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 176997. Universitas Scientiarum, 1, 45 - 54.
- Naranjo, J. (2010). Producción de polihidroxi-butilato a partir de residuos agroindustriales. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales, Colombia.
- Quillahuaman, J., Hatti, R., Mattiasson, B., Álvarez, M. & Delgado, O. (2004). *Halomonas boliviensis* sp. nov. an alkalitolerant moderate halophile isolated from soil around a bolivian hypersaline lake, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54, 721 – 725

- Quillahuaman, J., Doan-Van, T., Guzman, H., Guzman, D., Martin, J. & Everest, A. (2008). Poly (3-hydroxybutyrate) production by *Halomonas boliviensis* in fed-batch cultura. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 227-232.
- Ramírez, N., Sandoval, A. & Serrano, J. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24, 12-23
- Rodríguez, F., & García, J. (1990). Effects of culture conditions on Poly (β – hidroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*, *Applied and Environmental Microbiology*, 8, 2517 – 2521.
- Saad, A., Hermida, E. & Povoló, F. (2001). Determinación de los módulos tensil y de almacenamiento de compuestos de PHB. *Jornadas SAM*, 1, 967-976.
- Salmiati, Z., Salim, M. & Elsson, G. (2009). Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from mixed microbial cultures by simple digestion and saponification. *Institute of Environmental and Water Resource Management. University Teknology, Malaysia*.
- Tian, P., Shang, L., Ren, H., Mi, Y. & Fan, D. (2009). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development. *African Journal of Biotechnology*, 8(5), 709-714.
- Ventosa, A. (2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats: Hypersaline environments. *University of Seville, Spain*.
- Vieyra, H. (2011). Elaboración de polímeros biodegradables polietileno-almidón y estudio de biodegradabilidad. Tesis de Maestría. *Instituto Politécnico Nacional, México DF*.

ANEXOS

ANEXO 1

Cálculo del número de muestras de aguas de salinas para el aislamiento de bacterias halófilas extremas productoras de PHA (Alvitres, 2000)

$$n = \frac{Z^2(p \cdot q)}{t^2}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra

Z = 1,96 ($\alpha = 0,05$) valor estándar.

p = Prevalencia o presencia de bacterias productoras de PHA en aguas de salinas (0,10).

q = Ausencia (0,90).

t = error permitido (8 %).

$$n = \frac{(1,96)^2(0,10 \times 0,90)}{(0,08)^2}$$

n = 54 muestras

ANEXO 2

Medio de cultivo (g/L) específico para halófilos extremos

NaCl	194,0
MgCl ₂	16,0
MgSO ₄	24,0
CaCl ₂	1,0
KCl	5,0
NaHCO ₃	0,2
NaBr	0,5
Glucosa	2,0
Extracto de Levadura	7,5
pH final	7,5

Para el agar específico para halófilos extremos agregar 1,5 g de agar por litro de caldo.

ANEXO 3

Conservación de bacterias halófilas extremas con glicerol a 25 % (Bayona, 2003)

- Obtener una solución de glicerol al 50 % esterilizada.
- Depositar 0,5 mL de la solución de glicerol al 50 % en crioviales de 1,5 mL de capacidad.
- Tomar 0,5 mL del cultivo de la bacteria halófila extrema en fase estacionaria (tubos 4 – 5 del nefelómetro de Mc Farland).
- Verter el cultivo bacteriano en el criovial conteniendo la solución de glicerol al 50 % (0,5 mL de medio + 0,5 mL de glicerol al 50 % resulta una solución final de glicerol a 25 %).
- Agitar fuertemente para homogenizar el contenido.
- Colocar el criovial a 4 °C por 1 hora.
- Conservar el criovial a -20 °C por 1 año.

ANEXO 4

Medio de cultivo (g/L) caldo específico para halófilos extremos modificado

(Según Rodríguez & García, 1990)

NaCl	194,0
MgCl ₂	16,0
MgSO ₄	24,0
CaCl ₂	1,0
KCl	5,0
NaHCO ₃	0,2
NaBr	0,5
Glucosa	10,0
Extracto de Levadura	7,5

pH final	7,5
----------	-----

ANEXO 5

Técnica de coloración con Sudan Negro B (Carreño y Muñoz, 2012)

- Cubrir las extensiones con la solución de Sudan Negro B por 15 minutos.
- Decolorar con xilol, secar y contrateñir con safranina durante 10 segundos.
- Lavar con agua.
- Observar con lente de inmersión. Los gránulos de PHA se colorean de gris negro y las células vegetativas de rosado.

ANEXO 6

Determinación cualitativa de polihidroxialcanoatos por espectrofotometría (según Cholula, 2005)

- Depositar el polímero obtenido en un tubo de ensayo.
- Agregar 1mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Llevar a baño maría, a una temperatura entre 90 – 95°C por 10 minutos, en agitación constante.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente (28°C).
- Colocar el contenido en una celda de cuarzo y hacer una corrida espectral en un rango comprendido entre 200 a 300nm.
- Si el pico de absorbancia más alto se encuentra a 235nm es una prueba positiva para el polihidroxibutirato P(3HB).