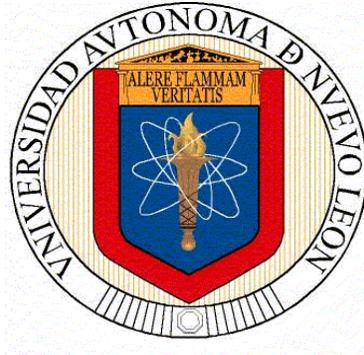


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**"AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE BACTERIAS DEL GÉNERO *BACILLUS* (CHRISTIAN GOTTFRIED EHRENBERG, 1835) PRODUCTORAS DE POLIHIDROXIALCANOATOS".**

**POR:**

**ÁLVARO RIOS SOSA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**2022**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"Aislamiento, identificación y caracterización fisiológica de bacterias del género *Bacillus* (Christian Gottfried Ehrenberg, 1835) productoras de polihidroxicanoatos".

Por

ÁLVARO RIOS SOSA.

Como requisito para obtener el grado de Maestría en ciencias con  
orientación en Microbiología.

2022

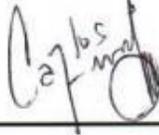
"Aislamiento, identificación y caracterización fisiológica de bacterias del género *Bacillus* (Christian Gottfried Ehrenberg, 1835) productoras de polihidroxialcanoatos".

Comité de Tesis

---

Dra. Elva Teresa Aréchiga  
Carvajal

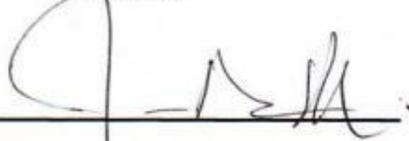
Director de Tesis



---

Dr. Carlos Eduardo Hernández  
Luna

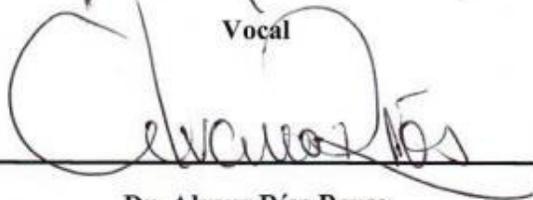
Secretario



---

Mtr. Juan Manuel Adame Rodríguez

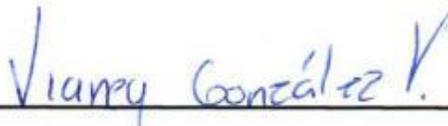
Vocal



---

Dr. Alvaro Ríos Reyes

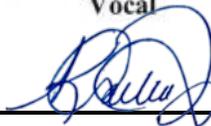
Vocal



---

Dra Vianey González Villasana

Vocal



---

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Subdirectora de Posgrado



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **Agradecimientos**

Llegar hasta aquí no habría sido posible sin el apoyo académico brindado por varios docentes, Dra. Katiushka Arévalo Niño, Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna, Dr. Benito Pereyra Alférez, Dra Vianey González Villasana, y muchos otros a lo largo de la carrera por brindar los conocimientos utilizados, ni sin el apoyo del MC Juan Manuel Adame Rodríguez, jefe del laboratorio donde se realizó el proyecto. También se le agradece al Dr. José Santos García Alvarado por el apoyo como coordinador del programa de maestría, de igual manera se reconoce el gran apoyo brindado por mis compañeros de laboratorio Katia Jamileth Gonzales Lozano, Juan Pablo Cabral Miramontes, Felipe de Jesús Mares Rodríguez, etc. Adicionalmente se agradece mucho el apoyo proporcionado por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Gobierno Federal de México por el apoyo económico proporcionado en la realización de este proyecto de maestría. A la Dra. María Elizabeth Alemán Huerta y a la Dra. Arely Prado Barragán se les agradece mucho también por el apoyo externo brindado al proporcionar información de interés para el proyecto. La dirección proporcionada por la Dra. Elva Teresa Arechiga Carvajal fue indispensable, su conocimiento, recursos y colaboración fue la piedra angular que permitió el desarrollo de este trabajo, se da un agradecimiento especial a Camilo Alonso Vázquez Pérez por proporcionar las muestras de suelo de Tabasco utilizadas en este proyecto. Finalmente se agradece mi *alma mater* en si la Universidad autónoma de Nuevo León por el apoyo proporcionado económicamente como hijo de trabajador y por proveer el ambiente y lugar para poder desarrollar la carrera profesional. *¡Alere Flammam Veritatis!*

## **Dedicatoria**

Esta tesis es una marca de gran crecimiento personal, yo no sería el hombre que soy sin mi familia, a mis padres Alvaro Ríos Reyes y Liliana Beatriz Sosa Compeán por todos los años en los que me apoyaron de manera incondicional como su hijo, ellos me formaron como persona y todos los logros que tengo tienen su origen en ellos, a mi hermana Ethel Cyrene Ríos Sosa, mi abuela Beatriz Compean Guzmán, a mis tíos, a mis primos, a mis amigos, a la gracia de Dios, todos tienen un lugar en ayudarme a ser lo que soy, esta tesis es uno de los productos de este proceso y por esto les dedico a todas estas personas que han sido importantes que me han acompañado en este viaje llamado vida.

## Índice

Resumen.....	10
<b>Abstract.....</b>	<b>11</b>
1. Introducción.....	12
2. Antecedentes .....	14
<b>2.1. Metabolismo de la ruta del PHB conocido.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.Polihidroxitirato:.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.Estado el arte.....</b>	<b>20</b>
3. Justificación.....	23
4. Hipótesis .....	23
5. Objetivos.....	23
<b>5.1. Objetivos generales .....</b>	<b>23</b>
<b>5.2.Objetivos específicos.....</b>	<b>23</b>
6. Materiales y métodos .....	24
<b>6.1. Aislamiento.....</b>	<b>25</b>
<b>6.2.Protocolo de extracción de ADN con CTAB.....</b>	<b>25</b>
<b>6.3.Identificación de bacterias con genes productores .....</b>	<b>26</b>
<b>6.4.Pruebas bioquímicas .....</b>	<b>27</b>
<b>6.5.Identificación de bacterias productoras de PHB:.....</b>	<b>28</b>
<b>6.6.Determinación de concentración celular .....</b>	<b>29</b>
<b>6.7.Cinética de crecimiento y conteo de UFC.....</b>	<b>29</b>
<b>6.8.Extracción de PHB .....</b>	<b>29</b>
<b>6.9.Ensamblaje del genoma .....</b>	<b>30</b>
7. Resultados.....	31
8. Discusión .....	37
9. Conclusiones .....	39

10. Perspectivas .....	39
11. Bibliografía.....	40

## Índice de figuras

Figura 1: Ruta metabólica del PHB.....	17
Figura 2: Rutas metabólicas alternativas.....	18
Figura 3: Numero de publicaciones (azul) y patentes (rojo) desde 2005 hasta el 2020.....	20
Figura 4: Formula química de varios compuestos del grupo PHA (Ke, Yu & Liu, et al, 2017).....	21
Figura 5: Tamaño de mercado de los plásticos más comunes en el mundo.....	22
Figura 6: Diagrama de flujo con la metodología general utilizada para el proyecto. ....	24
Figura 7: Secuencia codificante para PhaC.....	27
Figura 8: Placas con colonias bacterianas sometidas a tinción con Sudan Black B .....	28
Figura 9: Reacción positivas para detección de 16s y PhaC .....	33
Figura 10: Formación de PHB en diferentes cepas .....	34
Figura 11: Curva de crecimiento en medio inductor de PHB. ....	34
Figura 12: Grafico tipo Bandage.....	35
Figura: 13: Genes encontrados en el genoma ensamblado .....	36

## Índice de tablas

Tabla 1: Homología entre la secuencia nucleotídica del gen PhaC .....	15
Tabla 2: Muestras de Bacilos y su producción de PHB aisladas de diferentes lugares .....	16
Tabla 3: Propiedades físicas del polihidroxiutarato(Mistra et al. 2006). .....	19
Tabla 4: Compañías productoras de plásticos PHA en el mundo .....	22
Tabla 5: Oligonucleótidos diseñados para detección del gen PhaC por PCR.....	27
Tabla 6: Características encontradas en las cepas de bacilos Gram positivos aislados .....	32
Tabla 7: Características generales del genoma ensamblado de la cepa MSF4 .....	35
Tabla 8: Características del grupo de genes .....	36

## Resumen

La acumulación de plástico hecho a base de petróleo ha contribuido considerablemente a la problemática ambiental actual, la producción de plástico alcanzo aproximadamente 500 millones de toneladas en el 2020, encontrándose en estudios de monitoreo que los desechos plásticos y micro plásticos se encuentran en prácticamente todos los lugares del planeta. El ácido polihidroxitirico (PHB), es un biopolímero tipo poliéster, es decir con un grupo éster en su cadena principal, expresado como forma de almacenar energía en ambientes con abundantes fuentes de carbono pero carentes en otros nutrientes como nitrógeno por algunos microorganismos, siendo algunas de las mejores cepas productoras aisladas de refinerías o aguas residuales. El PHB es candidato ideal para sustituir los plásticos, los cuales se obtienen a base de petróleo, obteniendo así una alternativa más biodegradable. Puede ser producido usando sustratos relativamente baratos como desechos de caña de azúcar, maíz, agave, glicerol, lodos activos, desechos de acuicultura, etc. Las condiciones en la que se encuentran las cepas productoras de PHB también pueden ser propicias para cepas tolerantes a condiciones extremas, además de tolerancia a escases de nutrientes se pueden encontrar cepas alcalofilas, resistentes a alta salinidad y temperaturas elevadas. En este proyecto se aislaron y caracterizaron cepas del género *Bacillus* de muestras de suelo en territorio mexicano productoras de PHB identificadas utilizando pruebas bioquímicas y moleculares utilizando oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen PhaC, comprobándose la capacidad de producción de estas por tinción en medio inductor, se encontraron características de resistencia a condiciones de estrés similar a la extremofilia, notablemente las cepas MSF4 y MSD1 mostraron crecimiento con colonias visibles en 6 horas a 40°C y tolerancia a pH 9 en el caso de la primera y el genoma de MSF4 fue ensamblado, anotándose los genes referentes a la producción de PHB, dando un panorama más claro de la flora microbiana del país y su potencial biotecnológico.

## **Abstract**

The accumulation of petroleum-based plastic has contributed considerably to the current environmental problems. Plastic production reached approximately 500 million tons in 2020, and monitoring studies have found that plastic waste and microplastics are found in practically all parts of the planet. Polyhydroxybutyric acid (PHB) is a polyester-type biopolymer, with an ester group in its main chain, expressed as a way to store energy in environments with abundant carbon sources but lacking in other nutrients such as nitrogen by some microorganisms, some of the best producing strains being isolated from refineries or wastewater. PHB is an ideal candidate to replace plastics, which are obtained from petroleum, thus obtaining a more biodegradable alternative. It can be produced using relatively inexpensive substrates such as sugar cane waste, corn, agave, glycerol, activated sludge, aquaculture waste, etc. The conditions in which PHB-producing strains are found can also be conducive to strains tolerant to extreme conditions, in addition to tolerance to nutrient shortages, alkalophilic strains resistant to high salinity and high temperatures can be found. In this project, PHB-producing strains of the *Bacillus* genus were isolated and characterized from soil samples in Mexico, identified using biochemical and molecular tests using oligonucleotides designed to amplify the *PhaC* gene, and their production capacity was verified by staining in inductor medium, resistance characteristics to stress conditions similar to extremophilia were found, notably the MSF4 and MSD1 strains showed growth with visible colonies in 6 hours at 40°C and tolerance to pH 9 in the case of the former, and their genome was assembled and annotated, giving a clearer picture of the microbial flora of the country and its biotechnological potential.

## 1. Introducción

La producción de plásticos a base de petroquímicos ha crecido de 1.5 millones de toneladas en 1950 a 299 millones de toneladas con un crecimiento anual del 9% en 2013, proyectándose hasta 840 millones para 2025, estos tienden a acumularse en el ambiente al no tener tiempos de degradación cortos, un máximo de un 90% del material degradado en 6 meses definido por la norma NMX-E-273-NYCE y ASTM D6400, objetos plásticos grandes se fragmentan y forman micro plástico. Los problemas relacionados con el impacto ambiental debido a la actividad humana son temas de mayor interés para la sociedad, uno de las causas más notables son los plásticos no biodegradables los cuales pueden acumularse en el ambiente y permanecer ahí por miles de años causando no solo efectos nocivos para la fauna, sino que también potencialmente para los humanos. (*Williams & Caridad, 2013*) (*Xiao Zhi Lim 2021, <https://doi.org/10.1038/d41586-021-01143-3>*)

Las propiedades del plástico como la elasticidad, resistencia, maleabilidad y versatilidad general hace que la independencia de este producto sea difícil en la práctica, sin embargo, existen materiales con propiedades similares que tienen la ventaja de ser fácilmente degradables como los biopolímeros del grupo de los polihidroxicanoatos (PHAs), los cuales están compuestos por 300 a 35,000 monómeros de ácidos grasos hidroxilados, cada monómero tiene una cadena R que es usualmente un alquilo. (*Chia- Lung, et al. 2014*) El compuesto más común del grupo PHA es el ácido polihidroxibutírico (PHB), un biopolímero producido en bacterias como respuesta a exceso de fuentes de carbono y limitadas fuentes de nitrógeno en su ambiente además de otras condiciones adversas, entre las bacterias que reportan expresión de este biopolímero se encuentran; *Bacillus licheniformis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Pseudomonas* sp, *Aeromonas* sp, *Alcaligenes* sp, *Chromobacterium* sp. (*Sangkharak & Prasertsan, 2012*) (*Hassan et al. 2018*) (*Rodríguez-Contreras et al, 2013*)

En México se cuentan con una amplia diversidad de ecosistemas y ambientes donde se pueden aislar microorganismos de interés, desde desiertos hasta junglas, campos de cultivo y refinerías, dando la oportunidad de encontrar cepas con características potencialmente útiles en organismos que se desea usar en producción industrial, como alta resistencia a alcalinidad o acidez o altas temperaturas además de bajo requerimiento nutricional, *Bacillus* siendo un gran candidato a considerar por su abundancia, resistencia a condiciones extremofílicas y lo conocida que es la especie como modelo biotecnológico.

En el país además se producen grandes cantidades de desechos agropecuarios, lácteos, etc. Los cuales son sustratos potenciales para bacterias productoras de PHB baratos, lo cual es uno de los retos para la producción a escala industria del biopolímero junto con el paso de extracción, esto da un área de oportunidad a México de potencialmente explotar este nicho biotecnológico (*Martínez-Herrera et al, 2020*)

El proyecto presentado se enfocó en el aislamiento y caracterización de cepas del género *Bacillus*, principalmente se buscaron cepas con la capacidad de producir PHB las cuales se identificaron por amplificación del gen productor del polímero, PhaC y se confirmó por inducción de producción en medio de cultivo modificado. Ambientes contaminados con lípidos son especialmente considerados por tener las mejores tasas de expresión de PHB reportadas en bacterias Gram positivas, siendo capaces de mostrar hasta un 70% de su peso seco en producción (*Rodríguez-Contreras et al. 2013*). Otras propiedades como utilización de sustratos, tolerancia a condiciones extremas, capacidad de esporulación, fueron tomadas en cuenta para caracterizar mejor las cepas aisladas e identificar la especie.

## 2. Antecedentes

La presencia de gránulos de PHB se observó por primera vez en *B. megaterium* por Maurice Lemoigne en 1926, sin embargo los microorganismos modelo para la producción de este biopolímero suelen ser bacterias Gram negativas, como *Ralstonia eutropha*, con hasta el 87% de su peso seco, sin embargo una ventaja de bacterias del género *Bacillus* sobre estos organismos al ser utilizados como productores es que el PHB sintetizado por bacterias Gram negativas contienen lipopolisacárido (LPS) que son endotoxinas bacterianas que pueden causar reacciones inmunogénicas al contacto, ( Sang Yup Lee. 1999)

Las bacterias del género *Bacillus* se caracterizan por ser Gram positivas, aerobias y mesófilas con un rango de temperatura óptima de 30 a 37 °C, siendo uno de los grupos de microorganismos más comunes en los suelos, estos son de interés humano en el ámbito de salud y el económico, *Bacillus* es uno de los principales grupos bacterianos que producen antibióticos. (Contreras, 2014) Son de crecimiento rápido pueden llegar a fase estacionaria en no más de 6 horas (Castañeda & Consuelo 2016) una de las características más icónicas de estas es la producción de endosporas, permitiéndole a la bacteria sobrevivir independientemente de la célula madre a condiciones adversas, como falta de oxígeno y agua, este mecanismo de defensa, que consiste únicamente en la formación de endospora, es un proceso que tarda en promedio 16 horas, (Fajardo, et al. 2011). Esta adaptación es una de las características que confieren a las bacterias del género *Bacillus*, muy similarmente a las anaerobias *Clostridium*, cierto grado de extremofilia aun fuera de estado vegetativo, ya que la formación de esta estructura les permite sobrevivir a condiciones extremas de estrés, como altas temperaturas, salinidad o acidez, en estado latente hasta que las condiciones en las que se encuentran sean nuevamente favorables para su crecimiento (Santos, 2012).

Tabla 1: Homología entre la secuencia nucleotídica del gen *PhaC* en diferentes especies de *Bacillus*

Nombre Científico	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<i>Bacillus cereus</i>	2013	2013	100%	0	100.00%	1090	AY907827.2
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1999	1999	99%	0	99.82%	5637049	CP021436.1
<i>Bacillus wiedmannii</i>	1943	1943	99%	0	98.90%	5309441	AP022643.1
<i>Bacillus tropicus</i>	1832	1832	99%	0	97.06%	5246960	CP049019.1
<i>Bacillus anthracis</i>	1738	1738	99%	0	95.50%	5135792	CP054816.1

*B. megaterium* sigue siendo el pionero en expresión de PHB, la cepa uyuni S29 aislada del salar Uyuni, Bolivia es un ejemplo al ser capaz de sintetizar el biopolímero de manera natural con una producción de hasta el 70% de su peso seco en PHB haciéndola una de las bacterias Gram positivas con mayor eficiencia reportada, obtenidos utilizando medio mínimo mineral a 35°C con un valor de pH de 6.7 a 7 (Rodríguez- Contreras et al. 2013).

Otras bacterias del mismo género también han reportado producción siendo los aislados de ambientes contaminados con aceites de cadena larga, hidrocarburos o de residuos mineros, es decir de ambientes hostiles. Este proceso tradicionalmente es atribuido a la movilización y almacenamiento de carbono en caso de que esta encuentre limitaciones de fuente de carbono en un futuro, estudios recientes reportan otras funciones fisiológicas del PHB en mecanismos de protección contra agregación de proteínas y protección a membrana celular causados por radicales libres de oxígeno reactivo y choque térmico supervivencia a condiciones de choque térmico y estrés oxidativo, respuesta regulada por el nucleótido ppGpp. (Marcelo, et al. 2021)

Tabla 2: Muestras de Bacilos y su producción de PHB aisladas de diferentes lugares

Bacteria productora de PHB	Lugar de aislamiento	% de PHB en peso seco	PHB /l de medio	Referencia
<i>Bacillus megaterium</i> uyuni S29	Salar Uyuni, Bolivia	70%	2.35 g/l	Rodríguez-Contreras, A. (2013). High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild <i>Bacillus megaterium</i> Bolivian strain. <i>Journal of Applied Microbiology</i> , 1378--1387.
<i>Bacillus subtilis</i> G-3	Campo de biodiesel Jatropaha	62.6%	0.81 g/l	Hassan et al.(2018) Statistical optimization studies for polyhydroxybutyrate (PHB) production by novel <i>Bacillus subtilis</i> using agricultural and industrial wastes
<i>Bacillus megaterium</i>	Planta de tratamiento de aguas residuales, Alejandria, Egipto	38.42%	0.48 g/l	K.Gouda, M. (2001). Production of PHB by a <i>Bacillus megaterium</i> strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. <i>Microbiological Research</i> , 201-207.
<i>Bacillus subtilis</i>	Suelos contaminados del área industria de Helwan y Kaluobia en Egipto	62.21%	23.20 g/l	Eman, Z, et al. (2014) Production of (PHAs) By <i>Bacillus subtilis</i> and <i>Escherichia coli</i> Grown on Cane Molasses Fortified with Ethanol
<i>Bacillus megaterium</i>	Sedimentos marinos obtenidos en la costa este de Tamil Nadu, India	62.4%	2.74 g/L	K. Mohanrasua, et al. (2020) Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by <i>Bacillus Megaterium</i>
<i>Bacillus sp. CI</i>	Suelo de la rizosfera en <i>Saccharum officinarum</i> , <i>Calotropis procera</i> , <i>Ficus benghalensis</i> , <i>Bambusa vulgaris</i> y <i>Ipomoea batatas</i>	35%	4.39 g l	Swayamsidha Pati, et al. (2020)Biocompatible PHB Production from <i>Bacillus</i> Species Under Submerged and Solid-State Fermentation and Extraction Through Different Downstream Processing
<i>Bacillus subtilis</i> NG220	Suelo de campos de caña de azúcar, India.	51%	5.297 g/L	Singh, G., Kumari, A., Mittal, A., Yadav, A., & Aggarwal, N. K. (2013). Poly β-hydroxybutyrate production by <i>Bacillus subtilis</i> NG220 using sugar industry waste water. <i>BioMed research international</i> , 2013, 952641. <a href="https://doi.org/10.1155/2013/952641">https://doi.org/10.1155/2013/952641</a>
<i>Bacillus licheniformis</i> PHA 007	Desperdicio de pepinillos	68.80%	6.58 g/l	Sangkharak K, Prasertsan P. Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. <i>J Gen Appl Microbiol</i> . 2012;58(3):173-82. doi: 10.2323/jgam.58.173. PMID: 22878735.

## 2.1. Metabolismo de la ruta del PHB conocido

El PHB normalmente se produce tanto en condiciones de abundancia de cualquier fuente de carbono utilizable por la bacteria, como la glucosa, fructosa, lactosa, etc., y condiciones de estrés como escasas de nitrógeno y oxígeno (Singh *et al.* 2009). La ruta metabólica para producción de este consiste de tres enzimas;  $\beta$ -cetotilasa, codificada por el gen *phaA*, cataliza dos moléculas de acetil CoA en una de acetoacetyl CoA. NADPH-dependiente acetoacetyl-CoA deshidrogenasa, codificada por gen *phaB*. Y P (3HB) sintetiza, codificada por gen *phaC*, que es la enzima específica para esta ruta, polimeriza los monómeros de (R)-3-hidroxibutiril-CoA. (Fig. 1)

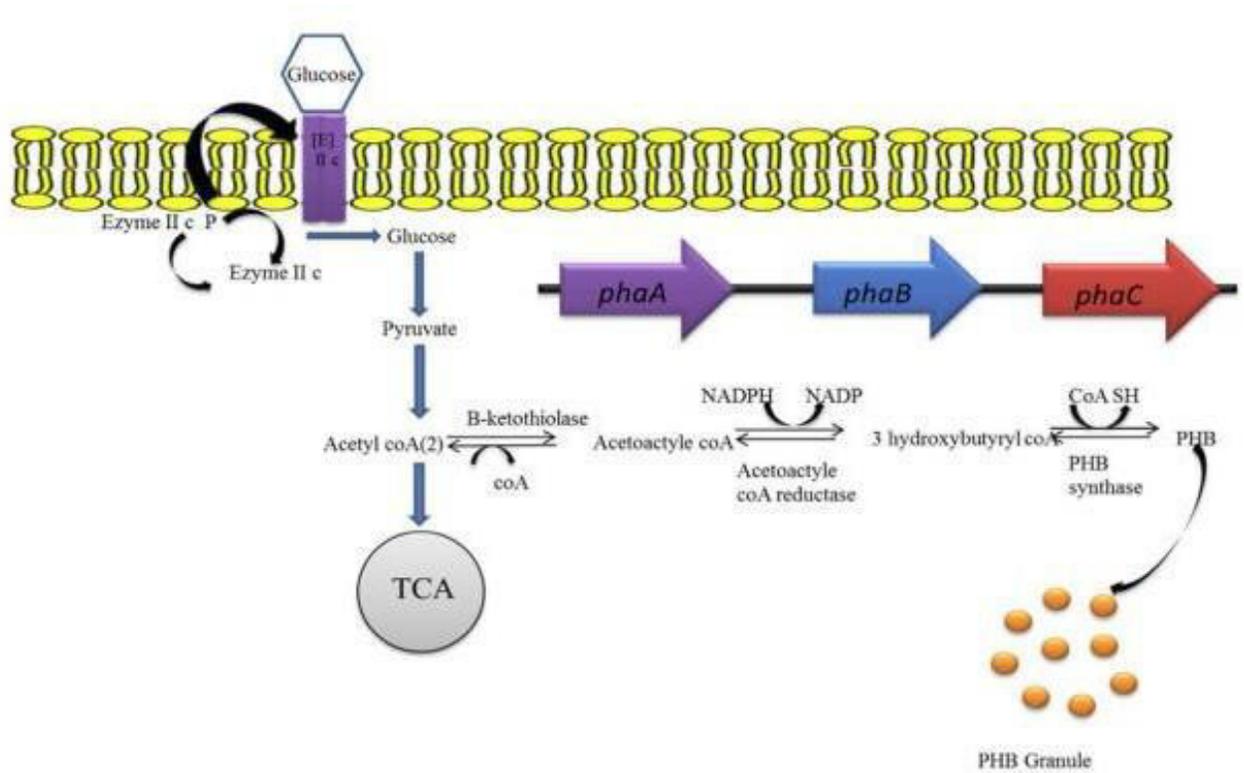


Figura 1: Ruta metabólica del PHB,  $\beta$ -cetotilasa, Acetoacetyl-CoA deshidrogenasa y P (3HB) sintetasa (Mohapatra, et al. 2017). Hydroxybutyryl

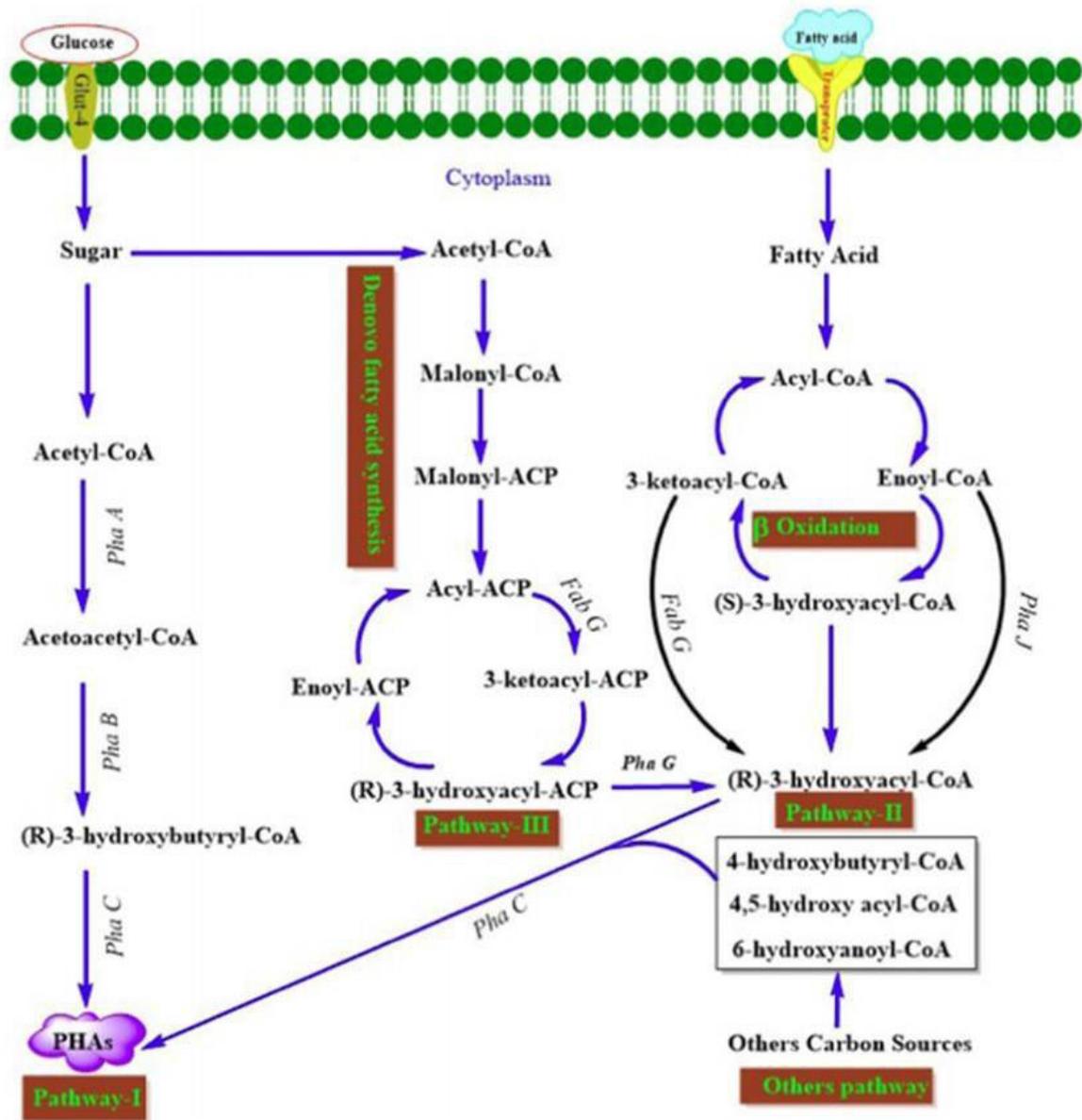


Figura 2: Rutas metabólicas alternativas, (R)-3-hidroxitiril-CoA es el precursor de PHB y este es producto de  $\beta$ -oxidación y de síntesis de novo de ácidos grasos (Mohapatra, et al. 2017).

## 2.2. Polihidroxitirato:

Los biopolímeros son un tipo de material biológico, su definición más estricta incluye cualquier macromolécula producida por un ser vivo, como las proteínas, el almidón, la celulosa, sin embargo, en el contexto de este proyecto un biopolímero se refiere a un material tipo plástico producido por microorganismos. El compuesto buscado en este proyecto es el ácido polihidroxitirico (PHB) el cual es un tipo de polihidroxicanoato (PHA). Una clase de poliéster el cual se acumula en el citoplasma de algunos microorganismos como medio de almacenamiento de energía en respuesta a exceso de fuentes de carbono y limitadas fuentes de nitrógeno, el PHB es el tipo más común de PHA (Riaño, 2010) (Babruwad et al. 2015).

Este biopolímero ha cobrado gran importancia gracias a que a diferencia de los plásticos tradicionales, puede ser degradado en CO<sub>2</sub>, agua o abono lo que le da una gran ventaja frente a sus contrapartes sintéticas. (Villada, et al. 2007) además de que requieren sustratos baratos incluyendo melaza de caña de azúcar, maíz o fermentación de agave tequilero por bacterias celulíticas (Gouda et al. 2001) (González et al. 2005)

Tabla 3: Propiedades físicas del polihidroxitirato (Mistra et al. 2006).

Propiedad	Medida
Temperatura de fusión (°C)	160-177
Temperatura de transición vítrea (°C)	-4 a +15
Resistencia a la tracción (MPa)	15-40
Módulo de tracción (GPa)	1.1-3.5
Cristalinidad (%)	55-80
Elongación de ruptura (%)	1-6
Densidad (g*cm <sup>-3</sup> )	1.243
Índice de polidispersidad	1.9-2.1
Periodo de degradación	> 52 semanas
Modo de degradación	Hidrolítica, despolimerasa bacteriana
Angulo de contacto (°)	66

### 2.3. Estado el arte

La producción de PHB para fines biotecnológicos y el estudio de las enzimas involucradas en la producción inicio en la década de los 70 utilizando el microorganismo *Hidrogemonas eutropha* (Oeding & Schlegel, 1972). En 1982 fue cuando se lanzó el primer producto de PHB al mercado, el termoplástico BIOPOL™ por ICI (Imperial Chemical Industries), a partir de este año se extendió la investigación hacia el aislamiento de nuevos organismos productores de PHB y los procesos involucrados en su producción con la finalidad de obtener patentes (Fig.2 )

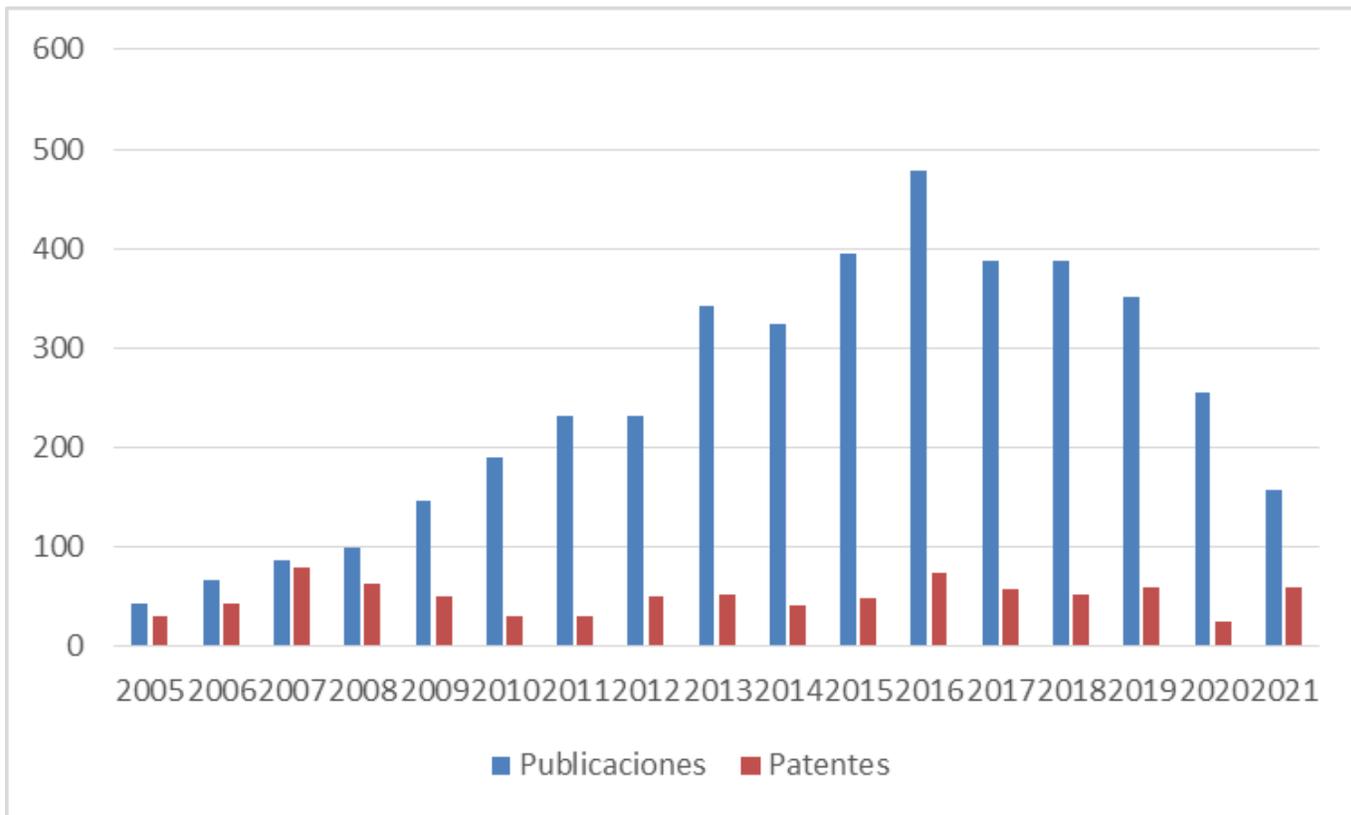


Figura 3: Numero de publicaciones (azul) y patentes (rojo) desde 2005 hasta el 2020 (Datos obtenidos de la Base de datos de Patentes <https://patentscope.wipo> y la base de datos de artículos <https://core.ac.uk/> el 21 de Febrero del 2022)

El uso general que se le ha dado comercialmente al PHB es el de empaques y bolsas plásticas biodegradables, con algunas propuestas uso especializado en el campo medico gracias a su gran biocompatibilidad. La producción a escala industrial sin embargo enfrenta grandes retos para poder ser competitiva con los plásticos tradicionales, entre el precio de los sustratos y procedimientos para la purificación, particularmente en el balance que se debe tener en los solventes que se utilizan para la purificación de PHB, siendo estos suficientes para decaerse de los contaminantes celulares y al mismo tiempo no decrezca las partículas de polímero, el costo de producción de PHB es el punto crítico que limita la viabilidad económica de las empresas que busquen producir el biopolímero en escala industrial (*Takita, Masaki. 2016. US9249258B2*). Empresas clave incluyen Danimer Scientific (US), Shenzhen Ecomann Biotechnology Co Ltd (China), Kaneka Corporation (Japan), etc. El tamaño de mercado se estimó en 62 millones USD en 2020 y se proyecta que alcance 121 millones USD para el 2025 a un crecimiento anual compuesto de 14.2% entre 2020 y 2025, Europa siendo el mercado más importante. (*Markets and Markets, 2021*)

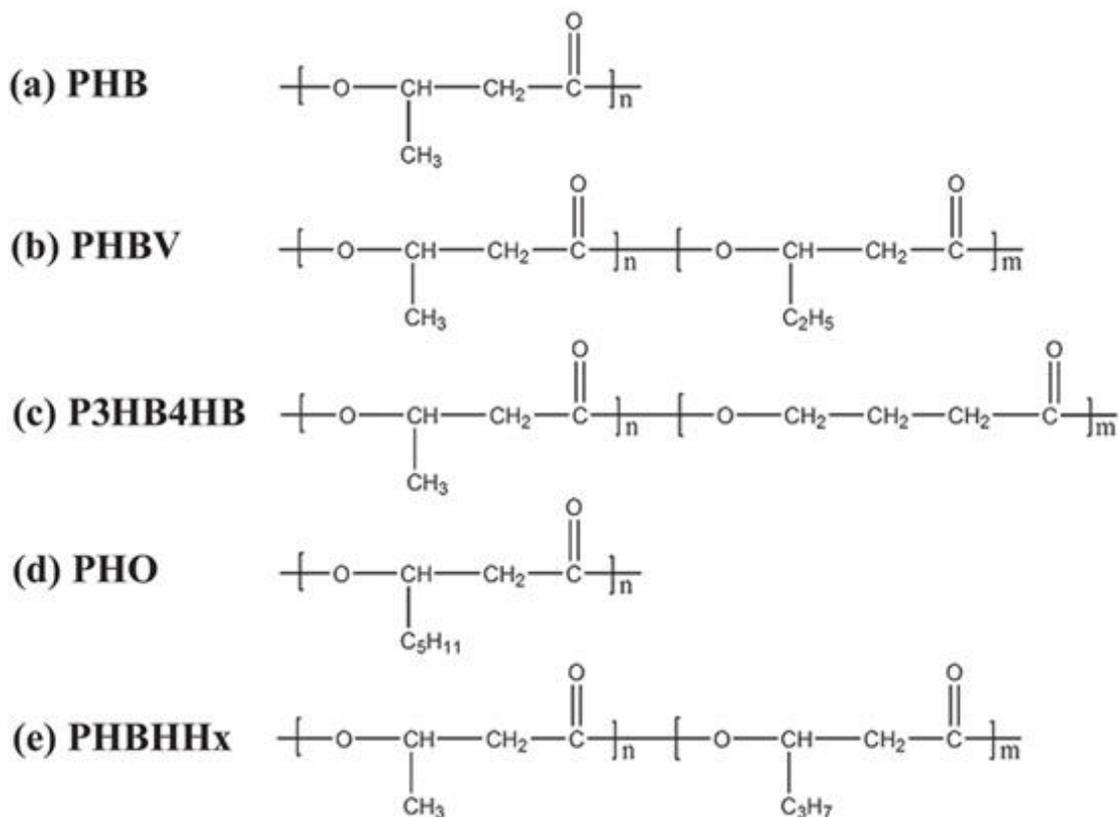


Figura 4: Formula química de varios compuestos del grupo PHA (*Ke, Yu & Liu, et al, 2017*)

Tabla 4 Compañías productoras de plásticos PHA en el mundo, se describe la escala de producción en toneladas/año activas en el 2020 (Roberta, C, et al.)

Name of the Company	City/Country	Production (kt Year <sup>-1</sup> )	Raw Material	Brand Name
Biomer	Schwalbach am Taunus/Germany	-	PHB	Biomer
Biomatera	Toronto/Canada	-	PHA	Biomatera
Bio-On	Bologna/Italy	10	PHA	Minerv
Kaneka	Osaka/Japan	10	PHB	
Tianjin Green-Bio	Taijin/China	10	PHA	Green Bio
Imperial Chemical Industries (ICI)	London/UK	0.3	PHB	-
Danimer Scientific	Georgia/USA	0.3	PHA	-
PHB Industrial	Serrana/Brazil	0.1	PHB	Biocycle
TEPHA	Massachusetts/USA	-	PHA	Tephaflex/TephElas
Tinan	Zhejiang/China	10	PHB	Enmat
SIRIM	Selangor/Malaysia	2	PHA	-
Shenzhen Ecomann	Shandong/China	5	PHA	AmBio

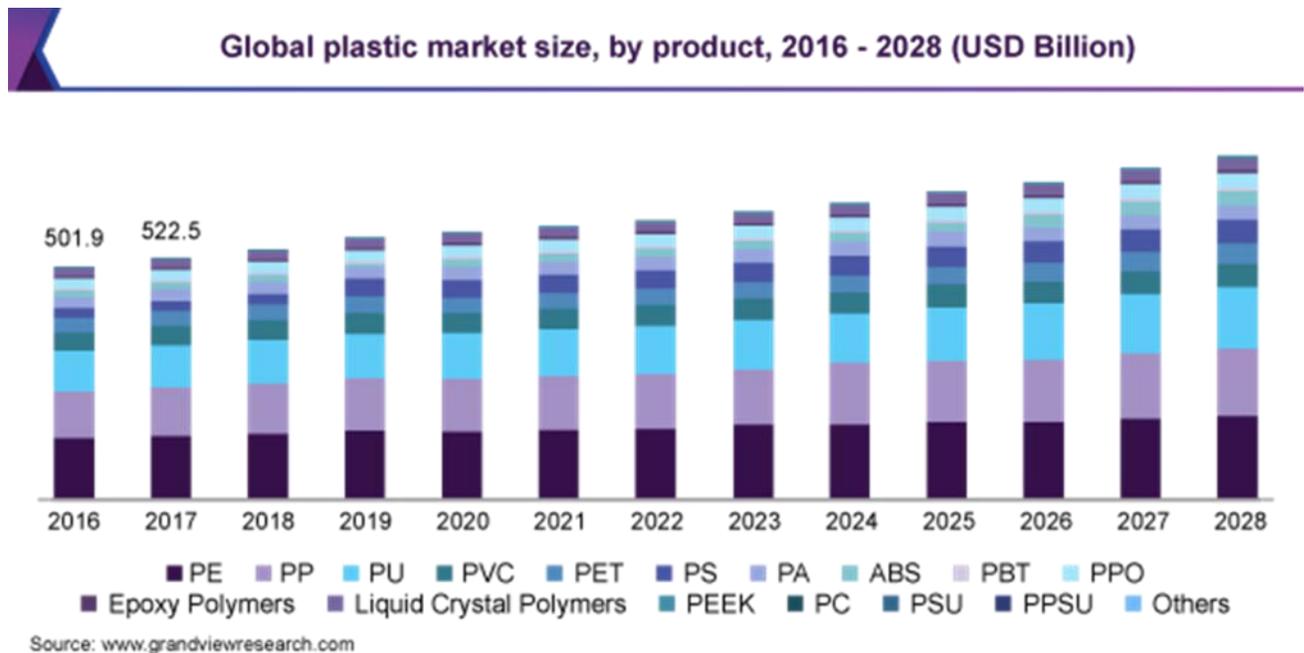


Figura 5: Tamaño de mercado de los plásticos más comunes en el mundo y su crecimiento proyectado, este es de 579.7 mil millones en 2020, el PET representa 55 mil millones, el PHB 62 millones. (<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/global-plastics-mar>)

### **3. Justificación**

En este proyecto se buscó aislar cepas del género *Bacillus* productoras de PHB con el fin de evaluar su capacidad de producción, este proyecto así mismo, ayudará a elevar el estado del arte en esta disciplina al proveer de información sobre el potencial en variedades no estudiadas que podrían ser o no más eficientes que los microorganismos reportados, encontrar una bacteria con buena eficiencia en expresión de PHB es el primer paso para potencialmente promover la futura industria de los biopolímeros, lo cual traerá beneficios ecológicos y no en menor medida económicos.

### **4. Hipótesis**

En el territorio mexicano se encuentran cepas no caracterizadas pertenecientes al grupo taxonómico de *Bacillus* con potencial no explorado para ser productoras de PHB, prefiriendo zonas contaminadas con lípidos y/o hidrocarburos como lugar de aislamiento al ser ambientes que favorecen la producción de PHB.

### **5. Objetivos**

#### **5.1. Objetivos generales**

- Aislamiento e identificación de cepas del género *Bacillus* capaces de producir PHB obtenidas en territorio mexicano utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para el gen PhaC

#### **5.2. Objetivos específicos**

- Caracterizar preliminarmente las cepas aisladas de manera tradicional para seleccionar *Bacillus*
- Identificar potenciales productores de PHB por prueba PCR diagnóstica para el gen PhaC
- Establecer un protocolo de seguridad a fin de no aislar *Bacillus anthracis*
- Comprobar de manera cualitativa producción de PHB por la bacteria en condiciones inductoras

## 6. Materiales y métodos

Las pruebas se realizarán en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León siguiendo el protocolo y paso descritos en el siguiente mapa (Fig.4).

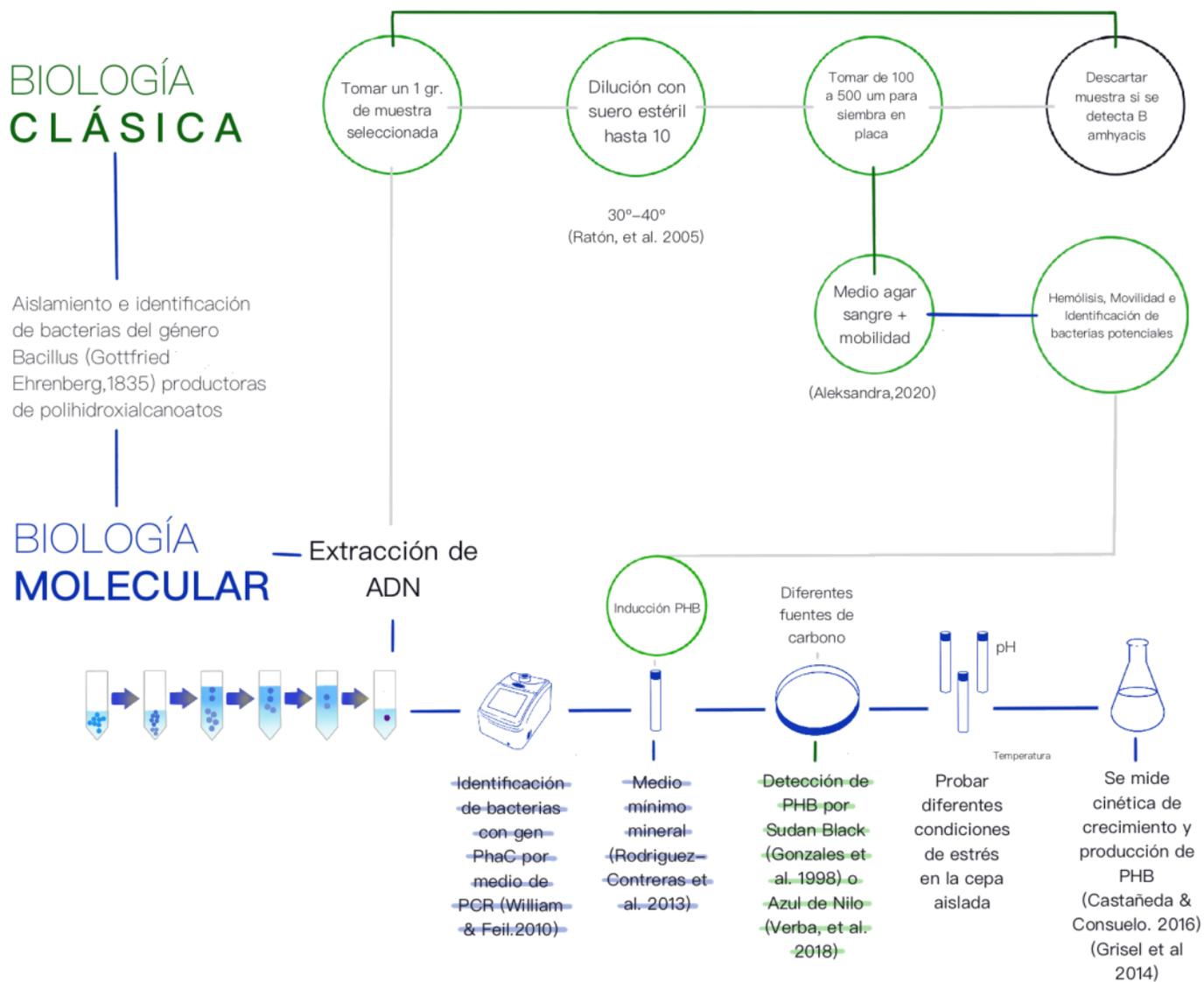


Figura 6: Diagrama de flujo con la metodología general utilizada para el proyecto.

## 6.1. Aislamiento

A partir de muestras ambientales de suelos potencialmente contaminados con lípidos y/o hidrocarburos, así como ambientes extremófilos en general, se aislaron las bacterias de interés. La muestra se dejó incubar por 20 horas a 45 °C, favoreciendo la supervivencia de bacterias esporulantes, la muestra de tierra se diluyó en alícuotas de 10 ml hasta llegar a la dilución  $10^{-4}$ , a continuación las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  fueron sembradas en medio agar sangre utilizando 10  $\mu$ l de la dilución y extendiéndola por toda placa, bacterias hemolisis negativas se sometieron a prueba de motilidad en agar semi-sólido para detectar *B. anthracis*, las placas en las que se detectó el patógeno fueron esterilizadas en autoclave. (Aleksandra, 2020). Las placas libres de patógenos se prepararon sembrándolas bacterias hemolíticas y/o móviles en placas con agar LB (Luria Bertani) las cuales se incubaron a 37 °C el tiempo necesario para ver su crecimiento, luego se observaron a microscopio 100x con tinción de Gram para verificar que se aislaron bacilos Gram positivos.

## 6.2. Protocolo de extracción de ADN con CTAB proteinasa K (Modificado, William & Feil, 2012)

Se utilizó un paso de acumulación de biomasa en tubos Eppendorf estériles de 2 ml, se centrifuga el tubo a 13000 rpm por 3 minutos, se decantó el sobrenadante, se volvió a rellenar el tubo y se llevó a mezclar el medio en el aparato Daigger “Vortex Genie 2” para deshacer el concentrado celular y se volvió a centrifugar, este paso se repitió 3 veces. Una vez que se obtuvo el concentrado celular por centrifugación se realizó un tratamiento con etanol al 70% en las muestras que producían mucílago, este consistió en añadir 300  $\mu$ L del alcohol y agitar con vortex, se lleva a la centrifuga por 10 segundos y se descarta el sobrenadante. Luego se hicieron lavados con agua destilada, las muestras sin mucilago pasan directamente a este tratamiento, el cual consistió en agregar 500  $\mu$ L al tubo con pastilla, agitar con vortex y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos, se decanta el sobrenadante y se repitió el proceso una vez más. Después de decantar el ultimo lavado se añadió al tubo con la pastilla bacteriana 390  $\mu$ L de buffer TE y 10  $\mu$ L de proteasa K, la mezcla se incubo 1 hora a 55 °C y se mantuvo en agitación a 900 rpm, después se agregaron 100  $\mu$ L de NaCl 5M y se mezcló, se agregaron 80  $\mu$ L de (TAB 10%/NaCl 5M (1:1), se volvió a mezclar la solución y se dejó incubar a 65 °C por 10 minutos, al finalizar este paso se agregaron 500  $\mu$ L de la fase fenol de una solución Fenol Cloroformo (1:1), esta se llevó a vortex hasta

obtener un color lechoso y se procedió a centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos, una vez transcurrido se separó la fase acuosa transparente y se transfirió a un tubo limpio, se agregaron 500 uL de fenol nuevamente y se repitió el procedimiento mencionado por segunda vez.

En el tubo nuevo con la última fase acuosa se añadieron 2 volúmenes, de la fase recuperada, de etanol frío al 100% y 0.1 volúmenes de acetato de amonio 3M, se mezclaron por inversión e incubaron por 20 minutos a -20 °C, o 4 °C durante toda la noche en algunas muestras, después de este periodo el tubo se llevó a centrifuga a 13000 rpm por 5 minutos, se decantó el alcohol y se agregaron 300 uL de etanol al 70% al tubo, el cual se mezcló en vortex y llevo a centrifugación a 13000 rpm por 5 minutos, se descartó el alcohol y dejo secar por 10 minutos a 65 °C con el tubo abierto, finalmente se suspendió el ADN del tubo seco en 20 µL de buffer TE y dejo incubar 5 minutos a 65 °C con el tubo cerrado antes de ser guardado en refrigeración a 4°C, la calidad del ADN posteriormente se probó en un equipo de espectrofotómetro Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000/2000c.

### **6.3. Identificación de bacterias con genes productores de PHB en *Bacillus* por PCR y diseño de oligonucleótidos**

Se obtuvieron al menos 10 secuencias del gen PhaC de diferentes bacterias, incluyendo *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. cereus* y *B. aryabhatai*, de la base de datos de nucleótidos del NCBI, estas se compararon por alineamiento utilizando el programa ClustalW para formar observar si existía una secuencia consenso lo cual sirvió como base para el diseño de los oligonucleótidos utilizado la herramienta bioinformáticas; Bioedit, Multiple Primer Analyzer de Thermophisher, Blastn del NCBI e *In Silico* PCR amplificación, se utilizó electroforesis en gel de agarosa para identificar que bacterias muestren amplificación, la cual debe tener un tamaño de 303 pb.

Tabla 5 Oligonucleótidos diseñados para detección del gen PhaC por PCR

Gen blanco	Oligonucleótido "forward" (5'-3')	Oligonucleótido "reverse" (3'-5')	Amplificación (pb)
PhaC	TGACTACATTCGCAACAGAATGGG	AACCACGATCCACTAGATATTCCAC	303

ATGACTACATTCGCAACAGAATGGGAAAAGCAATTAGAGCTATACCCAGAAGAGTACCGAAAAGCATACCG  
 CCGAGTGAAAAGGGCGAGTGAAATTTTATTACGTGAACCAGAGCCGCAAGTCGGATTAACGCCGAAAGAG  
 GTTATTGGACGAAGAATAAGACGAAGCTTTATCGCTACATTCCAAACAAGAAAAACACAAAGAGTTCCA  
 ATTCTGTTAATATATGCTCTTATTAATAAACCATATATTATGGATTTAACTCCTGGAAATAGTTTAGTGGAAATCT  
 AGTGGATCGTGGTTTGGATGIATATATGCTTGATTGGGGCACATTTGGTTTAGAAGATAGTCATTTGAAATTTG  
 ATGATTTCTGTTTGGATTATAT

Reverse  
 Forward  
 Zona conservada de la proteína



Figura 7: Secuencia codificante para PhaC en *Bacillus cereus* cepa CFR06 (NCBI AY907827.2), se resalta la región conservada en amarillo y la región blanca para los oligonucleótidos.

#### 6.4. Pruebas bioquímicas

Para optimizar la caracterización de las cepas aisladas se le hicieron varias pruebas de preferencia de sustrato, el medio se preparó con 10 g/l de peptona de caseína, 5 g/l de NaCl, 0,015 g/l de purpura de bromocresol como indicador de pH y de 8 a 10 g/l del carbohidrato a analizar, glucosa, lactosa, sorbitol, sacarosa, etc. El medio resultante se mantuvo purpura a pH neutro y básico, este cambio a amarillo en pH ácido, lo que indica producción de ácido a partir del sustrato por parte de la cepa. También se realizó la prueba de hidrólisis de gelatina, la cual se prepara con caldo LB agregando 4.8 g/l de gelatina al medio, después de 1 a 3 días de incubación los tubos con medio se meten a refrigeración por 30 minutos, medio líquido indica hidrólisis de gelatina. Ambas pruebas dan un perfil que resulta útil en la diferenciación de las diferentes cepas y/o especies de *Bacillus* aisladas.

### 6.5. Identificación de bacterias productoras de PHB:

Se identificó la producción en bacterias aisladas utilizando medio inductor de PHB, medio Mínimo o medio pobre en nutrientes excepto carbohidrato el cual está compuesto por 2.5 g/L de extracto de levadura, 1.25 g/L de NaCl, 2 g/L de peptona y 15 g/L de glucosa, (Martínez-Herrera, et al. 2020) una vez que se observaron colonias estas se tiñeron en la placa utilizando una solución alcohólica de Sudan Black B disuelto al 0.02% en etanol al 96% , la placa se saturó hasta cubrirla toda y se deja incubar por 30 minutos, el exceso de tinta se decantó y se enjuago cuidadosamente con etanol absoluto, las colonias que expresaron producción de PHB tuvieron un cambio de coloración de colonia de blanco al negro azulado (Khan, et al. 2019).

La tinción con Sudan Black B utiliza un tinte lipofílico se une al biopolímero y tiñe de negro cualquier bacteria que potencialmente contenga este en su citoplasma (Fig. 6).

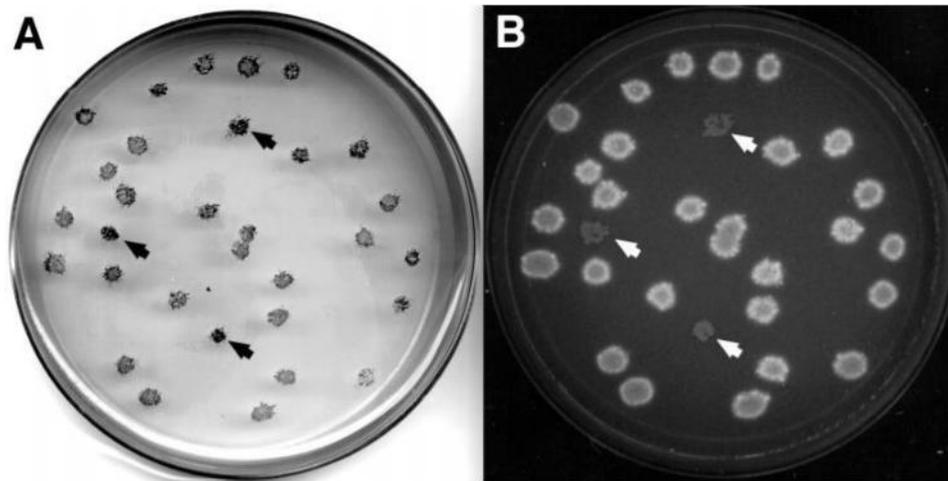


Figura 8: Placas con colonias bacterianas sometidas a tinción con Sudan Black B, las colonias señaladas son candidatas para contener PHB, A se observa a simple vista en Medio Mínimo con fructosa, B se observa bajo luz UV en una placa LB-calcofluor según el reporte de Gonzales et al. 1998

## 6.6. Determinación de concentración celular

Se utilizó conteo celular por método de Cámara de Neubauer (EMS Catalog #68052-14, 68052-15); Se hicieron diluciones hasta  $10^{-6}$  en solución salina estéril del cultivo líquido y se utilizaron 5  $\mu$ L de estos para el conteo en la cámara. Se observó a microscopio en resolución 100x los cuadros del centro de la cámara y se contaron las bacterias observadas.

La fórmula para obtener el número de células en el medio es;

$$\frac{\text{Numero de células}}{\text{Numero de cuadros}} \times \frac{220,000}{\text{Factor de dilucion}} = \text{Bacterias por mL}$$

## 6.7. Cinética de crecimiento y conteo de UFC

Para iniciar la curva se inoculó un medio nuevo y se calculó cuanto pre-cultivo se necesita para este tenga una concentración aproximada de 1, 000,000 células/ml se utiliza la siguiente formula;

$$\frac{(1 \times 10^6 \text{ células})(\text{mL de medio a inocular})}{\frac{\text{Células}}{\text{mL}} \text{ del medio original}}$$

El medio utilizado fue medio mínimo mineral, el crecimiento bacteriano se monitoreó a través de lecturas de densidad óptica a 650 nm por intervalos de una hora por 10 horas (Azario, et al. 2010). Cada hora se hicieron de 3 a 6 diluciones de la muestra medida, esta se inoculo en una caja Petri\* con agar LB con 10  $\mu$ L utilizando el método de plaqueo por extensión. (Castañeda & Consuelo 2016)

## 6.8. Extracción de PHB

Se utilizó 25 ml de cultivo inductor de PHB líquido incubado con nuestras cepas por 48 horas el cual es centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos, repitiendo el proceso con dos lavados de agua destilada estéril, el precipitado se secó a 100 °C por aproximadamente 24 horas hasta que se obtuvo un peso constante y con eso se determinó el peso seco celular del producto. Para la extracción de PHB se utilizó la biomasa seca y se le agrego 10 ml de cloroformo y luego se incubo a 70 °C por 10 minutos y posteriormente se 3000 rpm por 10

minutos para colectar la fase líquida la cual se dejó secar a 100 °C por aproximadamente 24 horas hasta que se obtuvo un peso constante el cual se considera el peso seco del PHB libre de células (*El-Kadi, S.M, et al. 2021*). La diferencia de pesos entre los dos valores se considera la producción de PHB (g/20ml) convertido a g/L con la siguiente fórmula;

$$\text{PHB (\%)} = \text{Peso seco de PHB (g/L)} \times 100 / \text{peso seco celular total (g/L)}$$

## 6.9. Ensamblaje del genoma

El ADN extraído se sometió a una columna de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean up system kit marca Promega, el purificado resultante se corrió en una cámara de electroforesis utilizando gel de agarosa 1% observando la eficacia del kit, posteriormente se cuantificó el producto utilizando NanoDrop para comprobar que la muestra purificada cumpla con los requerimientos para secuenciación; mínimo de 50-500 ng de ADN, 5:50 ng/μL. Ratio de 260/280 ≤ 1.8-2.00. Ratio de 260/230 > 1.8, ambos como índice de contaminación proteica.

Una vez comprobada la calidad de la extracción de ADN y purificación esta se mandó a secuenciar a un servicio externo, se utilizó MiSeq™ reagent kit de Illumina PE 70 nt con una cobertura de 50. La calidad de las secuencias pareadas obtenidas fue probada en la herramienta bioinformática FastQC en la plataforma Galaxy, el ensamblaje de las secuencias se realizó utilizando la plataforma PATRIC y se compararon los ensamblajes realizados incluyendo los algoritmos SPAdes y Unicycler, la anotación se realizó utilizando el programa RASTtk proporcionado en la misma plataforma. Los contigs generados, fueron comparados con los genomas encontrados en la base de datos del NCBI por medio de la herramienta BLASTn, secuencias similares, así mismo se buscó la secuencia nucleotídica del gen PhaC y se utilizó la herramienta “Translate tool” de ExPasy para comparar la secuencia aminoacídica en la base de datos de proteínas.

## 7. Resultados

Las bacterias aisladas a partir de muestras de suelo recogidas en la zona desértica de Mina, Nuevo León (coordenadas: 25°58'44.0"N 100°38'01.5"W), y una zona de derrame de petróleo en Cunduacan, Tabasco (coordenadas 17°59'56.1"N 93°07'08.6"W), fueron seleccionadas en base a las siguientes características: varillas móviles Gram positivas, se aislaron 24 cepas totales, 17 de suelos contaminados con petróleo de Tabasco y 7 de suelos áridos de Mina Nuevo León

Las colonias no hemolíticas, no móviles y Gram negativas fueron descartadas, se probaron 12 cepas con las propiedades compartidas descritas en el manual de Bergey, 8 de estas resultaron positivas para el diagnóstico del gen, además de la morfología las cepas comparten características como rango de temperatura óptima similar, son capaces de crecer a concentraciones de al menos 5% de NaCl crecimiento a pH de entre 6 y 8, producción de ácido universal en medio con glucosa, incapacidad de procesar lactosa e hidrolisis de gelatina.

Se encontraron algunas características peculiares, las muestras de Mina, que consisten en MSN1, MSN3, MSN5, MSF4 y MSD1, mostraron en su mayor parte tolerancia a temperaturas cercanas a los 50 °C, con la notable excepción de MSF4, en la prueba de tolerancia a alta salinidad MSD1, MSF4 y MSN3 lograron crecer a concentraciones de 10% de NaCl en medio nutritivo LB. Las cepas aisladas de suelos de Tabasco, C32<sub>1</sub>, C32<sub>2</sub> y C32<sub>EX</sub>, mostraron una capacidad más universal para crecer en pH de 5 pero carecían de la misma halotolerancia y termotolerancia mostradas en las cepas del desierto. Una diferencia notable y un punto de interés es la capacidad de la cepa MSF4 de crecer hasta pH 9, algo de lo que carecen todas las demás cepas probadas. Se ha reportado que algunas cepas de *Bacillus* sufren una severa inhibición de crecimiento incluso a 40°C, lo mismo ocurre con pH superiores a 8 e inferiores a 6, mostrando que no todas las cepas pueden tolerar las mismas condiciones de estrés. (Hiremath, et al. 2012). Metabólicamente las cepas son bastante similares, la diferencia se encuentra en la producción de ácido con sorbitol en MSD1 y C32<sub>1</sub>, además de producción de una especie de mucilago o polisacarido en las cepas de Mina la cual está ausente en las cepas de Tabasco (Tabla 6).

Tabla 6 Características encontradas en las cepas de bacilos Gram positivos aislados

	<i>MSD1</i>	<i>MSF4</i>	<i>MSN1</i>	<i>MSN3</i>	<i>MSN5</i>	<i>C32<sub>1</sub></i>	<i>C32<sub>2</sub></i>	<i>C 32<sub>EX</sub></i>
<i>Morfología</i>	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
<i>Gram</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Motilidad</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>pH más bajo tolerado</i>	6	6	5	5	5	5	5	5
<i>pH más alto tolerado</i>	8	9	8	8	8	8	8	8
<i>Hemolisis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rango de temperatura</i>	27-50	27-45	36-50	27-50	36-50	36-40	36-40	36-40
<i>Tolerancia a NaCl máxima</i>	10%	10%	5%	10%	5%	<10%	<10%	<10%
<i>Producción de ácido por glucosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Producción de ácido por lactosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Producción de ácido con sorbitol</i>	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>Hidrolisis de gelatina</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mucilago</i>	+	-	+	+	+	-	-	-

Las cepas fueron seleccionadas en base a la detección del gen PhaC utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y un par de oligonucleótidos diseñados para este propósito, según el marcador de peso molecular se observó una banda de amplificación en la región cercana a 300 pb, concordando con la predicción hecha por las herramientas bioinformáticas, lo que indica la presencia del gen en nuestras cepas y el potencial para producir el polímero PHB (Figura 9)

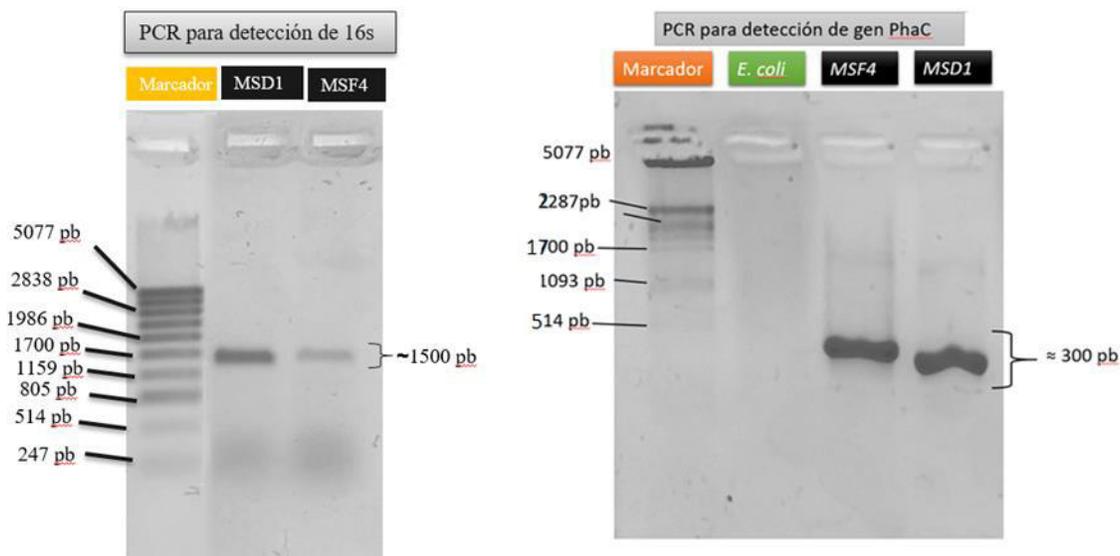


Figura 9: Reacción positivas para detección de 16s y PhaC en gel de agarosa al 1% y 2% respectivamente, se observan un amplicon de aproximadamente 300 pb en cepa MSF4 y MSD1, se utilizó bacteriófago Lambda como marcador de peso molecular y un PCR para detección de PhaC en ADN de *E. coli* como control negativo.

Como confirmación de la eficacia de los oligonucleótidos, se utilizó la técnica de detección directa del PHB utilizando la tinción de colonias con Negro de Sudán, ambas cepas mostraron colonias teñidas de negro, lo que confirma su producción. (Aragosa, et al, 2021) En la extracción de PHB con cloroformo sometido a calor se obtuvo un peso seco celular de 4.05 g/L y peso seco de PHB de 0.48 g/L en la extracción de la cepa D1 la cual tiene una producción en peso seco de 11.85%.

A) Cepa MSF4



B) Control negativo, E. coli



Figura 10: Formación de PHB en diferentes cepas de este trabajo teñidas con. Las placas se tiñen con una solución de Sudan black B, 0.02 g/l diluido en etanol 96%. (A) Bacteria MSF4 (B) *E. coli* como control negativo.

La curva de crecimiento en el medio inductor de PHB (Martínez-Herrera RE et al, 2020) mostró diferencias significativas entre las cepas que seleccionamos por sus características de extremofilia, específicamente colonias visibles a las 6 horas de crecimiento en temperaturas de 40 °C y en el caso de MSF4 crecimiento a pH 9, esta fue más lenta en crecer, pero alcanzó un pico más alto, mientras que MSD1 mostró un crecimiento acelerado en las primeras horas, alcanzando antes la fase estacionaria.

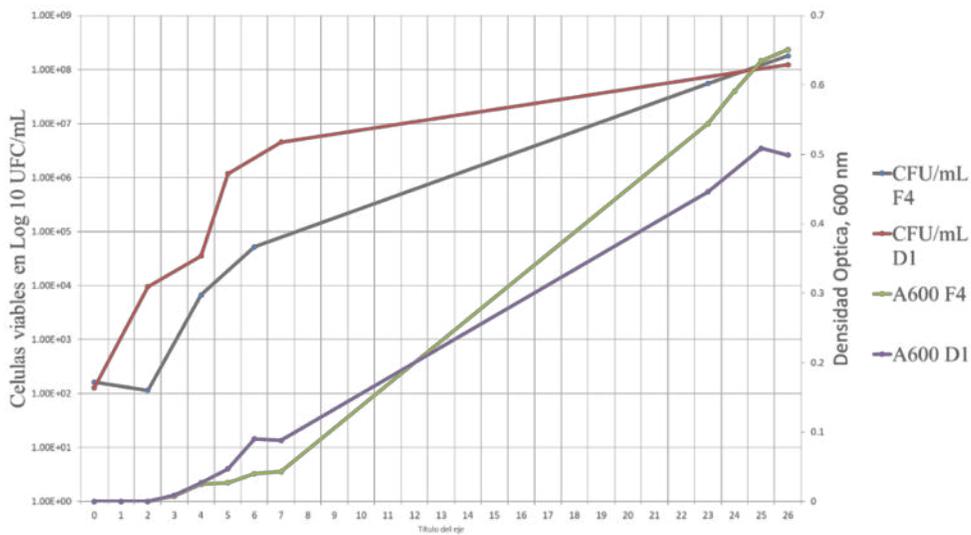


Figura 11: Curva de crecimiento en medio inductor de PHB en cepas aisladas 40°C por 26 horas.

Las cepas de bacterias MSD1 y MSF4 fueron seleccionadas para su secuenciación y posterior ensamblaje, la se recibieron secuencias pareadas las cuales no mostraron secuencias de baja calidad. El programa para ensamblaje SPAdes (Prjibelski, A. et al. 2020) género los mejores resultados que se pueden visualizar por graficas Bandage (Figura 12).

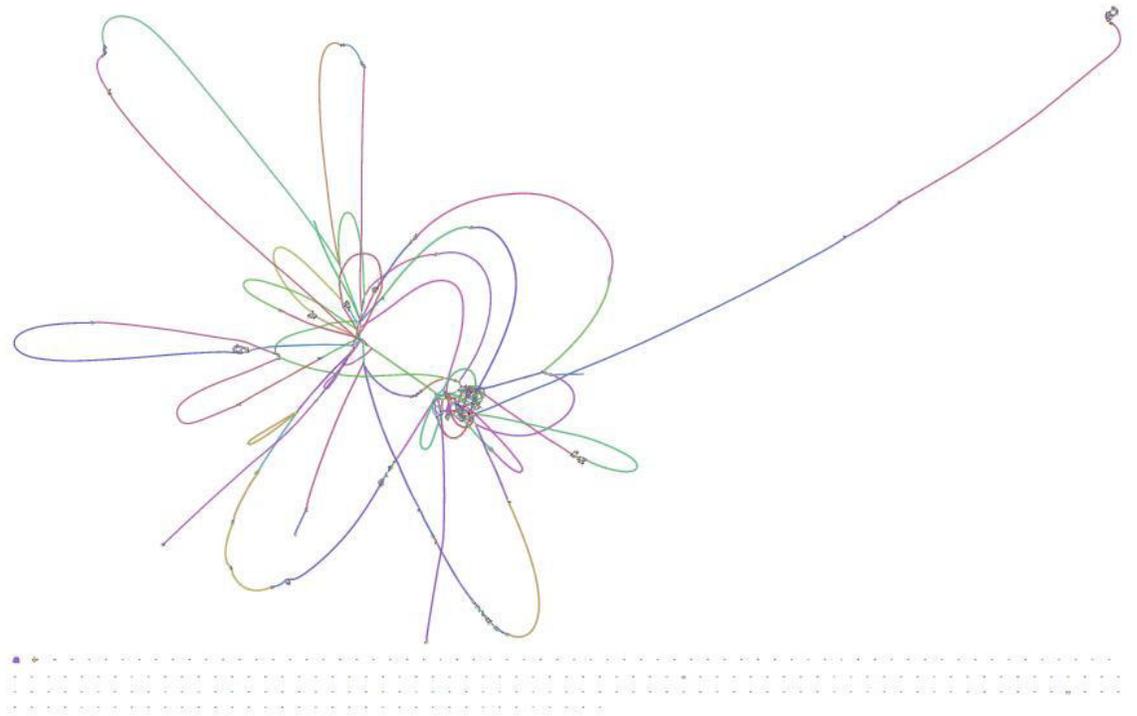


Figura 12: Grafico tipo Bandage generado a partir del ensamblaje de las secuencias contiguas de la cepa MSF4.

La anotación del ensamblaje del genoma asistido por RASTtk en la cepa MSF4 mostro un genoma de 5096 kilobases con un contenido GC de 35%, se encontraron 1188 proteínas hipotéticas y 4187 proteínas con función conocida (Tabla 7) La comparación de las secuencias ensambladas con la base de datos del NCBI junto con las características descritas a lo largo del proyecto indica que la cepa MSF4 tiene similitudes al grupo de *Bacillus cereus* de manera preliminar, este incluye siete especies, Comprende siete especies estrechamente relacionadas, *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis*, y *B. cytotoxicus*.

Tabla 7: Características generales del genoma ensamblado de la cepa MSF4

Tamaño del genoma	5096047
Contiguos generados	137
Contenido GC	35,3%
Secuencias CDS	5775
Proteínas con función conocida	4187

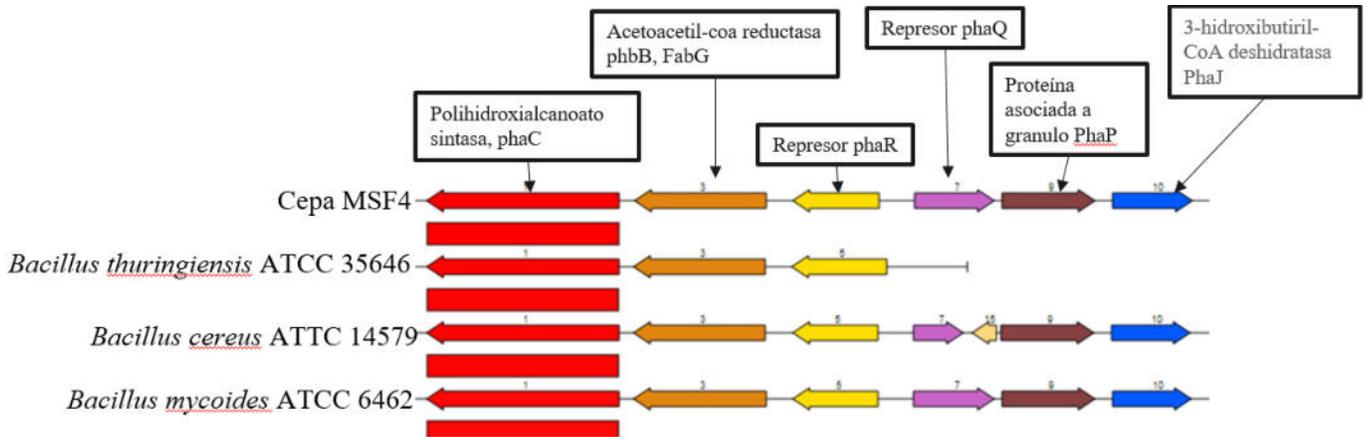


Figura: 13: Genes encontrados en el genoma ensamblado utilizando el programa SPADes en la plataforma Patric de la cepa MSF4 relacionados con el metabolismo del butanoato comparado con grupos de genes similares en otras especies, PhaC se encuentra entre estos.

Se encontraron 6 genes relacionados al metabolismo del butanoato, entre ellos phaC el cual se encuentra en la cadena anti sentido junto con phaB, y phaR que actúa como represor en este operon.

Tabla 8: Características del grupo de genes

Gen	Posición Inicio-fin	Numero de nucleótidos	Aminoácidos del producto	Cadena
phaC	121096..122181	1086	361	-
phbB	122264..123007	744	247	-
PhaR	123159..123641	483	160	-
phaQ	123840..124292	453	150	+
phaP	124335..124859	525	174	+
phaJ	124961..125404	444	147	+

## 8. Discusión

Según el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (*Paul De Vos, et al., 2009*) las características que en general son comunes para las bacterias del género *Bacillus Spp* y las condiciones que estas pueden tolerar incluyen temperaturas de 32 a 45 °C, con un máximo de 50 °C, lo que las hace moderadamente termófilas dependiendo de la cepa, la tolerancia a concentraciones de NaCl de 7% hasta 10% es también un rasgo aceptado de la especie. Las cepas aisladas de Mina Nuevo León en general presentan crecimiento es el extremo superior de los rangos descritos tanto en el manual como en publicaciones que detallan la extrema adaptabilidad de este género bacteriano gracias al repertorio de estados alternativos que poseen en respuesta a las condiciones ambientales (*Richard, M. 2020*) Las bacterias del genero *Bacillus*, y las *Firmicutes* en general, son conocidas por su adaptabilidad en condiciones extremas, especialmente en condiciones con múltiples condiciones de estrés, en buena parte gracias a la capacidad de producir endoesporas, esta tiene un alto coste energético por lo que en condiciones mesofilas y en condiciones con un solo factor de estrés la proporción de *firmicutes* presentes en el ambiente, incluyendo *Bacillus*, es menor. Lugares con múltiples factores de condiciones extremas son los ambientes que tienen la mayor proporción de bacterias formadoras de esporas en cuanto a población total (*Filippidou, 2016*)

Varias especies de *Bacillus* tienen la capacidad de producir capsula bacteriana, notablemente *Bacillus mucilaginosus* y *Bacillus anthracis* el cual de manera característica incorpora polipéptidos a su capsula la cual normalmente consiste en polisacáridos, *Bacillus megaterium* también posee la capacidad de formar capsula bajo ciertas condiciones (*Bishop, et al. 1993*), se ha descrito recientemente que algunas cepas de *Bacillus cereus* puede desarrollar la capacidad de producir capsulas cuando normalmente este no es el caso para la especie, indicando que esta es una característica atípica que puede emerger en grupos taxonómicos relacionados con *B. anthracis* los cuales son capaces de incorporar los genes de virulencia responsables de esta capacidad de producción de capsula como factor de virulencia. (*Baldwin, M, Victoria. 2020*)

La distribución de *Bacillus* es fuertemente determinada por adaptaciones ecológicas, se ha reportado también que la termotolerancia está positivamente asociada con cepas de

mayor virulencia, mientras que la tolerancia a climas más fríos se asocia a un decremento de virulencia, además de la temperatura otras adaptaciones incluyen resistencia a choque térmico, a choque osmótico por sales y a diferentes rangos de pH ácidos y alcalinos. (Frédéric, C, et al. 2010) Estos estudios concuerdan con lo observado en el proyecto, los grupos de bacterias aisladas de Mina, Nuevo León, tienden a tener crecimiento rápido a temperaturas de 40 °C y en más casos producción de capa viscosa protectora en 4 cepas, MSN1, MSN3, MSN5 y MSD1, todas de Mina. Las bacterias aisladas son capaces de producción de ácido al crecer con glucosa como única fuente de carbono de manera consistente en las pruebas, las cepas se seleccionaron por su capacidad de hemólisis, el perfil bioquímico tuvo ligeras variaciones en azúcares como el sorbitol con 2 cepas positivas, lo cual puede identificar a la bacteria como *B.subtilis* *B.Thuringiensis* o *B.licheniformis* en cuanto especies comunes de este género, el resto son negativas lo cual generalmente es indicio de *B. Cereus*, la capacidad de producción de PHB estaba presente en cepas de los dos territorios muestreados lo que da credencia a los reportes de su inducción en condiciones estresantes, sin embargo esta de manera natural se presentó en una concentración baja en la cepa D1, 0.48 g/L representando un 11.85% de su peso seco, una cifra inferior a la todas las bacterias reportadas como productoras en la tabla mostrada en antecedentes lo cual se puede deber principalmente a la falta de optimización en condiciones de inducción, variaciones entre la cantidad producida de PHB entre cepas puede ser significativa aun entre la misma especie.

En 8 de 12 (66%) cepas probadas confirmaron presencia del gen *phaC* por medio de los oligonucleótidos diseñados, el reporte estadístico de Hassan, et al (2018) indico un aproximado de 74 productoras entre 153 bacterias aisladas (48%), este autor junto con Singh, et al. (2013) reportan la capacidad de *Bacillus subtilis* y *B. megaterum* como productoras, sin embargo la base de datos del NCBI tiene mayormente reportada la secuencia de *phaC* para bacterias del grupo *Cereus*, si bien la región funcional en teoría debe conservarse la incógnita en la secuencia exacta de otras cepas da la posibilidad a variaciones no solo en producción sino también en la maquinaria metabólica.

En el análisis del genoma ensamblado a partir del ADN extraído de las cepa de Mina, Nuevo León, MSF4 se observó una alta similitud a secuencias de nucleótidos pertenecientes a genomas del grupo *cereus* encontrados en la base de datos de Genomas del NCBI, acorde

con las pruebas bioquímicas y de morfología observada y con reportes de ensamblaje de este tipo de genomas con el programa SPADes (Bianco, 2021), de manera más puntual la comparación hecha con la información de la base de datos identificó a la cepa MSF4 como perteneciente a este grupo y confirmando que pertenece al género *Bacillus*, en este genoma se encontró la presencia de PhaC el cual junto con PhaB, y el represor PhaR, encontrados en el mismo genoma, formando un operon en la cadena antisentido del cromosoma, el grupo de genes phaQ, phaP, y phaJ forman otro operon en la cadena sentido, ambos han sido reportados en cepas productoras de biopolímero en *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus anthracis*, en contraste *Bacillus megaterium*, otra especie productora conocida, parece del gen phaJ (Kihara, 2017)

## 9. Conclusiones

- Se lograron descartar todas las colonias potencialmente pertenecientes al género *Bacillus especie anthracis*
- Se caracterizaron de manera bioquímica 8 cepas las cuales bacilo Gram positivas observándose sus propiedades a diferentes condiciones y permitiendo seleccionar las cepas de interés.
- Los oligonucleótidos diseñados detectaron presencia de phaC, corroborada por lo encontrado en el genoma de la cepa MSF4
- Se confirmó la capacidad de producción de PHB aludida en la información genética de la cepa seleccionada, las colonias reaccionaron al tinte lipofílico.

## 10. Perspectivas

Queda por comprobar la competitividad de esa producción de PHB frente a otras cepas en % producido. factores que promueven la expresión de los genes de producción de PHB y la posibilidad de realizar ingeniería metabólica, asistido por programación en bioinformática, el PET tiene tuvo una producción de 24 millones de toneladas en el 2021 con un costo de venta de 950 dólares estadounidenses en el 2022, o 0.095 centavos por gramo, comparado con su precio de 725 dólares en el 2020 (Recuperado el 30 de Mayo del 2022 de <https://www.statista.com/statistics>), este es el potencial de mercado y el precio de venta competitivo a alcanzar para el PHB.

## 11. Bibliografía

- A., P. (2009). Optimization of process parameters for maximum poly(-beta)-hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Polish Journal of microbiology*, 149-154.
- Aleksandra A. Zasada (2020) Detection and Identification of *Bacillus anthracis*: From Conventional to Molecular Microbiology Methods. *Microorganisms*. doi: 10.3390/microorganisms8010125
- Alvarez, E. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del genero *Bacillus* sp., primerpaso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *NOVA*, 53-65.
- Aragosa, A., Specchia, V., & Frigione, M. (2021). Isolation of Two Bacterial Species from Argan Soil in Morocco Associated with Polyhydroxybutyrate (PHB) Accumulation: Current Potential and Future Prospects for the Bio-Based Polymer Production. *Polymers*, 13(11), 1870. <https://doi.org/10.3390/polym13111870>
- Azario, R. R. (2010). Efecto del Cromo Hexavalente y Trivalente sobre el Crecimiento de *Escherichiacoli* ATCC 35218. *Información Tecnológica*, 51-56.
- Babruwad, P. R. (2015). Production and characterization of thermostable polyhydroxybutyrate from *Bacillus cereus* PW3A. *Journal of Biochemical Technology*, 990-995.
- Baldwin VM (2020) You Can't *B. cereus* – A Review of *Bacillus cereus* Strains That Cause Anthrax-Like Disease. *Front. Microbiol.* 11:1731. doi: 10.3389/fmicb.2020.01731
- Bergey, H. D. (2009). *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*. Baltimore: THEWILLIAMS & WILKINS COMPANY. Segunda Edicion. Volumen 3
- Bianco Angelica, et al. (2021), Characterization of *Bacillus cereus* Group Isolates From Human Bacteremia by Whole-Genome Sequencing, *Frontiers in Microbiology*, 11, ISSN=1664-302X, DOI=10.3389/fmicb.2020.599524
- Bishop, A. H, et al. (1993) Components of the wall and capsule of *Bacillus megaterium* NCIB 7581. *Microbiology*. Volumen 139. Edicion 11. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-11-2723>
- Bresan, Stephanie & Sznajder, et al. (2016). Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*. 6. 26612. 10.1038/srep26612.
- Chen. (2010). Industrial produvntion of PHA. *Microbiology Monographs*, 121-132.
- Chia, L. C. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*.
- Contreras, R. (2014). *El género Bacillus*. Obtenido de La Guia: <https://biologia.laguia2000.com/microbiologia/el-genero-bacillus>
- Dunlap, C.A. (2020). Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status. *Antonie van Leeuwenhoek* **113**, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01354-9>
- El-Kadi, S. M., Elbagory, et al. (2021). Biosynthesis of Poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) from Different Bacterial Strains Grown on Alternative Cheap Carbon Sources. *Polymers*, 13(21), 3801. <https://doi.org/10.3390/polym13213801>

- Erika, J.-P. (2019). Production of poly (3-hydroxybutyrate) from a dairy industry wastewater using *Bacillus subtilis* EPAH18: Bioprocess development and simulation. *Biochemical Engineering Journal*, 1-9.
- Fajardo, S. A. (2011). Crecimiento vegetativo y esporulación de *Bacillus subtilis* 83 en medio mineral en cultivos sumergidos en lote y lote alimentado. *XIV*
- Feil., W. S. (2012). *Bacterial genomic DNA isolation using CTAB*. Obtenido de Joint Genome Institute: <https://jgi.doe.gov/>
- Filippidou S, et al. (2016) A Combination of Extreme Environmental Conditions Favor the Prevalence of Endospore-Forming Firmicutes. *Front. Microbiol.* 7:1707. doi: 10.3389/fmicb.2016.01707
- Frédéric Carlin, et al. (2010) Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment, *Food Research International*, Volume 43, Issue 7, Pages 1885-1894, ISSN 0963-9969, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.024>.
- Gasser, E. (2014). Microbial production of biopolymers from the renewable resource wheat straw. *Journal of Applied Microbiology*, 1035-1044.
- Gilberto, P. (2002). PLÁSTICOS Y MEDIO AMBIENTE. *Revista Iberoamericana Polímeros*, 1-13.
- Gonzales, J. (1998). A Novel Screening Method for Isolating Exopolysaccharide-Deficient Mutants. *Applied and environmental microbiology*, doi/10.1128/AEM.64.11.4600-4602.1998
- Markets and Markets. (2021). Polyhydroxyalkanoate (PHA) Market by Type (Short Chain Length, Medium Chain Length), Production Method (Sugar Fermentation, Vegetable Oil Fermentation, Methane Fermentation), Application, and Region - Global Forecast to 2025. <https://www.marketsandmarkets.com/>. Consultado el 9 de Mayo del 2022.
- González García, et al.. (2005). Potencial del bagazo de Agave tequilero para la producción de biopolímeros y carbohidrasas por bacterias celulolíticas y para la obtención de compuestos fenólicos. *e-Gnosis*.
- Grisel, M. (2014). Separación, purificación y caracterización de poli-hidroxibutirato. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de azúcar*, 7-15.
- Gulab Singh, A. K. (2013). Poly  $\beta$ -Hydroxybutyrate Production by *Bacillus subtilis* NG220 Using Sugar Industry Waste Water. *Biomed Res Int*.
- Hendrik Dijkman (2016), Process for producing a microbial storage compound, WO2015181083A1
- Hiremath, Gurusiddesh. (2012). Isolation and characterization of nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain AS-4 from agricultural soil. *International Journal of Recent Scientific Research*. 3. 762-765.
- Jaquel, N. (2008). Isolation and purification of bacterial poly (3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 15-27.
- Jimenez, J. A. (2011). *Biopolímeros de interés industrial. Síntesis y caracterización de polihidroxibutirato (phb)*. Bahía Blanca, Argentina.

- K.Gouda, M. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 201-207.
- Ke, Yu & Liu, et al. (2017). Surface Modification of Polyhydroxyalkanoates toward Enhancing Cell Compatibility and Antibacterial Activity. *Macromolecular Materials and Engineering*. 302. 1700258. [10.1002/mame.201700258](https://doi.org/10.1002/mame.201700258).
- Khan, I. F. (2019). Isolation and Identification of Indigenous Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria from Different Waste. *Plant Tissue Cult. & Biotech*, 15-24.
- Kihara, T. et al. (2017). *Bacillus cereus*-type polyhydroxyalkanoate biosynthetic gene cluster contains R-specific enoyl-CoA hydratase gene. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 81(8), 1627–1635. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1325314>
- Kumar, e. a. (2013). Rapid Identification of Polyhydroxyalkanoate Accumulating Members of Bacillales Using Internal Oligonucle Using for phaC Gene of. *ISRN Bacteriology*, 1-13.
- Marcelo Müller-Santos, et al. (2021), the protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 45, Issue 3, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa058>
- Maria, G. G. (2008). Producción de poli-hidroxialcanoatos por bacterias del genero *Bacillus* de origen marino. La Paz, Baja California, Mexico.
- Martínez-Herrera, et al. (2020). Statistical optimization and effect of mesquite honey and maize alkaline wastewater (nejayote) as substrates for cellular biomass production and polyhydroxybutyrate biosynthesis by *Bacillus cereus* 4N. *Mexican journal of biotechnology*. 5. 51-69. [10.29267/mxjb.2020.5.2.51](https://doi.org/10.29267/mxjb.2020.5.2.51).
- Martínez-Herrera, et al. (2020). Statistical optimization and effect of mesquite honey and maize alkaline wastewater (nejayote) as substrates for cellular biomass production and polyhydroxybutyrate biosynthesis by *Bacillus cereus* 4N. *Mexican journal of biotechnology*. 5. 51-69. [10.29267/mxjb.2020.5.2.51](https://doi.org/10.29267/mxjb.2020.5.2.51).
- Martínez-Herrera, R. E. (2020). Efficient recovery of thermostable polyhydroxybutyrate (PHB) by a rapid and solvent-free extraction protocol assisted by ultrasound. *International journal of biological macromolecules*, 164, 771–782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.101>
- Maximilian, S. T. (2019). Utilization of desugared sugar beet molasses for the production of poly(3-hydroxybutyrate) by halophilic *Bacillus megaterium* uyuni S29. *Process Biochemistry*, 9-15.
- Mohapatra, et al. (2017). *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 12. 206-213. [10.1016/j.bbrep.2017.10.001](https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001).
- Paul, A. K. (2019). Bioconversion of sugarcane molasses to poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by endophytic *Bacillus cereus* RCL 02. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 20-24.
- Prjibelski, et al. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current protocols in bioinformatics*, 70(1), e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Radecka, S. L. (2000). Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *Journal of Applied Microbiology*, 353-357.
- Ramsay, J. A. (1990). Recovery of poly-3-hydroxyalpoic acid granules by a surfactant-hypochlorite treatment. *Biotechnology Techniques Vol 4 No 4* , 221-226 .
- Ratón, T. O. (2005). Aislamiento de cepas del genero *bacillus* sp. con potencialidades para la bioprotección y la estimulación del crecimiento vegetal. *Revista Cubana de química*, 189-195.

- Roberta, et al. (2020) Industrial Production of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from CO<sub>2</sub>: Can Cyanobacteria Meet this Challenge?
- Riaño, J. Y. (2010). Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros. *teoría y praxis investigativa*, 79-84
- Richard M. Losick, (2020) *Bacillus subtilis*: a bacterium for all seasons, *Current Biology*, Volume 30, Issue 19, Pages R1146-R1150, ISSN 0960-9822, <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.083>.
- Rios, S. A. (2019). Tesis de Licenciatura. *Establecer las condiciones de cultivo de cepas del genero Bacillus para obtención de ácido polihidroxibutírico*. Monterrey, Nuevo Leon, Mexico: UANL.
- Rodríguez-Contreras, A. (2013). High production of poly(3-hydroxybutyrate) from a wild *Bacillus megaterium* Bolivian strain. *Journal of Applied Microbiology*, 1378--1387.
- Sangkharak, K. (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 173-182.
- Sang Yup Lee. (1999). Removal of Endotoxin during Purification of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Gram-Negative Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 2762-2764, 65, 6. doi:10.1128/AEM.65.6.2762-2764.1999
- Santos, E. A. (2012). *Bacterial Spores Current Research and applications*. Norfolk UK: Caister Academic Press.
- Schlegel, O. &. (1973). p-Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its Significance in the Regulation of Poly-p-hydroxybutyrate Metabolism. *Biochem Journal*, 239-248
- Singh, M. (2009). *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*.
- SK, M. (2006). Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*, 2249-2258.
- Takita, Masaki, et al. Method for producing poly-3-hydroxyalkanoic acid and agglomerates thereof. US9249258B2
- Verma, et al. (2018) Efficient poly- $\gamma$ -hydroxybutyrate production from *Bacillus* sp. *The Pharma Innovation Journal*. 153-157 revisado el 7 de Marzo del 2020 <https://www.thepharmajournal.com/archives/?year=2018&vol=7&issue=4&ArticleId=1852>
- Villada, H. S. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*, 5-12.
- Williams, C. (2013). Efectos nocivos de la contaminación ambiental sobre la embarazada. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 226-238
- William S. and Helene Feil, A. Copeland (2012) Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. Doe Joint Genome institute, US Department of Energy. <https://jgi.doe.gov/>

## RESUMEN BIBLIOGRAFICO

Alvaro Ríos Sosa

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con especialidad en Microbiología

Tesis: Aislamiento e identificación de bacterias del género *Bacillus* (Christian Gottfried Ehrenberg, 1835) productoras de polihidroxicanoatos

Campo de estudio: Microbiología

Datos personales: Nacido en la ciudad metropolitana de nuestra señora de Monterrey, Nuevo León el 21 de Febrero de 1996, hijo de Alvaro Ríos Reyes y Liliana Beatriz Sosa Compean

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Biotecnología Genómica en 2019.