

## Evaluación de la producción de Polihidroxicanoatos (PHAs) por *Bacillus* sp. mediante Microscopía confocal

Raul E. Martínez-Herrera<sup>a</sup>, Olga M. Rutiaga-Quiñones<sup>b</sup>, Paola Flores-Rodríguez<sup>c</sup> y María E. Alemán-Huerta<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n. Ciudad Universitaria. C.P. 66455. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

<sup>b</sup>Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Durango, Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica, Felipe Pescador 1803 Ote, Colonia Nueva Vizcaya, C.P. 34080. Durango, Dgo, México.

<sup>c</sup>Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, (CIIDIR) IPN-Durango. Calle Sigma #119, Fraccionamiento 20 de Noviembre II, C.P. 34220. Durango, Dgo, México.

\*maria.alemanhr@uanl.edu.mx

**Palabras clave:** azul de Nilo, *Bacillus*, biomateriales, confocal, polihidroxicanoatos.

### Introducción

Los Polihidroxicanoatos (PHAs), son poliésteres biodegradables que se acumulan a manera de inclusiones citoplasmáticas (carbonosomas) en una amplia variedad de géneros bacterianos<sup>1</sup>. Debido a sus propiedades físico-químicas, este biomaterial presenta distintas aplicaciones en áreas como medicina, industria y agricultura<sup>2</sup>.

El interés biotecnológico de los PHAs ha dado lugar a la bioprospección y selección de cepas bacterianas con el potencial de acumular estas inclusiones bajo diversos sustratos como fuentes de carbono<sup>3</sup>. Actualmente se ha considerado a la microscopía confocal como una técnica novedosa para la observación de la síntesis de PHAs<sup>4</sup>, así como el potencial de esta técnica para dilucidar el número y estructura de los gránulos sintetizados<sup>5</sup>.

El objetivo del presente proyecto fue evaluar la producción de PHAs producido por una cepa bacteriana del género *Bacillus* mediante una tinción lipofílica y microscopía confocal.

### Metodología

100 µL (10<sup>8</sup> UFC/mL) de una suspensión de esporas de *Bacillus* sp. fueron inoculados en un medio de cultivo modificado con un exceso de fuente de carbono, dicho inóculo se incubó a 30° C, con una agitación de 150 rpm durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se realizaron fijaciones en calor en un portaobjetos, dicha fijación se sometió a una tinción con azul de Nilo 1% y se añadió agarosa al 2% como medio de montaje.

Las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio confocal de barrido invertido SP8 DMI8 (Leica) con emisión de 570 nm, ganancia de 780. Las imágenes fueron tomadas en corte xyz, resolución de 8192 x 8192.

### Resultados y discusión

*Bacillus* sp. presentó acumulaciones internas a los diferentes tiempos de incubación, siendo las 48 horas donde se encuentra una mayor presencia. Estos carbonosomas fueron observados como una coloración rojiza debido a la excitación del colorante azul de Nilo bajo el láser del microscopio confocal (Fig. 1).

Debido a la estructura química de tipo ácido graso de los PHAs, estos pueden ser observados cuando se tiñen con colorantes lipofílicos como el azul o rojo de Nilo bajo microscopía confocal. Esta microscopía es considerada como una herramienta novedosa para la selección de bacterias con

capacidad de acumular carbonosomas y la edad del cultivo a la que estos se presentan en mayor medida<sup>4</sup>.

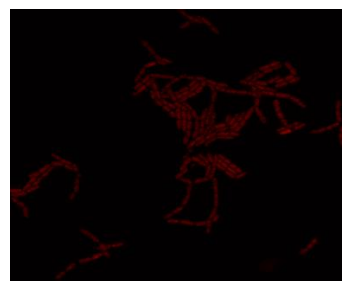


Fig. 1. Micrografía confocal (100 x) del polímero acumulado por *Bacillus* sp. a 48 horas de incubación.

### Conclusiones

Las tinciones con colorantes lipofílicos y la microscopía confocal son herramientas útiles en la selección de cepas bacterianas con capacidad de acumular Polihidroxicanoatos y la edad del cultivo a la que estas inclusiones tienen mayor presencia en la célula bacteriana.

### Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a manera de beca nacional (Raul E. Martínez beneficiario de beca no. 468278).

### Referencias

1. Rohini, D; Phadnis, S; Rawal, S. K. Indian J Biotechnol. **2006**, 5, 276–283.
2. Ray, S; Kalia, V. C. Indian J Microbiol. **2017**, 57, 261–269.
3. Verlinder, R.; Hill, D.; Kenward, M.; Radecka, I. J Microbiol. **2007**, 102, 1437-1449.
4. Pillai, A; Kumar, A; Thulasi, K; Kumarapillai, H. Brazilian J Microbiol. **2017**, 48, 451–460.
5. Mravec, F; Obruca, S; Krzyzanek, V; Sedlacek, P; Hrubanova, K; Samek, O; Kucera, D; Benesova, P; Nebesarova, J. FEMS Microbiol Lett. **2016**, 363, 1–7.