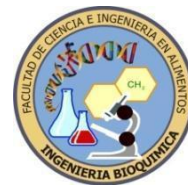




UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



“Caracterización de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando azúcares presentes en residuos agroindustriales”

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previa la obtención del Título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor: Darwin Roberto Llumigusín Jácome

Tutor: Orestes Darío López Hernández. PhD.

Ambato - Ecuador

Noviembre – 2018

APROBACIÓN DEL TUTOR

Orestes Darío López Hernández; PhD.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, noviembre de 2018



Doc. Orestes Darío López Hernández

CI: 1754784864

Tutor

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Darwin Roberto Llumigusin Jácome, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo la obtención del título de Ingeniero Bioquímico son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Darwin Roberto Llumigusin Jácome


C.C. 1726307414

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura o consulta y procesos investigativos, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además pruebo la reproducción de este Trabajo dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando está reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Darwin Roberto Llumigusin Jácome

C.C. 1726307414

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato. Para constancia firman:



Presidente del Tribunal

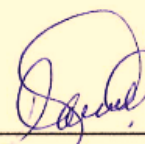
Ing. Mg. Cesar Augusto Germán Tomalá

C.C. 180116710-5



Ing. Mg. Paulo Santiago Baquero Icaza

C.C. 180323354-1



Lic. Mg. Danae Fernández Rivero

C.C. 175718120-9

Ambato, 14de noviembre de 2018

DEDICATORIA

A ti mami, Lucy, quien has sido mi mayor motivación y por quien luché día a día por salir adelante, me has inculcado todos los valores y me has formado como persona. Hoy todo lo que soy te lo debo a ti, Dios te bendiga siempre y este logro es por ti, ¡te adoro mamita!

A ti, Kelly, ñaña querida, que este trabajo sea tu motivación para salir adelante y seas una guerrera como lo has sido hasta hoy, nuestros caminos han sido duros, pero sé que lograras muchos más éxitos en tu vida, gracias por aguantarme todos estos años, eres la mejor ¡te quiero!

A ti, Machilita, abuelita querida, que desde pequeño siempre me ayudaste en más de mil y una formas, tu cariño siempre lo valoraré y hoy que vives cada día junto a mí también te dedico este trabajo, el cual sé que anhelas.

A ti papi, Iván que desde el cielo sé que estarás orgulloso de este logro.

Con mucho cariño

Darwin

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la dicha de compartir día a día una nueva aventura, y permitirme disfrutar de mi familia y amigos.

A mi mami y mi ñaña por ser siempre mi apoyo y estar siempre en las buenas y en las malas apoyándome en todas mis locuras. Gracias por su apoyo incondicional y por acompañarme en todo son las mejores

A la Doctora Linda Guamán y al Doctor Carlos Barba mis tutores a la distancia, muchísimas gracias por compartir todos sus conocimientos, paciencia y dedicación para lograr que este trabajo se haga realidad, sin duda son una fuente de inspiración y un gran equipo, Dios le pague por todo.

Al Doctor Orestes López, por toda su confianza, paciencia y por todo lo que me ha brindado, por las oportunidades que me ha dado de salir adelante día a día, gracias por todo, sin duda es una gran persona, muchas bendiciones para usted y su familia.

A ti, Mercy querida amiga que siempre hemos pasado en las buenas y en las malas en este pequeño trayecto de nuestras vidas, muchas gracias por ser parte de esto

A ti, Dani por ser un apoyo en mi tesis, fuiste participe de mi parte experimental, muchas gracias por todo, espero que Dios te bendiga siempre y salgas adelante, mi futura ingeniera biotecnóloga.

A mis amigos de la U, Majito, Isa Chabelita, Dianita, Chonsi, Che, Anita Pichona, Abyy a mis amigos desde el cole Yomi y Romelito, muchas gracias por todo su apoyo, amistad, paciencia y confianza, les agradezco el que hayan formado parte en este trayecto de mi vida, sin duda son los mejores. ¡Gracias por todo!

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

PORTADA	i
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	2
1.1. Tema.....	2
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Generales.....	3
1.3.2. Específicos.....	3
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes investigativos.....	4
2.1.1. Generalidades de las bacterias.....	4
2.1.2. Producción de biopolímeros	4
2.1.3. Generalidades sobre polihidroxicanoatos.....	4
2.1.3.1. Material de almacenamiento.....	4
2.1.3.2. Composición química.....	5
2.1.3.3. Características físicas.....	6
2.1.3.4. Consideraciones biológicas	7
2.1.3.4.1. Biodegradabilidad	7
2.1.3.4.2. Naturaleza renovable	8
2.1.3.5. Aplicaciones.....	8
2.1.4. Microorganismos productores de PHA.....	9

2.1.5.	Azúcares presentes en residuos agroindustriales.	11
2.1.6.	Costos asociados a la producción de PHA.....	12
2.2.	Hipótesis	12
2.2.1.	Hipótesis Nula (Ho)	12
2.2.2.	Hipótesis Alternativa (H1).....	12
2.3.	Señalamiento de variables de la hipótesis	12
CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS		13
3.1.	Material y métodos.....	13
3.1.1.	Recolección de las muestras de suelo	13
3.1.2.	Caracterización fisicoquímica del suelo	13
3.1.3.	Aislamiento y purificación de bacterias productoras de PHA	13
3.1.3.1.	Aislamiento de bacterias.....	13
3.1.3.2.	Preparación de placas de cultivo	14
3.1.3.3.	Dispersión en placa	15
3.1.3.4.	Tinción de colonias con Sudan Black B	16
3.1.3.5.	Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias productoras de PHA.....	16
3.1.3.6.	Preservación de bacterias productoras de PHA	17
3.1.4.	Cinética de crecimiento de bacterias productoras de PHA	17
3.1.4.1.	Preparación de cultivos para la cinética de crecimiento	17
3.1.4.2.	Ensayo de cinética de crecimiento.....	17
3.1.5.	Perfil de consumo de azúcares por las bacterias.	18
3.1.5.1.	Preparación de cultivos para el perfil de consumo	18
3.1.5.2.	Medición del consumo de la fuente de azúcar.....	18
3.1.6.	Ensayo de cuantificación PHA acumulado.....	18
3.1.6.1.	Preparación de cultivos para el acúmulo de PHA.....	18
3.1.6.2.	Ensayo de cuantificación de PHA.....	18
3.1.7.	Identificación genotípica de bacterias productoras de PHA.	19
3.1.7.1.	Diseño de primers para amplificar el gen 16SrDNA.....	19
3.1.7.2.	Amplificación de fragmentos por PCR	20
3.1.7.3.	Obtención de secuencias de 16SrDNA.....	20
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		21
4.1.	Análisis y discusión de los resultados.....	21

4.1.1.	Caracterización fisicoquímica del suelo	21
4.1.2.	Aislamiento y purificación de bacterias productoras de PHA	21
4.1.2.1.	Aislamiento de bacterias	21
4.1.2.2.	Tinción con Sudan Black a las bacterias aisladas.	22
4.1.2.3.	Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias 23	
4.1.3.	Cinética de crecimiento de bacterias productoras de PHA.	24
4.1.3.1.	Ensayo de cinética de crecimiento.....	24
4.1.3.2.	Velocidad específica de crecimiento de cada cepa.	25
4.1.4.	Perfil de consumo de azúcar por bacterias productoras de PHA 28	
4.1.5.	Cuantificación de la producción de polihidroxicanoatos	33
4.1.6.	Caracterización molecular de bacterias productoras de PHA ...	39
4.2.	Verificación de hipótesis	47
5.	CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
5.1.	Conclusiones	48
5.2.	Recomendaciones	49
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
	ANEXOS.....	57
	ANEXO 1. Placas en MM.....	57
	ANEXO 2. Caracterización microscópica.....	59
	ANEXO 3. Caracterización microscópica con la Tinción Sudan Black ..	60
	ANEXO 4. Secuenciación del gen 16SrRNA de bacterias productoras de PHA	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Comparación entre las propiedades físicas y térmicas de diferentes polímeros.....	7
Tabla 2.	Producción de PHA por diferentes microorganismos y estrategias	10
Tabla 3.	Composición de materiales lignocelulósicos	11
Tabla 4.	Diluciones realizadas en el experimento.....	14
Tabla 5.	Componentes de Medio Mineral	15
Tabla 6.	UFC aisladas.	21
Tabla 7.	Resultados de la tinción de Sudan Black	22

Tabla 8. Caracterización macroscópica de bacterias.....	23
Tabla 9. Caracterización microscópica de bacterias.....	24
Tabla 10. Linealización de la fase exponencial.....	26
Tabla 11. Perfil de consumo de azúcar.....	33
Tabla 12. Cuantificación de PHA a las 48 y 72 horas.....	38
Tabla 13. Primers universales.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los PHA.....	6
Figura 2. Descripción morfológica bacteriana.....	16
Figura 3. Cinética de crecimiento de cepas productoras de PHA.....	24
Figura 4. Perfil de consumo de lactosa la cepa DD04.....	29
Figura 5. Perfil de consumo de arabinosa de la cepa DD05.....	29
Figura 6. Perfil de consumo de glucosa de la cepa DD06.....	30
Figura 7. Perfil de consumo de glucosa de la cepa DD07.....	30
Figura 8. Perfil de consumo de lactosa de la cepa DD08.....	31
Figura 9. Perfil de consumo de arabinosa de la cepa DD09.....	31
Figura 10. Perfil de consumo de xilosa de la cepa DD10.....	32
Figura 11. Cuantificación del PHA de la cepa DD04.....	34
Figura 12. Cuantificación del PHA de la cepa DD05.....	34
Figura 13. Cuantificación del PHA de la cepa DD06.....	35
Figura 14. Cuantificación del PHA de la cepa DD07.....	35
Figura 15. Cuantificación del PHA de la cepa DD08.....	36
Figura 16. Cuantificación del PHA de la cepa DD09.....	36
Figura 17. Cuantificación del PHA de la cepa DD10.....	37
Figura 18. Cuantificación del PHA del control negativo <i>E.coli</i>	37
Figura 19. Secuencia parcial del gen 16SrRNA de la cepa DD04.....	40
Figura 20. Secuencia parcial del gen 16SrRNA de la cepa DD10.....	41
Figura 21. Similitud en bases de datos del NCBI de la cepa DD04.....	42
Figura 22. Identificación genotípica de la cepa DD04.....	42
Figura 23. Similitud en bases de datos del NCBI de la cepa DD10.....	43
Figura 24. Identificación genotípica de la cepa DD10.....	43
Figura 25. PHA sintasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
Figura 26. PHA sintasa de <i>Citrobacter freundii</i>	46

RESUMEN

La producción a bajos costos de los polihidroxicanoatos ha sido un reto actual para el mundo biológico. El presente trabajo ha identificado una cepa que aún no ha sido descrita con capacidad de producción de dicho biopolímero, *Citrobacter freundii*. Esta bacteria patógena presente muy comúnmente en el agua, suelo o inclusive en los intestinos de los animales, puede metabolizar diferentes azúcares como: lactosa, citrato o alcoholes como el glicerol. En este estudio, los sustratos para dicha bacteria han sido: lactosa y xilosa (azúcares presentes en residuos agroindustriales como en el suero de la leche o en el bagazo del arroz, maíz etc., respectivamente). Las velocidades de crecimiento específicos son: 0,6009 y 0,6175 h⁻¹ respectivamente y el consumo de azúcar durante 24 horas, ha sido alrededor de 5 g/L.

Las concentraciones de PHA acumulada fueron evaluadas a las 48 y 72 horas, siendo a las 48 horas, los picos más altos, alcanzando los entre los 25 a 28 g/L. Una manera de confirmar que esta especie produzca el biopolímero fue identificando el gen PHA sintasa en su genoma, que es el responsable de producir dicho biopolímero, análisis realizado in silico, obteniéndose aproximadamente que el 80% del gen a comparar que corresponde al PHA sintasa.

Palabras clave: *Polihidroxicanoatos*, *Citrobacter freundii*, PHA sintasa, lactosa, xilosa

ABSTRACT

The low-cost production of polyhydroxyalkanoates has been a current challenge for the biological world. The present work has identified a strain that has not yet been reported with production capacity of said biopolymer, *Citrobacter freundii*. This pathogenic bacterium commonly present in water, soil or even in the intestines of animals, can metabolize different sugars such as lactose, citrate or alcohols such as glycerol. In this study, the substrates for said bacteria have been: lactose and xylose (sugars present in agroindustry residues as in the whey of milk or in the bagasse of rice, corn etc., respectively). The specific growth rates are: 0.6009 and 0.6175h⁻¹ respectively and the consumption of sugar for 24 hours, has been around 5 g/L.

The concentrations of PHA accumulated were evaluated at 48 and 72 hours, being at 48 hours, the highest peaks, reaching between 25 to 28 g/L. One way to verify that this species produces the biopolymer, was identifying the gene PHA synthase in its genome, which is responsible for producing said biopolymer, analysis made in silico, obtaining 80% of the gene to be compared that corresponds to the PHA synthase.

Keywords: *Polyhydroxyalkanoates*, *Citrobacter freundii*, PHA synthase, lactose, xylose

INTRODUCCIÓN

Durante más de setenta años, los plásticos a base de petróleo se han utilizado en una variedad de aplicaciones industriales y cotidianas debido a su versatilidad y durabilidad. Sin embargo, tienen atributos negativos que incluyen la recalcitrancia a la biodegradación, la toxicidad después de la incineración y la acumulación masiva de desechos en los vertederos y el medio ambiente marino. El desafío para los nuevos polímeros es conservar las características fisicoquímicas de los plásticos tradicionales, pero se benefician de la biocompatibilidad y biodegradabilidad como se puede evidenciar en el trabajo de Keshavarz & Roy (2010). Los polihidroxiclcanoatos (PHA) hoy en día son considerados como un sustituto ideal comparado con los polímeros de origen petroquímico, debido a que estos poseen un origen biológico: los microorganismos. Estos microorganismos pueden producir los biopolímeros a partir de fuentes de carbono baratas, generalmente sin valor comercial (residuos) y son importantes por sus características físicas similares a las de los plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno y polietileno(Lemos Delgado & Mina Cordoba, 2015). A pesar de las ventajas ambientales de los PHA frente a los plásticos petroquímicos, el problema fundamental que todavía afronta la producción de este polímero es su elevado costo (Chanprateep, 2010), por lo que se están haciendo nuevos estudios entre las cuales figuran mejoras en el proceso de fermentación, purificación y extracción(Lee, 1996). Los PHA son polímeros totalmente biodegradables más versátiles con propiedades similares a los plásticos convencionales. Otros polímeros biodegradables tales como plásticos químicamente sintetizados (por ejemplo, ácido poliglicólico y ácido poliláctico) y plásticos a base de almidón (por ejemplo, almidón-polietileno) también han aparecido en la escena, pero carecen de variabilidad en la estructura y extensas propiedades del material. Se ha identificado un número apreciable de PHA con más de 150 monómeros. Con masas moleculares que varían de 50,000 a 1,000,000 Da. Como los PHA son biodegradables e inmunológicamente inertes, tienen aplicaciones futuras prometedoras, particularmente en campos relacionados con la medicina, a pesar de su costosa producción (Choi & Lee, 1997).

CAPÍTULO I. EL PROBLEMA

1.1. Tema

Caracterización de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHA) utilizando azúcares presentes en residuos agroindustriales

1.2. Justificación

Uno de los principales contaminantes ambientales de los residuos sólidos urbanos, que produce el 12% total de los desechos en un hogar común ecuatoriano es el plástico de origen petroquímico (Ministerio del Ambiente, 2013). El plástico es un derivado del petróleo, que se ajustó por sus bajos costos y su bajo peso, a la producción de varios productos comúnmente utilizados como: fundas, envases, recipientes, etc. Existen varios problemas cuando estos terminan su uso y son desechados sin un tratamiento previo, en muchos de los casos al medio ambiente. Esto provoca por ejemplo una fauna amenazada, problemas en la salud humana (el 90% de los niños recién nacidos y casi todos los adultos analizados están contaminados con disruptores endocrinos y otros productos tóxicos presentes en el plástico) como señala Romano (2012) y daños ecológicos, ya que se requieren entre 10 y 100 años para degradarse por completo indica Téllez (2012).

Ecuador es un país diverso, que alberga varios ecosistemas en los cuales por ejemplo dispone de un 10% de todas las especies de plantas que hay en el planeta, además del 8% de las especies de animales. Un grupo muy interesante para nuevos estudios son los microorganismos entre ellos las bacterias, que por su naturaleza se puede adaptar a los diferentes ecosistemas de nuestro país (Mena, 2014), estos seres vivos pueden producir bioproductos de gran interés a nivel industrial como: aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, biocombustibles o biopolímeros (Lee, 1996).

Debido a esto, ha crecido el interés en el estudio de bacterias nativas de Ecuador que produzcan biopolímeros, semejantes en características físicas al plástico, específicamente en la producción de polihidroxicanoatos (PHA). Los PHA son polímeros de hidroxialcanoato que se acumulan como carbono/energía o como material de almacenamiento de energía reductora en varios microorganismos (Choi & Lee, 1999).

Un inconveniente importante para la comercialización de los PHA es su precio en comparación con los materiales plásticos petroquímicos, por ejemplo, el polietileno y el polipropileno se comercializa a USD \$ 1/kg. Sin embargo, la empresa, Zeneca Bio Products de Reino Unido, ya produce PHA y su precio bordea USD \$ 16/kg, Las comparaciones con otros polímeros biodegradables como la polilactida, poliésteres alifáticos basados en dioldiácido y polímeros basados en almidón, que actualmente se venden entre USD \$ 5-12/kg (Choi & Lee, 1997).

Por este motivo se ha intentado reducir el costo de producción para competir contra los plásticos petroquímicos mediante el desarrollo de mejores cepas modificadas, procesos de fermentación/recuperación, más eficientes, la utilización de sustratos más económicos o nuevas especies de microorganismos más eficaces. Una de estas estrategias consiste en utilizar fuentes de carbono renovables, como los residuos agroindustriales que se generan en las industrias del centro del país, con el fin de disminuir los costos de producción y como una alternativa sustentable de uso para dichos residuos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Generales

Caracterizar bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando azúcares presentes en residuos agroindustriales

1.3.2. Específicos

- Aislar bacterias provenientes de suelos de la provincia de Pichincha del cantón Mejía con capacidad de producción de PHA.
- Determinar la cinética de crecimiento de las bacterias productoras de PHA.
- Establecer el perfil de uso de los azúcares utilizados por las bacterias para el acúmulo de PHA.
- Cuantificar el biopolímero producido por el/los microorganismos con mejor perfil de acúmulo de PHA.
- Identificar a nivel de género y/o especie el/los microorganismos con mejor perfil de uso de azúcares y acúmulo de PHA.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes investigativos.

2.1.1. Generalidades de las bacterias.

La envoltura de células de bacterias es una estructura compleja de capas múltiples que sirve para proteger a estos organismos de su entorno impredecible y, a menudo, hostil (Hancock, 1997). Las envolturas de la mayoría de las bacterias pertenecen a uno de los dos grupos principales. Las bacterias Gram negativas están rodeadas por una delgada pared celular de peptidoglicano, que a su vez está rodeada por una membrana externa que contiene lipopolisacáridos. Las bacterias Gram positivas carecen de una membrana externa pero están rodeadas por capas de peptidoglicano muchas veces más gruesas que las que se encuentran en los Gram-negativos (Silhavy et al., 2010).

2.1.2. Producción de biopolímeros

Los polímeros de base biológica son materiales que se producen a partir de recursos renovables. Los términos polímeros de base biológica y polímeros biodegradables se usan ampliamente en la literatura, pero existe una diferencia clave entre los dos tipos de polímeros (Byrom, 1987). Los polímeros biodegradables se definen como materiales cuyas propiedades físicas y químicas sufren deterioro y se degradan por completo cuando se exponen a microorganismos, procesos de fermentación (aeróbico), metano (procesos anaeróbicos) y agua (procesos aeróbicos y anaeróbicos). Los polímeros de base biológica pueden ser biodegradables (por ejemplo, ácido poliláctico) o no degradables (por ejemplo, biopolietileno). De forma similar, aunque muchos polímeros de base biológica son biodegradables (por ejemplo, almidón y polihidroxialcanoatos), no todos los polímeros biodegradables son de base biológica (por ejemplo, policaprolactona) (Babu et al., 2013).

2.1.3. Generalidades sobre polihidroxialcanoatos.

2.1.3.1. Material de almacenamiento.

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son macromoléculas estructuralmente simples sintetizadas por muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los PHA se acumulan como gránulos a niveles tan altos como el 90% del

peso seco de la célula y, en general, se cree que desempeñan un papel como suministro de carbono y/o energía (Dawes & Senior, 1973).

Cuando los suministros de nutrientes están desequilibrados, es ventajoso que las bacterias almacenen el exceso de nutrientes intracelularmente, especialmente dado que su estado general no se ve afectado. Al polimerizar compuestos intermedios solubles en moléculas insolubles, la célula no experimenta alteraciones de su estado osmótico y se previene la fuga de estos compuestos valiosos fuera de la célula. En consecuencia, las reservas de nutrientes seguirán estando disponibles a un costo de mantenimiento relativamente bajo y con un retorno de la inversión asegurado (Senior et al., 1972).

Una vez que los PHA se extraen de la célula bacteriana, estas moléculas muestran propiedades materiales que son similares a algunos plásticos comunes como el polipropileno. El origen bacteriano de los PHA hace que estos poliésteres sean considerados como material natural y, de hecho, muchos microorganismos han evolucionado la capacidad de degradar estas macromoléculas. Además de ser biodegradable, los PHA son reciclables como los termoplásticos petroquímicos (Choi & Yoon, 1994).

2.1.3.2. Composición química

Se han identificado hasta la fecha diferentes tipos de PHA y éstos son principalmente poliésteres lineales de extremo a extremo, compuestos de monómeros de ácido grasos 3-hidroxi. En estos polímeros, el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero vecino (Madison & Huisman, 1999).

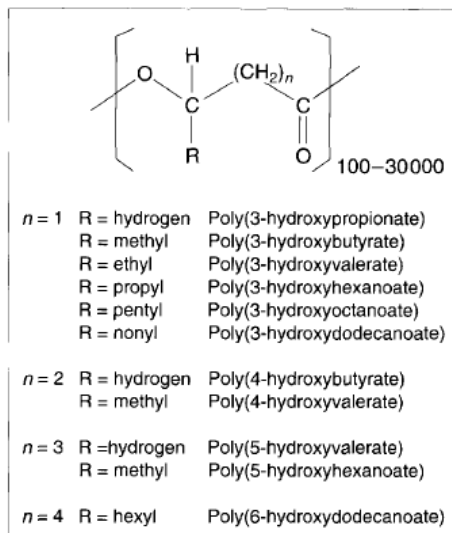


Figura 1. Estructura química de los PHA

Tomado de: (Lee, 1996)

En todos los PHA que se han caracterizado hasta ahora, el átomo de carbono sustituido con hidroxilo tiene la configuración R, excepto en algunos casos especiales en los que no hay quiralidad. En la misma posición C-3 o β , se posiciona un grupo alquilo que puede variar de metilo a tridecilo. Sin embargo, esta cadena lateral de alquilo no está necesariamente saturada: se han informado también monómeros aromáticos, insaturados, halogenados y ramificados (Madison & Huisman, 1999).

Los PHA se clasifican en tres clases de longitud de cadena corta, media o larga (scl, mcl y lcl) respectivamente, de acuerdo con la cantidad de carbonos en las cadenas laterales. Los scl-PHA tienen menos de 5 átomos de carbono, mientras que los mcl-PHA tienen de 5 a 14 átomos de carbono y los lcl-PHA tienen más de 14 átomos de carbono, pero son poco comunes y menos estudiados. (Steinbuchel et al., 1995; Raza et al., 2018).

2.1.3.3. Características físicas

La principal razón que nació para haber despertado tan grande interés es debido a sus características. El P(3HB) (Poli-3 hidroxibutirato) es altamente cristalino, rígido y resistente, con características similares a las de poliestireno o cloruro de polivinilo (PVC). Sus propiedades físicas son frecuentemente comparadas a aquellas del polipropileno, por tener un punto de fusión y cristalinidad similar (Lomas et al., 2013; Guamán et al., 2018). Varios enfoques han conducido para reducir su fragilidad. Algunos de estos

estudios, se basan en obtener co-polimeros con unidades de hidroxivalerato, que tienen menor cristalinidad y mejores propiedades mecánicas que el P(3HB) (Lopes et al., 2014); (Mendonça et al., 2014).

Tabla 1. Comparación entre las propiedades físicas y térmicas de diferentes polímeros

Polímero	Tm (°C)	Tg (°C)	Resistencia a la tensión (Mpa)	Elongamiento para la ruptura %
P(3HB)	177	4	43	5
P(3HB-co-10%HV)	150	-	25	20
P(3HB-co-20%HV)	135	-	20	100
P(3HB-co-3%4HB)	166	-	28	45
P(3HB-co-64%4HB)	50	-	17	591
P(3HB-co-5%4HHx)	151	-	-	-
P(3HB-co-25%4HHx)	52	0	-	-
PHO	61	-4	9	380
Polipropileno	170	-35	34	400
Poliestireno	110	-	50	-
PET	252	-	56	730
HDPE	135	-	29	-
LDPE	130	-30	10	620

3HB: 3-hidroxibutirato; 4HB: 4-hidroxibutirato; HV: 3-hidroxivalerato; HHx: 3-hidroxihexanoato; PHO: 3-hidroxi octanoato; PET: polietileno tereftalato, HDPE: polietileno de alta densidad; LDPE: polietileno de baja densidad; Tm: temperatura de fusión; Tg: temperatura de transición vítrea

Adaptado:(Holmes, 1985; Sudesh et al., 2000; Silva et al., 2007; Guamán et al., 2018).

2.1.3.4. Consideraciones biológicas

2.1.3.4.1. Biodegradabilidad

Además de las propiedades poliméricas típicas descritas anteriormente, una característica importante de los PHA es su biodegradabilidad. En la naturaleza, un vasto consorcio de microorganismos puede degradar los PHA

utilizando hidrolasas de PHA secretadas y despolimerasas de PHA (Jendrossek et al., 1996). Las actividades de estas enzimas pueden variar y depender de la composición del polímero, su forma física (amorfa o cristalina), las dimensiones de la muestra y, de manera importante, las condiciones ambientales (Sudesh et al., 2000).

2.1.3.4.2. Naturaleza renovable

Tan importante como las características biológicas y la biodegradabilidad de los PHA es el hecho de que su producción se basa en recursos renovables. La producción fermentativa de PHA se basa en productos agrícolas como azúcares y ácidos grasos como fuentes de carbono y energía. Estas materias primas agrícolas se derivan de CO₂ y agua, después de su conversión a PHA biodegradable, los productos de degradación son nuevamente CO₂ y agua. Por lo tanto, si bien para algunas aplicaciones la biodegradabilidad es crítica, las PHA reciben atención general porque se basan en compuestos renovables en lugar de en nuestras reservas decrecientes de combustible fósil (Madison & Huisman, 1999).

2.1.3.5. Aplicaciones

Los PHA son poliésteres termoplásticos naturales y, por lo tanto, la mayoría de sus aplicaciones reemplazan a los polímeros petroquímicos actualmente en uso para aplicaciones de envasado y recubrimiento. La amplia gama de propiedades físicas de la familia de polímeros PHA y el rendimiento ampliado que se puede obtener por combinación y mezcla, proporcionan una amplia gama correspondiente de posibles aplicaciones de uso final, como se describe en numerosas patentes. Los esfuerzos iniciales se centraron en aplicaciones de moldeo, en particular para artículos de embalaje de consumo tales como botellas, envases cosméticos, bolígrafos y camisetas de golf (Madison & Huisman, 1999). Se han descrito artículos de higiene personal biodegradables o compostables a partir de copolímeros de P(3HB). Los PHA también se pueden usar para reemplazar polímeros petroquímicos en composiciones de tóner y revelador o como polímeros conductores de iones. Los PHA se pueden usar como látex, por ejemplo, para aplicaciones de revestimiento de papel, o se pueden usar para producir sustitutos de crema láctea. El PHA se puede hidrolizar químicamente y los monómeros se

pueden convertir en moléculas comercialmente atractivas, tales como β -hidroxiácidos, ácidos 2-alquenoicos, β -hidroxialcanoatos, β -acilactonas, β -aminoácidos y ésteres de β -hidroxiácidos (Madison & Huisman, 1999).

La última clase de productos químicos actualmente está recibiendo atención debido a posibles aplicaciones como solventes biodegradables (Silva et al., 2007).

2.1.4. Microorganismos productores de PHA

Tanto el tipo de microorganismos procariotas como eucariotas pueden producir diferentes tipos de PHA. Los PHA también se han notificado en sangre y tejidos de humanos y animales (Breuer, 2009; Raza et al., 2018) y se usan para controlar las convulsiones, las enfermedades metabólicas y aumentar la eficacia cardíaca. Diferentes bacterias producen diferentes tipos de PHA. Las cepas fluorescentes de *Pseudomonas*, por ejemplo, son bien conocidas por acumular mcl-PHA ya que tienen mcl-PHA sintasas para la síntesis de PHA con 6-14 átomos de carbono (Kim et al., 2000; Raza et al., 2018).

Tabla 2. Producción de PHA por diferentes microorganismos y estrategias

Fuente de carbono	Cepa bacteriana	Modo de fermentación	Tipo de polímero	Factor limitante	Peso seco celular (g/L)	Acumulación de PHA (%)
Triglicéridos	<i>Pseudomonas resinovorans</i>	Fed-Batch	mcl	NA	3.3	45.0
Hexadecano	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	Continuo	mcl	Nitrógeno	1.0	7.5
Glucosa	<i>Bacillus cereus</i>	Batch	scl	NA	3.4	47,9
Octanoato	<i>P. oleovorans</i> ATCC 29347	Continuo	mcl	Carbono y Nitrógeno	ND	10,1
Residuos de aceites	<i>P. aeruginosa</i> 42A2 NCIB 40045	Batch	mcl	Nitrógeno	3.2	54.6
Ácidos grasos	<i>P. putida</i> Bet001	Batch	mcl	Nitrógeno	ND	49.7-68.9
Glucosa	<i>Lysinibacillus sphaericus</i> GBS1	Batch	scl	ND	ND	60.0
Glicerol	<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Fed-Batch	scl	Nitrógeno	ND	62.0
Ácido oleico	<i>Alcaligenes sp.</i> NCIM 5085	Batch	scl	ND	4.1	70.8
Bagazo de caña de azúcar	<i>P. aeruginosa</i>	Batch	ND	ND	ND	60.0

ND: No determinado; Tomado de: (Raza et al., 2018)

2.1.5. Azúcares presentes en residuos agroindustriales.

Los residuos lignocelulósicos obtenibles por parte de la industria, poseen una variedad de polisacáridos, entre aquellos las pentosas, principalmente: xilosa y arabinosa, también poseen hexosas como: glucosa, galactosa y manosa (Guilherme et al., 2015).

El suero es un residuo de la industria láctea que representa hasta el 90% del volumen de leche procesada. La mitad de este suero de leche se convierte en productos utilizables para humanos y animales, el resto generalmente se desecha en el medio ambiente. Se investigaron los intentos de usar suero de leche como fuente de carbono para el crecimiento bacteriano como un sustrato barato para la estrategia de producción de PHA como se describe en el estudio realizado por Raza (2018).

Tabla 3. Composición de materiales lignocelulósicos

Compuesto	Unidad en base seca	Madera				Residuos agroindustriales			
		Pino	Abedul	Sauce	Eucalipto	Bagazo de trigo	Bagazo de arroz	Bagazo de maíz	Bagazo de caña
Glucano	%	46,4	43,4	38,2	39,4	38,2	34,2	35,6	36,5
Xilano	%	8,8	4,9	19,7	9,68	21,2	24,5	18,9	29,8
Arabinosa	%	2,4	1,1	ND	1,03	2,5	ND	2,9	5,65
Manosa	%	11,7	12,8	1,2	ND	0,3	ND	0,3	ND
Lignina	%	29,4	28,1	21,8	16,0	23,4	11,9	12,3	17,7

ND: No determinado, Adaptado de: (Guilherme et al., 2015; Cesário & de Almeida, 2015; Obruca., 2015).

2.1.6. Costos asociados a la producción de PHA

Aunque los plásticos de origen microbiano tienen una clara ventaja sobre los plásticos basados en petróleo convencionales, el principal inconveniente es el alto costo asociado con la producción fermentativa (Chanprateep, 2010). Los principales factores que afectan el costo de producción incluyen el tipo de fuente de carbono, el costo corriente de la fermentación, la productividad del proceso, los rendimientos de las fuentes de carbono seleccionadas y el procesamiento posterior (Lee & Na, 2013) (Raza et al., 2018). Los contenidos de PHA en la biomasa celular son muy importantes para el proceso de extracción económico, también la selección de un microorganismo hiperproductivo es igualmente importante para una producción rentable. Por ejemplo, se informó que el costo promedio de USD/kg de la producción de PHB (100.000 ton / año) fue 2.6, 5.37 y 6.69 de *Alcaligenes latus*, *E. coli* recombinante y *Methylobacterium organophilum*, respectivamente (Choi & Lee, 1999)

2.2. Hipótesis

2.2.1. Hipótesis Nula (H_0)

Las bacterias aisladas del suelo del cantón Mejía no son productoras de PHA usando azúcares presentes en residuos agroindustriales.

2.2.2. Hipótesis Alternativa (H_1)

Las bacterias aisladas del suelo del cantón Mejía son productoras de PHA usando azúcares presentes en residuos agroindustriales.

2.3. Señalamiento de variables de la hipótesis

- Aislamiento y purificación de bacterias aisladas del suelo del cantón Mejía.
- Perfil consumo de azúcares por las bacterias productoras de PHA.
- Producción de PHA por bacterias aisladas.
- Caracterización molecular de las mejores bacterias productoras de PHA.

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material y métodos

3.1.1. Recolección de las muestras de suelo

Las muestras de suelo se recolectaron el 01 de marzo del 2018, mediante el uso de una pala estéril, realizando una excavación de aproximadamente 15 cm, se tomaron 100 g de suelo y fue depositado en frascos estériles y llevadas al laboratorio, para la caracterización fisicoquímica. El suelo utilizado fue del barrio Umbria del cantón Mejía de la provincia de Pichincha.

- **Coordenadas:** 0°33'30.5"S 78°38'03.0"W
- **Altitud:** 2945 msnm

3.1.2. Caracterización fisicoquímica del suelo

Los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron el pH y conductividad eléctrica, se pesaron 10 gramos de la muestra y se colocaron en un vaso de precipitación de 100 mL con 90 mL de agua destilada, a continuación, las muestras fueron homogeneizadas durante 30 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se tomaron lecturas de pH y conductividad por triplicado y se reportó el promedio.

3.1.3. Aislamiento y purificación de bacterias productoras de PHA

3.1.3.1. Aislamiento de bacterias

Se realizó diluciones seriadas como está descrita en la siguiente tabla:

(ver página siguiente)

Tabla 4. Diluciones realizadas en el experimento

Dilución	Descripción
1/10 ⁰	Se tomó 10 g de suelo y se disolvió con 90ml de agua destilada, con agitación vigorosa por 1 hora
1/10 ¹	Se tomó una alícuota de 1 ml de la dilución 1/10 ⁰ en 9ml de agua destilada
1/10 ²	Se tomó una alícuota de 1 ml de la dilución 1/10 ¹ en 9ml de agua destilada
1/10 ³	Se tomó una alícuota de 1 ml de la dilución 1/10 ² en 9ml de agua destilada

3.1.3.2. Preparación de placas de cultivo

Para favorecer el acúmulo de PHA se preparó medio de cultivo mineral (MM) con adición de 1,5% agar, conteniendo limitación de nitrógeno (1g/L) y las fuentes de carbono fueron: xilosa, glucosa, lactosa y arabinosa (15g/L). La composición del MM está descrita en la tabla 5 en una relación por 1 litro.

(ver página siguiente)

Tabla 5. Componentes de Medio Mineral

Compuesto	Cantidad
KH ₂ PO ₄	1,50 g
Na ₂ HPO ₄	3,54 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,20 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,01 g
Citrato de amonio férrico	0,06 g
Elementos traza	
H ₃ BO ₃	0,33 ml
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,20 ml
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,10 ml
MnCl ₂ * 4H ₂ O	0,03 ml
NaMoO ₄ *2H ₂ O	0,02 ml
NiCl ₂ *6H ₂ O	0,02 ml
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,01 ml

3.1.3.3. Dispersión en placa

Se trabajaron con las diluciones: $1/10^2$ y $1/10^4$, para lo cual se inocularon 100 μ L de las diluciones en placas con MM agar conteniendo las diferentes fuentes de carbono, los cuales se dispersaron con un asa de Digrafsky, procedimiento que se lo realizará por triplicado, posteriormente se dejó incubando durante 48 horas a 37°C. Las placas fueron identificadas como MMX (medio mineral suplementado con xilosa), MMG (medio mineral suplementado con glucosa), MML (medio mineral suplementado con lactosa) y MMA (medio mineral suplementado con arabinosa).

3.1.3.4. Tinción de colonias con Sudan Black B

Se preparó la solución de Sudan Black B 0,02% (p/v) con etanol al 96%, para lo cual se prepararon placas con agar MM con cada fuente de carbono 15g/L y de nitrógeno 1g/L en donde se inocularon las bacterias seleccionadas en el paso anterior y se añadió la solución de Sudan Black por 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo, se realizó un lavado de la solución con etanol al 70%. Una coloración azul intensa, demostró la existencia de acúmulo de PHA, además se realizaron controles positivos y negativos con *Burkholderia sacchari* y *E.coli* respectivamente.

3.1.3.5. Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias productoras de PHA.

Para la caracterización macroscópica se identificó las principales características fenotípicas como la forma, elevación, margen las cuales se describió como se encuentra en la Figura 2.














Forma	 Circular	 Irregular	 Lentijuela	 Filamentosa	 Rizoide
Elevación	 Plana	 Convexa	 Umbonada		
Margen	 Entero	 Ondulado	 Lobado	 Filamentoso	 Rizado

Figura 2. Descripción morfológica bacteriana

Tomado de: (Estrada et al., 2018)

Para la caracterización microscópica se identificó a que grupo pertenecen las bacterias (Gram positivas o Gram negativas), se realizó la tinción diferencial por el método de Gram. Se realizó un frotis con la ayuda de un asa de transferencia, tomando una colonia pura y aislada fijándola con calor; posteriormente, se tiñó durante 1 minuto con cristal violeta y se lavó con agua destilada; seguidamente, la solución yodada se colocó por 1 minuto y se lavó nuevamente con agua destilada, la decoloración se realizó con alcohol al 70% y se lavó; finalmente se añadió safranina (color de contraste)

durante 1 minuto y se lavó con agua destilada por última vez. Las muestras fueron observadas en un microscopio óptico con los lentes 4X, 40X y 100X.

3.1.3.6. Preservación de bacterias productoras de PHA

Una vez aisladas y caracterizadas microscópicamente las bacterias productoras de PHA, cada una de estas se codificaron y se inocularon en 10 ml de caldo LB (Luria Bertani), posteriormente se incubaron por 24 horas a 37°C y con agitación constante a 200 rpm. Transcurrido el tiempo se tomó una alícuota de 500 µl de la suspensión de células bacterianas y se añadió 500 µl de glicerol 50% (v/v) en Eppendorfs, finalmente se conservó a -80°C.

3.1.4. Cinética de crecimiento de bacterias productoras de PHA

3.1.4.1. Preparación de cultivos para la cinética de crecimiento

Se inocularon las bacterias en 3 ml de caldo LB y se incubaron durante 24 horas a 30°C, con agitación constante a 200 rpm. Una vez transcurrido el tiempo, se midió en un espectrofotómetro la densidad óptica (OD) y se hicieron los cálculos necesarios para empezar el ensayo con 0.05 de OD inicial en cada cultivo bacteriano.

3.1.4.2. Ensayo de cinética de crecimiento.

En un espectrofotómetro se incubaron en una placa multipozos cada cultivo bacteriano con su respectiva fuente de carbono a 5 g/L a 37 °C con agitación de 150 rpm por 24 horas, con una OD inicial del 0.05. Todas las muestras bacterianas estuvieron expuestas a una lectura constante cada 15 minutos a 600nm. Las lecturas se hicieron por triplicado y con sus respectivos blancos. Finalmente se analizaron los resultados mediante gráficos entre la OD en función al tiempo. Adaptado a estudios realizados por: (Lopes et al., 2014; Tufail et al., 2017; Guamán et al., 2018), se calculó la velocidad específica de crecimiento, linealizando la fase exponencial de dichos gráficos. Debido a que este parámetro sirvió para determinar las bacterias con mejor perfil de adaptación al MM y a su respectiva fuente de carbono.

3.1.5. Perfil de consumo de azúcares por las bacterias.

3.1.5.1. Preparación de cultivos para el perfil de consumo

Se inocularon las bacterias en estudio en 3 ml de caldo LB y se incubaron por 24 horas a 30°C con agitación constante a 200 rpm para tener un cultivo fresco. Una vez transcurrido el tiempo, se midió en un espectrofotómetro la densidad óptica (OD) y se hicieron los cálculos necesarios para empezar el ensayo con 0.05 de OD en cada cultivo bacteriano.

3.1.5.2. Medición del consumo de la fuente de azúcar.

Todos los cultivos a partir de una OD inicial del 0,05 los cuales se inocularon en 25 ml de MM caldo y se incubaron por 24 horas a 30°C con agitación constante de 200 rpm, con su respectiva azúcar a 15 g/L. Se hicieron lecturas en un refractómetro digital cada 4 horas por triplicado, tomando 0,025ml en cada medición. Se registraron los promedios y se graficaron la concentración de azúcar (g/L) en función al tiempo, este método, ha sido adaptado a partir (Borji et al., 2017).

3.1.6. Ensayo de cuantificación PHA acumulado.

3.1.6.1. Preparación de cultivos para el acúmulo de PHA

Se inocularon las bacterias en 3 ml de caldo LB y se incubaron por 24 horas a 30°C con agitación constante a 200 rpm para tener un cultivo fresco. Una vez transcurrido el tiempo, se midió en un espectrofotómetro la densidad óptica (OD) y se hicieron los cálculos necesarios para empezar el ensayo con 0.05 de OD en cada cultivo bacteriano.

3.1.6.2. Ensayo de cuantificación de PHA

Basados en el protocolo descrito por (Porrás et al., 2017), se realizó la siguiente metodología: Se preparó 50 ml de MM caldo con cada uno de los cultivos bacterianos en su respectiva fuente de carbono con una OD inicial de 0,05 y se incubaron por 72 horas a 30°C con agitación constante de 200 rpm.

Se tomó 2 ml de cultivo a las 0, 24, 48 y 72 horas por triplicado, cada ml se

distribuyó en tubos Eppendorf diferentes y se centrifugó a 15000 rpm por 15 minutos, después se lavó con agua destilada estéril. Al tubo 1 se añadió 400 µl de Sudan Black (30% p/v) y al tubo 2, 400 µl de agua destilada. Se incubó por 20 minutos a 30°C con agitación constante a 200 rpm, posteriormente se centrifugó a 15000 rpm por 5 minutos y se lavó 3 veces con agua destilada, se re-suspendió el cultivo con 1 ml de agua destilada y se homogeneizó en un vórtex. Finalmente se subdividió el sobrenadante en 5 tubos de 200 µl y se diluye con 1 ml de agua destilada (1:20) posteriormente se leyó en un espectrofotómetro las absorbancias a una longitud de onda entre 550 a 800 nm.

Los valores obtenidos de absorbancia tanto con (tubo 1) y sin (tubo 2) Sudán Black, se analizaron mediante un método cuantitativo descrito por Porras, (2017), basados en una ecuación lineal, estimada por dicho autor, donde la pendiente de dicha ecuación patrón es la diferencia de la altura entre las dos rectas con y sin tinción del Sudan Black, el resultado obtenido fue en g/L.

La ecuación usada a partir de la fuente bibliográfica es:

$$Y_a = 16.375 X_a - 1.0686$$

Donde:

Y_a = Concentración de PHA producido por la cepa bacteriana (g/L)

X_a = Altura entre la tinción con y sin Sudan Black (nm)

Las lecturas se hicieron a las 48 y 72 horas por triplicado, usando los promedios para las gráficas.

3.1.7. Identificación genotípica de bacterias productoras de PHA.

3.1.7.1. Diseño de primers para amplificar el gen 16SrDNA

Se utilizó para el diseño de primers el software SnapGene (a partir de GSL Biotech; disponible en snapgene.com) con una temperatura de alineamiento de 60°C y 18bp de hibridación, que se usaron como estándar para dicho diseño.

3.1.7.2. Amplificación de fragmentos por PCR

Los fragmentos fueron amplificados usando Phusion® High Fidelity DNA Polymerase y las condiciones fueron: 98°C por 1', 30X (98°C por 30'', Tm°C 30'', 72°C por 1') 72°C por 5'.

3.1.7.3. Obtención de secuencias de 16SrDNA

Los fragmentos amplificados se purificaron y se cuantificó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Finalmente, las muestras se enviaron para la identificación de la secuencia del gen 16SrDNA de las bacterias presentes.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis y discusión de los resultados

4.1.1. Caracterización fisicoquímica del suelo

Los valores obtenidos son un pH de 6,22 y una conductividad eléctrica de 82,34 $\mu\text{s}/\text{cm}$, valores semejantes a los reportados en estudios de caracterización de bacterias y actinomicetos (Estrada et al., 2018) en ecosistemas glaciares y andinos con características similares a las del presente estudio, por lo que se corrobora dichos valores obtenidos.

4.1.2. Aislamiento y purificación de bacterias productoras de PHA

4.1.2.1. Aislamiento de bacterias

En la tabla 6 se detalla las unidades formadoras de colonias (UFC) que crecieron en su respectiva fuente de carbono.

Tabla 6. UFC aisladas.

Fuente de carbono	Dilución	Tiempo de incubación	# de bacterias aisladas
MMA	10^{-2}	48 h	5
MML	10^{-2}	48 h	3
MMG	10^{-2}	48 h	4
MMX	10^{-2}	48 h	2

No se realizó el cálculo de concentración de UFC/g suelo debido a que por técnicas de microbiología, este parámetro se calcula en una rango significativo de colonias de 30 a 300 (Estrada et al., 2018; Madigan, 2009), en las otras diluciones se dejó incubando más tiempo pero el crecimiento fue más notorio de levaduras y hongos filamentosos.

Las colonias bacterianas detalladas en la tabla 6 fueron aisladas y purificadas en su respectiva fuente de carbono para su respectiva codificación, tinción de Sudan Black y caracterización microscópica.

4.1.2.2. Tinción con Sudan Black a las bacterias aisladas.

En la tabla 7 se detalla los resultados a cada una de las bacterias identificadas en el anterior paso, por lo que se puede diferenciar que no todas las bacterias tomaron la coloración azul intensa, para este paso se usó los controles positivos y negativos, que fueron *Burkholderia sacchari* y *E.coli* respectivamente para corroborar el funcionamiento del colorante.

Tabla 7. Resultados de la tinción de Sudan Black

MM	Colonia	Resultado
MMA	1	+
	2	-
	3	-
	4	+
	5	-
MML	1	+
	2	-
	3	+
MMG	1	-
	2	-
	3	+
	4	+
MMX	1	-
	2	+
MMX	<i>Burkholderia sacchari</i>	+
MMG	<i>E. coli</i>	-

En resumen, las bacterias aisladas y con resultado positivo a la tinción de Sudan Black dan los primeros indicios de que puedan acumular PHA son 7, que a partir del MML, MMA y MMG son 2 y del MMX 1.

La tinción se da debido a que muchas bacterias están compuestas por un poliéster: el ácido poli- β -hidroxibutírico (PHB) y se usa al Sudan Black como un colorante primario para identificar este compuesto lipofílico, usado por primera vez por Schlegel et al.,(1970) y replicada en varias otras investigaciones por Tufail et al.,(2017) y por Munir (2015).

4.1.2.3. Caracterización macroscópica y microscópica de bacterias

En la tabla 8 se detalla la codificación y caracterización macroscópica de las colonias en estudio.

Tabla 8. Caracterización macroscópica de bacterias

Cepa	Medio mineral usado	Forma	Elevación	Margen
DD04	MML	Circular	Plana	Entera
DD05	MMA	Circular	Convexa	Entera
DD06	MMG	Irregular	Convexa	Ondulado
DD07	MMG	Circular	Plana	Lobado
DD08	MML	Circular	Plana	Entera
DD09	MMA	Circular	Convexa	Entera
DD10	MMX	Irregular	Plana	Ondulado

En la tabla 9 se detalla, la codificación de las bacterias y la caracterización microscópicas (Anexo 2), además de las pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa.

Tabla 9. Caracterización microscópica de bacterias

Cepa	Medio mineral usado	Tinción Gram	Forma	Oxidasa	Catalasa
DD04	MML	-	Bacilo	+	+
DD05	MMA	-	Bacilo	-	+
DD06	MMG	-	Coco	-	+
DD07	MMG	-	Coco	-	+
DD08	MML	-	Coco	-	+
DD09	MMA	-	Bacilo	+	+
DD10	MMX	-	Bacilo	+	+

4.1.3. Cinética de crecimiento de bacterias productoras de PHA.

4.1.3.1. Ensayo de cinética de crecimiento.

Basados en estudios realizados por (Lopes et al., 2014; Tufail et al., 2017), se realizó el ensayo de cinética de crecimiento, evaluación realizada durante 24 horas, haciendo mediciones cada 15 minutos de la OD a 600 nm, para lo cual se realizó por cada cepa bacteriana 3 réplicas y el promedio se graficó.

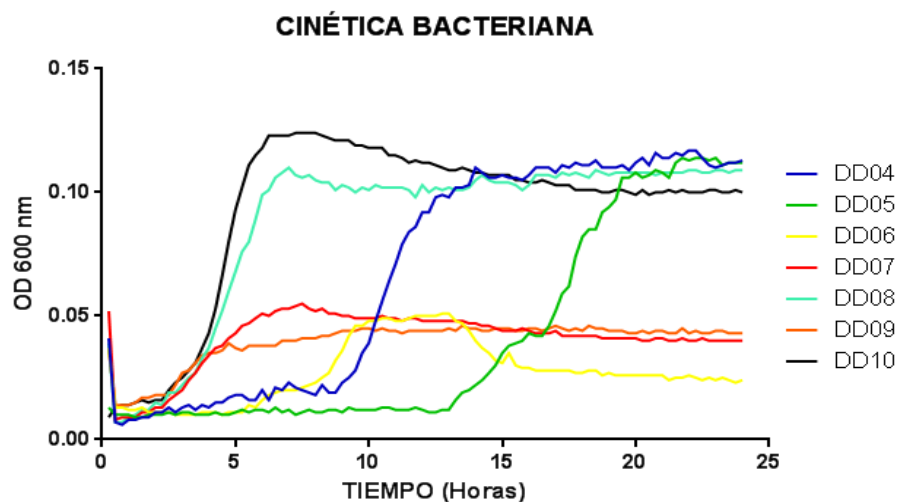


Figura 3. Cinética de crecimiento de cepas productoras de PHA

Todas las bacterias como se demuestra en la figura 3, tienen indicios de tres de las cuatro fases de una curva de crecimiento bacteriano (adaptación, exponencial y estacionaria) principalmente las bacterias DD04, DD05, DD08 y DD10, que se adaptan de mejor manera a las condiciones del medio de cultivo. El resto de las bacterias presenta una cinética muy diferente y baja, esto puede ocurrir a que no tienen la capacidad óptima de crecer en un medio mineral con limitaciones de nutrientes esenciales como lo son el fósforo y el nitrógeno. Por ejemplo “el fósforo es fundamental en procesos biológicos como la división y crecimiento celular y en procesos vitales como: glucólisis, respiración y síntesis de ácidos grasos, extendiéndose su relevancia a las partes constitutivas esenciales de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y ATP” según señala Madigan (2009).

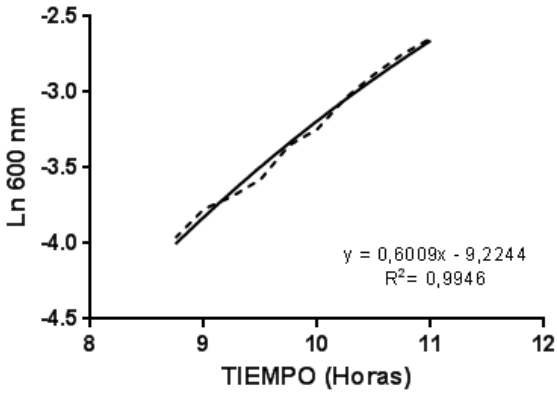
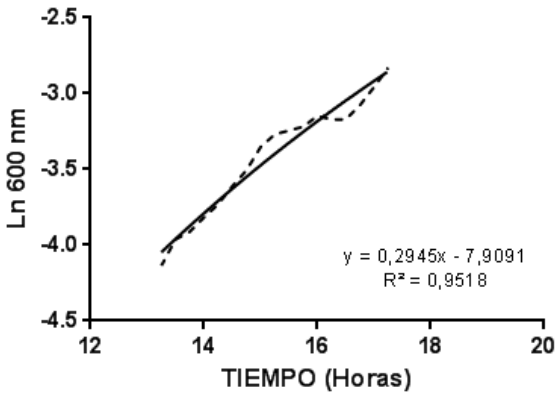
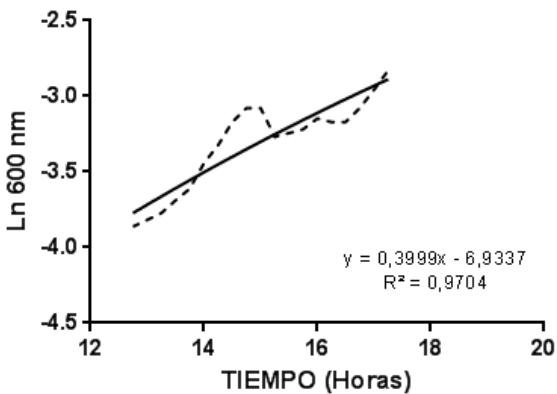
En cambio el nitrógeno se encuentra como radical $-NH^2$, que forma parte de los aminoácidos (que a su vez son los productores de las proteínas) y de las bases nitrogenadas (que participan en los ácidos nucleicos y en algunas coenzimas) en un estudio descrito por Stanier (1996).

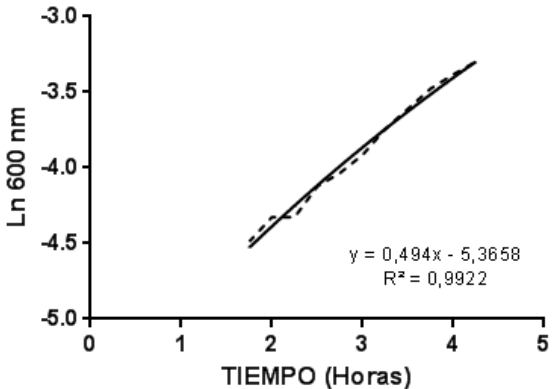
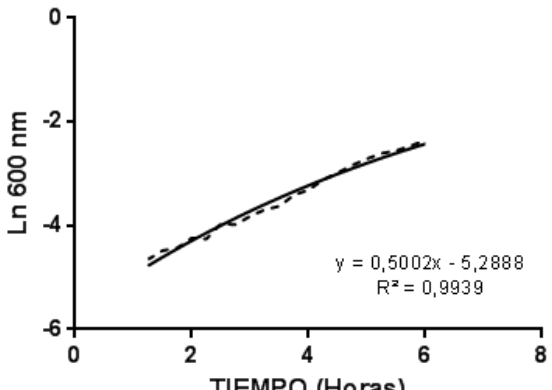
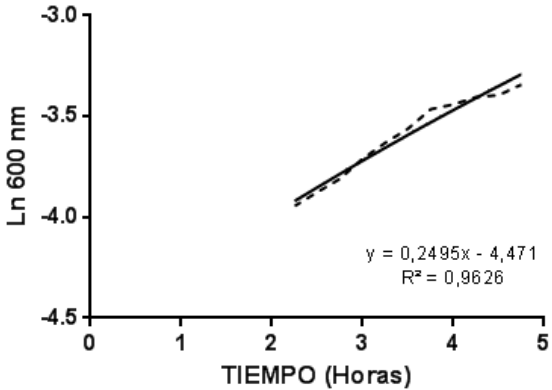
4.1.3.2. Velocidad específica de crecimiento de cada cepa.

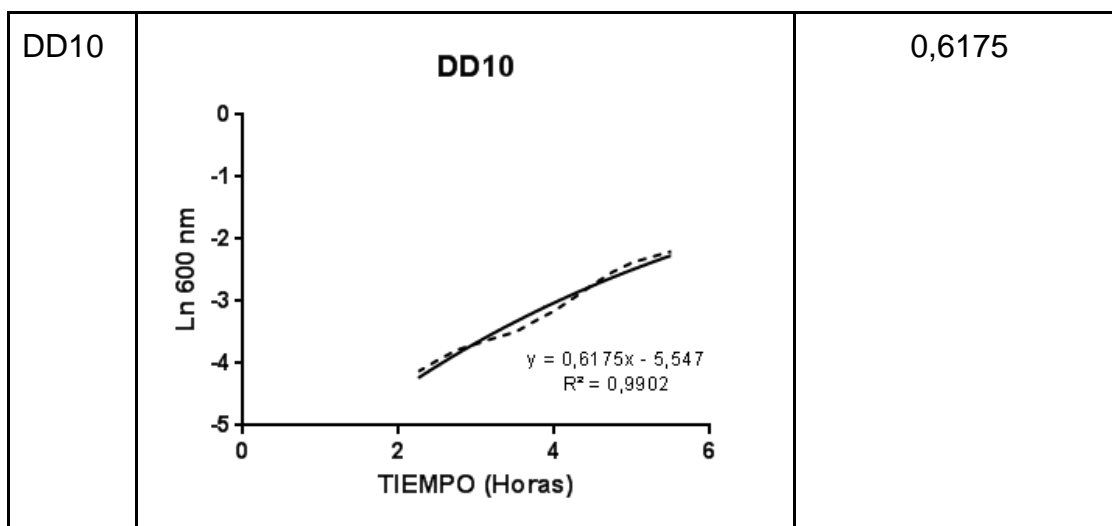
Una vez evaluada la cinética de crecimiento se procedió a linealizar la fase exponencial de cada bacteria con el fin de estimar la velocidad específica de crecimiento y con ello tener una aproximación de cómo cada cepa bacteriana se adaptó al MM respectivo (Madigan, 2009).

(página siguiente)

Tabla 10. Linealización de la fase exponencial

CEPA	GRÁFICO	VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (h ⁻¹)
DD04	<p style="text-align: center;">DD04</p>  <p style="text-align: center;"> $y = 0,6009x - 9,2244$ $R^2 = 0,9946$ </p>	0,6009
DD05	<p style="text-align: center;">DD05</p>  <p style="text-align: center;"> $y = 0,2945x - 7,9091$ $R^2 = 0,9518$ </p>	0,2945
DD06	<p style="text-align: center;">DD06</p>  <p style="text-align: center;"> $y = 0,3999x - 6,9337$ $R^2 = 0,9704$ </p>	0,3999

DD07	<p style="text-align: center;">DD07</p>  <p style="text-align: center;">$y = 0,494x - 5,3658$ $R^2 = 0,9922$</p>	0,494
DD08	<p style="text-align: center;">DD08</p>  <p style="text-align: center;">$y = 0,5002x - 5,2888$ $R^2 = 0,9939$</p>	0,5002
DD09	<p style="text-align: center;">DD09</p>  <p style="text-align: center;">$y = 0,2495x - 4,471$ $R^2 = 0,9626$</p>	0,2495



Las velocidades específicas de crecimiento de cada una de las bacterias en estudio están descritas en la tabla 10, la cual indica la variación que tiene cada cepa bacteriana en adaptarse al medio mineral con su respectivo sustrato en función del tiempo.

Las bacterias que presentan en su linealización un coeficiente de correlación alto son: DD04, DD08 y DD10. Estas bacterias presentan una velocidad específica de crecimiento mayor al $0,5 \text{ h}^{-1}$, por lo que son fueron consideradas como las idóneas para el completo estudio del presente trabajo.

4.1.4. Perfil de consumo de azúcar por bacterias productoras de PHA

Para las siete cepas bacterianas en estudio, se evaluó el perfil de consumo de cada uno de los azúcares en el que inicialmente crecieron.

Los gráficos que se presentan a continuación están en basados a la cinética de crecimiento presentado en el punto 4.1.3.1 y los g/L de azúcar consumidos en función al tiempo.

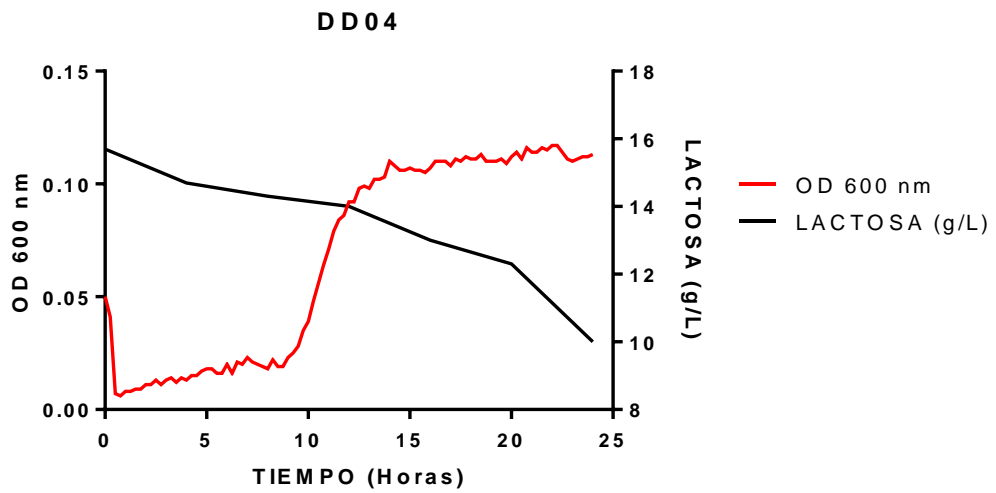


Figura 4. Perfil de consumo de lactosa la cepa DD04

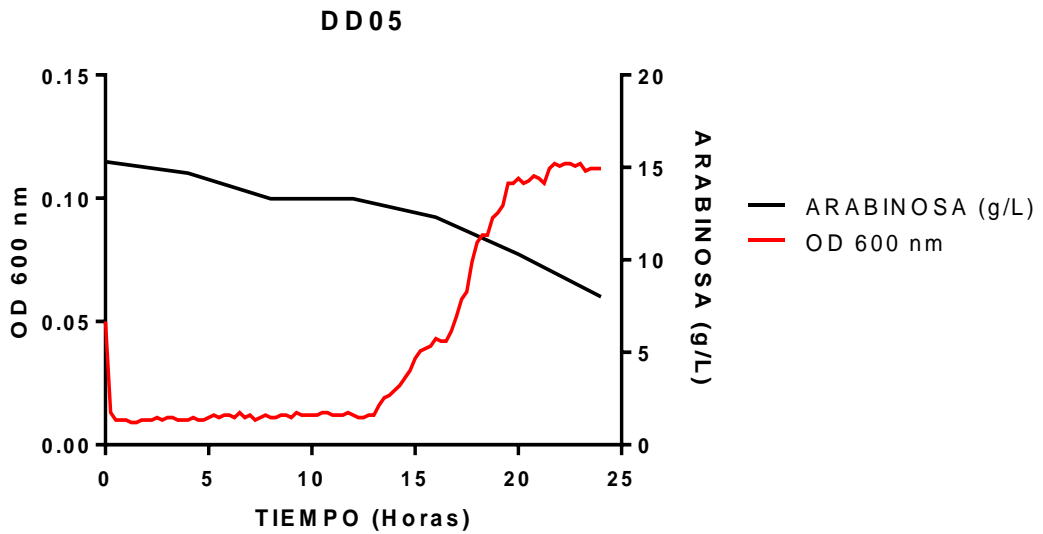


Figura 5. Perfil de consumo de arabinosa de la cepa DD05

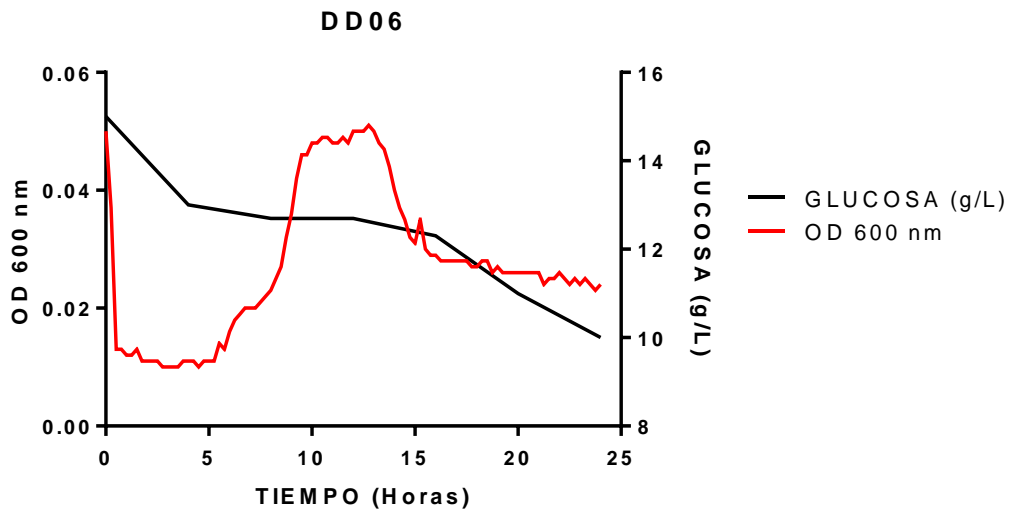


Figura 6. Perfil de consumo de glucosa de la cepa DD06

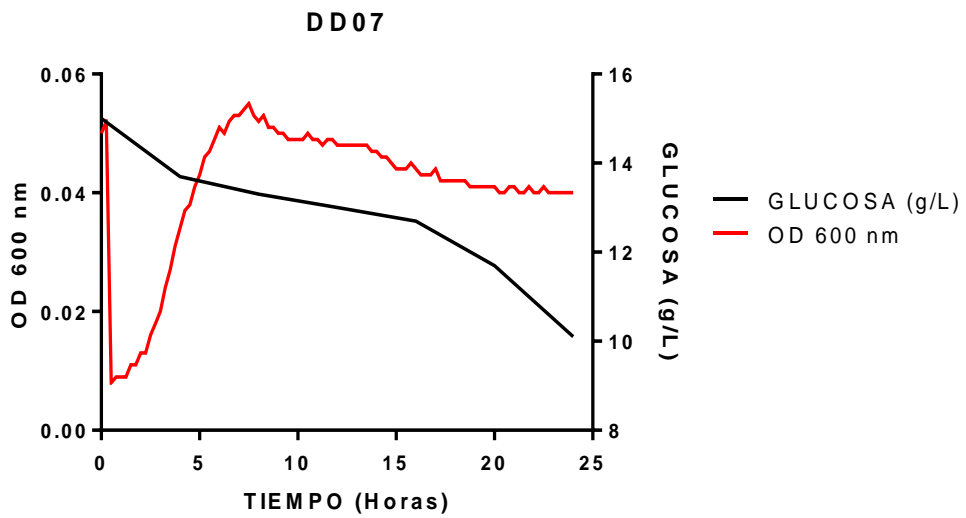


Figura 7. Perfil de consumo de glucosa de la cepa DD07

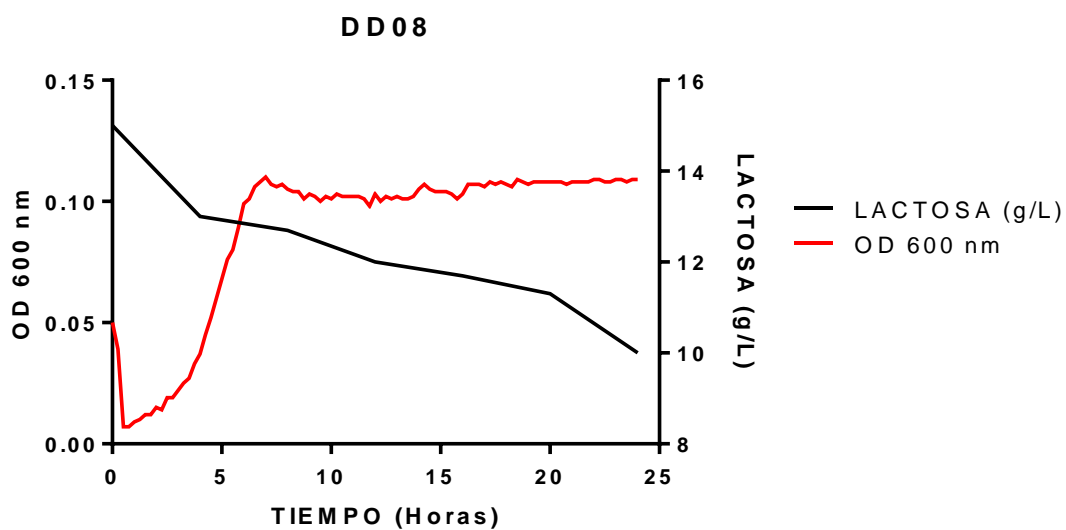


Figura 8. Perfil de consumo de lactosa de la cepa DD08

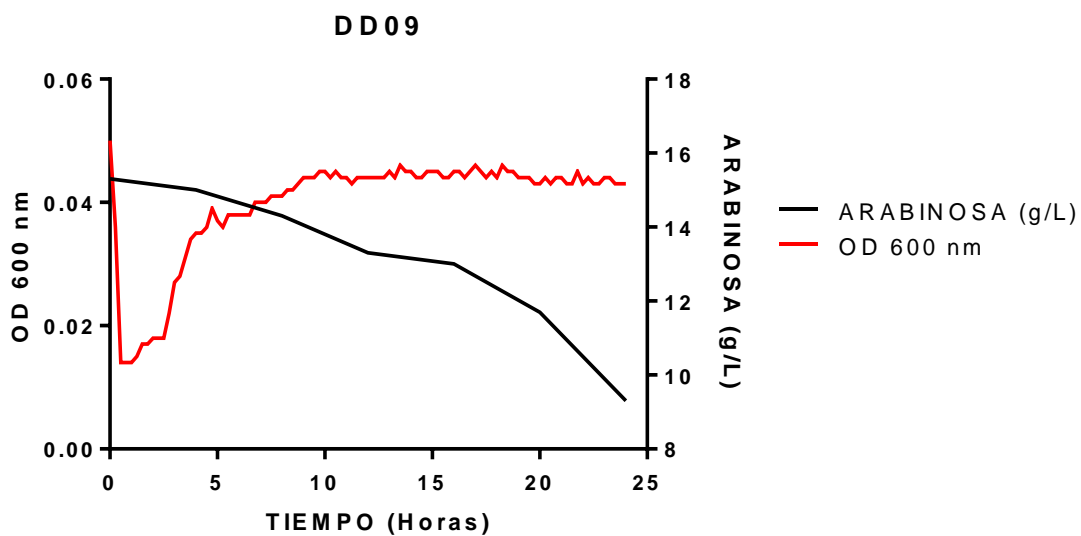


Figura 9. Perfil de consumo de arabinosa de la cepa DD09

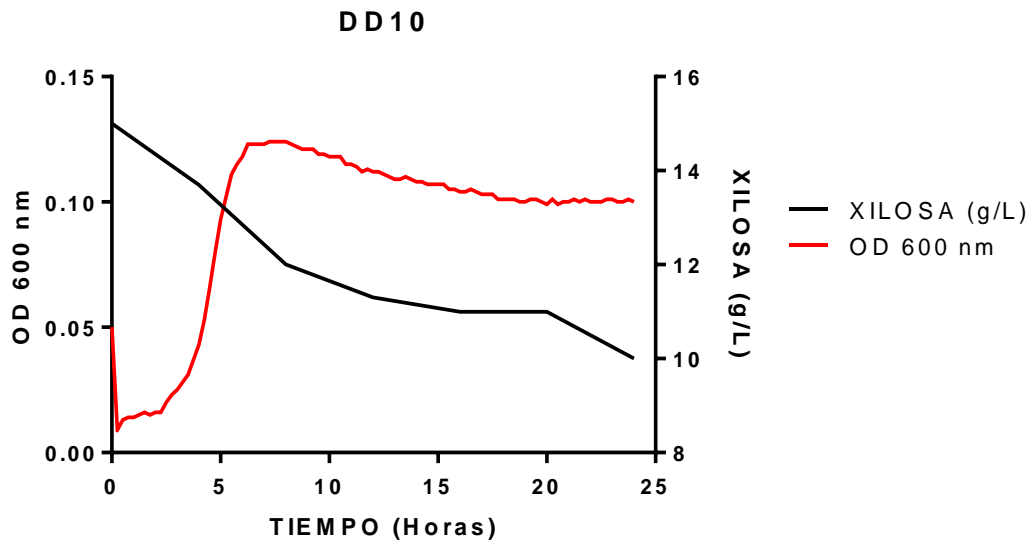


Figura 10. Perfil de consumo de xilosa de la cepa DD10

El consumo de azúcar por los microorganismos es una parte fundamental en este estudio, ya que en función a este parámetro se podrá determinar si es viable o no la utilización de dichos azúcares en la producción de PHA, debido a esto han existido varios estudios que han intentado bajar los costos de producción usando residuos agroindustriales como sustrato para los microorganismos, entre los cuales destacan: suero de leche, almidón, aceites, hidrocarburos como el diesel (Tufail et al.,2017; Raza et al., 2018), alcanzando resultados que aún no son competitivos comparados con la producción de plásticos petroquímicos.

Todas las cepas bacterianas inicialmente se inocularon con una concentración inicial de la fuente de carbono de 15g/L por lo que, al evaluar el perfil de consumo durante 24 horas (Tabla 11), este disminuyó considerablemente pese a las limitaciones de nutrientes que tiene el medio de cultivo.

Las cepas DD04, DD08 y DD10, quienes tuvieron mejores resultados en la cinética de crecimiento, también presentaron un aceptable perfil de consumo que el resto de las cepas bacterianas, alcanzando una concentración final de alrededor de 10 g/L, en la siguiente tabla se resume los resultados:

Tabla 11. Perfil de consumo de azúcar

CEPA	Concentración inicial de azúcar (g/L)	Concentración final de azúcar (g/L)	Total, de azúcar consumido (g/L)
DD04	15,70	9,80	5,90
DD05	15,30	8,00	7,30
DD06	15,00	10,00	5,00
DD07	15,00	9,30	5,70
DD08	15,00	9,90	5,10
DD09	15,30	9,50	5,80
DD10	15,30	9,70	5,60

4.1.5. Cuantificación de la producción de polihidroxicanoatos

Para cuantificar el biopolímero, se graficó tanto la cepa con y sin el colorante Sudan Black, además de un control negativo, *E.coli*. Las lecturas se hicieron a una longitud de onda desde 550 nm a 850 nm, siendo que el biopolímero muestra una máxima absorbancia entre 650 nm a 680 nm y es allí donde se calculó la altura entre los picos para usar la ecuación lineal descrita por (Porras et al., 2017).

A continuación, se presentan los resultados 48 y 72 horas:

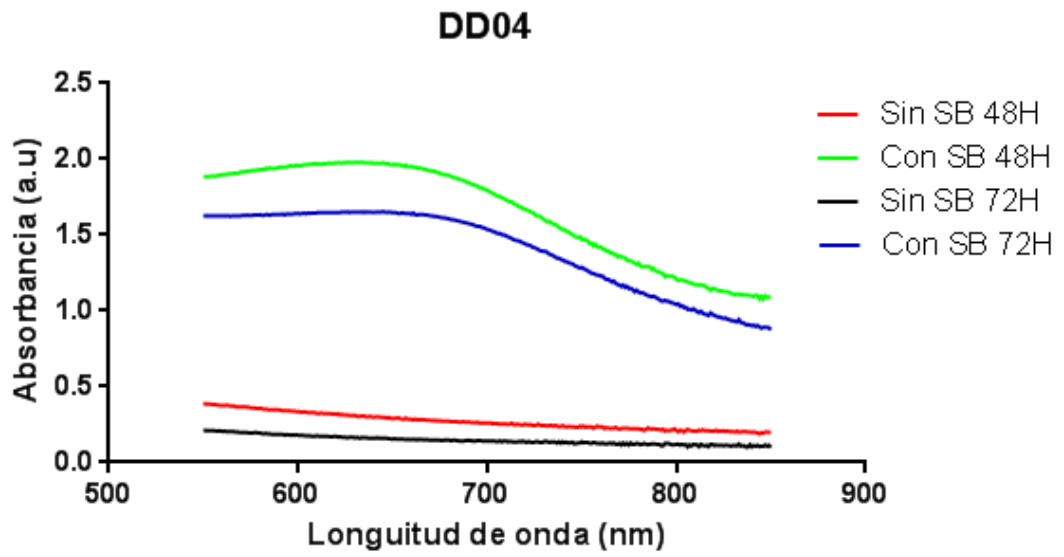


Figura 11. Cuantificación del PHA de la cepa DD04

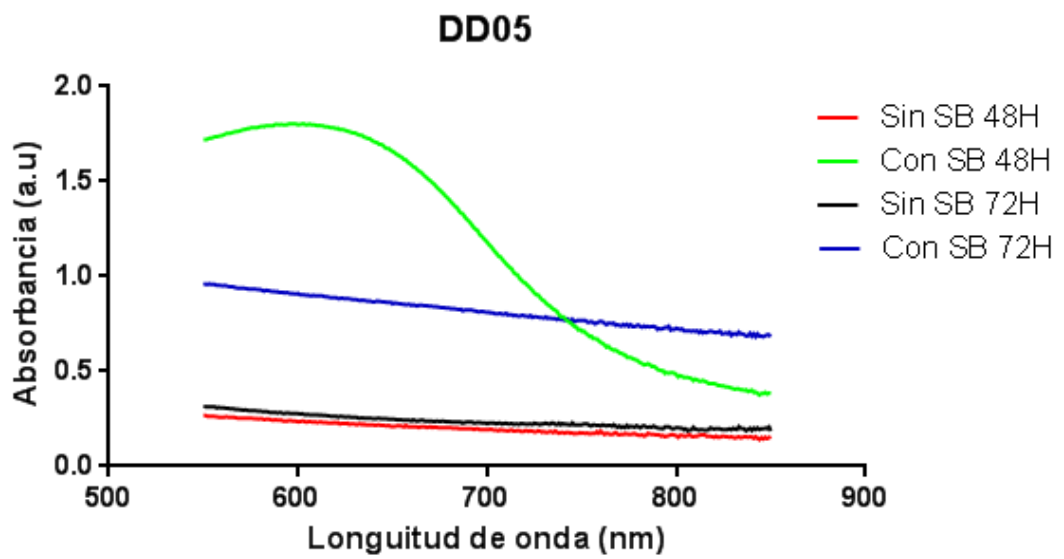


Figura 12. Cuantificación del PHA de la cepa DD05

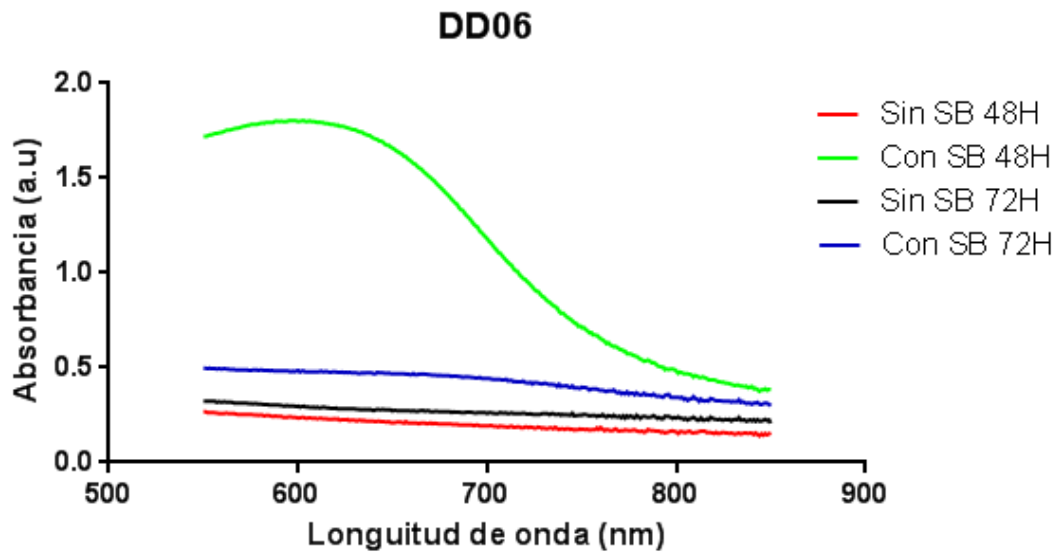


Figura 13. Cuantificación del PHA de la cepa DD06

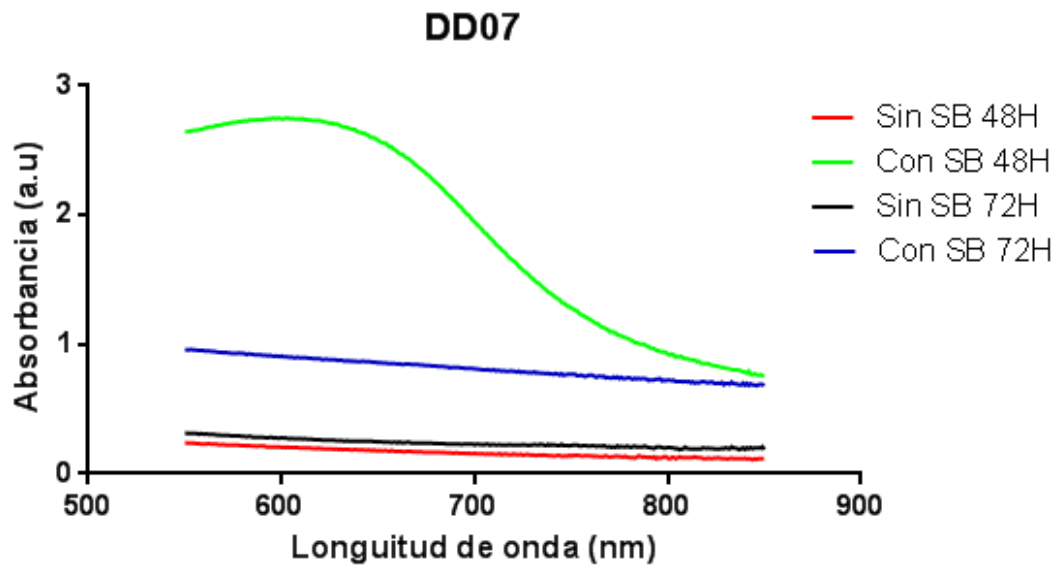


Figura 14. Cuantificación del PHA de la cepa DD07

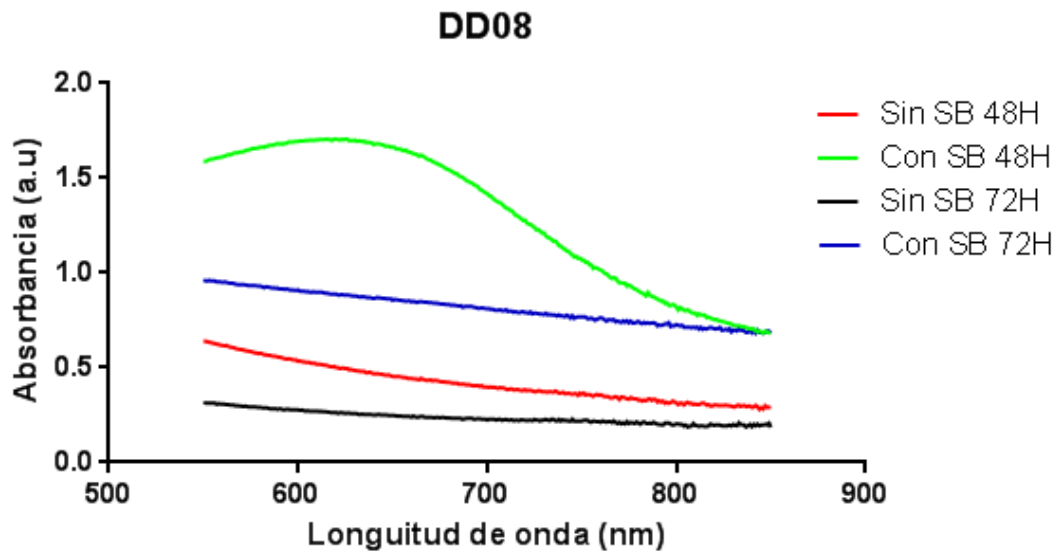


Figura 15. Cuantificación del PHA de la cepa DD08

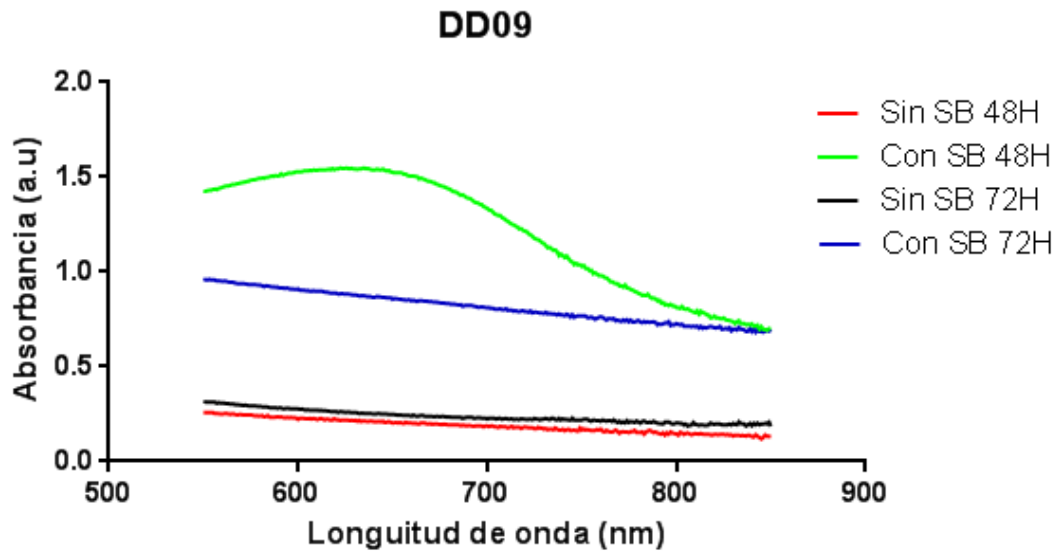


Figura 16. Cuantificación del PHA de la cepa DD09

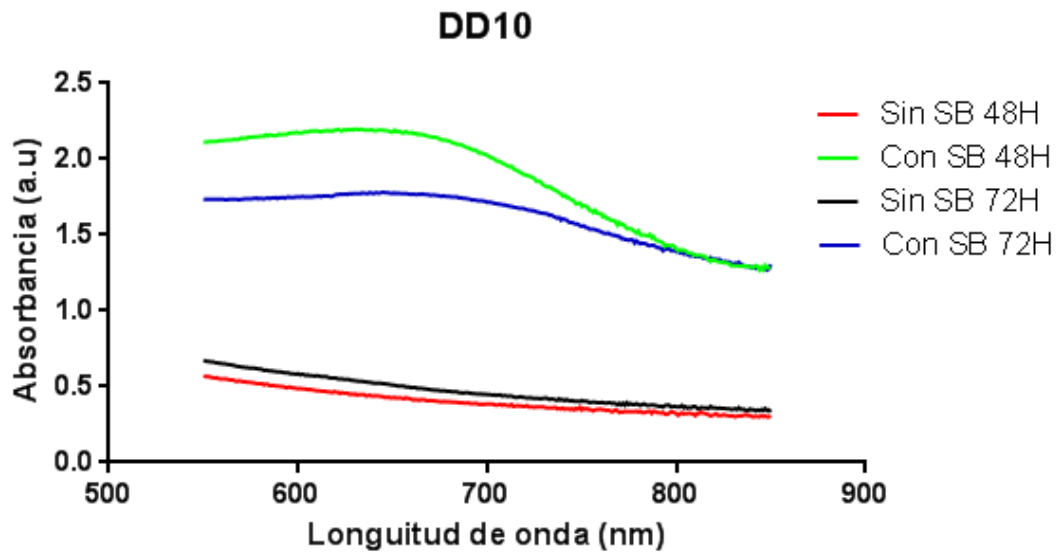


Figura 17. Cuantificación del PHA de la cepa DD10

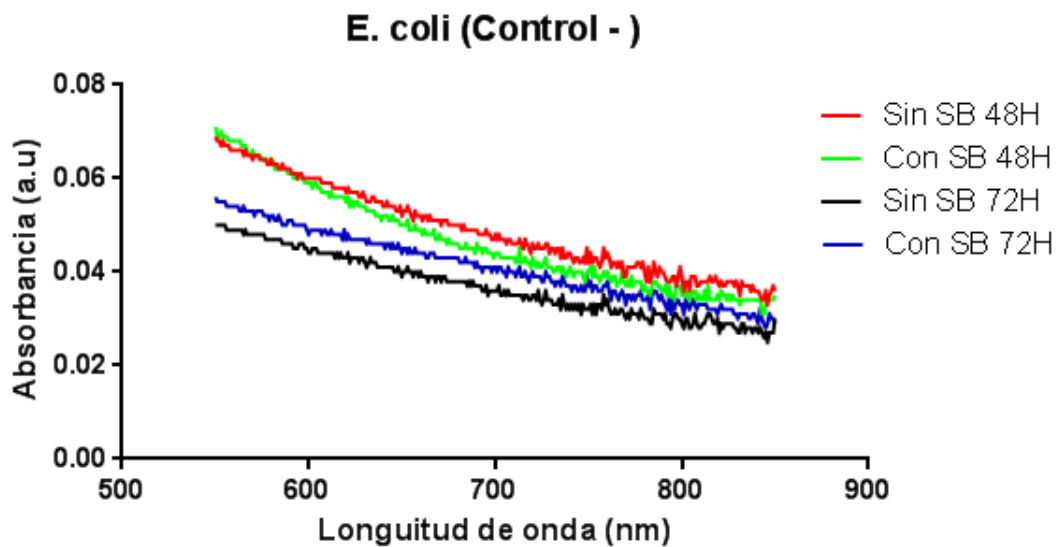


Figura 18. Cuantificación del PHA del control negativo *E.coli*

Como se puede observar en la figura 17, del control negativo, las lecturas de absorbancias fueron muy bajas y no se puede distinguir ninguna altura entre rectas.

A continuación, en la tabla 12, se resumirá los datos usados para la cuantificación del biopolímero, tanto para las 48 horas y 72 horas.

Tabla 12. Cuantificación de PHA a las 48 y 72 horas

CEPA	DIFERENCIA (nm) 48 horas	DIFERENCIA (nm) 72 horas	Yh (g/L) 48 horas	Yh (g/L) 72 horas
DD04	1,653	1,210	25,999	18,745
DD05	1,330	0,604	20,710	8,821
DD06	3,106	0,194	49,792	2,108
DD07	2,255	1,138	35,857	17,567
DD08	1,171	0,897	18,106	13,619
DD09	1,287	0,992	20,006	15,175
DD10	1,765	1,302	27,833	20,251

Todas las bacterias presentan concentraciones de PHA en g/L, según estudios presentados por (Raza et al., 2018), existen varios factores para determinar la cantidad del biopolímero producido, entre ellos la capacidad del microorganismo de asimilar la limitación de nutrientes para el acúmulo del mismo, la pureza del azúcar que se use como fuente de carbono, las condiciones de cultivo del microorganismo como temperatura, pH, etc. Además, que es un método empírico-analítico el usado para la cuantificación del polímero descrito por (Porrás et al., 2017).

Debido a varios factores que se han analizado hasta este punto en este estudio, las bacterias con mejor cinética de crecimiento y consumo de azúcar fueron las cepas DD04, DD08 y DD10. Como se detalla en la tabla 12, todas las cepas bacterianas en estudio presentan una considerable concentración de PHA a las 48 horas, que se asume que están aún en su fase estacionaria, que es la fase donde se produce los PHA (Guamán et al., 2018; Madison & Huisman., 1999), a las 72 horas se considera una notable disminución de la concentración de PHA, lo que hace suponer que ya están en su fase de muerte. Las cepas DD06 y DD07 son las que más producen a las 48 horas, pero debido a que tienen una fase de adaptación mucho más larga que el resto y su velocidad específica de crecimiento es baja, en términos de productividad, esto no es rentable, por lo tanto, quedaron

descartadas para la caracterización molecular. En cambio, con las cepas DD05, DD09 presentan bajas concentraciones de producción de PHA, que sumando a las mismas características de las cepas anteriores quedaron descartadas para el siguiente punto de investigación.

De las tres cepas con mejores características, la DD08 fue la que menos concentración de PHA produjo, por lo que también se la descartó. Las cepas DD04 (MML) y DD10 (MMX) fueron las seleccionadas para la caracterización molecular, ya que aparte de producir una cantidad considerable de PHA, la lactosa (presente en residuos de la industria láctea, muy común en el centro del Ecuador) y la xilosa (una pentosa que no es muy común que los microorganismos la usen como fuente de carbono) (Guamán et al., 2018), fueron las que mayor interés despertaron.

4.1.6. Caracterización molecular de bacterias productoras de PHA

4.1.6.1. Diseño de primers

Los ácidos nucleicos del gen 16SrRNA fueron amplificados por una PRC convencionales con primers universales, descritos a continuación:

Tabla 13. Primers universales

Sentido	Nombre	Secuencia	Referencia
Forward	27F	AGAGTTTGATCMTG GCTCAG	(Schumann, 1991; Weisburg et al., 1991)
Reverse	1492R	ACCTTGTTACGACTT	(Weisburg et al., 1991; Schumann, 1991);

4.1.6.2. Secuenciación del gen 16SrRNA

El fragmento amplificado por la PCR convencional fue mandado a secuenciar y se usó el método Sanger. Este método “arroja secuencias de alta calidad para segmentos relativamente largos de ADN (de hasta aproximadamente 900 pares de bases). La técnica suele utilizarse para secuenciar fragmentos individuales de ADN, como plásmidos bacterianos o

ADN copiado en la PCR” señalan estudios realizados por Metzker (2010), Mardis,(2011) y Stein (2010).

Utilizando el Software SnapGene (disponible en: snapgene.com) se visualizó la distribución de los ácidos nucleicos del fragmento amplificado del gen 16SrRNA, a continuación, una demostración:



Figura 19. Secuencia parcial del gen 16SrRNA de la cepa DD04

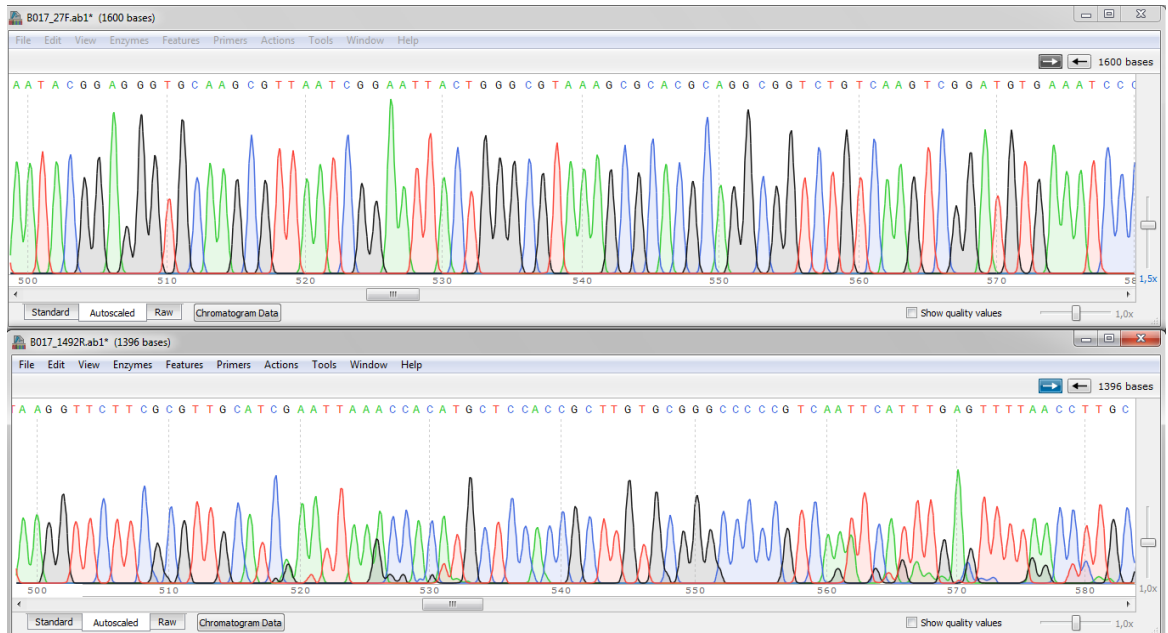


Figura 20. Secuencia parcial del gen 16SrRNA de la cepa DD10

4.1.6.3. Identificación genotípica de las bacterias

Una vez obtenida la secuencia del gen 16SrRNA, este fue comparado con las bases de datos de GenBank del NCBI (disponible en: ncbi.nlm.nih.gov/genbank/), para la identificación genotípica de la misma.

Tanto la cepa DD04 y la DD10, pertenecen al género *Citrobacter*, además se puede detallar que la cepa DD04 tiene un porcentaje de identidad del 99% con *Citrobacter freundii*, por otro lado, la cepa DD10 tiene un porcentaje de identidad del 99% con *Citrobacter freundii* y *Citrobacter braakii*, debido a que solo se obtuvo un hit con *Citrobacter braakii* y varios con *Citrobacter freundii* es más probable que se trate de *Citrobacter freundii*.

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign In to NCBI

BLAST » blastn suite » RID-RKHR3F7U01R Home Recent Results Saved Strategies Help

BLAST Results

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download YouTube How to read this page Blast report description

Job title: Nucleotide Sequence (1405 letters)

RID [RKHR3F7U01R](#) (Expires on 08-21 03:37 am)

Query ID Id|Query_178113 Database Name nr
 Description None Description Nucleotide collection (nt)
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.8.0+ Citation
 Query Length 1405

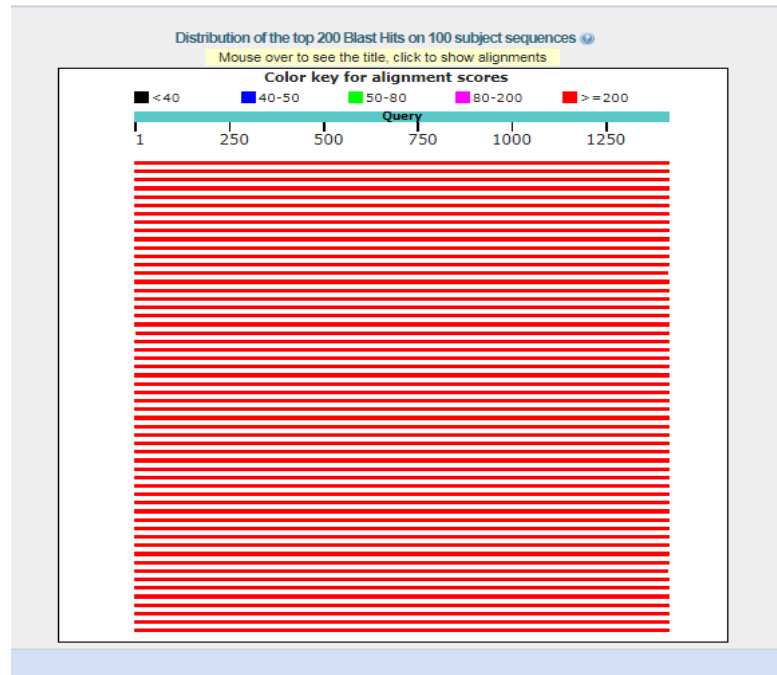


Figura 21. Similitud en bases de datos del NCBI de la cepa DD04

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain CAV1741 . complete genome	2564	20026	100%	0.0	99%	CP011657.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain CAV1321 . complete genome	2564	20026	100%	0.0	99%	CP011612.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain BD genome	2558	20353	100%	0.0	99%	CP018810.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter sp. ChDC B346 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	100%	0.0	99%	KF733674.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Citrobacter sp. clone F7oct.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	100%	0.0	99%	GQ416611.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain AR_0023 chromosome, complete genome	2553	20120	100%	0.0	99%	CP026677.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii complex sp. CFNIH4 chromosome, complete genome	2553	20198	100%	0.0	99%	CP026231.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain FDAARGOS_61 chromosome, complete genome	2553	20259	100%	0.0	99%	CP026231.1

Questions/comments

Figura 22. Identificación genotípica de la cepa DD04

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information Sign in to NCBI

BLAST® » blastn suite » RID-RKKVJSTY014 Home Recent Results Saved Strategies Help

BLAST Results

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download You Tube How to read this page Blast report description

Job title: Nucleotide Sequence (1405 letters)

RID RKKVJSTY014 (Expires on 08-21 04:13 am)

Query ID |cl|Query_75931 Database Name nr
 Description None Description Nucleotide collection (nr)
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.8.0+ » Citation
 Query Length 1403

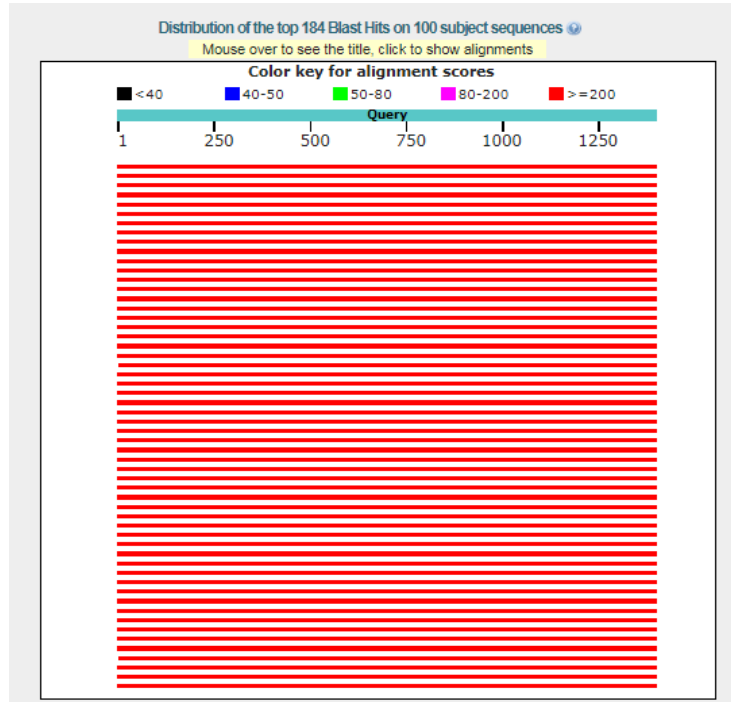


Figura 23. Similitud en bases de datos del NCBI de la cepa DD10

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Citrobacter braakii strain 519C53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2560	2560	100%	0.0	99%	KT764987.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter sp. SJH-004 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2558	2558	100%	0.0	99%	KC335138.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain I-N-5-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	99%	0.0	99%	KU570300.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain sch53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2556	2556	99%	0.0	99%	JX294886.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain AR_0023 chromosome, complete genome	2555	20285	100%	0.0	99%	CP026677.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii complex sp. CFNIH4 chromosome, complete genome	2555	20179	100%	0.0	99%	CP026231.1
<input type="checkbox"/> Citrobacter freundii strain AR_0021, complete genome	2555	20285	100%	0.0	99%	CP024898.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone 218002-208 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2555	2555	100%	0.0	99%	

Questions/comments

Figura 24. Identificación genotípica de la cepa DD10

Una vez identificada el género y especie de ambas cepas en estudio: *Citrobacter* pertenecen a un grupo de bacilos gramnegativos, anaerobios y facultativos dentro de la familia *Enterobacteriaceae*. Con frecuencia se encuentran en el agua, el suelo, los alimentos, los intestinos de animales y humanos (Liu et al., 2018). Este género se clasifica en 11 especies (*C. freundii*, *C. koseri*, *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlakii*, *C. rodentium*, *C. gillanii* y *C. murlinae*), de los cuales *Citrobacter freundii* y *Citrobacter koseri*. (Liu et al., 2018; Giri et al., 2018).

Citrobacter freundii representa aproximadamente el 29% de todas las infecciones oportunistas (Whalen et al., 2007). Por lo tanto, una de las principales razones por las cuales se están secuenciando muchas cepas y plásmidos diferentes del genoma de *Citrobacter freundii* es para encontrar antibióticos que puedan combatir estas infecciones.

Sorprendentemente, este microorganismo infeccioso en humanos juega un papel positivo en el medio ambiente. *Citrobacter freundii* es responsable de reducir el nitrato a nitrito en el medio ambiente (Puchenkova, 1996). Esta conversión crucial es una etapa importante en el ciclo del nitrógeno. Y reciclar el nitrógeno es muy esencial porque la atmósfera de la tierra es de aproximadamente 85% de nitrógeno (Puchenkova, 1996).

Por otro lado, con el género *Citrobacter* se han realizado otros tipos de investigaciones, por ejemplo: La producción mejorada mediante ingeniería genética de 1,3-propanodiol (Celińska et al., 2015), producción de compuestos tiosulfatos antimicrobianos (Morozova et al., 2016), acoplamiento de la resistencia de metales pesados y la flexibilidad del oxígeno para la bioremediación de iones de cobre (Wang et al., 2018) y posee una enzima con actividad de la fosfatasa que está involucrada en la acumulación de plomo, que puede tener un papel importante en la industria de la biotecnología (Levinson & Mahler, 1998).

Sin embargo, no existen estudios donde se señala que esta bacteria sea capaz de producir polihidroxicanoatos, por lo que se realizó el siguiente análisis en bases de datos, con el fin de hallar posibles indicios de confirmación de dicho biopolímero.

Se buscó una bacteria que produzca los PHA, *Pseudomonas aeruginosa* en la base de datos del NCBI y se analizó una región conservada de dicho microorganismo, el gen PHA sintasa. Esta enzima clave está implicada en la biosíntesis y funciones de PHA mediante la polimerización de sustratos de hidroxialcanoato monoméricos. En la actualidad, se han notificado un total de 14 vías que conducen a la síntesis de PHA. Las PHA sintasas se han categorizado en cuatro clases principales en función de sus secuencias primarias, la especificidad del sustrato y la composición de la subunidad (Chek et al., 2017). El resultado obtenido de la base de datos es el siguiente:

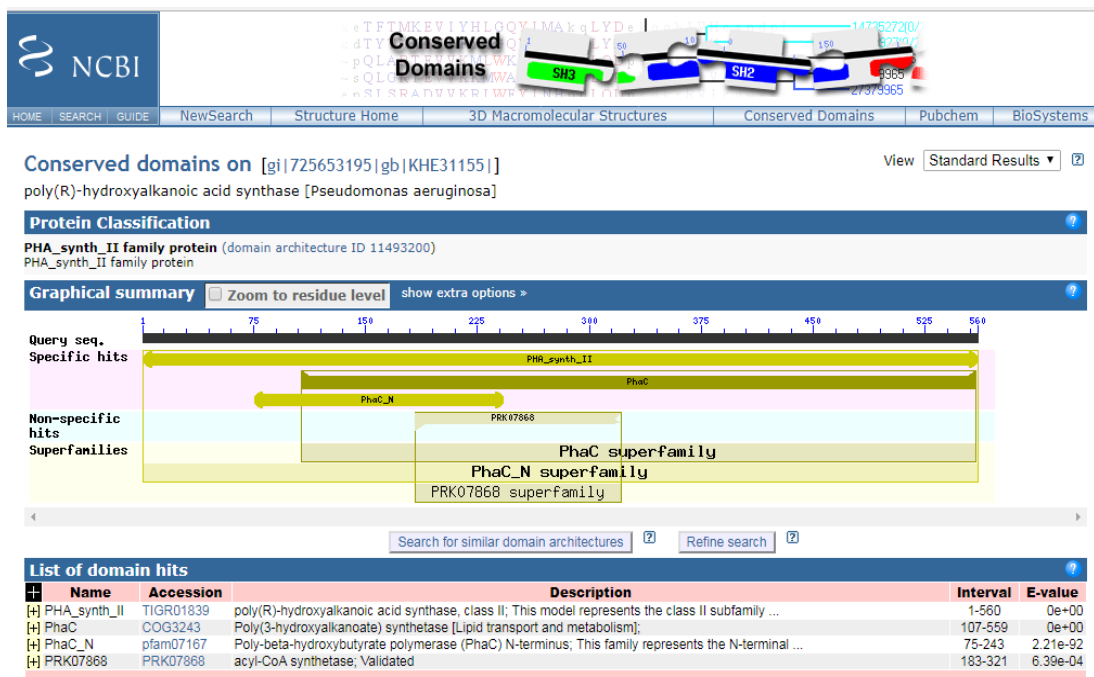


Figura 25. PHA sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*

Posteriormente con esta región conservada del gen PHA sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*, fue comparada con el genoma completo de *Citrobacter freundii*, para encontrar alguna similitud en los genomas, el resultado:

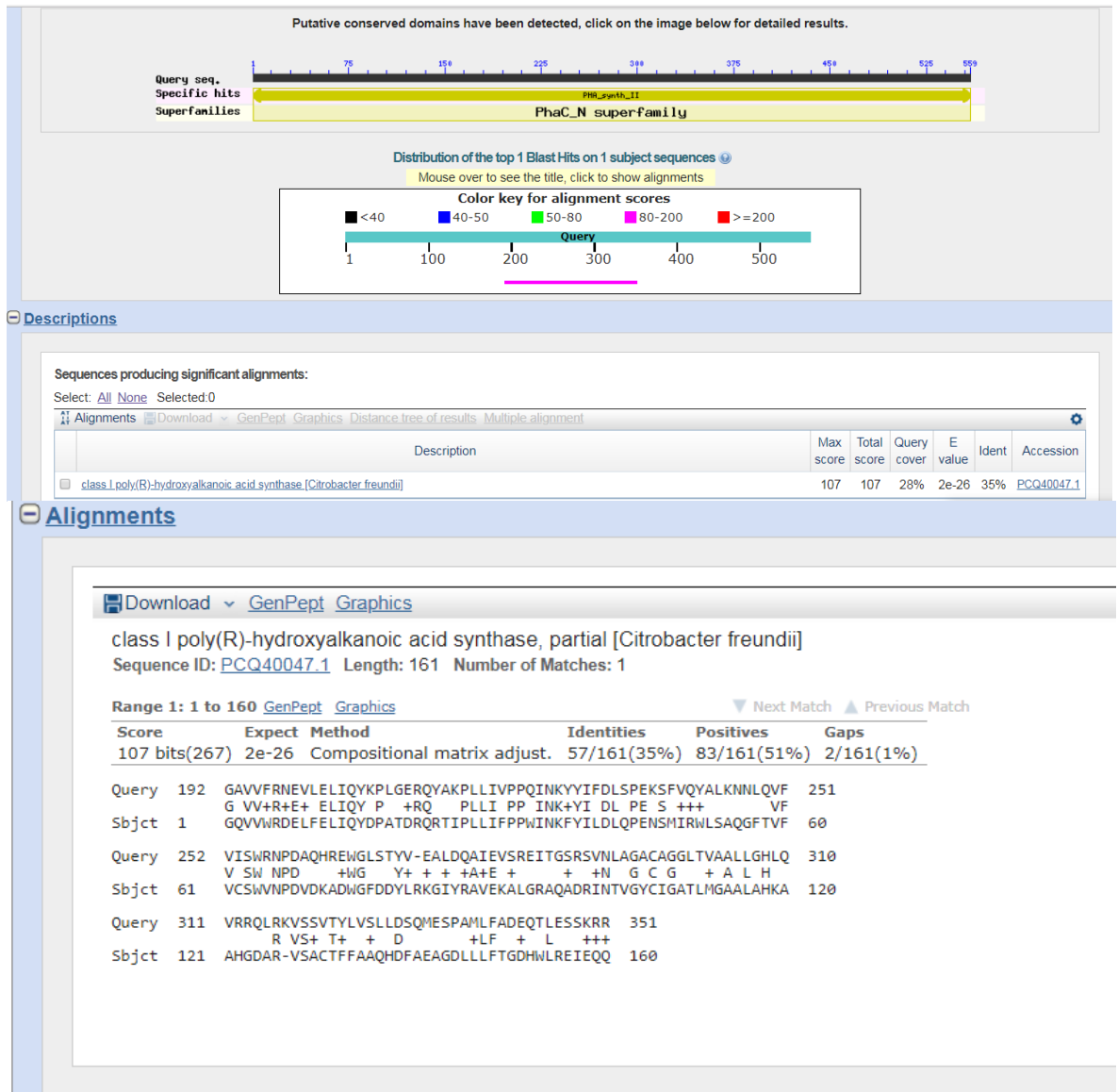


Figura 26. PHA sintasa de *Citrobacter freundii*

Por ende, existe una gran probabilidad de que dicha bacteria en estudio, si pueda producir PHA, ya que en su genoma si contiene el gen PHA sintasa. Los aminoácidos analizados en esta comparación son 161, de los cuales 57 son idénticos, 83 son positivos (químicamente similares), resultando ser semejante en un 86%.

Además otros estudios, corroboran que la bacteria *Citrobacter freundii*, es capaz de metabolizar lactosa (azúcar en la que se aisló inicialmente) e inclusive citrato (Keevil et al., 1977). Para el metabolismo, *Citrobacter freundii* tiene una sorprendente capacidad de crecer con glicerol como única fuente de carbono y energía. En este proceso, el glicerol se fermenta

mediante un proceso de dismutación (Keevil et al., 1977; Chek et al., 2017). Además, contiene genes de glucólisis y gluconeogénesis, ciclo de Krebs, vía de la pentosa fosfato, utilización de lactosa y galactosa. La diversificación de su metabolismo hace inducir que por aquella razón también es capaz de metabolizar la xilosa, como lo fue en el caso de la cepa DD10. Por ende, todos los datos iniciales se corroboran con investigaciones ya realizadas.

4.2. Verificación de hipótesis

Se acepta la hipótesis alternativa, ya que de las siete bacterias aisladas del suelo del cantón Mejía, genotípicamente una se confirmó secuenciando su gen 16SrRNA como probable productora de PHA usando azúcares presentes en residuos agroindustriales como la lactosa y la xilosa.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se caracterizaron siete bacterias aisladas de suelo, con altas probabilidades de ser productoras de PHA, utilizando azúcares presentes en residuos agroindustriales basados en técnicas cualitativas (tinción de Sudan Black) y cuantitativas (método empírico-analítico), en las que todas presentaron, concentraciones aceptables de PHA, sin embargo, dos cepas en estudio mediante secuenciación del gen 16SrRNA se identificaron que pertenece a la especie *Citrobacter freundii*.
- Se aislaron cinco bacterias con fuente de carbono MMA, tres con MML, cuatro con MMG y dos con MMX, de las cuales el 50% tienen la capacidad de acumular PHA, siendo dos en MMA, dos en MML, dos en MMG y una en MMX.
- Las siete bacterias en estudio presentaron en su cinética de crecimiento, tres de las cuatro fases en estudio, usando así la fase exponencial para determinar sus velocidades específicas de crecimiento, donde las cepas DD04, DD08 y DD10, superaron las $0,5 \text{ h}^{-1}$, siendo un valor aceptable de adaptación al medio de cultivo para la producción de PHA.
- Todas las siete bacterias en estudio presentaron un buen perfil de consumo de azúcar, que, en la mayoría de caso, en 24 horas consumió en promedio 5g/L, siendo las cepas DD04, DD05, DD09 y DD10, las que mejores resultados obtuvieron, perteneciendo a diferentes fuentes de azúcar (latosa, glucosa, arabinosa y xilosa respectivamente)
- Se cuantificó los PHA, basados en un modelo matemático, donde a las 48 horas se expresó de mayo manera la concentración de PHA, siendo las cepas DD06 y DD07 son las que mayor produce (49,792 y 35,857 g/L, respectivamente), sin embargo su fase de adaptación al MM es lenta y en términos de productividad, no es ideal, por lo que las cepas DD04 y DD10 que tienen concentraciones de PHA aceptables, fueron consideradas para la secuenciación del gen

16SrRNA, al tener una buena cinética de crecimiento y un buen perfil de consumo del azúcar.

- Gracias a la secuenciación del gen 16SrRNA, las dos bacterias DD04 y DD10, pertenecen a la misma especie, con un 99% de similitud según las bases de datos, *Citrobacter freundii*, las cuales no han sido descritas como productoras de PHA, sin embargo, en un análisis in silico, se demostró que esta bacteria contiene en su genoma la PHA sintasa, por lo que existe la capacidad de producción de PHA

5.2. Recomendaciones

- Cuantificar el biopolímero por otras técnicas de mayor exactitud, como por ejemplo por masa seca celular, mediante gravimetría.
- Medir el perfil del consumo de azúcar, mediante HPLC, que permitirá valores más exactos.
- Secuenciar las cinco restantes cepas bacterias para confirmar que la producción de PHA y/o descubrimiento de nuevas especies.
- Realizar ensayos usando los residuos como única fuente de carbono pura para el consumo de las bacterias para producir PHA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Babu, R. P., O'Connor, K., & Seeram, R. (2013). Current progress on bio-based polymers and their future trends. *Progress in Biomaterials*, 2(1), 8. doi:10.1186/2194-0517-2-8
- Borji, A., Borji, F., & Jourani, A. (2017). A new method for the determination of sucrose concentration in a pure and impure system: spectrophotometric method. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 8214120. doi:10.1155/2017/8214120
- Breuer, U. (2009). Book reviews: microbial production of biopolymers and polymer precursors: applications and perspectives. edited by bernd H. A. rehm. *CLEAN - Soil, Air, Water*, 37(6), 414–414. doi:10.1002/clen.200990026
- Byrom, D. (1987). Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends in Biotechnology*, 5(9), 246–250. doi:10.1016/0167-7799(87)90100-4
- Celińska, E., Drożdżyńska, A., Jankowska, M., Białas, W., Czaczyk, K., & Grajek, W. (2015). Genetic engineering to improve 1,3-propanediol production in an isolated *Citrobacter freundii* strain. *Process Biochemistry*, 50(1), 48–60. doi:10.1016/j.procbio.2014.09.001
- Cesário, M. T. F., & de Almeida, M. C. M. D. (2015). Lignocellulosic hydrolysates for the production of polyhydroxyalkanoates. In B. Kamm (Ed.), *Microorganisms in Biorefineries* (Vol. 26, pp. 79–104). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-662-45209-7_4
- Chanprateep, S. (2010). Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–632. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.07.014
- Chek, M. F., Kim, S.-Y., Mori, T., Arsad, H., Samian, M. R., Sudesh, K., & Hakoshima, T. (2017). Structure of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase PhaC from

- Chromobacterium sp. USM2, producing biodegradable plastics. *Scientific Reports*, 7(1), 5312. doi:10.1038/s41598-017-05509-4
- Choi, J., & Lee, S. Y. (1997). Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess Engineering*, 17(6), 335. doi:10.1007/s004490050394
- Choi, J., & Lee, S. Y. (1999). Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 13–21. doi:10.1007/s002530051357
- Choi, M. H., & Yoon, S. C. (1994). Polyester Biosynthesis Characteristics of *Pseudomonas citronellolis* Grown on Various Carbon Sources, Including 3-Methyl-Branched Substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(9), 3245–3254.
- Dawes, E. A., & Senior, P. J. (1973). The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. In *Advances in microbial physiology volume 10* (Vol. 10, pp. 135–266). Elsevier. doi:10.1016/S0065-2911(08)60088-0
- Estrada, M. C., Díaz, A., & Rodríguez, C. (2018). “Determinación preliminar de producción de compuestos bioactivos de actinomicetes y bacterias aislados de ecosistemas glaciares andinos y antárticos.” Thesis Grade, 126. Retrieved from http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27508/1/BQ_149.pdf
- Giri, A., Banerjee, U. C., Kumar, M., & Pant, D. (2018). Intracellular carbonic anhydrase from *Citrobacter freundii* and its role in bio-sequestration. *Bioresource Technology*. doi:10.1016/j.biortech.2018.07.089
- Guamán, L. P., Oliveira-Filho, E. R., Barba-Ostria, C., Gomez, J. G. C., Taciro, M. K., & da Silva, L. F. (2018). xylA and xylB overexpression as a successful strategy for improving xylose utilization and poly-3-hydroxybutyrate production in *Burkholderia sacchari*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 45(3), 165–173. doi:10.1007/s10295-018-2007-7

- Guilherme, A. A., Dantas, P. V. F., Santos, E. S., Fernandes, F. A. N., & Macedo, G. R. (2015). Evaluation of composition, characterization and enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 32(1), 23–33. doi:10.1590/0104-6632.20150321s00003146
- Hancock, I. C. (1997). Bacterial cell surface carbohydrates: structure and assembly. *Biochemical Society Transactions*, 25(1), 183–187. doi:10.1042/bst0250183
- Holmes, P. A. (1985). Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Physics in Technology*, 16(1), 32–36. doi:10.1088/0305-4624/16/1/305
- Jendrossek, D., Schirmer, A., & Schlegel, H. G. (1996). Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5–6), 451–463.
- Keevil, C. W., Hough, J. S., & Cole, J. A. (1977). Prototrophic growth of *Citrobacter freundii* and the biochemical basis for its apparent growth requirements in aerated media. *Journal of General Microbiology*, 98(1), 273–276. doi:10.1099/00221287-98-1-273
- Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 321–326. doi:10.1016/j.mib.2010.02.006
- Kim, D. Y., Kim, Y. B., & Rhee, Y. H. (2000). Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28(1), 23–29.
- Lee, S. Y. (1996). Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 14(11), 431–438. doi:10.1016/0167-7799(96)10061-5

- Lemos Delgado, A. C., & Mina Cordoba, A. (2015). Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Informador Técnico*, 79(1), 83. doi:10.23850/22565035.139
- Levinson, H. S., & Mahler, I. (1998). Phosphatase activity and lead resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 161(1), 135–138. doi:10.1016/S0378-1097(98)00064-0
- Liu, L.-H., Wang, N.-Y., Wu, A. Y.-J., Lin, C.-C., Lee, C.-M., & Liu, C.-P. (2018). *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 51(4), 565–572. doi:10.1016/j.jmii.2016.08.016
- Lomas, A. J., Webb, W. R., Han, J., Chen, G.-Q., Sun, X., Zhang, Z., ... Forsyth, N. R. (2013). Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/collagen hybrid scaffolds for tissue engineering applications. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 19(8), 577–585. doi:10.1089/ten.TEC.2012.0457
- Lopes, M. S. G., Gomez, J. G. C., Taciro, M. K., Mendonça, T. T., & Silva, L. F. (2014). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis and simultaneous removal of organic inhibitors from sugarcane bagasse hydrolysate by *Burkholderia* sp. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 41(9), 1353–1363. doi:10.1007/s10295-014-1485-5
- Madigan, M. T. (2009). *Brock, biología de los microorganismos 12/e*. Pearson Educación.
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21–53.
- Mardis, E. R. (2011). A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470(7333), 198–203. doi:10.1038/nature09796
- Mena, P. (2014). *La biodiversidad del Ecuador*. Universidad Latinoamericana de Postgrado Líder En Ciencias Sociales.

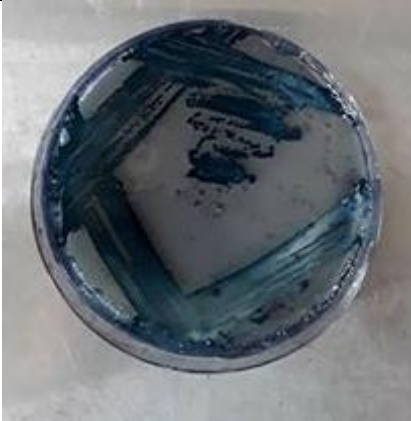

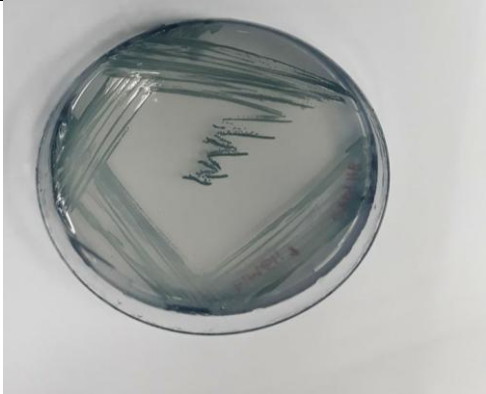
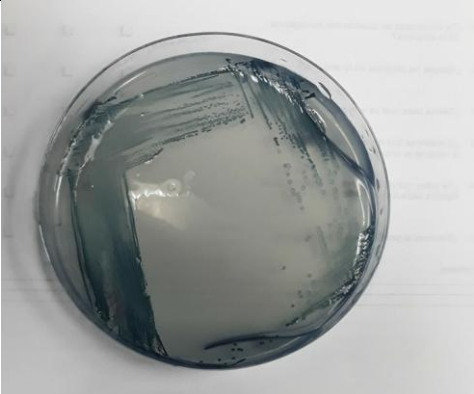
- Mendonça, T. T., Gomez, J. G. C., Buffoni, E., Sánchez Rodríguez, R. J., Schripsema, J., Lopes, M. S. G., & Silva, L. F. (2014). Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 815–829. doi:10.1111/jam.12406
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews. Genetics*, 11(1), 31–46. doi:10.1038/nrg2626
- Ministerio del Ambiente. (2013). Programa 'PNGIDS' Ecuador. Retrieved January 5, 2018, from <http://www.ambiente.gob.ec/programa-pngids-ecuador/>
- Morozova, E. A., Kulikova, V. V., Rodionov, A. N., Revtovich, S. V., Anufrieva, N. V., & Demidkina, T. V. (2016). Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase effectively produces antimicrobial thiosulfinates. *Biochimie*, 128–129, 92–98. doi:10.1016/j.biochi.2016.07.007
- Munir, S., Iqbal, S., & Jamil, N. (2015). Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production using Paper Mill Wastewater as Carbon Source in Comparison with Glucose. *Journal of Pure and Applied Microbiology*.
- Obruca, S. (2015). Use of lignocellulosic materials for PHA production. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal*, 29(2), 135–144. doi:10.15255/CABEQ.2014.2253
- Porras, M. A., Villar, M. A., & Cubitto, M. A. (2017). Novel spectrophotometric technique for rapid determination of extractable PHA using Sudan black dye. *Journal of Biotechnology*, 255, 28–32. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.06.012
- Puchenkova, S. G. (1996). Enterobacteria in areas of water along the Crimean coast. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal (Kiev, Ukraine : 1993)*, 58(2), 3–7.
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 45–56. doi:10.1016/j.ibiod.2017.10.001

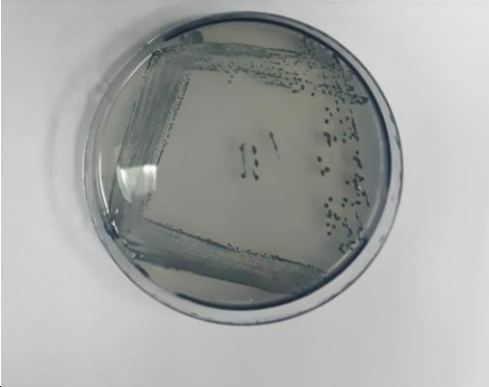



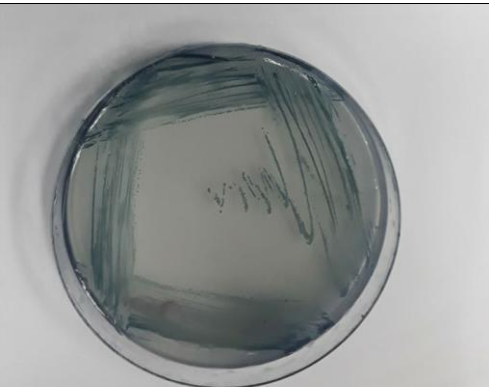
- Romano, D. R. (2012). Disruptores endocrinos, Nuevas respuestas para nuevos retos. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS), 1–60. Retrieved from http://www.istas.ccoo.es/descargas/disruptores_endocrinos_final.pdf
- Schlegel, H. G., Lafferty, R., & Krauss, I. (1970). The isolation of mutants not accumulating poly- γ -hydroxybutyric acid. *Archiv For Mikrobiologie*, 71(3), 283–294. doi:10.1007/BF00410161
- Schumann, P. (1991). E. stackebrandt and M. goodfellow (editors), nucleic acid techniques in bacterial systematics (modern microbiological methods). XXIX + 329 S., 46 abb., 28 tab. chichester — new york — brisbane — toronto — singapore 1991. john wiley & sons. \$ 55.00. ISBN: 0–471–92906–9. *Journal of Basic Microbiology*, 31(6), 479–480. doi:10.1002/jobm.3620310616
- Senior, P. J., Beech, G. A., Ritchie, G. A., & Dawes, E. A. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly- γ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *The Biochemical Journal*, 128(5), 1193–1201.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414
- Silva, L. F. da, Gomez, J. G. C., Rocha, R. C. S., Taciro, M. K., & Pradella, J. G. da C. (2007). Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. *Química Nova*, 30(7), 1732–1743. doi:10.1590/S0100-40422007000700040
- Stanier, R. Y. (1996). *Microbiología*. (J. R. Villanueva, Ed.) (Segunda Edición., p. 727). Reverte.
- Stein, L. D. (2010). The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biology*, 11(5), 207. doi:10.1186/gb-2010-11-5-207
- Steinbuchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M. H., ... Valentin, H. E. (1995). Considerations on the structure and biochemistry of bacterial

- polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology*, 41 Suppl 1, 94–105. doi:10.1139/m95-175
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503–1555. doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- Téllez, A. (2012). La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Económicas, Instituto de Estudios Ambientales-IDEA, 1–120.
- Tufail, S., Munir, S., & Jamil, N. (2017). Variation analysis of bacterial polyhydroxyalkanoates production using saturated and unsaturated hydrocarbons. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 48(4), 629–636. doi:10.1016/j.bjm.2017.02.008
- Wang, X., Huang, N., Shao, J., Hu, M., Zhao, Y., & Huo, M. (2018). Coupling heavy metal resistance and oxygen flexibility for bioremoval of copper ions by newly isolated *Citrobacter freundii* JPG1. *Journal of Environmental Management*, 226, 194–200. doi:10.1016/j.jenvman.2018.08.042
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Whalen, J. G., Mully, T. W., & English, J. C. (2007). Spontaneous *Citrobacter freundii* infection in an immunocompetent patient. *Archives of Dermatology*, 143(1), 124–125. doi:10.1001/archderm.143.1.124

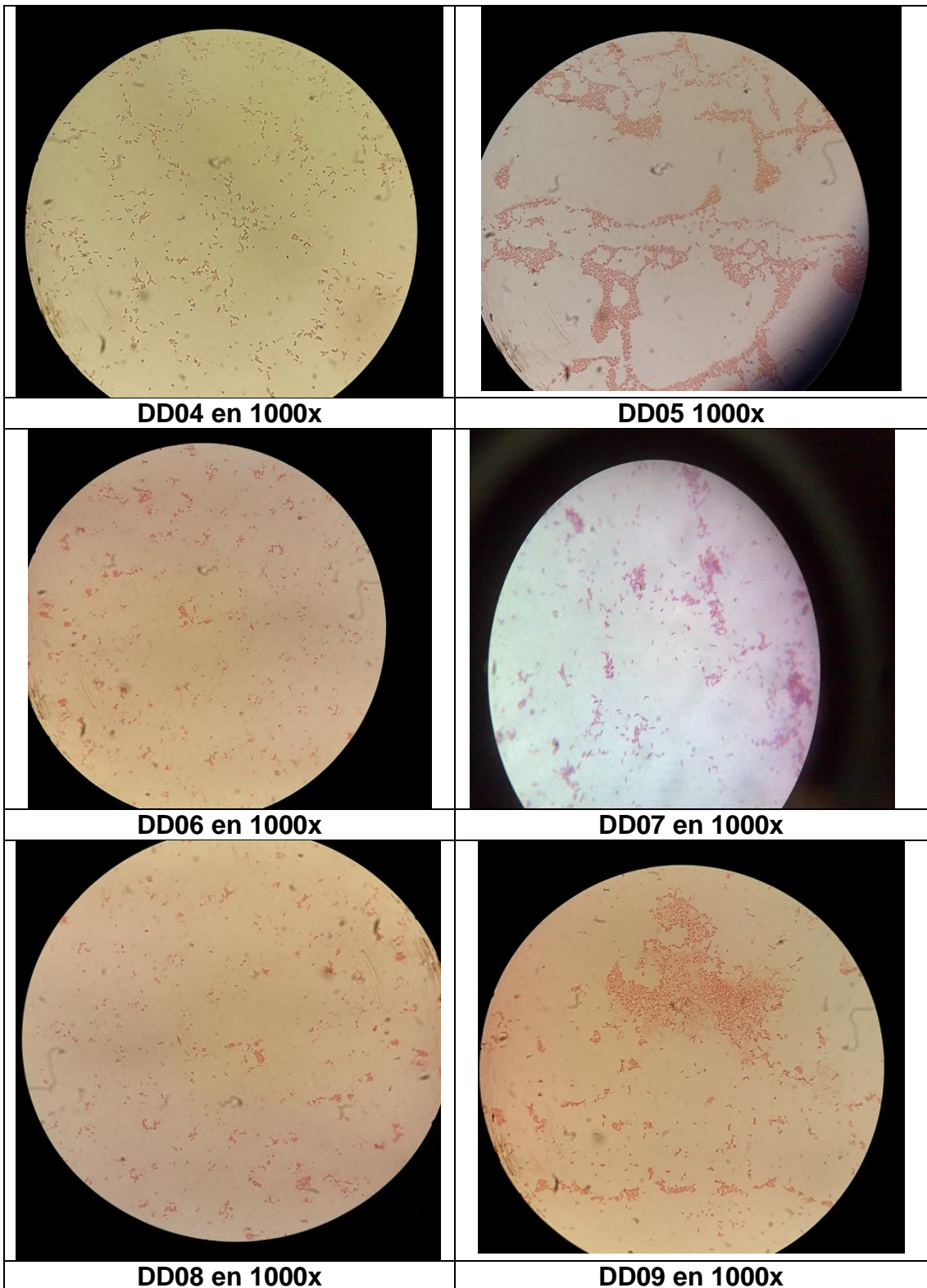
ANEXOS

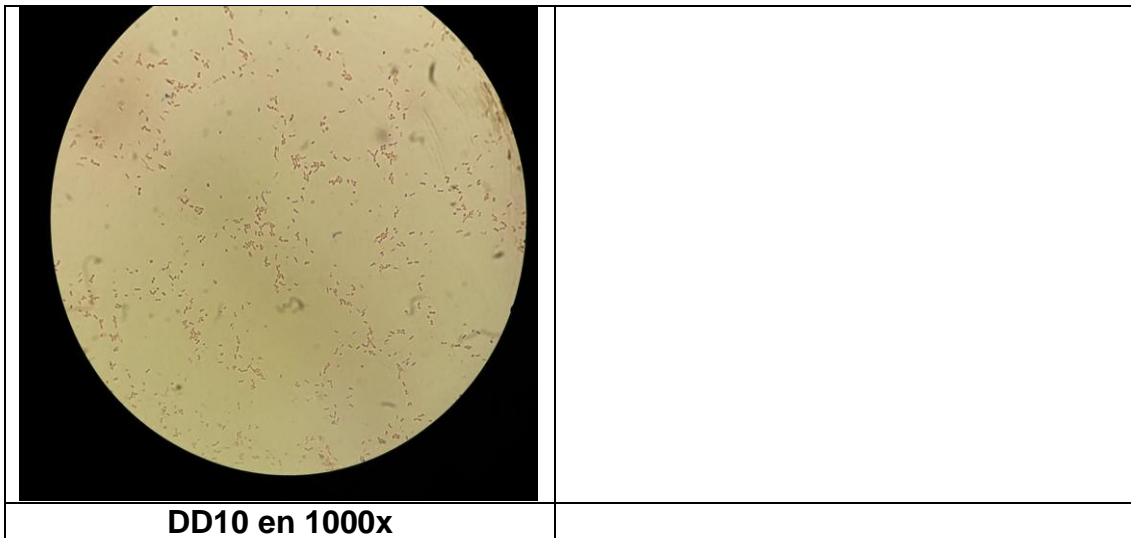
ANEXO 1. Placas en MM

	
<i>B.sacchari</i> (Control positivo)	<i>E.coli</i> (Control negativo)
	
DD04	DD05

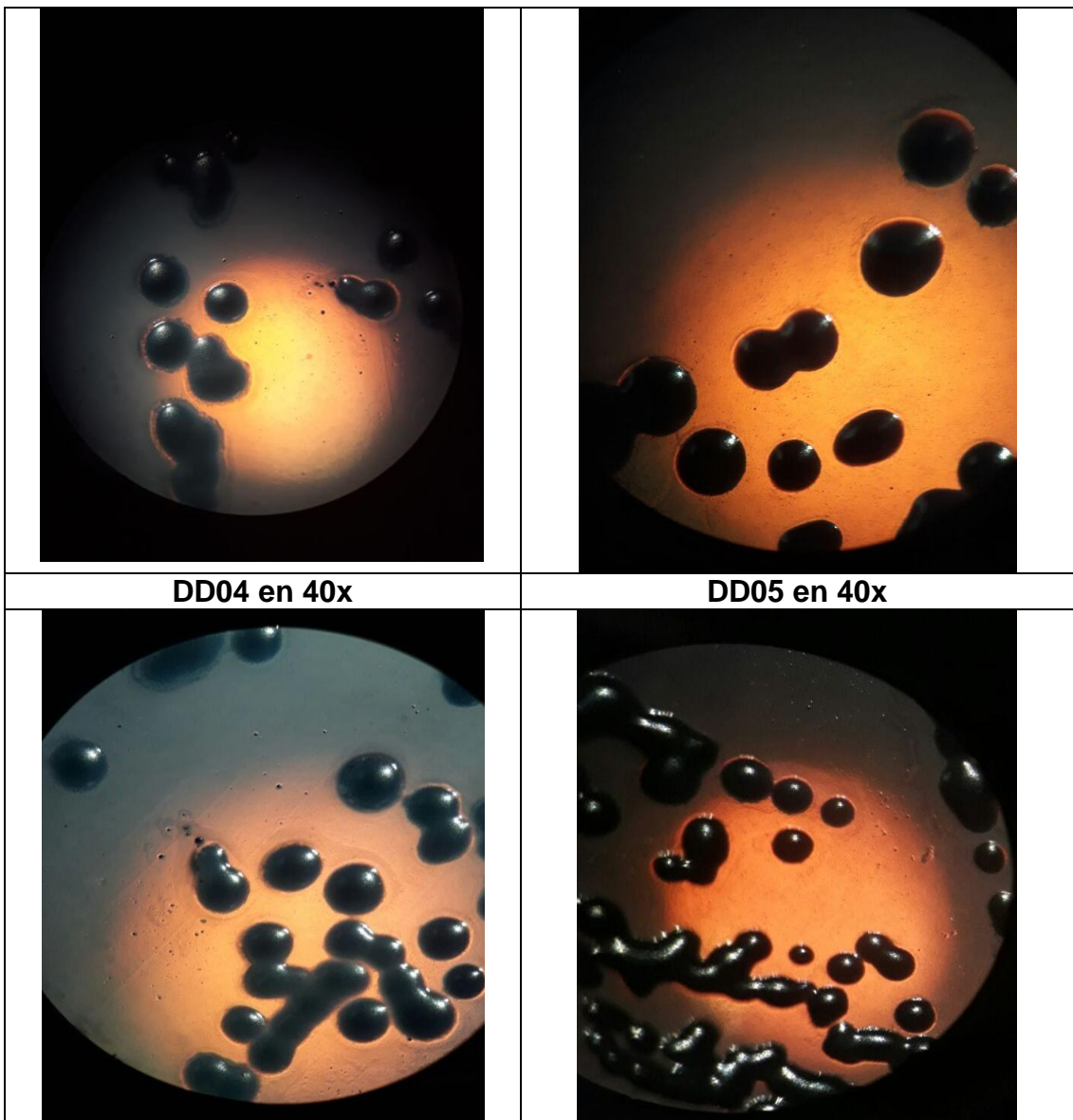
	
DD06	DD07
	
DD08	DD09
	
DD10	

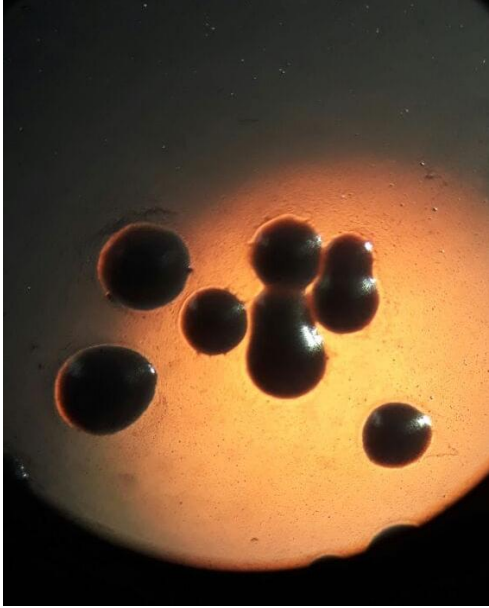
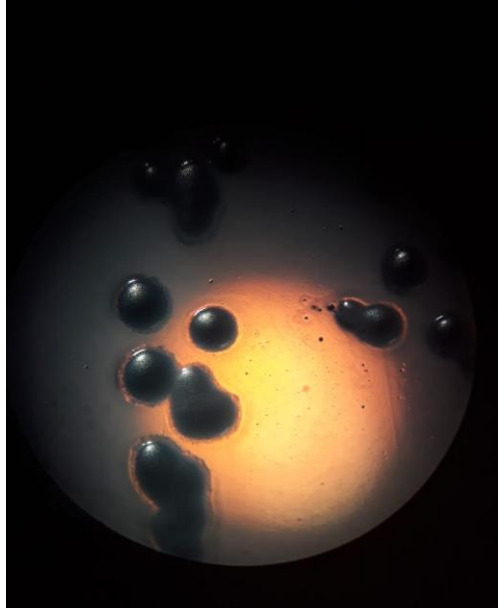
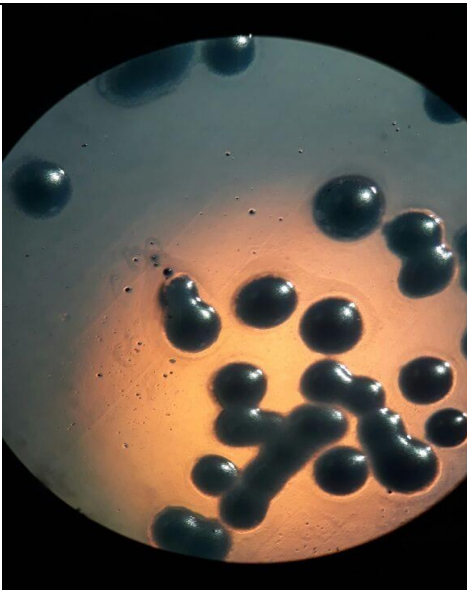
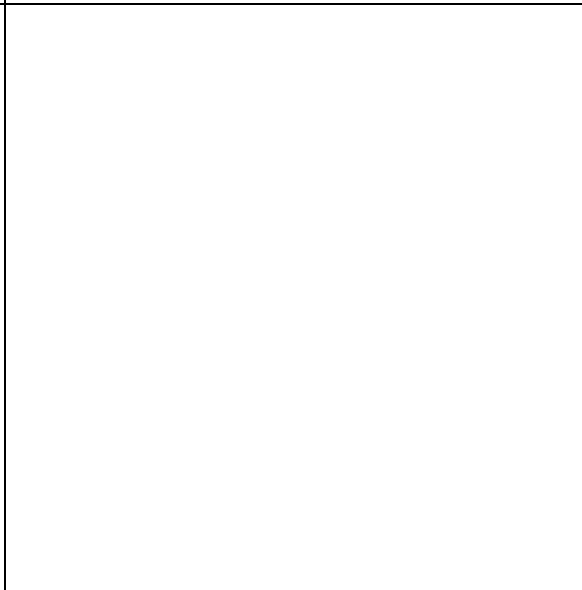
ANEXO 2. Caracterización microscópica





ANEXO 3. Caracterización microscópica con la Tinción Sudan Black



<p data-bbox="459 210 660 241">DD06 en 40x</p> 	<p data-bbox="1027 210 1228 241">DD07 en 40x</p> 
<p data-bbox="459 860 660 891">DD08 en 40x</p> 	<p data-bbox="1027 860 1228 891">DD09 en 40x</p> 
<p data-bbox="459 1491 660 1523">DD10 en 40x</p>	

ANEXO 4. Secuenciación del gen 16SrRNA de bacterias productoras de PHA

CÓDIGO	SECUENCIA 5' - 3'	NÚMERO DE NUCLEÓTIDOS	ID
DD04	CGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTT GCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGT GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCAT TCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCAT GGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACG ACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAG GTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAGCACGT GTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTT GACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCACTG GCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACCGCTG GCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGCGGG ACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGA CAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAA GGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGAT GTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATC GAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG CCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGG CCGTACTCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTA GCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACCT CCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCA GGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTTCG CACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGC CTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCTACGCA TTTCACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCT ACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGGATGCAGT TCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGAC TTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAG TAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTAC CGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTT YTTCTGCGAGTAACGTCAATCACTAAGGTTATTA ACCTTAATGCCTTCCTCCTCGCTGAAAGTACTTT ACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCAT GGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATAT TCCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACC GTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCT CAGACCAGCTAGGGATAGTGGCCTAGATGAGCC GTTACCCACATACTAGCTAATCCCATCTGGGCA CATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCCCCCT CTTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAGCTAC CGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCGGGCAG TTTCCAGACATTACTACCCGTCGCCACTCGT CACCCAAGGAGCAAGCTCCTCTGTGCTACCGTT CGACTGCA	1405	<i>Citrobacter freundii</i>
DD05	TGGTAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTAC TTCTTTTGAACCCACTCCCATGGTGTGACGGG CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG TGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGA CTTCATGGAGTCGAGTTGCACACTCCAATCCGG ACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTC	1404	<i>Citrobacter freundii</i> / <i>Citrobacter braakii</i>

GCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATATGCCATTGTAG
CACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGAT
GACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTAT
CACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGACCGAAT
CGCTGGCAACAGAGGATAAGGGTTGCGCTCGTT
GCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGC
TGACGACRGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTT
CCCGAAGGCACCTAAGCATCTCTGCTAAGTTCT
CTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGT
TGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGT
GCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCT
TGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGGTGACTTAACG
CGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACA
ACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCT
TTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGG
CCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCT
ACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCC
CCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCGGAT
GCAGTTCCAGGTTGAGCCCCGGGATTTACAT
CCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACG
CCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCAACCCTCCGT
ATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGT
GCTTCTTCTGCGAGTAACGTCAATTGCTGCAGTT
ATTAACCACAACACCTTCCTCCTCGCTGAAAGTA
CTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCG
GCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCA
ATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG
GACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATC
CTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTG
AGCCGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTG
GGCACATCCGATGGCAAGAGGCCCGAAGGTCC
CCCTCTTTGGTCTTGCGACGTTATGCGGTATTAG
CTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTCCATCGGG
CAGTTTCCAGACATTA CTACCCGTCGGCCACT
CGTCACCCAAGGGAGCAAGCTCCTCTGTGCTAC
CGT