



BIOPROSPECCIÓN DE BACTERIAS MARINAS PRODUCTORAS DE POLI-HIDROXIALCANOATOS EN TAPETES MICROBIANOS CONTAMINADOS

Alejandro López Cortés

Mar Bermejo 195, Playa Palo Santa Rita, La Paz, B.C.S., 23090, México. Fax: (612) 123 8527, e-mail:

alopez04@cibnor.mx

Palabras clave: Polihidroxicanoatos, bioplásticos, tapetes microbianos.

Introducción. Los tapetes microbianos fotosintéticos son ecosistemas autosustentables, diversos, compuestos por poblaciones de microorganismos fotoautótrofos, ftoheterótrofos, quimioautótrofos y heterótrofos. La singularidad de los tapetes microbianos es debida a la intrincada y compleja interacción de sus diversas poblaciones en una escala de milímetros a centímetros que hacen a tales tapetes un ecosistema completo. El uso de materiales plásticos de origen petroquímico ha generado problemas de contaminación. Como una alternativa real están los polihidroxicanoatos, PHAs. Los PHAs son polímeros de almacenamiento de carbono, energía, biodegradables, y sintetizados por bacterias. Los PHAs tienen propiedades físicas y químicas similares a las del polipropileno de origen petroquímico. El uso de técnicas moleculares ha mostrado que solo una pequeña fracción (1%) de microorganismos ha sido cultivada de los hábitats investigados. Por ello, la diversidad microbiana debe ser considerada una fuente de innovación en biotecnología.

El objetivo del presente trabajo fue la bioprospección de tapetes microbianos contaminados, en particular de bacterias marinas productoras de PHA.

Metodología. Sedimentos de dos sitios fueron seleccionados en Puerto San Carlos, B.C.S., "La Curva" (no impactado) y "La Enlatadora" (sitio impactado). Se determinó la salinidad, temperatura, pH, concentración de oxígeno disuelto, amonio, nitratos, nitritos y fosfatos, para la caracterización del sitio. Para el primoaislamiento se utilizó medios formulados con agua de mar artificial, agar marino 2216, medio para bacterias luminiscentes, medio marino peptona-extracto de levadura (PYM). Para la detección de inclusiones de PHA se utilizó microscopia de contraste de fases para la observación de inclusiones citoplasmáticas refringentes (ICRs); tinciones lipofílicas basadas en Negro Sudan B y Rojo Nilo. La extracción química de PHA se realizó empleando solventes orgánicos y convirtiendo el PHA en ácido crónico el que fue cuantificado por espectrofotometría a 235 nm. Se diseñaron primers para amplificar el gen *phaC* para posteriormente ser secuenciado. Las cepas que mostraron por microscopia presencia de inclusiones de PHA fueron seleccionados para su identificación, usando la morfología colonial, celular, motilidad, tolerancia al oxígeno, producción de oxidasa, asimilación de

carbohidratos y secuenciación parcial del 16S rRNA. Secuencias del 16S rRNA de las cepas obtenidas y aquellas emparentadas disponibles en GenBank obtenidas por BLAST fueron alineadas y usadas posteriormente para la reconstrucción filogenética, empleando el método de vecino más cercano y máxima parsimonia. Productos de PCR del 16S rRNA de las bacterias aisladas y de DNA ambiental fueron separados con ayuda de electroforesis de geles en gradiente desnaturizante (DGGE).

Resultados y discusión.

Diferencias en la composición microbiana fueron encontradas cuando se compararon ambas localidades, estas son atribuidas a las altas concentraciones de amonio y fosfatos del sitio contaminado. Desarrollo conspicuo de tapetes microbianos ocurrió en los sedimentos del sitio contaminado, pero no en el sitio pristino. El análisis microscopico mostró seis cianobacterias (*M. chthonoplastes*, *L. aestuarii*, *Leptolyngbya*, *Oscillatoria*, *Geitlerinema*, and *Gloeocapsa*), bacterias fotótrofas anoxigénicas (*Chloroflexus*). Las secuencias del 16S rRNA de las cepas de bacterias heterótrofas aisladas fueron filogeneticamente agrupadas en tres: Actinobacterias, *Bacillus-Lactobacillus-Staphylococcus* y alfa-proteobacterias. Los géneros *Bacillus* y *Staphylococcus* fueron detectados en ambos sitios. *Paracoccus* y *Micrococcus* solo fueron encontradas para el sitio contaminado y *Rhodococcus* y *Methylobacterium* solo fueron encontradas para el sitio pristino. Cuatro cepas mostraron producciones de PHA por arriba del 50% del peso seco de su biomasa. La detección del gen *phaC* se logro para cepas de los géneros *Bacillus* y *Paracoccus*. La producción de PHA en el tapete microbiano probablemente no solo funciona como material de almacenaje sino como un mecanismo para lidiar con el estrés nutricional del sitio contaminado.

Conclusiones. Este estudio contribuye a la comprensión de la diversidad de bacterias productoras de PHA aisladas de tapetes microbianos sujetos a estrés ambiental por contaminación orgánica de un efluente, que contribuye al desequilibrio de nutrientes.