



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

DETERMINACION DEL BIOPOLIMERO POLI-β. HIDROXIBUTIRATO (PHB) EN DIFERENTES CEPAS DEL GENERO *Rhisobium*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTAN ROGELIO MONTOYA CRUZ MARIA DEL CARMEN ORTEGA SANCHEZ

ASESOR: Q.F.B. ALBERTO NATAHLIEL SOTO GUEVARA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2001

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Determinación del biopolímero
poli-B-hidroxibutirato (PHB) en diferentes cepas del género
Bioplastic

que presenta el pasante: Rogelio Montoya Cruz
con número de cuenta: 8811050-5 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 30 de Agosto de 2000

PRESIDENTE C.F.I. Andrea A. Becerril Osneya
VOCAL M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez
SECRETARIO C.F.B. Nathaniel Soto Guevara
PRIMER SUPLENTE Dra. Susana E. Mendoza Elvira
SEGUNDO SUPLENTE Dr. Andres Romero Rojas

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Ya que me dices:

¡ Tú !, único en su clase,
el más excepcional entre los más excepcionales,
un tesoro inapreciable,
poseedor de cualidades mentales y capaz de acciones como ningún otro ser que haya vivido.
Pero ¿ quién fue el ser creador ?
Tú, mi señor.

A mi Padre:

Sabiendo que esto solo es el resultado de tu enorme apoyo, sacrificios y esfuerzos; pero aunque ya no estas conmigo para compartir la culminación del sueño que emprendimos juntos, quiero decir que fuiste un gran ejemplo de disciplina y fortaleza para mí, por enseñarme a tener esperanza, energía y entusiasmo para alcanzar mis metas.

A mi Madre:

Por tu inmenso amor y guiar mis pasos por el buen sendero para alcanzar lo verdadero, lo justo, lo bello y la superación. Este logro alcanzado es gracias a tu apoyo y confianza que siempre me haz brindado, no solo en mi formación profesional, sino en cada momento de mi vida.

A mis Hermanos:

Aída, Lilia y Arturo.

De quienes he aprendido algo mas acerca de la vida y que forman parte de mi vida misma, al amarnos y compartir nuestras experiencias. Por el gran amor y apoyo incondicional que siempre me han brindado para llegar a la culminación de este logro que también es suyo.

A mi sobrino Aarón:

Por transmitirme la alegría y la paz de tu corazón y ser un estímulo para alcanzar cada una de mis metas.

A Eduardo Romero:

Por compartir un hermoso amor que va creciendo cada día, basado en la confianza y en la comprensión; por tu apoyo en los gratos y difíciles momentos y tu constante estímulo para hacer posible este logro.

A mis Amigos:

Raful Luciano, Ivonne Callejas, Adán Chávez, Emma López, Reyna Silva, Carlos Quezada, Rigoberto Nolasco, Rogelio Montoya y Edgar Romero, quienes compartieron su alegría y me brindaron su amistad. A todos os compañeros (as) de la 19^{ma} generación de Químico Farmacéutico Biólogo. **Gracias**

DEDICATORIAS

A TI CHUCHIN POR DARME LA OPORTUNIDAD DE ESTAR Y SOBREVIVIR.

A MI MADRE:

POR CADA DESVELO,
PREOCUPACIÓN, ENOJO, CONSEJO,
POR TANTAS COSAS QUE SOLO UNA
MADRE REALIZA POR SUS HIJOS.

A MI PADRE:

POR SER EL EJEMPLO DE LA
RESPONSABILIDAD Y DEPOSITAR
TODA SU CONFIANZA EN MI.

A MIS HERMANOS:

RUBÉN, JOSÉ ALBERTO, CARLOS Y
MARÍA DEL CARMEN POR ESA
SUMA QUE DA COMO RESULTADO
UNA FAMILIA.

A MIS AMIGOS:

CLAUDIA ELENA NIETO MENDIETA
Y CARLOS QUEZADA CHÁVEZ POR
COMPARTIR Y SABER UTILIZAR
TODO LO QUE INVOLUCRA LA
PALABRA AMIGO

MIL GRACIAS POR TODO SU
CARIÑO Y ESPERA

AGRADECIMIENTOS

A CARMEN POR SER MI
COMPAÑERA Y SOPORTAR LA
PRESIÓN DE TRABAJAR CONMIGO
LLEGAMOS AL FINAL DE UN GRAN
COMIENZO DISFRÚTALO.

A MI HERMANO RUBEN POR
CONVERTIRSE EN LA SEGUNDA
CABEZA DE LA FAMILIA Y
SACRIFICAR SU TRABAJO PARA
ESTE TU RESULTADO.

A MI ASESOR:

NATAS A TI MAS QUE A NADIE TÉ
AGRADEZCO ESE TIEMPO, POR SER
UNA DE LAS PERSONAS QUE CREYÓ
EN MI Y DEPOSITAR TU TEMA EN
MI PERSONA NO TE FALLE.

A MI TÍA ARTEMIA CRUZ
MARTÍNEZ POR SU APOYO
INCONDICIONAL TANTO PARA MI
PERSONA COMO PARA MI FAMILIA
MIL GRACIAS.

A MI ILUSIÓN:

A TI PEDACITO DE VIDA QUE HAZ
VENIDO A FORTALECER MI VIDA,
COMO UNA MUESTRA DEL
SENTIMIENTO MÁS HERMOSO QUE
PUEDE TENER EL SER HUMANO.

A MI MUNDO:

CLAUDIA, CARLOS, EDGAR,
CRISTINA, MARCO, HILDA, EDNA,
DAVID, LETICIA, ELIZABETH,
MIRIAM, OLIVIA

GRACIAS POR ACOMPAÑARME EN
LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES DE
MI VIDA(ESCUELA Y TRABAJO) Y
POR ESE APOYO QUE SOLO LAS
PERSONAS QUE HAN ESTADO EN
UNA UNIVERSIDAD SABEN DARLO.

COMENZAMOS

INDICE**PÁGINA****I. SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS****II. RESUMEN**

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. GENERALIDADES.....	3
2.1 Taxonomía del género <i>Rhizobium</i>	3
2.2 Factores y componentes que afectan al crecimiento.....	4
2.2.1 Características y condiciones de crecimiento del género <i>Rhizobium</i>	6
2.3 Medición del crecimiento microbiano.....	6
2.3.1 Peso seco celular.....	7
2.3.2. Absorción.....	7
2.3.3. Peso húmedo.....	7
2.3.4. Volumen de células empacadas.....	8
2.3.5. Número de células.....	8
2.4. Cinética de crecimiento.....	8
2.5. Inclusiones en células procarióticas y eucarióticas.....	10
2.5.1. Materiales de reserva no nitrogenados.....	11
2.6. Descubrimiento de ácido poli- β -hidroxibutirato (PHB).....	12
2.7. Características y propiedades generales del PHB.....	13
2.7.1. Estructura primaria del PHB.....	13
2.7.2. Propiedades físicas del PHB.....	14
2.7.3. Propiedades de solubilidad del PHB.....	14
2.8. Biosíntesis del PHB.....	15
2.9. Obtención del PHB.....	17
2.10. Métodos analíticos para la determinación del PHB.....	18
2.11. Degradación y aplicaciones de los polihidroxialcanoatos (PHA's).....	19
2.11.1. Clasificación de plásticos biodegradables.....	20
2.11.2. PHA's que son plásticos biodegradables.....	21
2.11.3. Microorganismos que degradan al PHA's.....	22
2.11.4. Técnicas para determinar la biodegradación.....	23
2.11.5. Aplicaciones de los PHA's.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo general.....	25
3.1.2. Objetivos particulares.....	25
4. JUSTIFICACIÓN.....	26
5. MATERIALES, EQUIPOS E INSTRUMENTOS.....	27
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	28
6.1. Purificación y caracterización de las cepas de trabajo del género <i>Rhizobium</i>	28
6.2. Inóculo de crecimiento y producción de biomasa.....	28
6.3. Aislamiento y cuantificación del biopolímero exopolisacárido (EPS).....	28
6.4. Cuantificación de proteínas (método de Bradford).....	29
6.5. Obtención del PHB (método cualitativo).....	30
6.6. Ensayo en U.V. para la identificación del PHB.....	31
6.7. Cuantificación del PHB por espectrofotometría.....	31
7. DIAGRAMA DE FLUJO.....	32
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33

8.1. Caracterización de las cepas de trabajo.....	33
8.2. Curva estándar de proteínas (método de Bradford).....	33
8.3. Obtención del PHB (método cualitativo).....	34
8.4. Identificación del PHB.....	35
8.4.1. Análisis del espectro de absorción.....	36
8.5. Curva estándar del PHB.....	37
8.5.1. Curva estándar de PHB utilizando H ₂ O como diluyente.....	38
8.5.1. Curva estándar de PHB utilizando H ₂ SO ₄ como diluyente.....	38
8.6. Cuantificación de los metabolitos obtenidos en las cinéticas de crecimiento (D.O.) y producción (g/l) para <i>Rhizobium loti</i>	39
8.6.1. Evaluación de D.O. en medio base para <i>Rhizobium loti</i>	40
8.6.2. Evaluación de EPS en medio base para <i>Rhizobium loti</i>	40
8.6.3. Evaluación de PHB en medio base para <i>Rhizobium loti</i>	41
8.6.4. Evaluación de D.O. en medio óptimo para <i>Rhizobium loti</i>	42
8.6.5. Evaluación de EPS en medio óptimo para <i>Rhizobium loti</i>	43
8.6.6. Evaluación de PHB en medio óptimo para <i>Rhizobium loti</i>	43
8.7. Cuantificación de los metabolitos obtenidos en las cinéticas de crecimiento (D.O.) y producción (g/l) para <i>Rhizobium phaseoli</i>	44
8.7.1. Evaluación de D.O. en medio base para <i>Rhizobium pasheoli</i>	45
8.7.2. Evaluación de EPS en medio base para <i>Rhizobium pasheoli</i>	45
8.7.3. Evaluación de PHB en medio base para <i>Rhizobium pasheoli</i>	46
8.7.4. Evaluación de D.O. en medio óptimo para <i>Rhizobium pasheoli</i>	47
8.7.5. Evaluación de EPS en medio óptimo para <i>Rhizobium pasheoli</i>	47
8.7.6. Evaluación de PHB en medio óptimo para <i>Rhizobium pasheoli</i>	48
8.7.7. Evaluación de D.O. en medio para producción de EPS para <i>Rhizobium pasheoli</i>	49
8.7.8. Evaluación de EPS en medio para producción de EPS para <i>Rhizobium pasheoli</i>	49
8.7.9. Evaluación de PHB en medio para producción de EPS para <i>Rhizobium pasheoli</i>	50
8.8. Tiempos de producción.....	50
8.8.1. Análisis de los tiempos de producción.....	51
9. CONCLUSIONES.....	52
10. SUGERENCIAS.....	53
11. APENDICE.....	54
12. REFERENCIA.....	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las diferentes especies de <i>Rhizobium</i>	3
Tabla 2. Principales diferencias entre cepas del género <i>Rhizobium</i> de desarrollo rápido y lento.....	4
Tabla 3. Inclusiones de células procarrióticas.....	11
Tabla 4. Materiales de reserva no nitrogenados.....	12
Tabla 5. Solubilidad del PHB en diferentes solventes.....	15
Tabla 6. Papel que desempeñan el hipoclorito de sodio y cloroformo en la dispersión para la obtención del PHB.....	18
Tabla 7. Posibles aplicaciones de los PHA's.....	19
Tabla 8. Factores ambientales que influyen en la degradabilidad de los plásticos.....	20
Tabla 9. Microorganismos capaces de degradar a los PHA's.....	22
Tabla 10. Producción industrial y aplicaciones de los PHA's.....	24
Tabla 11. Preparación de los estándares para la curva de calibración de proteínas.....	29
Tabla 12. Identificación de las cepas de trabajo.....	33
Tabla 13. Valores obtenidos para la curva estándar de proteínas.....	33
Tabla 14. Obtención del PHB empleando diferentes métodos de extracción.....	34
Tabla 15. Absorbancia del estándar y las muestras a las mismas longitudes de onda en H ₂ SO ₄ concentrado y H ₂ O.....	35
Tabla 16. Valores de D.O. obtenidas para la cuantificación del PHB (curva estándar).....	37
Tabla 17. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para <i>Rhizobium loti</i> en medio base.....	39
Tabla 18. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para <i>Rhizobium loti</i> en medio óptimo.....	41
Tabla 19. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para <i>Rhizobium phaseoli</i> en medio base.....	44
Tabla 20. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para <i>Rhizobium phaseoli</i> en medio óptimo.....	46
Tabla 21. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para <i>Rhizobium phaseoli</i> en medio para producción de exopolisacárido (EPS).....	48
Tabla 22. Tiempo de producción (Tp) del EPS y PHB en los diferentes medios de cultivo para <i>Rhizobium loti</i> y <i>Rhizobium phaseoli</i>	50

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curva estándar de proteínas.....	34
Gráfica 2. Curva estándar del PHB.....	37
Gráfica 3. Cinética de crecimiento y producción de <i>Rhizobium loti</i> en medio base....	40
Gráfica 4. Cinética de crecimiento y producción de <i>Rhizobium loti</i> en medio óptimo	42
Gráfica 5. Cinética de crecimiento y producción de <i>Rhizobium phaseoli</i> en medio base.....	45
Gráfica 6. Cinética de crecimiento y producción de <i>Rhizobium phaseoli</i> en medio óptimo.....	47
Gráfica 7. Cinética de crecimiento y producción de <i>Rhizobium phaseoli</i> en medio para producción de exopolisacárido.....	49
Gráfica 8. Tiempos de producción de EPS y PHB.....	51

INDICE DE FIGURAS

Fig.1. Cinética típica de crecimiento de un microorganismo en un medio intermitente o sistema cerrado a la cual no se le adiciona medio al cultivo.....	9
Fig. 2. Condiciones de crecimiento anormal y síntesis microbiana de material de reserva intracelular como son P- β -HA, P-HB, P-HV.....	10
Fig. 3. Vía general de producción del PHB, enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación del PHB, B.....	16
Fig. 4. Clasificación esquemática de plásticos degradables.....	21
Fig. 5. Análisis del PHB por espectrofotometría en U.V.....	36

I. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

CoA.....	Coenzima A
D.O.....	Densidad óptica
EPS.....	Exopolisacárido
H ₂ SO ₄ conc.....	Ácido sulfúrico concentrado
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
MB.....	Medio base
NAD ⁺	Nicotin adenin dinucleótido
NADH.....	Nicotin adenin dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotin adenin dinucleótido fosfatado
NADPH.....	Nicotin adenin dinucleótido fosfatado reducido
nm.....	Nanómetros
PHA.....	Polihidroxialcanoato
PHB.....	Poli-β-hidroxibutirato
PHV.....	Polihidroxivalerato
rpm.....	Revoluciones por minuto
Rl.....	<i>Rhizobium loti</i>
RMN.....	Resonancia magnética nuclear
Rp.....	<i>Rhizobium phaseoli</i>
TCA.....	Ciclo de ácido tricarbóxico
tp.....	Tiempo de producción
U.V.....	Ultravioleta
VCE.....	Volumen de células empaçadas
α.....	Alfa
β.....	Beta
λ.....	Longitud de onda
μl.....	Microlitros
μm.....	Microgramos

II. RESUMEN.

El género *Rhizobium* pertenece al grupo de bacterias en forma de bacilos Gram negativo, móvil aeróbico y además posee gránulos de poli-β-hidroxibutirato.

El PHB se reconoce como fuente de inclusiones de lípidos y después se emplearon como reserva de carbono y energía. Este termoplástico muestra una característica importante, la biodegradación, potencialmente útil como poliéster desplazando los termoplásticos derivados del petróleo.

La presencia de PHB en las diferentes cepas del género *Rhizobium* fue el principal motivo por la cual se llevo a cabo este trabajo.

Recientemente la industria y la ciencia se han enfocado en el desarrollo y aplicación de materiales de plástico biodegradables los cuales son definidos como plásticos en la cual la biodegradación resulta de la acción de microorganismos como son bacterias hongos y algas.

El objetivo principal de este estudio fue determinar la presencia y cuantificación del PHB en g/l por día empleando cinéticas de crecimiento y producción. Para lo cual se utilizaron 2 medios de cultivo líquido para *Rhizobium loti* y 3 para *Rhizobium phaseoli*. Se emplearon 3 métodos para la recuperación del PHB (choque térmico, hipoclorito de sodio-cloroformo-metanol y dispersión clorofórmica). Eligiendo a la dispersión clorofórmica como la representante para llevar a cabo la recuperación, debido a su principio basado en la hidrofobicidad del PHB y la hidrofiliidad de la membrana celular, rapidez y cantidad de precipitado.

El método analítico utilizado para cuantificar el PHB fue el espectrofotométrico por ser simple y específico, su fundamento consiste en 2 fases: el primero el PHB es convertido cuantitativamente en ácido crotonico por una digestión en H_2SO_4 concentrado segundo: el ácido crotonico tiene su máxima absorción en ultravioleta a una longitud de onda de 235 nm cuando se usa el H_2SO_4 concentrado como solvente este método de cuantificación de PHB es práctico, confiable, rápido, económico.

Con los datos obtenidos en este trabajo se observa que los medios de cultivo los cuales dieron mejor producción de PHB en *Rhizobium loti* es el MB con un tp de 0.59 g/l por hora, para *Rhizobium phaseoli* fue el Rp con un tp de 0.88 g/l por hora.

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas se han hecho muchas investigaciones sobre la síntesis de biopolímeros y la acumulación por microorganismos pertenecientes a diversos grupos taxonómicos como son *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*.^(57,58)

Los Poli- β -hidroxibutiratos (PHB) han sido estudiados desde 1926 por Lemoigne; La acumulación del biopolímero en los distintos gránulos es en el interior de la célula y pueden ser usualmente vistos por microscopía de contraste de fases y por microscopía electrónica.⁽¹³⁾

Este biopolímero, muestra algunas propiedades físicas y químicas; tales como: solubilidad en cloroformo y/o resistencia a la degradación por la digestión con una solución de hipoclorito alcalino, y a una rápida conversión a ácido crotonico en presencia de H₂SO₄ concentrado. La obtención de PHB depende de varios factores, incluyendo principalmente la localización del PHB en la célula y características del PHB como solubilidad, tamaño, lavabilidad y localización celular.^(4,50,51)

El ácido poli- β -hidroxibutirato es un polímero lineal (-)-D-hidroxibutirato, este es un poliéster alifático con un oxígeno carbonil alternado y grupos metil consigo a lo largo de la cadena del biopolímero, es biocompatible, termoplástico, biodegradable y por consiguiente de interés industrial. El PHB es un candidato de un nuevo material de plástico biodegradable ya que éste presenta propiedades fisicoquímicas muy similares al poli-propileno y poli-etileno.^(1,11,13,41)

Las especies de *Rhizobium* acumulan PHB dentro de las células bacterianas estos polímeros funcionan como una reserva de compuestos de carbono.⁽⁵⁷⁾

El PHB constituye uno de los metabolitos secundarios producidos por *Rhizobium* que han despertado un gran interés tecnológico. Los PHB están involucrados en el aporte de energía en el proceso de fijación simbiótica de nitrógeno en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Una característica importante es que el PHB se acumula en la fase estacionaria del crecimiento desde el punto de vista cinético, es decir, su producción se incrementa bajo condiciones no óptimas para el crecimiento de la bacteria. Este biopolímero se acumula en el bacteroide y puede llegar a representar el 50% del

peso celular (Wong y Evans, 1971). Desde el punto de vista industrial el interés se concentra en la posibilidad de utilizarlos como materiales termoplásticos biodegradables. La atención actual a la contaminación causada por plásticos no biodegradables de la industria petroquímica y el agotamiento de los recursos naturales no renovables como el petróleo ha dado un gran impulso a la investigación del PHB en estas bacterias.⁽¹⁾

Recientemente la industria se ha enfocado en el desarrollo y aplicación de materiales biodegradables. Los plásticos biodegradables son definidos como un producto en la cual la degradación resulta por la acción de microorganismos como son bacterias, hongos, algas, etc. Los biopolímeros naturales preferentemente son degradados por reacciones hidrolíticas, la presencia de grupos que facilitan la degradación biológica. Esta biodegradación se ve influida por varios parámetros como son: Fisicoquímicos, microbiológicos, químicos y de procesos.⁽⁴¹⁾

2. GENERALIDADES.

2.1. Taxonomía del género *Rhizobium*.

El género *Rhizobium* pertenece a la familia de las Rhizobiaceae, estas bacterias forman nódulos en las plantas leguminosas donde se lleva a cabo la fijación de N_2 atmosférico en forma simbiótica y son clasificadas dentro de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*. *Rhizobium* fue aislada en 1888 por Beijerinck de raíces noduladas y la estableció como el agente causal de la asimilación de Dinitrógeno. Este investigador propuso el nombre de *Bacillus radicolus*, pero más tarde fue nombrado *Rhizobium* -del griego *rhizo*: una raíz y *bios*: vida- por Frank (1889).^(10,18,36)

Las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium* son bacilos que pertenecen a la familia Rhizobiaceae, según la clasificación propuesta por Bergey. El género *Rhizobium* se compone de varias especies, las cuales reciben el nombre de acuerdo a las especies vegetales en que se alojan. Las Tabla 1 nos detalla las diferentes especies del género *Rhizobium* y las leguminosas con las cuales se asocia.⁽³⁶⁾

Tabla 1. Clasificación de las diferentes especies de *Rhizobium*.⁽³⁶⁾

Especie de <i>Rhizobium</i>	Planta(s) hospedero (s)
<i>R. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> y <i>Trigonella</i> spp.
<i>R. leguminosarum</i>	
<i>bv. viciae</i>	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lathyrus</i> y <i>Lens</i> spp.
<i>bv. trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.,
<i>bv. phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> .
<i>R. loti</i>	<i>Lotus</i> spp. (<i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lotus pedunculatus</i>).
<i>R. huakii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> .
<i>R. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>R. sp. cepa</i> NGR234	Leguminosas tropicales y <i>Parasponia</i> spp. (no leguminosa)
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> spp. y <i>Macrotilium</i> spp.
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega officinalis</i> , <i>G. orientalis</i>
<i>R. fredii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> y otras leguminosas.
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> y otras leguminosas
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> y otras leguminosas
<i>Bradyrhizobium</i> sp <i>cepa parasponia</i>	<i>Parasponia</i> spp no leguminosa
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i> spp (<i>nodulación de tallos</i>)

Otros estudios han llevado a una clasificación taxonómica de estas bacterias basados en su grado de desarrollo (Tabla 2) , los de desarrollo rápido que incluyen al género *Rhizobium* con ocho especies reconocidas, *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. loti*, *R. galagae*, *R. tropici*, *R. huakii*, *R. etli* y *R. fredii*, (aunque se han realizado estudios sobre una nueva especie, *R. ciceri*, aislada de *Cicer arietinum*) y los de desarrollo lento, que incluyen al género *Bradyrhizobium* contiene sólo una especie reconocida *B. japonicum*. Dos nuevos géneros han sido reconocidos: *Azorhizobium*, con una especie, *A. caulinodans*, y *Sinorhizobium*, con dos especies, *S. fredii* y *S. xinjiangensis*.⁽¹⁸⁾

Tabla 2. Principales diferencias entre cepas del género *Rhizobium* de desarrollo rápido y lento.⁽¹⁹⁾

Características	Desarrollo rápido	Desarrollo lento
Tiempo de generación	• Menos de 6 horas	• Más de 6 horas
Presencia de flagelos	• Peritricos	• Subpolares
Resistencia Intrínseca a antibióticos	• Baja	• Alta

2.2 Factores y componentes que afectan al crecimiento.

El crecimiento de los microorganismos depende básicamente de la disponibilidad del agua. Para sintetizar material celular se requiere materias nutritivas (macroelementos y microelementos).

Agua. Las bacterias la necesitan, para crecer y multiplicarse, gran cantidad de agua en sus inmediaciones. El agua es el vehículo por el cual los materiales esenciales penetran en la célula y salen todos los desechos.⁽⁶⁰⁾

Sales inorgánicas. Como todos los organismos, las bacterias necesitan para su desarrollo determinadas sales inorgánicas. Estas desempeñan tres papeles importantes: 1) Mantienen un estado coloidal y una presión osmótica adecuados; 2) mantienen el equilibrio acidobásico. 3) actuar como parte de las enzimas o como activadores de las reacciones enzimáticas.⁽⁶⁰⁾

El azufre es un constituyente de algunos aminoácidos la cistina, la metionina. Puede ser suministrado a algunos organismos en forma de sulfatos. El hierro es esencial para el funcionamiento de varias enzimas. Algunas bacterias forman varias cadenas en un medio deficiente de magnesio, pero vuelven a la normalidad con la adición de éste. Los fosfatos juegan un papel importante en la transferencia de energía. En total tienen que estar en el medio en forma de compuestos utilizables todos los elementos que se requiera para la formación de la sustancia celular.⁽¹⁾

Muchos organismos no se conforman, sin embargo, con la sola presencia de los compuestos adecuados; deben darse muchas otras condiciones secundarias para un posible crecimiento en un medio dado.⁽¹⁾

Los microorganismos exigentes y determinados mutantes defectuosos requieren, además, compuestos, partes esenciales de la célula son incapaces de sintetizar. Estos productos secundarios se denominan factores de crecimiento (sustancias complementarias o suplemento); puede tratarse de aminoácidos, vitaminas u otras sustancias. Los microorganismos que requiere algún factor de crecimiento se denominan auxotróficos.⁽¹⁾

Aun cuando se encuentren presentes todas las sustancias nutritivas requeridas, el crecimiento también depende de determinadas condiciones; la concentración de iones hidrógeno, la temperatura y la presión osmótica, aireación u O_2 .⁽¹⁾

La mayoría de organismos presentan un crecimiento óptimo cuando los iones H^+ y los iones OH^- se encuentran aproximadamente en la misma concentración (pH 7.0). Muchas bacterias prefieren pH's más elevados (pH = 8) esto es un medio ligeramente alcalino.⁽¹⁾

El mantenimiento de un pH determinado durante el crecimiento es importante en aquellos microorganismos productores de ácido pero que no lo toleran. Para evitar la autodestrucción a causa de los ácidos producidos se utilizan sustratos no fermentables (en lote) o bien se amortigua el medio de cultivo. Los fosfatos inorgánicos desempeñan un papel amortiguador para pH superiores a 7.2. Cuando la secreción de ácido es superior se recomienda la adición de carbonato de calcio o bicarbonato de sodio.⁽¹⁾

En lo que se refiere a la temperatura los microorganismos presentan distintos comportamientos. La mayoría de bacterias del suelo y del agua son mesófilicas: sus temperaturas óptimas oscilan entre 25°C y 40°C.⁽¹⁾

El requerimiento de la biotina (la cual tiene la función de servir como factor estimulante para el desarrollo de ciertos microorganismos) está influido por los componentes del medio de cultivo.⁽⁶⁰⁾

2.2.1 Características y condiciones de crecimiento del género *Rhizobium*.

Las bacterias del género *Rhizobium* son bacilos Gram. negativos miden de 0.5 - 0.9 µm de diámetro por 1.2 - 3.0 µm de largo, son móviles, presentan un flagelo polar o subpolar, o de dos a seis flagelos peritricos. Son comúnmente pleomórficos bajo condiciones adversas de desarrollo, no producen endosporas se puede desarrollar bajo tensiones de O₂ de 0.01 atmósferas. Su temperatura óptima de desarrollo es de 25 - 30°C y su intervalo de pH entre 5.0 y 8.0.⁽¹⁰⁾

Todas las especies utilizan un amplio número de carbohidratos como son: glucosa, sacarosa y manitol. También requieren de compuestos inorgánicos conteniendo nitrógeno (NH₃ y NO₃). Algunas cepas requieren además de biotina y de otras vitaminas solubles en agua.⁽¹⁰⁾

Algunas cepas tienen la habilidad de producir ácido, obteniendo un máximo de 2 - 3ml de ácido 0.1N por cada 100ml de medio líquido en 48hrs (Laird y West, 1938); esto se puede prevenir con un medio amortiguado con buffer, aunque el pH puede bajar hasta 6.8 después de 144hrs. de incubación.⁽³⁹⁾

2.3 Medición del crecimiento microbiano.

Antes de considerar el desarrollo de las poblaciones de células microbianas en detalle, es importante considerar cómo puede medirse este crecimiento.

2.3.1. Peso seco celular:

El método más usado para medir el crecimiento microbiano es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de células que sedimentan rápidamente, esto usualmente implica centrifugación de muestra de cultivo en tubos de centrifuga prepesados, el lavado de la pastilla celular concentrado con solución salina isotónica seguida por recentrifugación. Luego, las células concentradas se colocan en un horno a 90°C durante unas 20 hrs. a 105°C durante 6 a 10 hrs, hasta que se haya alcanzado un peso constante. La desventaja de este método es que son lentos y requieren volúmenes grandes del cultivo.⁽⁴⁵⁾

2.3.2. Absorbancia:

A menudo se saca ventaja del hecho de que en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro, esta relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo con la ley de Lamber-Beer. Por lo general, se emplean longitudes de onda alrededor de 600 nm. Es importante saber que como la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño o la forma de éstas cambia durante el crecimiento del cultivo.⁽⁴⁵⁾

En este método es importante medir el coeficiente para todo el experimento de crecimiento puesto que no siempre es constante. Es posible que este coeficiente no sea constante a medida que la densidad de células aumenta debido a la respuesta no-lineal del espectrofotómetro a valores de absorción altos. Por lo tanto, es importante trabajar en el intervalo lineal mediante la dilución adecuada de las muestras del cultivo, de modo que la absorción esté directamente relacionada con la densidad celular.⁽⁴⁵⁾

2.3.3. Peso húmedo:

Este quiere decir simplemente la centrifugación o filtración de muestras del cultivo seguido por el peso directo. Aunque es un método extremadamente rápido, es importante estandarizar

correctamente el procedimiento ya que se mide el agua tanto intra como extracelular, los cuales pueden ocasionar errores considerables.⁽⁴⁵⁾

2.3.4. Volumen de células empacadas:

Mediante la centrifugación de muestras del cultivo en tubos de centrifuga graduados se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas (VCE). Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular.⁽⁴⁵⁾

2.3.5. Número de células:

El crecimiento se puede determinar también en términos del número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre un porta objeto de microscopios graduados como los de Helber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio.

Aunque este método es relativamente rápido y exacto, no distingue entre células viables y no viables, y resulta ser muy agotador para la persona que lo realice.⁽⁴⁵⁾

2.4 Cinética de crecimiento.

El sistema en lote representa un crecimiento del microorganismo en donde no se añade medio nuevo al cultivo que se trabaja.

El ciclo de crecimiento se puede dividir en varias fases (Fig. 1):

Fase 1 lag: Representa un período de adaptación para el crecimiento en un medio nuevo y significa la síntesis de las enzimas requeridas para la evolución en este medio.

Fase 2 o de aceleración : Los microorganismos se empiezan a replicar, se reproducen a una velocidad acelerada.

Fase 3. Fase exponencial o fase log: Se habla de un crecimiento equilibrado donde los nutrientes son consumidos continuamente y los productos finales del metabolismo se acumulan, por lo tanto, el medio cambia constantemente al igual que la reproducción de microorganismos.

Fase 4. Fase estacionaria: Los nutrientes del medio se agotan y dejan de reproducirse, si los microorganismos producen ácido se inhibe el crecimiento.

Fase 5. Fase de desaceleración: Esta se caracteriza por ningún crecimiento neto. De hecho el crecimiento puede estar ocurriendo, pero esta equilibrado por la rapidez de muerte o lisis celular. Es común que la población entre a la fase estacionaria como resultado de la disminución de algún nutriente esencial, formación de productos tóxicos o de un cambio en medio físico.

Fase 6. Fase de declinación o de muerte: Durante la fase estacionaria la rapidez de desaparición puede volverse más alta que la rapidez de crecimiento, en cuyo caso disminuye la densidad de células.

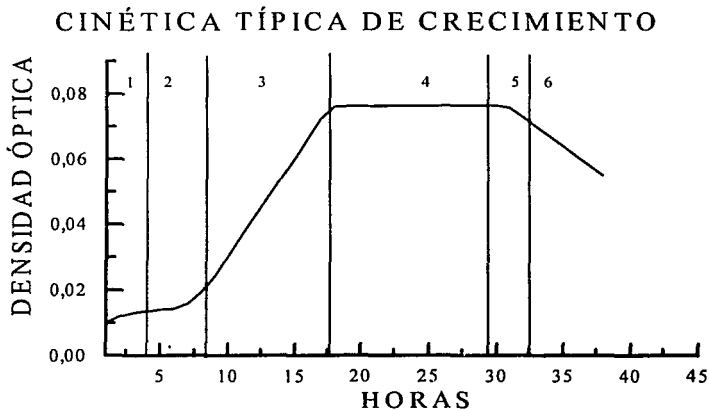


Fig. 1. Cinética típica de crecimiento de un microorganismo en un medio intermitente o sistema cerrado (lote) a la cual no se le adiciona medio al cultivo.

2.5 Inclusiones en células procariotes y eucariotes.

Algunos microorganismos tanto procariotes como eucariotes poseen la capacidad enzimática de sintetizar una variedad de material de reserva intracelular.^(41,48)

Estos materiales de reserva son definidos como metabolitos los cuales son sintetizados por organismos bajo condiciones particulares como son condiciones de crecimiento no balanceado, esto ocurre cuando cada uno de los macro o microelementos faltan totalmente o solo están presentes en concentraciones bajas.⁽⁴¹⁾

El efecto de concentraciones anormales de fuente de carbono y nitrógeno (Fig. 2) en la síntesis de materiales de reserva intracelular es conocido en el caso de material de reserva microbiano que contiene carbono como glucógeno y PHB.^(41,48)

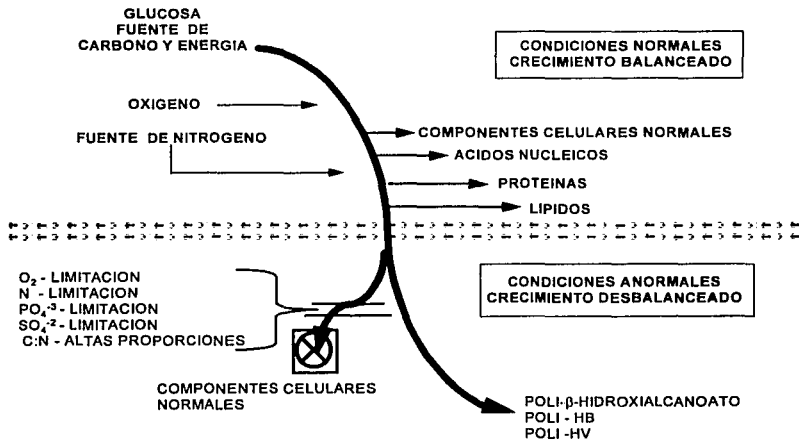


Fig. 2. Condiciones de crecimiento anormal y la síntesis microbiana de material de reserva intracelular como son P-β-HA, P-HB, P-HV.⁽⁴¹⁾

El material de reserva de las células eucarióticas en forma de inclusiones celulares son usualmente lípidos o polisacáridos. Las células eucarióticas como son levaduras, hongos filamentosos y células animales acumulan glóbulos de grasa intracelulares y polisacáridos intracelulares como son almidón y glucógeno.^(41,48)

En células procarióticas hay variedad de inclusiones intracelulares los cuales realizan las funciones de material de reserva que son mucho más diversos que en células eucarióticas. Los materiales de reserva son degradados cuando otros nutrientes disminuyen y son subsecuentemente utilizados como fuente de carbono y de energía por el organismo.^(41,48)

Las inclusiones de las células procarióticas se dividen en dos grandes grupos que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Inclusiones de células procarióticas.⁽⁴¹⁾

No unidas a membrana.	Unidas a membrana.
Gránulos de glucógeno	Poli glucosa
Gránulos de poli fosfatos	Poli-β-hidroxiacaloides (Poli-β-hidroxi butirato, Poli-β-hidroxi valerato)
Ficobilisomas (biliproteínas)	Vacuolas de gas
Tubulos	Inclusiones de sulfuro
Microtubulos	Carboxisomas
Proteínas	Clorosomas

2.5.1. Materiales de reserva no nitrogenados.

Entre los organismos procarióticos están muy extendidos dos tipos químicamente diferentes de materiales de reserva no nitrogenados, cada uno de los cuales constituye un almacén intracelular de carbono o energía. (Tabla 4).

Estos materiales son polisacáridos de glucosa (α -1.4-glucanos) tales como el almidón, el glucógeno y un poliéster del PHB. El primer tipo de sustancias también se presenta como material de reserva

en muchos organismos procariotes que no almacenan grasas neutras; por esto el PHB puede considerarse el equivalente procariótico de ese tipo de material.⁽⁵³⁾

Tabla 4. Materiales de reserva no nitrogenados.

Distribución de materiales orgánicos no nitrogenados de reserva entre procarióticos.

A. Glucógeno

Cianobacterias (la más representativa)
Bacterias entéricas (principales géneros, excepto los indicados en B)
Esporulados: numerosas especies de *Bacillus* y *Clostridium*

B. Poli- β -hidroxibutirato

Bacterias entéricas: géneros *Deneckea* y *Photobacterium*
Pseudomonas (especies varias)
Grupo *Azotobacter* (*Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*)
Rhizobium
Moraxella (algunas especies)
Spirillum
Bacillus (algunas especies)
Sphaerotilus

C. Glucógeno y Poli- β -hidroxibutirato

Cyanobacteria (unas pocas especies)
Bacterias rojas

D. Material de reserva no demostrable

Pseudomonas (algunas especies)
Acinetobacter
Bacterias verdes

2.6 Descubrimiento del ácido poli- β -hidroxibutirato (PHB).

El PHB es el arcotipo poli-hidroxialcanoato (PHA) y fue el primero descrito como un importante producto bacteriano por Lemoigne en 1923^(28,41). Desde el uso del microscopio en el campo de la microbiología, el PHB muchas veces fue descrito como pequeñas "gotas de grasa" pudiendo ser regularmente observado en muchas células bacterianas.⁽¹⁾

Beijerinck (1888)^(3,41) también observó que dentro de las células de *Rhizobium* (bacterias aisladas de nódulos), se encontraban presentes gránulos y esta existencia fue descrita como glóbulos extremadamente refráctales. Más tarde, esto fue reconocido por muchos microbiólogos ya que aquellos gránulos "lipofílicos" se hicieron evidentes en muchas bacterias. La composición del PHB esclarecida por Lemoigne fue utilizando cepas de *Bacillus spp* y llevando a cabo una lisis en

agua destilada, observándose que el valor del pH decreció debido a la formación de un ácido desconocido. Este ácido desconocido fue subsecuentemente fundido y se determinó que era idéntico al ácido β -hidroxibutírico aislado de la orina de pacientes diabéticos.^(1,29,30,31,32)

Lemoigne en 1927 caracterizó al PHB y observó que esta involucrado en la esporulación de *Bacillus spp.*, no es bien reconocido en las inclusiones de lípidos pero es acumulado por muchas bacterias al entrar en la fase estacionaria de crecimiento o se usa con el fin de una reserva interna de carbono y energía.^(30,31,32)

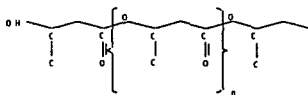
Años más tarde Forsythe y colaboradores (1958) fueron uno de los primeros grupos en demostrar que muchas bacterias Gram. Negativas podían sintetizar PHB y tener o no la capacidad de poder ser usado como un determinante taxonómico.⁽⁴¹⁾

Durante el mismo año Williamson y Wilkinson (1958)⁽⁵⁹⁾ desarrollaron uno de los primeros métodos prácticos para la determinación cuantitativa del contenido de la biomasa bacteriana usando hipoclorito de sodio, bajo condiciones controladas de temperatura.^(1,41)

2.7 Características y propiedades generales del PHB.

2.7.1 Estructura primaria del PHB.

El PHB es un polímero lineal y macromolecular óptimamente activo (-)D-3-hidroxibutírico, es un poliéster alifático con un oxígeno carbonil alternando y grupos metil consigo a lo largo de la cadena del polímero.^(13,41) En PHB, un homopolímero, de unidades repetitivas es ácido 3-hidroxibutírico cuya estructura es:



en donde el valor de n puede ser extremadamente variable de 600 a más de 35000 que depende grandemente en un número de varios factores. Esta variación del valor de n se ve afectado por:

- El método de aislamiento (extracción de gránulos de PHB de la biomasa procarriótica).
- Agotamiento o fatiga del uso bacteriano (muerte bacteriana).
- El tipo de sustrato empleado.
- El tiempo de cosecha de las células, tiempo de incubación del cultivo (curva de crecimiento).
- Y algunos otros factores limitantes del crecimiento.⁽⁵⁶⁾

2.7.2 Propiedades físicas del PHB.

El PHB es un poliéster natural. Esta es una secuencia dentro del PHA tipo biopolímeros. PHB es un termoplástico con un punto de fusión cercano a 175°C y pertenece a la clase de biopolímeros cristalinos con un alto grado de cristalinidad. Dentro de las propiedades cristalinas, las macromoléculas del PHB acepta la conformación regular helicoidal con dos cadenas antiparalelas; el biopolímero contiene C₈ a C₁₀ componentes cristalinos.

Las propiedades físicas del PHB son convencionalmente plásticas parecidas al polietileno y poliestireno con respecto a la fuerza de tensión y extensión al rompimiento. Cabe enfatizar que las propiedades físicas del PHB dependen del peso molecular y pureza de la muestra de trabajo.^(20,21,41)

Las propiedades fisicoquímicas del PHB son relacionadas con el tamaño de pequeñas esferas formadas durante la cristalización, directamente relacionados a la microestructura.

Para llevar a cabo una cristalización en un intervalo de 110° y 120°C.⁽⁴¹⁾

2.7.3 Propiedades de solubilidad del PHB.

Las propiedades de solución del PHB tales como viscosidad, presión osmótica esparcimiento ligero y dispersión rotatoria óptica han sido extensivamente estudiadas. La solubilidad del PHB en varios solventes se presenta en la Tabla 5.

La solubilidad del PHB en solventes orgánicos se ha utilizado para extraer el biopolímero del medio húmedo o usualmente de la masa microbiana seca en una escala piloto. La influencia de la temperatura en la solubilidad del PHB puede ser efectivamente usada para su precipitación en la forma de un gel en el correspondiente solvente por una disminución de la temperatura. Sin

embargo una extracción a altas temperaturas, es muy posible que ocurra la degradación del peso molecular.^(41,47)

Tabla 5. Solubilidad del PHB en diferentes solventes.⁽⁴¹⁾

Propiedades de solubilidad de PHB.

Altamente soluble en:

Cloroformo	Etilencarbonato	Dimetilformamida
Diclorometano	Propilencarbonato	Etilacetato acetato
Di-,tri-, tetra-cloroetano	Trifluoroetano	Trioleina
Dicloroacetato	Anhidrido acético	Acido acético
Hidroxido de Sodio 1N	Alcoholes (con mas de 3 átomos de carbono)	

Muy Soluble en:

Dioxano	Tolueno
Octanol	Piridina

Insoluble en:

H ₂ O	Acidos minerales diluidos	Acetato de etilo
Metanol	Hipoclorito de Sodio	Etilmetilcetona
Etanol	Diétiler	Tetrahidrofurano
1-Propanol	Hexano	Etil formiato
2-Propanol	Benceno	Butil acetato
Ciclohexanol	Ciclohexano	Acido valérico
Tetracloruro de carbono		

2.8 Biosíntesis del PHB.

En las ultimas dos décadas se han hecho investigaciones sobre la síntesis del poliéster y la acumulación por microorganismos pertenecientes a diversos grupos taxonómicos. El biopolímero natural existe dentro del ácido hidroxialcanoico en donde se detecto.⁽⁵⁸⁾

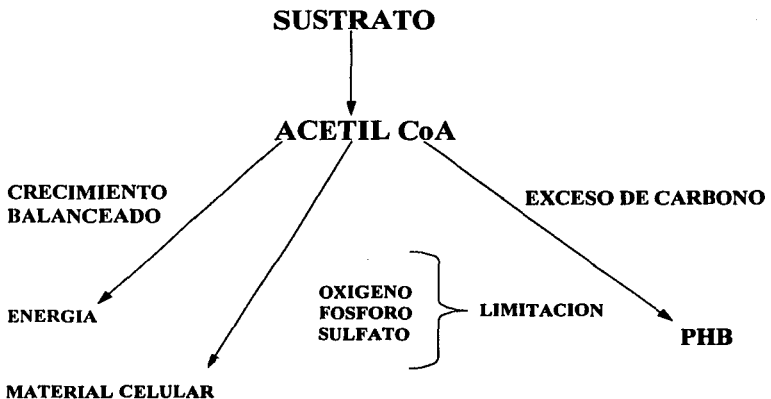
Las bases enzimáticas de la formación del PHB recaen en tres enzimas que son responsables para la acumulación del biopolímero (Fig. 3). Bajo condiciones de exceso de carbono, se inhiben los niveles de NADH y a su vez se inhibe citrato (ciclo del ácido tricarboxílico) y entonces los niveles

de acetil coenzima A aumenta. Para la producción de PHB, dos moléculas de acetil-CoA son condensadas por la enzima β -cetotilasa. Acetoacetil-CoA es subsecuentemente reducida por acetoacetil-CoA reductasa a 3-hidroxitubiril CoA el cual es polimerizado por PHB sintetasa para formar el poli- β -hidroxibutirato, posteriormente comienza la degradación del polímetro, que es controlada al terminar la oxidación del monómero 3-hidroxibutirato por la enzima 3-hidroxibutirato deshidrogenasa la cual va a estar sujeta al producto de inhibición por acetoacetato y NADH.^(4,11,12,13,41,46,47)

Los niveles reducidos de coenzima A libre inducen la condensación del Acetil CoA por medio de acetil-CoA acetiltransferasa se cataliza hacia acetoacetil CoA y por lo tanto el PHB puede ser formado. La enzima 3-cetotilasa es la enzima que controla la biosíntesis de PHB junto con la coenzima A, la cual es la llave del metabolito efector.^(4,11,12,13,41,46,47)

En esencia, la síntesis de PHB es un sistema de almacenamiento de carbono de forma que sea inerte osmóticamente; la síntesis del biopolímero también representa un método de neutralizar un metabolito ácido, ya que el grupo carboxilo libre del ácido β -hidroxibutírico es eliminado mediante la formación de enlaces éster entre las subunidades del biopolímero.^(4,11,12,13,41,46,47)

A



B

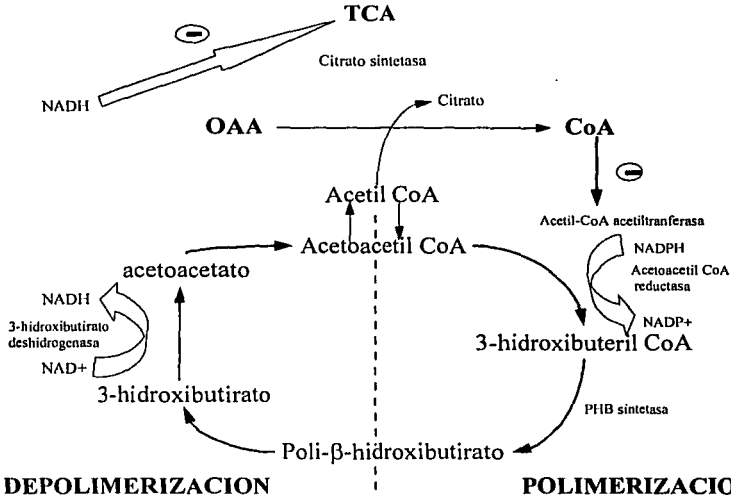


Fig. 3. Vía general de producción del PHB, A, enzimas involucradas en la biosíntesis y degradación del PHB, B.⁽¹³⁾

2.9 Obtención del PHB.

Un sin número de métodos se han empleado para la obtención del PHB, la mayoría de estos procesos de separación involucran a solventes que para recuperarlos incurre significativamente en el costo. Se han propuesto otros procesos de recuperación del PHB como la de digestión diferencial empleando hipoclorito de sodio (Willanson y Wilkinson 1958)⁽⁵⁹⁾; esto causa degradación severa del PHB, transformando al PHB no apto para diversas aplicaciones. En orden de ventajas de digestiones diferenciales y solventes de extracción, se ha usado la dispersión de hipoclorito de sodio y cloroformo (Tabla 6) para la obtención del PHB. La hidrofobicidad del PHB y la hidrofiliicidad de la membrana celular forman la base de esta técnica. El hipoclorito de sodio aísla al PHB de las células en la fase acuosa, entonces el PHB liberado migra inmediatamente hasta la

fase cloroformica, donde el cloroformo protege al PHB de una acción destructora por el hipoclorito.^(4,20,21)

Como una alternativa a los solventes, ha sido desarrollado por ZENECA métodos de digestión enzimática en medio acuoso.⁽²⁰⁾

Tabla 6. Papel que desempeñan el hipoclorito de sodio y cloroformo en la dispersión para la obtención del PHB.⁽²⁰⁾

Hipoclorito de sodio.	Cloroformo.
• Destrucción celular.	• Extracción de PHB.
• Control del peso molecular.	• Protección al PHB del hipoclorito.
• Digestión de material no PHB.	• Purificación.

2.10 Métodos analíticos para la determinación de PHB.

La determinación gravimétrica del PHB de liofilizado seguido de una extracción con cloroformo y precipitación con dietileter o acetona fue un prolongado método de estandarización. Un método simple para la determinación del PHB en biomasa bacteriana es el de disolver las células bajo condiciones controladas de temperatura y tiempo en una solución de hipoclorito de sodio. Bajo estas condiciones todo el material celular con excepción del PHB es completamente disuelto. Law y Slepecky (1960)^(50,51) describen la determinación por fotometría cuantitativa ($\lambda = 235 \text{ nm}$) según la conversión de la extracción provisional del PHB a ácido crotónico con H_2SO_4 concentrado. Además, el PHB puede ser determinado seguido de una extracción de células bacterianas por absorción infrarroja a $5.75 \mu\text{m}$ cuando el disolvente es el cloroformo (Juttner). Findlay y White en 1983 emplearon la cromatografía gas-líquido capilar junto con una fragmentografía espectral de masas para la identificación de poli-hidroxicanoatos aislados de *Bacillus megaterium*. Otros métodos como la pirólisis en combinación con cromatografía de gas, espectrometría de masas y espectrometría RMN-protón, fueron usados por Morikawa en 1981 para identificar y caracterizar bacterias poli-hidroxicanoatos de *Bacillus cereus* y *B. megaterium*.^(1,41)

2.11 Degradación y aplicaciones de polihidroxialcanoatos (PHA's).

Los biopolímeros de alto peso molecular juegan un papel importante en la naturaleza como elementos estructurales o como componente de almacenamiento (ej. celulosa y almidón). Otros polímeros de inmensa importancia para aplicaciones técnicas (ej. plásticos semejantes al polietileno o poliestireno), estos materiales plásticos en contraste con los biopolímeros tienen (ácidos nucleicos, proteínas y polisacáridos) casi ilimitado tiempo de vida. Desde entonces el primer desarrollo de plásticos en el principio de este centenario ha sido la meta de la industria y la ciencia (Tabla 7) para mejorar la resistencia de este material de los ataques microbianos.^(8,9)

Tabla 7. Posibles aplicaciones de los PHA's.⁽¹⁰⁾

-
- Películas, bolsas y recipientes.
-
- Portadores biodegradables para la dosificación de fármacos, medicinas, insecticidas y fertilizantes.
 - Artículos como navajas de afeitar, utensilios, pañales y productos de higiene femenina.
 - Alfileres quirúrgicos, suturas, grapas y torundas.
 - Estimulación en el crecimiento de los huesos.
 - Reemplazo de vasos sanguíneos
-

Recientemente, la ciencia y la industria se han enfocado en el desarrollo y aplicación de materiales plásticos biodegradables. Los plásticos biodegradables son definidos por la Sociedad Americana por Pruebas y Materiales como un plástico degradable en el cual la degradación resulta de la acción natural que ocurre por microorganismos semejantes a una bacteria, hongo y alga. En la naturaleza, los polímeros son degradados preferentemente por reacciones hidrolíticas. La biodegradación es influenciada por una serie de diferentes parámetros ambientales (Tabla 8). Los parámetros físicoquímicos y microbiológicos del ecosistema, las propiedades primarias del material y el procesamiento del material afectan la extensión de la biodegradación.^(8,9)

Tabla 8. Factores ambientales que influyen en la degradabilidad de los plásticos.⁽⁸⁾

Parámetros	Factores
Parámetros fisicoquímicos de un ecosistema	Temperatura pH Contenido de agua Contenido de oxígeno Potencial Redox Suministro de nutrientes Presencia de inhibidores
Parámetros microbiológicos de un ecosistema	Densidad de la población Diversidad microbiana Actividad microbiana Distribución espacial de microorganismos
Propiedades primarias del material	Composición del polímero Peso molecular Distribución del peso molecular Cristalinidad Temperatura de transición Porosidad Hidrofobicidad Configuración estérica
Procesamiento del material	Tipo de procesamiento Características de superficie Aditivos Fibras

2.11.1 Clasificación de plásticos biodegradables.

Los plásticos biodegradables pueden ser clasificados en varias categorías Fig. 5. El tipo de degradación (química, física, biológica) en primer criterio. La biodegradación tiene lugar bajo cualquier condición séptica o aséptica. Condiciones asépticas (condiciones estériles sin cualquier actividad microbiana) son requeridas para aplicaciones médicas. Los polímeros son degradados por reacciones hidrolíticas y/o bioreabsorbidos bajo estas condiciones. En contraste, los polímeros biodegradables para aplicaciones industriales son degradados bajo condiciones sépticas (sistemas con actividad microbiana) por la catálisis de microorganismos. Estos son dos tipos de materiales plásticos degradables microbianamente, es decir polímeros degradables completamente y polímeros consistentes un aditivo degradable y una matriz no degradable.^(8,9)

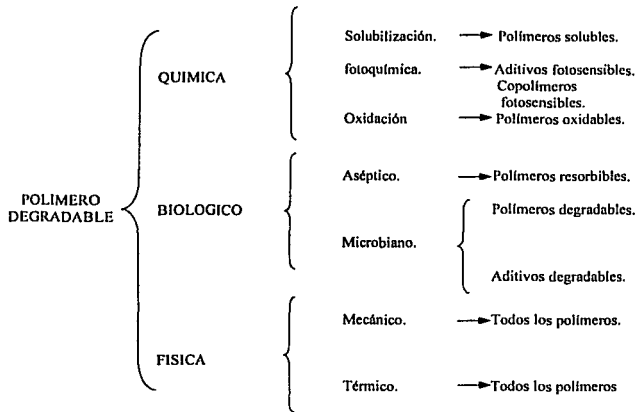


Fig. 4. Clasificación esquemática de plásticos degradables.⁽⁸⁾

2.11.2 PHA's que son plásticos biodegradables.

Los PHA's formados por bacterias han sido usados recientemente como plásticos biodegradables (Brandl et.al. 1990)⁽⁸⁾. Los PHA's son biopolímeros bacterianos y son formados cuando ocurre un almacenaje natural de poliéster en un gran número de microorganismos.⁽⁸⁾

Poli (3-hidroxibutirato) (P(3-HB)) es el representante mejor conocido de la familia de los PHA's. Los microorganismos son capaces de incorporar más de 60 tipos diferentes de monómeros dentro de los polímeros almacenados.⁽⁹⁾

Una serie de PHA's con diferentes composiciones monoméricas (i.e. diferentes propiedades físicas y químicas) pueden ser producidos para cualquier flexibilidad metabólica por un organismo particular para incorporar diferentes unidades de monómeros a la gran diversidad de microorganismos que pueden formar PHA's. En una escala bastante grande, los PHA's son producidos industrialmente por Zeneca Bio Products (Gran Bretaña) y es comercializado como un

plástico biodegradable bajo el nombre de Biopol. Este producto es un copolímero consistente de 3-HB y 3-hidroxivalerato (3HV) de unidades repetitivas.^(8,9,44)

2.11.3 Microorganismos degradantes de PHA's.

Existen solo unos pocos datos disponibles de la degradación extracelular de estos biopolímeros. Aunque las primeras investigaciones de la degradación de PHA por *Pseudomona spp.* fueron diseñadas a principios de los 60's, la siguiente Tabla 9 enlista a los microorganismos degradadores de P(3-HB) la cual ha sido drásticamente expandida.^(8,9)

Tabla 9. Microorganismos capaces de degradar a los PHA's.⁽⁸⁾

Organismo	Familia	Grupo
<i>Acidovorax facilis</i>	Procariote	Gram negativo
<i>Acidovorax delafieldii</i>	Procariote	Gram negativo
<i>Acremonium sp.</i>	Eucariote	Deuteromyceto
<i>Alcaligenes fecalis</i>	Procariote	Gram negativo
<i>Arthrobacter viscosus</i>	Procariote	Gram positivo
<i>Aspergillus sp.</i>	Eucariote	Ascomycetos
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Eucariote	Ascomycetos
<i>Aspergillus penicilloides</i>	Eucariote	Ascomycetos
<i>Bacillus megaterium</i>	Procariote	Gram positivo
<i>Bacillus polymyxa</i>	Procariote	Gram positivo
<i>Cephalosporium sp.</i>	Eucariote	Deuteromiceto
<i>Cladosporium sp.</i>	Eucariote	Deuteromiceto
<i>Comamonas testosteroni</i>	Procariote	Gram negativo
<i>Comamonas acidovorans</i>	Procariote	Gram negativo
<i>Citofaga johnsonae</i>	Procariote	Gram negativo

Información de microorganismos degradantes de PHA se ha hallado en sistemas marinos. Las bacterias aeróbicas Gram(+) así como las Gram (-), sabemos que tienen la habilidad para degradar PHA.^(8,9)

Aunque la degradación del PHA es extensiva en la naturaleza, enzimas depolimerizantes de solo un número limitado de organismos han sido descritos. Las depolimerasas de microorganismos anaerobicos aun no han sido caracterizados. En más casos el P(3-HB) ha sido usado como sustrato. Las depolimerasas atacan preferentemente PHAs con unidades de monómeros, otros con 3-HB han sido encontrados solo en dos organismos (Muller y Jendrosseck 1993; Schirmer et. al. 1993). Además del P(3-HB), depolimerasas de *Alcaligenes fecalis*, *Comamonas testosteroni*, *Pseudomonas lemoigne*, *Pseudomonas pickettii* y *Pseudomonas stutzeri* son capaces de usar homopolímeros de 4 hidroxibutirato como sustrato.^(8,9)

2.11.4 Técnicas para la determinación de biodegradación

Existen métodos diferentes y técnicos para determinar la degradabilidad de los materiales plásticos. Los métodos se basan en observaciones visuales de los materiales plásticos, determinados cuantitativos de crecimiento microbiano cuando los materiales plásticos son usados como fuentes de carbón, la utilización del polímero por microorganismos, determinación de cambios en las características del polímero durante incubación, y la determinación de actividades microbianas semejantes al consumo de oxígeno o producción de gas.^(8,9)

Solo un muy limitado número de métodos de laboratorio; puede ser aplicado en el campo o en pruebas "in situ". Resultados de pruebas de laboratorio pueden rara vez ser transferidos a condiciones en ecosistemas naturales por la complejidad de estos sistemas.^(8,9)

2.11.5 Aplicaciones de los PHA's.

Los PHA's pueden ser usados para muchas aplicaciones industriales y médicas (Tabla 10) en donde la biodegradación ofrece una ventaja selectiva sobre los tradicionales plásticos basados en la petroquímica. Sin embargo, corrientemente solo un muy limitado rango de artículos hechos de PHA están comercialmente disponibles. Mas de las posibles aplicaciones están bajo desarrollo.^(8,9)

Artículos hechos acerca de PHA's han anunciado que existe una biodegradación completa en ecosistemas naturales y son por lo tanto amigos del medio ambiente. Para todas las aplicaciones es importante determinar los plazos de vida de los materiales en medios ambientales específicos, para caracterizar los mecanismos de degradación, y para describir los microorganismos envueltos en la biodegradación. Una meta importante en futuras investigaciones es la evaluación ecotoxicológica (acumulación y toxicidad de intermediarios, y biocompatibilidad) de los materiales biodegradables usados.^(8,9)

Tabla 10. Producción industrial y aplicaciones de los PHA's.⁽⁴⁴⁾

Compañía	Área de interés
Berlin Corp.	Botellas hechas del BIOPOL.
Biociencia Ltd. (Finlandia)	Aplicaciones médicas.
Bioventura. (Canada)	Producción de PHA's por recombinantes.
Metabolix, Inc. (USA)	Producción de PHA's, plantas transgénicas <i>Arabidopsis thaliana</i> .
ZENECA (UK)	Producción de P(3HB) y P(3HB-co-3HV) por cultivo en lote de <i>Alcaligenes eutrophus</i> .
ZENECA (UK)	Producción de PHA's, plantas transgénicas <i>Arabidopsis thaliana</i>

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general.

- Obtener y cuantificar el biopolímero poli- β -hidroxibutirato (PHB) de diferentes cepas del género *Rhizobium*.

3.1.2 Objetivos particulares.

- Identificar la presencia del PHB en especies del género *Rhizobium* por diferentes métodos cualitativos.
- Determinar la fase de crecimiento y donde se lleva a cabo la mayor producción del PHB.
- Estandarizar un método que permita llevar a cabo la cuantificación del PHB, por medio de espectrofotometría en U.V.
- Evaluar los medios de cultivo y determinar en cual de ellos se tiene la máxima producción de PHB.

4. JUSTIFICACIÓN.

Debido al agotamiento de los recursos naturales no renovables como el petróleo y la búsqueda de alternativas que sustituyan el uso de plásticos obtenidos de la industria petroquímica y el papel que juegan estos como un contaminante del medio ambiente se ha propuesto, como una alternativa, el uso de bioplásticos producidos por bacterias, los cuales tiene como principal característica ser biodegradables, por lo tanto el presente trabajo se realizará para obtener un bioplástico el cual es de gran interés a nivel industrial.

5. MATERIAL Y EQUIPOS.

Material biológico. *Rhizobium loti*, *Rhizobium phaseoli*, Acido poli-β-hidroxibutirato de *Alcaligenes sp.*

El material que se utilizara para el presente trabajo se menciona en el siguiente cuadro a excepción del material de vidrio que es de uso común.

Equipos e Instrumentos.	Reactivos.	Medios.
<ul style="list-style-type: none"> • Incubadoras de 30° y 60° C • Potenciómetro. • Incubadora con agitación (New Bruns Wick Scientific Co. Inc). • Espectrofotómetro Beckman • Centrifuga Sorvall (RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge).. • Vortex. • Espectrofotómetro CARY 13E en U.V. • Termómetros Graduados • Microscopio (olympus) • Autoclaves 	<ul style="list-style-type: none"> • Tinción de Gram. • Alcohol isopropílico. • Reactivo de Bradford. • Solución digestora.^(*) • Hielo seco. • Acetona. • Hipoclorito de sodio al 6% y 30%. • Cloroformo • Metanol. • Ácido sulfúrico. • Agua destilada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Medio rojo congo.^(*) • Medio base.^(*) • Medio base líquido.^(*) • Medio Rl líquido.^(*) • Medio Rp líquido.^(*) • Medio EPS Rp líquido.^(*)

^(*) La composición de los medios se mencionan en el Apéndice

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología, ubicado en la unidad de posgrado, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan Campo 1, UNAM.

6.1. Purificación y caracterización de las cepas de trabajo del género *Rhizobium*.

Las cepas de trabajo fueron *R. phaseoli* y *R. loti* las cuales se sembraron en cajas petri con medio rojo congo de primo aislamiento del género *Rhizobium* (ver apéndice)^(40,52), las cajas se incubaron a 30°C por 5 días. Del crecimiento anterior se resembró en cajas con medio base (ver apéndice)^(40,52), cada uno de las cepas de trabajo y se incubó a 30°C por 3 días, posteriormente se realizó la caracterización e identificación de la cepa de a través de pruebas bioquímicas, motilidad, Gram.

6.2. Inóculo de crecimiento y producción de biomasa:

Una vez purificadas las bacterias se siembran en medio base cada una de las cepas incubándose durante 5 días a 30°C; a partir de este crecimiento se preparó un inóculo en 2 matraces Erlenmeyer de 500 ml con 150 ml de medio de cultivo líquido base (ver la formulación en el apéndice)^(40,52). Los matraces fueron incubados en agitación por 3 días a 30°C a 200 rpm.

Se hicieron cinéticas de crecimiento por duplicado en matraces Erlenmeyer de 1000ml con 300ml de medio líquido que contenía el medio específico para cada cepa (con medio base líquido, medio RI líquido, medio Rp líquido y con medio para producción de exopolisacárido de Rp), agregándoseles 10ml del inóculo anterior y se incubaron a 30°C con agitación constante de 200 rpm durante 12 días. Para realizar las cinéticas de producción se determinó la densidad óptica a una $\lambda = 600$ nm, se tomaron 10ml del medio cada 24 hrs y se leyó en un espectrofotómetro, realizando diluciones de la muestra cada vez que fuera necesario durante los 12 días que dura la cinética.

6.3. Aislamiento y cuantificación del biopolímero exopolisacárido (EPS).

El aislamiento y cuantificación del EPS se realizó después de haber leído la muestra a 600 nm, esta se centrifuga a 15 000 rpm a 4°C durante 25 minutos al sobrenadante se le adiciona 3 veces su volumen de alcohol isopropílico frío para precipitar el EPS, una vez obteniendo el biopolímero se

seco a 60°C (método de peso seco utilizando papel filtro) para obtener el rendimiento en (g/l).

6.4. Cuantificación de proteínas (método de Bradford).

La cuantificación de proteínas se hizo para cada una de las muestras por medio del método de Bradford, el cual en resumen se realiza de la siguiente forma:

Preparación del reactivo.

- 100 mg de azul brillante de Comassie.
- 50 ml de etanol al 95%.
- 100 ml de ácido fosfórico al 85%.
- llevar a 1000 ml con agua destilada.

Se disuelven 100 mg de azul de Comassie G-250 en 50 ml de etanol al 95%, a esta solución se le adicionan 100 ml de ácido fosfórico al 85% y se lleva a un litro.⁽⁷⁾

Preparación de los estándares de proteínas.

Se prepara un estándar de albúmina al 0.01% y se utiliza para realizar la curva de calibración la cual se detalla en la Tabla 11.

Tabla 11. Preparación de los estándares para la curva de calibración.

Sistemas	0	1	2	3	4	5
Soln. Stock Albúmina al (0.01%) µl	0	200	400	600	800	1000
Agua destilada (ml).	1.0	0.8	0.6	0.40	0.20	0
Reactivo de Bradford (ml).	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Concentración (µg/µl)	0	20	40	60	80	100

Cuantificación de proteínas para las muestras.

El paquete celular es resuspendido en 9 ml de H₂O destilada y se mezcla por inversión o usando un vortex, se transfiere en un tubo de ensayo de 12x100 mm, 1 ml de la solución (que contiene el paquete celular) y 1 ml de solución digestora (Tris HCl 0.5M pH=6.8) los cuales son sometidos a calentamiento a 100°C por 10 min. en baño de agua. Una vez terminada la digestión se toma 0.1 ml de la solución ya digerida y se agregan 5 ml del reactivo de Bradford homogenizando (por inversión). Posteriormente se lee la absorbancia a $\lambda = 595$ nm, después de 2 minutos y antes de una hora calculando la concentración de proteínas de las muestras por interpolación en una curva patrón. El blanco deberá contener 0.1 ml del buffer adecuado y 5 ml del reactivo de Bradford.⁽⁷⁾

6.5. Obtención del PHB. (método cualitativo).

Ensayo para la recuperación del PHB.

A estos tratamientos sé sometio a cada una de las muestras con que se trabajó:

Choque Térmico:

El paquete celular es diluido con agua desionizada y tratado en varias ocasiones a congelación-descongelación (con hielo seco y acetona) y calentamiento hasta destruir la membrana de las células, posteriormente se le agrega cloroformo al paquete y se incuba por 24 hrs, una vez terminado el tiempo de incubación se filtra la muestra a vacío y al filtrado se le adicionan 5 ml de metanol, dejándola reposar hasta observar una precipitación.⁽⁴⁴⁾

Usando hipoclorito de sodio comercial, cloroformo y metanol:

El paquete celular se le adiciona una solución de hipoclorito de sodio comercial (para destruir la membrana celular) e inmediatamente después se le agrega 5 ml de cloroformo se incuba a 37°C por 24 hrs, después de haber transcurrido este tiempo la muestra se filtra y al filtrado se le adicionan 5 ml de metanol dejar reposar hasta formación de un precipitado.^(10,21,44,55)

Empleando una dispersión de hipoclorito de sodio al 30%-cloroformo y metanol:

Después de lavar el paquete celular se coloca en un tubo de ensaye de 20 ml. se le adicionan 10 ml de una solución (1:1) de hipoclorito de sodio al 30% y cloroformo (dispersión) se incuban a 37°C por espacio de una hora. Una vez terminado el tiempo de incubación se centrifuga la muestra a 8000 rpm. durante 10 minutos, obteniéndose 3 fases, la de hipoclorito de sodio, restos celulares y la clorofórmica, la cual se extrae con una pipeta Pasteur para después ser filtrada. Al filtrado se le adicionan 5 ml de metanol frío se incubaba a 4°C hasta observar un precipitado. ^(4,20,21,44,55)

6.6. Ensayo en U.V. para la identificación del PHB.

Una vez obtenido el biopolímero este se compara con un estándar de ácido Poli-β-hidroxibutírico de *Alcaligenes sp.*

Se pesan cantidades equivalentes de estándar y muestra las cuales son sometidas a una digestión con 1 ml de H₂SO₄ concentrado a 100° C por 10 minutos (mismo tratamiento deben tener los blancos). Después de cumplirse la digestión se enfrían las muestras, el estándar y el blanco en hielo o ha temperatura ambiente. Se toman diferentes cantidades de muestra y estándar en µl (40, 60, y 80) formando dos filas, a la primera fila se le adiciona 10 ml de H₂O destilada y a la segunda fila se le agregan 10 ml de H₂SO₄ concentrado. Estas muestras se utilizaron para realizar un barrido en el intervalo de U.V. y comparar si la muestra tiene el mismo comportamiento que el estándar. ^(50,51,55)

6.7. Cuantificación del PHB por espectrofotometría en U.V.

Estos tratamientos se les hizo a cada una de las muestras trabajadas:

El precipitado obtenido de la dispersión fue tratado con 1 ml H₂SO₄ concentrado y es sometido a calentamiento en un baño de agua a 100°C durante 10 minutos con el propósito de convertir al PHB a ácido crotónico, se enfría la muestra , la digestión de PHB es diluida 1:10 v/v con agua destilada y las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a una $\lambda = 209 \text{ nm}$. ^(50,51,51)

El valor obtenido es interpolado en una curva de calibración donde se utilizo un estándar de PHB para obtener la concentración de PHB en g/l presentes en las muestras.

El siguiente diagrama desglosa en resumen la metodología a seguir para la obtención y cuantificación del PHB.

7. DIAGRAMA DE FLUJO

Purificación y caracterización de *Rhizobium loti* y *Rhizobium phaseoli*



Producción del biopolímero en medio de cultivo líquido.



Realizar una cinética de crecimiento y producción tomando muestras cada 24 hrs. durante 12 días



Centrifugar la muestra a 15000 rpm. por 15 min. a 4°C

Paquete celular

Sobrenadante



EXOPOLISACÁRIDO (EPS)

Proteínas (BRADFORD)

Obtención del biopolímero

Choque térmico

Hipoclorito de sodio comercial

Dispersión clorofórmica

Identificación y Cuantificación por espectrometría U.V.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. Caracterización de las cepas de trabajo.

Los resultados de las pruebas realizadas para la identificación de las cepas del género *Rhizobium* se resumen en la Tabla 12 estos resultados nos permiten confirmar las características del género (morfologías, motilidad, temperatura).^(33,40,52)

Tabla 12. Identificación de las cepas de trabajo.

Pruebas	<i>Rhizobium loti</i>	<i>Rhizobium phaseoli</i>
Tinción de Gram	-	-
Motilidad	+	+
Morfología	Bacilo	Bacilo
Producción de ácido	+	+
Reacción de leche tornasolada	Días	Días
Huésped ⁽³⁶⁾	<i>Lotus corniculatus</i>	<i>Phaseoli vulgaris</i>
Aislamiento de nódulos del huésped ⁽³⁶⁾	+	+

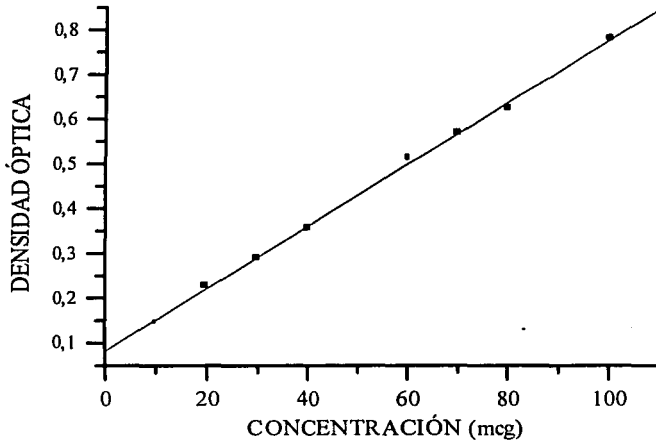
8.2. Curva estándar de proteínas (método de Bradford).

Para determinar la concentración de proteínas en las muestras se hizo una curva estándar (por triplicado) la cual se muestra en la Gráfica 1 los valores promedio de esta curva se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores obtenidos para la curva estándar de proteínas.

(PROTEÍNAS) μg	ABSORBANCIA A 595 nm
0	0
20	0.227
40	0.355
60	0.515
80	0.625
100	0.783

CURVA ESTÁNDAR DE PROTEÍNAS



Grafica 1. Curva estándar empleada para determinar la concentración proteica de las diferentes especies del género *Rhizobium* cuyos valores de regresión lineal son los siguientes:

$r^2 = 0.9983$
 $m = 0.00674$
 $b = 0.0864$

8.3. Obtención del PHB. (método cualitativo).

Los datos de la Tabla 14 representan la cantidad de precipitado obtenido empleando los diferentes procesos para la extracción del biopolímero.

Tabla 14. Obtención de PHB empleando diferentes métodos de extracción.

Bacteria	Hipoclorito + CH ₃ OH	Choque Térmico + CH ₃ OH	Dispersión + CH ₃ OH
Rl	++	+	+++
Rp	++	+	+++

Rl = *Rhizobium loti*
 Rp = *Rhizobium phaseoli*

+ = Poco precipitado.
 ++ = Precipitado moderado
 +++ = Precipitado abundante.

El uso de hipoclorito de sodio junto con el cloroformo (dispersión cloroformica reduce significativamente el tiempo de obtención y la degradación del PHB^(20,21) mostrándose esto con la formación de un precipitado), procurando tener cuidado en el % de hipoclorito de sodio a usar, la temperatura y tiempo de incubación. así como la temperatura de precipitación del PHB en metanol a 4°C.^(41,47)

8.4. Identificación del PHB.

La Tabla 15 representan los valores de absorbancia tanto del estándar como de las muestras y la comparación de dichos valores entre ambos.

Tabla 15. Absorbancia del estándar y las muestras a las mismas longitudes de onda en H₂SO₄ concentrado y H₂O.

Muestra en (μl)	Longitud de onda (nm)	Absorbancia	Diluyente
STD 80	209	1.0869	H ₂ O
RI 80	209	0.4656	H ₂ O
STD 80	235	1.5580	H ₂ SO ₄ conc.
RI 80	235	0.6026	H ₂ SO ₄ conc.
STD 60	209	0.6152	H ₂ O
Rp 60	209	0.2875	H ₂ O
STD 60	235	1.2545	H ₂ SO ₄ conc.
Rp 60	235	0.5248	H ₂ SO ₄ conc.

STD = Estándar de ácido poli-β-hidroxi-butyrico de *Alcaligenes spp.*

RI = *Rhizobium loti*.

Rp = *Rhizobium phaseoli*.

H₂O = Agua

H₂SO₄ conc. = Ácido sulfúrico concentrado.

Los datos representados en la Tabla 15 se muestran en el espectro de la Fig. 5

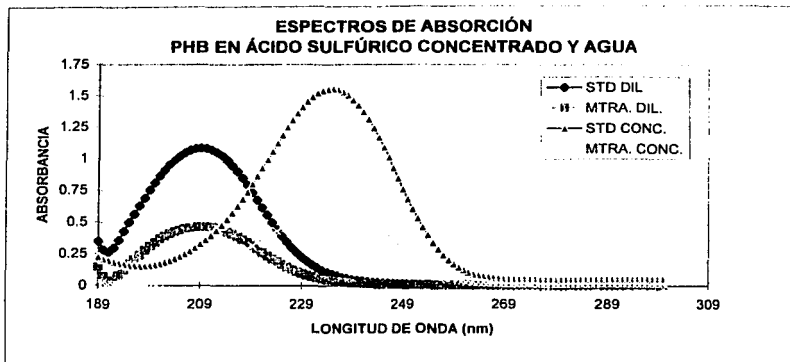


Figura 5 . Análisis de PHB por espectrofotometría en U.V.

8.4.1. Espectro de absorción.

En el espectro de absorción mostrado en la Fig 5 coinciden con lo reportado por Sun, Cao y colaboradores(1994)⁽⁵⁵⁾ entre el estándar y las muestras, esta similitud se observa en el pico máximo reportado tanto a 210 nm como a 235 nm.^(50,51,55)

Las diferencias que se observan en los valores de absorbancia entre el estándar y las muestras son proporcionales, pero en el espectro no se ve reflejado, estas diferencias pueden deberse a que el PHB tiene una estructura y pureza que dependen de algunos factores tales como:

- El método de aislamiento (extracción de gránulos de PHB de la biomasa procariótica).
- Agotamiento o fatiga del uso bacteriano (muerte bacteriana).
- El tipo de sustrato (fuente de carbono) empleado.
- Y algunos otros factores que fueron limitando el crecimiento.^(41,56)

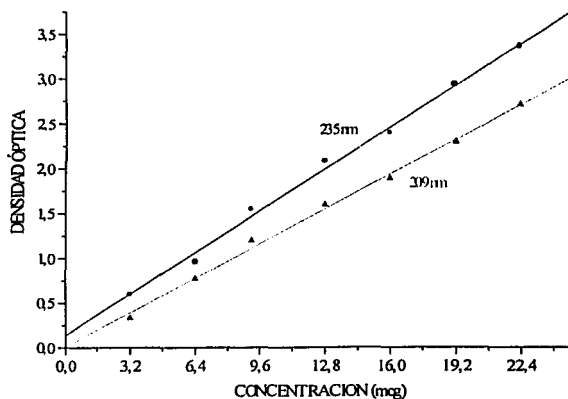
8.5 Curva estándar del PHB.

Valores obtenidos de densidad óptica del PHB a dos λ (209 y 235 nm) y en dos diluyentes (H_2SO_4 concentrado y H_2O).

Tabla 16. Valores de D.O. obtenidas para la cuantificación de PHB (curva estándar).

Densidad óptica utilizando H_2SO_4 conc. a una $\lambda= 235$	Densidad óptica utilizando H_2O a una $\lambda= 209$
0.6028	0.3308
0.9608	0.7730
1.5488	1.1987
2.0802	1.5932
2.3893	1.8840
2.9289	2.2928
3.3582	2.7071

CURVA ESTÁNDAR DE PHB



Gráfica 2. Curva estándar de PHB.

8.5.1. Curva estándar de PHB.

La realización de las curvas estándar permitió observar el comportamiento del PHB a dos diferentes longitudes (209 y 235 nm) para cuantificar la cantidad de PHB.

8.5.2. Curva estándar de PHB utilizando H₂O como diluyente:

Esta curva refleja un comportamiento lineal, indica que el PHB al ser sometido a una digestión con H₂SO₄ concentrado es convertido a ácido crotonico⁽⁶⁵⁾, se ve reflejado en el aumento de la D.O. con respecto a la concentración del estándar.

8.5.3. Curva estándar de PHB utilizando H₂SO₄ conc. como diluyente:

Esta curva también presenta un comportamiento lineal indica que el PHB a la digestión con H₂SO₄ concentrado es convertido a ácido crotonico⁽⁶⁵⁾ lo cual se observa en el aumento de la D.O. Ambas curvas son buenas pero se decidió tomar la primera debido principalmente a la manipulación de las muestras, riesgo, rapidez y costo.

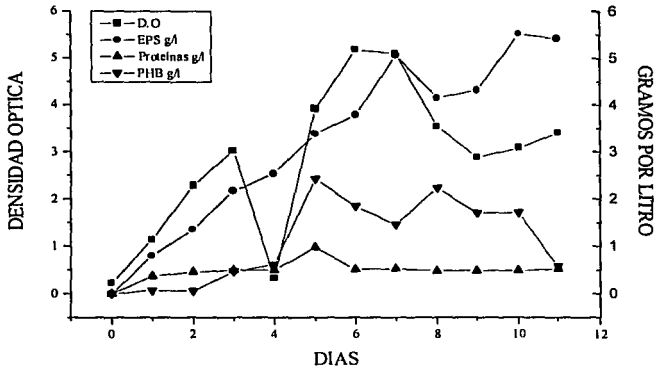
8.6. Cuantificación de los metabolitos obtenidos en la cinética de crecimiento (D.O.) y producción (g/l) para *Rhizobium. loti*.

En las Tablas 17-18 y Gráficas 3-4 se presentan los resultados de los cambios en densidad óptica y g/l (EPS, proteínas y PHB) en los diferentes días o tiempo de crecimiento, para las especies de *Rhizobium. loti*.

Todos los valores mostrados en las tablas fueron el resultado de los promedios de cada cinética.

Tabla 17. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para *Rhizobium. loti* en medio base.

Día	Densidad óptica	EPS g/l	Proteínas g/l	PHB g/l
0	0.23	0	0	0
1	1.14	0.8	0.3714	0.07084
2	2.27	1.35	0.4572	0.05428
3	3.02	2.16	0.4978	0.4678
4	3.28	2.54	0.4977	0.6089
5	3.92	3.38	0.978	2.4244
6	5.18	3.79	0.5079	1.8404
7	5.10	5.07	0.5282	1.4493
8	3.54	4.15	0.4767	2.2271
9	2.88	4.31	0.4898	1.6926
10	3.08	5.52	0.4833	1.7014
11	3.41	5.42	0.5227	0.5752



Gráfica 3. Cinética de crecimiento y producción de *Rhizobium loti* en medio base, se representa la biomasa (densidad óptica), la producción de exopolisacárido, proteínas y PHB en gramos por litro.

8.6.1. Evaluación de D.O. en medio base para *Rhizobium loti*.

Las gráficas reflejan que para medio base los días donde se observa la máxima D.O. son el 6 y 7 esto nos indica que la bacteria tuvo una adaptación más rápida en el medio base esto puede deberse a que la bacteria es de crecimiento rápido además de que el preinóculo utilizado para el trabajo se obtuvo de medio base por ende este crecimiento.^(1,41)

No se percibe algún cambio en el medio (color, viscosidad), indicando que la bacteria presente problemas para poder crecer y reproducirse en el transcurso de la cinética.

8.6.2. Evaluación de EPS en medio base *Rhizobium loti*.

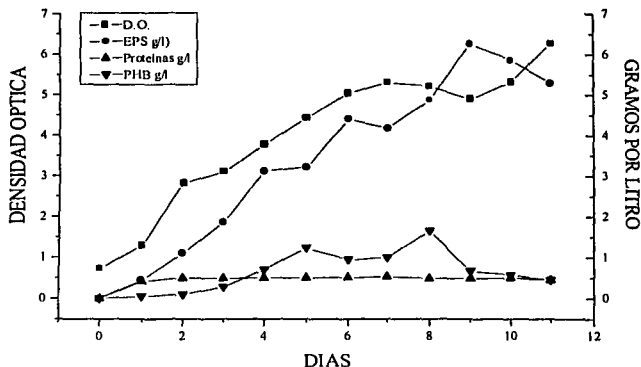
La mayor producción de EPS en medio base se da en los días 6 y 7 esto se esperaba debido a que el EPS es un metabolito secundario; el cual tiende a aumentar su producción en la fase estacionaria y es excretada al medio.

8.6.3. Evaluación de PHB en medio base *Rhizobium loti*.

La mayor cantidad de PHB producido por RI en medio base se encuentra en los días 5 y 8 que representa el inicio de la fase estacionaria⁽⁴⁾, transcurriendo la cinética hay disminución de la cantidad de PHB debido a que como se ha dicho el PHB es un material de reserva y como tal la bacteria la aprovecha como fuente de carbono o nutriente, esto se observa por el aumento y disminución de la D.O. y en la disminución en la producción de PHB.⁽⁵⁷⁾

Tabla 18. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para *Rizobium. loti* en medio óptimo.

Día	Densidad óptica	EPS g/l	Proteínas g/l	PHB g/l
0	0.725	0	0	0
1	1.29	0.44	0.4151	0.0463
2	2.82	1.1	0.4936	0.09644
3	3.1	1.86	0.4832	0.2736
4	3.78	3.13	0.4978	0.7018
5	4.434	3.21	0.4977	1.2342
6	5.05	4.41	0.5100	0.9495
7	5.3	4.18	0.5260	0.9985
8	5.22	4.88	0.4862	1.6495
9	4.89	6.26	0.4789	0.6673
10	5.32	5.87	0.4971	0.5704
11	6.27	5.29	0.4499	0.4507



Gráfica 4. Cinética de crecimiento y producción de *Rhizobium loti* en medio óptimo, se representa la biomasa (densidad óptica), la producción de exopolisacárido, proteínas y PHB en gramos por litro.

8.6.4. Evaluación de D.O. en medio óptimo para *Rhizobium loti*.

La Gráfica 4 muestra para el medio óptimo los días donde se observa la mayor D.O. son el 7 y 11 este comportamiento predice que la bacteria no tuvo problemas para duplicarse en el medio óptimo obtenido en el medio base.

Una observación en la Gráfica 3 y 4 es que a la D.O. en el medio base es mayor que en el medio óptimo lo que lleva a pensar en los componentes del medio aún siendo los mismos no están en la misma proporción, también se observa una disminución y aumento en la D.O. y esto se debe a la disminución de nutrientes que conlleva a este comportamiento.^(1,41)

No se percibe algún cambio en el medio (color, viscosidad), indicando que la bacteria presente problemas de crecimiento y reproducción en el transcurso de la cinética.

8.6.5. Evaluación de EPS en medio óptimo para *Rhizobium loti*.

La mayor producción de EPS en medio óptimo se da en los días 6 y 9 y de acuerdo a que el EPS es un metabolito secundario, este tiende a aumentar en la fase estacionaria al ser considerado como un material que la propia célula expulsa al medio.

En las dos cinéticas para R1 tanto en medio base como en medio óptimo el comportamiento del EPS y la D.O. después de la fase estacionaria es inverso esto se puede observar en las gráficas 3 y 4 que nos muestra que después del día 8 la biomasa disminuye y el EPS aumenta, el aumento del EPS se debe a gran parte a que la bacteria no puede utilizarlo para su beneficio este se va acumulando.

8.6.6. Evaluación de PHB en medio óptimo para *Rhizobium loti*.

La mayor cantidad de PHB producido por R1 en medio óptimo se encuentra en los días 5 y 8 que es representativo de la fase estacionaria en la cinética, transcurriendo la cinética hay disminución de la cantidad del PHB de acuerdo a la definición que se le da al PHB como un material de reserva que como tal la bacteria la va aprovechando,^(1,41) esto se observa por el aumento y disminución de la D.O. y en la disminución en la producción de PHB. En el medio óptimo es más notorio este comportamiento aclarando que la mayor cantidad de PHB se observa en el día 8.

La mayor presencia de PHB en el medio base se puede justificar a que el PHB es un ácido y el medio base no contiene ningún componente para el cual disminuya la producción de este ácido, al contrario del medio óptimo este contiene cloruro de calcio el cual tiene una función de amortiguador que no permite que el medio se acidifique por lo que el día de mayor producción de PHB se encuentre en el día 8 y no en el 5 y 8 como sucede en el medio base.^(1,41,52)

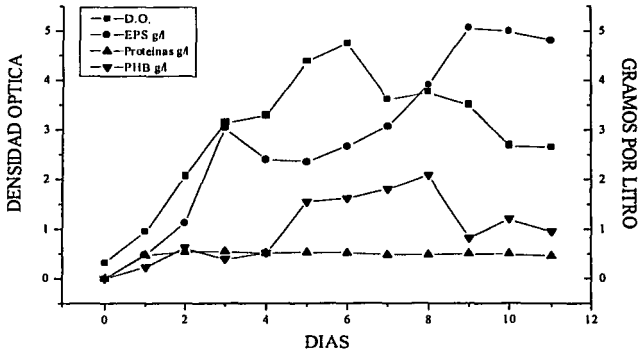
8.7. Cuantificación de los metabolitos obtenidos en la cinética de crecimiento (D.O.) y producción (g/l) para *Rhizobium phaseoli*.

En las Tablas 19-21 y Gráficas 5-7 se presentan los resultados de los cambios en densidad óptica y g/l (EPS, proteínas y PHB) en los diferentes días o tiempo de crecimiento, para las especies de *Rhizobium phaseoli*.

Todos los valores mostrados en las tablas fueron el resultado de los promedios de cada cinética.

Tabla 19. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para *Rhizobium phaseoli* en medio base.

Día	Densidad óptica.	EPS (g/l)	Proteínas (g/l)	PHB (g/l)
0	0.32	0	0	0
1	0.94	0.48	0.4670	0.2320
2	2.06	1.12	0.5390	0.6220
3	3.14	3.03	0.5485	0.3937
4	3.29	2.40	0.5122	0.5219
5	4.38	2.35	0.5253	1.5461
6	4.74	2.67	0.5151	1.6144
7	3.61	3.07	0.4784	1.8048
8	3.75	3.91	0.4883	2.0880
9	3.50	5.06	0.4999	0.8288
10	2.68	4.99	0.4995	1.2044
11	2.65	4.81	0.4956	0.9478



Gráfica 5. Cinética de crecimiento y producción de *Rhizobium phaseoli* en medio base, se representa la biomasa (densidad óptica), la producción de exopolisacárido, proteínas y PHB en gramos por litro.

8.7.1. Evaluación de D.O. en medio base para *Rhizobium phaseoli*.

En los resultados mostrados anteriormente se observa que para la cepa de *Rhizobium phaseoli* en un medio base la máxima D.O. obtenida se obtuvo el día 6 presentándose posteriormente una disminución de esta debido a que los nutrientes en el medio comienzan a agotarse, hasta llegar a una muerte celular, sin embargo podemos decir que la bacteria en este día logra alcanzar su máximo crecimiento.^(1,41)

8.7.2. Evaluación de EPS en medio base para *Rhizobium phaseoli*.

En la producción de EPS bacteriano en este medio de cultivo de acuerdo a la tabla 19 y la gráfica 5 se observa que el día 9 de la cinética se logra tener la máxima producción de este metabolito, comparado con la D.O. obtenida en este día se tiene que la bacteria se encuentra en su fase estacionaria de crecimiento en la cual las células ya no continúan creciendo (el crecimiento de los

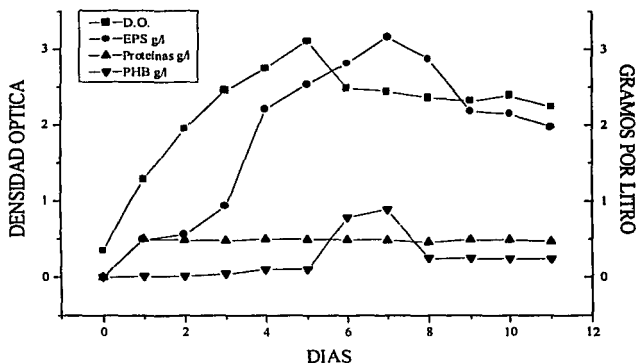
m.o) y por tanto la bacteria no requiere de ninguna fuente de nutrientes y debido a esto el EPS es excretado al medio de cultivo al no ser utilizado.

8.7.3. Evaluación de PHB en medio base para *Rhizobium phaseoli*.

Por otra parte en este mismo gráfico y tabla para el PHB se obtuvo una máxima producción el día 8 que comparativamente con las cinéticas de crecimiento bacteria, en este periodo la bacteria se encuentra en su fase estacionaria de crecimiento, por lo que cabe recordar que el PHB son inclusiones citoplasmáticas de lípidos las cuales se incrementan en la fase estacionaria de crecimiento, con el fin de usarse como fuente interna de carbono y energía, para ser utilizados cuando la bacteria lo requiera, mostrándose claramente este comportamiento en el gráfico.^(1,41,52)

Tabla 20. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para *Rhizobium phaseoli* en medio óptimo.

Día	Densidad óptica	EPS g/l	Proteínas g/l	PHB g/l
0	0.345	0	0	0
1	1.29	0.50	0.5001	0.0122
2	1.95	0.56	0.4885	0.0137
3	2.46	0.93	0.4755	0.0410
4	2.75	2.21	0.5044	0.1023
5	3.11	2.54	0.4929	0.1039
6	2.49	2.82	0.4943	0.7849
7	2.44	3.16	0.4842	0.8875
8	2.36	2.87	0.4610	0.2490
9	2.32	2.19	0.4929	0.2462
10	2.39	2.15	0.4900	0.2408
11	2.24	1.98	0.4668	0.2381



Gráfica 6. Cinética de crecimiento y producción de *Rhizobium phaseoli* en medio óptimo, se representa la biomasa (densidad óptica), la producción de exopolisacárido, proteínas y PHB en gramos por litro.

8.7.4. Evaluación de D.O. en medio óptimo para *Rhizobium phaseoli*.

En los resultados mostrados en la tabla 20 y gráfica 6 se tiene un valor máximo de D.O. obtenido en el medio de cultivo óptimo para crecimiento de *Rhizobium phaseoli*, fue el día 5, aunque en el gráfico se observa un crecimiento constante y un período de adaptación corto los resultados de D.O. obtenidos son bajos con respecto al medio base, lo cual se debió posiblemente al inóculo bacteriano proveniente de un preinóculo realizado en MB y al ser inoculado en el medio óptimo para Rp no lograron adaptarse algunas de las bacterias inoculadas al medio obteniéndose estos valores de D.O. bajos.^(1,41)

8.7.5. Evaluación de EPS en medio óptimo para *Rhizobium phaseoli*.

En los resultados de EPS obtenidos se puede ver que en el día 7 se encuentra la máxima producción de este, la producción se tiene cuando la bacteria se encuentra en la fase estacionaria de

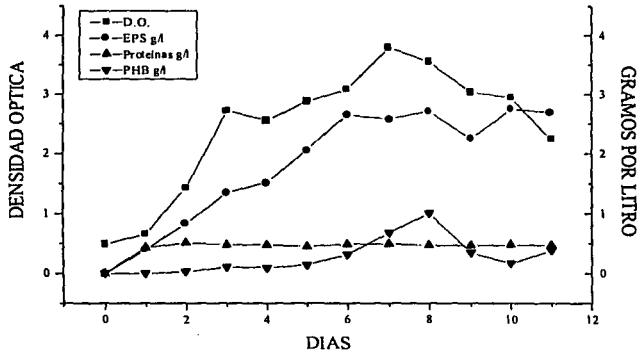
crecimiento la cual indica no hay requerimientos de nutrientes por parte de las bacterias y por lo tanto el EPS es excretado por estas.

8.7.6. Evaluación de PHB en medio óptimo para *Rhizobium phaseoli*.

En la producción de PHB utilizando el medio de cultivo óptimo, los resultados muestran su máxima producción en el día 7 que comparativamente con la D.O en este día se encuentra la fase estacionaria de crecimiento bacteriano confirmando de este modo que es un metabolito almacenado como fuente de carbono y energía en la fase estacionaria de crecimiento bacteriano ocurriendo posteriormente una disminución de este debido a que la bacteria lo utiliza al iniciar su fase de muerte.^(1,4)

Tabla 21. Valores obtenidos en la cinética de crecimiento y producción para *Rhizobium phaseoli* en medio para producción de exopolisacárido (EPS).

Día	Densidad Óptica	EPS g/l	Proteínas g/l	PHB g/l
0	0.4930	0	0	0
1	0.6570	0.4	0.4307	0
2	1.422	0.83	0.5108	0.0287
3	2.73	1.35	0.4810	0.1088
4	2.56	1.52	0.4774	0.0963
5	2.88	2.06	0.4514	0.1419
6	3.08	2.65	0.4891	0.3194
7	3.80	2.58	0.4954	0.6806
8	3.56	2.72	0.4738	1.0063
9	3.04	2.25	0.4644	0.3489
10	2.95	2.75	0.4787	0.1710
11	2.24	2.70	0.4688	0.3871



Gráfica 7. Cinética de crecimiento y producción de *Rhizobium phaseoli* en medio para producción de EPS, se representa la biomasa (densidad óptica), la producción de exopolisacárido (EPS) , proteínas y PHB en gramos por litro.

8.7.7. Evaluación de D.O. en medio para producción de EPS para *Rhizobium phaseoli*.

En la tabla 21 y gráfica 7 se muestran los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento de Rp en medio óptimo para la producción de EPS, se observa el máximo valor de D.O. se tiene al día 7, en este medio los valores de D.O. también son bajos comparativamente a los obtenidos en MB. Por lo tanto podemos decir que igualmente no se logra una adecuada adaptación al medio.

8.7.8. Evaluación de EPS en medio para producción de EPS para *Rhizobium phaseoli*.

En cuanto a la producción de EPS en este medio de cultivo se tiene que el día 8 es el día de mayor producción para nuestra bacteria, sin embargo los valores obtenidos en este caso no reflejan una alta producción con respecto a los otros medios de cultivo probados, sin embargo esta no es nula y al mismo tiempo podemos ver que la bacteria durante su crecimiento emplea a éste y llegando a la

fase estacionaria al no presentarse crecimiento celular fue expulsado pudiendo de esta manera obtener esta máxima producción.

8.7.9. Evaluación de PHB en medio para producción de EPS para *Rhizobium phaseoli*.

En este gráfico encontramos que la máxima producción de PHB se obtuvo el día 8 y 10, siguiendo el comportamiento ya conocido de estas inclusiones lipídicas funcionando como fuente de reserva de energía y carbono.^(1,41)

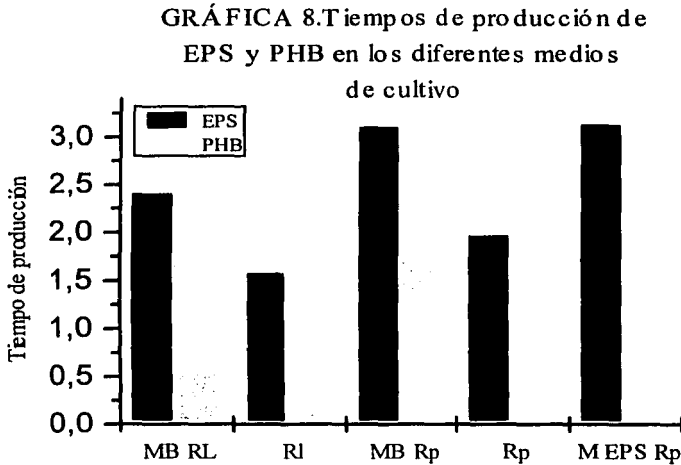
8.8. Tiempos de producción (tp)

La Tabla 22 muestra el tiempo de producción de los metabolitos obtenidos durante la cinética para las dos cepas de trabajo, las cuales se determinaron mediante las siguiente fórmula:

$$t_p = \ln 2 / \mu$$

Tabla 22. Tiempo de producción de EPS y PHB.

Medio.	EPS t_p g/l por día	PHB t_p g/l por día
MB R1	2.41	0.59
R1	1.59	0.81
MB Rp	3.12	1.99
Rp	1.98	0.88
M EPS Rp	3.15	1.26



Gráfica 8. El presente histograma nos representa la producción de los metabolitos a estudio de la cinética de crecimiento y producción en los diferentes medios de cultivo.

8.8.1. Evaluación de los tiempos de producción del EPS y PHB en los diferentes medios de cultivo.

En la tabla y gráfica anterior se observan los tiempos de producción tanto de *Rhizobium loti* como de *Rhizobium phaseoli*. Teniendo para *Rhizobium loti* en medio base el mejor tiempo de producción (tp) para PHB (0.59 g/l/día) y para EPS el medio óptimo ((1.59 g/l/día). Estos resultados eran esperados debido a la composición de los medios ya que el medio base se empleo para el mantenimiento de la viabilidad de la cepa y el medio óptimo para la producción de EPS.

Con respecto a *Rhizobium phaseoli* se observa que el medio óptimo se obtuvo en el medio Rp el mejor tiempo de producción para EPS (1.98 g/l/día) y el mejor tiempo de producción para PHB también se obtuvo en éste medio óptimo para Rp siendo de (0.88 g/l/día) lo que nos indica que este medio la bacteria tiene los nutrientes necesarios para excretar al medio el EPS y PHB y no hacer uso de el.

9. CONCLUSIONES.

- Se observó mayor precipitación por el método de dispersión clorofórmica.
- La mayor producción de PHB, se localizó en la fase estacionaria de crecimiento para las cepas de *Rhizobium loti* y *Rhizobium phaseoli*.
- Se determinó la λ máxima para cuantificar el PHB a 209 y 235 nm empleando una digestión con H_2SO_4 concentrado.
- La mayor producción del PHB (2.4244 g/l) en la cepa de *Rhizobium loti*, se obtuvo en el medio de cultivo base con un tiempo de incubación de 5 días, así como el mejor tp (0.59 g/l por hora).
- La mayor producción del PHB (2.0880 g/l) en la cepa de *Rhizobium phaseoli*, se obtuvo en el medio de cultivo RP con un tiempo de incubación de 8 días, el mejor tp se presentó en el medio óptimo (0.88 g/l por hora).

10. SUGERENCIAS.

- **Emplear diferentes fuentes de carbono y componentes del medio para determinar en cual de ellas se lleva acabo una mayor producción de PHB.**
- **Tomar como referencia los tiempos de producción para conformar una metodología en la cual se pueda prolongar la fase estacionaria para la producción del PHB.**
- **Emplear el pH como un factor a controlar en el transcurso que dura la cinética.**
- **Proponer otras pruebas físicas y químicas para la caracterización del PHB (punto de fusión, fuerza de tensión, extensión al rompimiento, tamaño de partícula, etc.).**
- **Emplear enzimas para disminuir el costo de obtención del PHB (eliminación de grandes cantidades de solventes).**

11. APENDICE

AGAR MEDIO BASE (MB)

COMPONENTES	g/l
K ₂ HPO ₄	1.66
MgSO ₄	0.76
NaCl	0.26
EXTRACTO DE LEVADURA	1.0
MANITOL	10.0
FeCl ₃	0.1
AGAR BACTERIOLÓGICO	20.0

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa.

Distribuir en matraces de 500 ml con 200 ml del medio y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH = 7.0

AGAR MEDIO BASE ROJO CONGO

COMPONENTES	g/l
K ₂ HPO ₄	1.66
MgSO ₄	0.76
NaCl	0.26
EXTRACTO DE LEVADURA	1.0
MANITOL	20.0
FeCl ₃	0.1
ROJO CONGO	0.002
AGAR BACTERIOLÓGICO	20.0

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa.

Distribuir en matraces de 500 ml con 200 ml del medio y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH = 7.0

AGAR MEDIO DE CULTIVO PARA *Rhizobium loti* (RI)

COMPONENTES	g/l
K ₂ HPO ₄	1.66
MgSO ₄	0.40
NaCl	0.10
EXTRACTO DE LEVADURA	1.50
MANITOL	25.0
FeCl ₃	0.10
AGAR BACTERIOLÓGICO	20.0

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa.

Distribuir en matraces de 500 ml con 200 ml del medio y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH = 7.0

MEDIO DE CULTIVO ÓPTIMO PARA *Rhizobium loti* (Rl)

COMPONENTES	g/l
K ₂ HPO ₄	1.66
MgSO ₄	0.40
NaCl	0.10
EXTRACTO DE LEVADURA	1.50
MANITOL	25.0
FeCl ₃	0.10
CaCO ₃	1.50

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua destilada.

Distribuir en matraces de 1000 ml con 300 ml del medio y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH = 7.0

AGAR MEDIO DE CULTIVO PARA *Rhizobium phaseoli* (Rp)

COMPONENTES	g/l
K ₂ HPO ₄	1.16
MgSO ₄	1.01
NaCl	0.10
EXTRACTO DE LEVADURA	1.50
MANITOL	10.0
FeCl ₃	0.15
AGAR BACTERIOLÓGICO	15.0

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, calentando lentamente hasta su disolución completa.

Distribuir en matraces de 500 ml con 150 ml del medio y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH = 7.0

MEDIO DE CULTIVO ÓPTIMO PARA *Rhizobium phaseoli* (Rp)

COMPONENTES	g/l
K ₂ HPO ₄	1.16
MgSO ₄	1.01
NaCl	0.10
EXTRACTO DE LEVADURA	1.50
MANITOL	10.0
FeCl ₃	0.15

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua destilada

Distribuir en matraces de 1000 ml con 500 ml del medio y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH = 8.0

MEDIO DE CULTIVO ÓPTIMO PARA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACARIDO *Rhizobium phaseoli* (EPS)

COMPONENTES	g/l
K ₂ HPO ₄	1.16
MgSO ₄	0.73
NaCl	0.10
EXTRACTO DE LEVADURA SACAROSA	0.76
	25.0
FeCl ₃	0.15
CaCO ₃	1.70

Preparación:

Disolver los componentes en un litro de agua destilada

Distribuir en matraces de 1000 ml con 500 ml del medio y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

pH = 8.0

COMPLEMENTO DEL MEDIO (EPS)

COMPONENTES	ml/cada 300 ml de medio (EPS)
Al ₂ (SO ₄) ₃	3.0 ml
FeCl ₃	3.0 ml
MnSO ₄	3.0 ml
BIOTINA ^(*)	1.0 ml
AMPICILINA	3.6 ml

Preparación:

Pesar 342.15 mg de Al₂(SO₄)₃ y diluir en 100 ml de agua destilada.

Pesar 676.00 mg de MnSO₄ y diluir en 100 ml de agua destilada.

Pesar 270.20 mg de FeCl₃ y diluir en 100 ml de agua destilada.

(*) Esterilizar a 101 lb por 10 minutos.

SOLUCIÓN DIGESTORA

COMPONENTES

TRIS 0.5, pH = 6.8	1.0 ml
AGUA DESTILADA	4.0 ml
GLICEROL	0.8 ml
SDS AL 10% EN AGUA DESTILADA	1.6 ml
2-β-MERCAPTOETANOL	0.4 ml
AZUL DE BROMOFENOL	0.2 ml

AMORTIGUADOR TRIS-HCl 0.5 pH = 6.8

COMPONENTES

TRIS-BASE

g/l

6.0

Ajustar a pH = 6.8 con HCl 1N

Llevar a 100 ml con agua destilada y almacenar a 4°C

12. REFERENCIAS

1. Anderson J. A., Dawes A. E. 1990. Occurrence, Metbolism, Metabolic Role, end Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiological Reviews. Vol 54: 450-472.
2. Baptist, J, N. Process for preparing poly- β -hydroxybutyric acid. U.S. Patent 3,044,942
3. Beijerinck, M. W. 1888. Bot.Ztg. 446. 725
4. Berger,E., Ramsay, B.A.,Chavarie, C. 1989. Recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. Rev. 103: 269-278.
5. Bogensberger, B. 1985. Ph. D. Thesis, Technische Universitat Graz. Austria.
6. Bourque D.,Pomerleua Y.,Groleau D.,1995. High-cell-density production of poli- β -hidroxybutirate (PHB) from methanol by Methylobacterium extorques: production of high-molecular-mass PHB.Appl Microbiol biotechol. vol 44: 367-376.
7. Bradford, M., 1985. A rapid an sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 151:369-374.
8. Brandl H., Bachofen R., Mayer J. and Wintermantel E. 1995. Degradation and applications of polyhydroxyalkanoates. Can. J. Microbiol. Vol 41. (Suppl.1): 143-153.
9. Brandl, H; and Puchner, P. 1992. Biodegradation of plastic bottles made from "biopol" in an aquatic ecosystem under *in situ*

10. Buchanan, R.E. and Gibbens, N.E., 1975. *Bergey's manual of Determinative bacteriology*, eighth Edition; The Williams and Wilkins Company/Baltimore: pp. 261-264.
11. Byrom, D. (ed). 1991. *Biomaterials: novel materials from biological source*. Stockton, New York.
12. Byrom, D. 1994. Polyhydroxyalkanoates, pp 5-33 In: D.P. Mobley (ed). *Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymers precursors*. Hanser Munich.
13. Byron D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: Technology and economic. *TIBIECH-September* vol. 5: 246-250.
14. Chang, H, N. 1994. Biodegradable plastic and biotechnology, pp 24-30. In: W.K.Teo, M.G. S. Yap, and S. K. W. Oh (eds) *Better living through innovative biochemical engineering*. Continental, Singapore.
15. Chum, H. L. (ed.) 1991. *Polymers form biobased materials*. Noyes Data Corporation, Park Ridge, NJ.
16. Dawes, E. A. (ed.). 1990. *Novel biodegradable microbial polymers*, Kluwer, Academic, Dordrecht, the Netherlands.
17. Doi, Y. 1990. *Microbial polyesters*. VCH, New York.
18. Elkan H. G. 1992. Taxonomy of the rhizobia. *Can. J. Microbiol.* Vol. 38: 446-450.
19. Fuerst, R., 1984: *Microbiología de Frobisher y Fuerst*, 14ª Edición; Nueva Editorial Interamericana; pp. 155-157.

20. Hahn K. S., Chang K. Y., Kim S. B and Chang N. H. 1994. Optimization of Microbial Poly (3-hydroxybutyrate) Recovery Using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 44: 256-261.
21. Hahn K. S., Chang K. Y., Kim S. B and Chang N. H. 1994. The recovery of Poly (3-hydroxybutyrate) by using Dispersions of Sodium Hypochlorite Solution and Chloroform. *Biotechn. Tech.* 7: 209-212.
22. Harrison, S.T; Chase, H. A; Dennis, J. S. 1991. The disruption of *Alcaligenes eutrophus* by high pressure homogenisation: key factors involved in the process. *Bioseparation* 2: 155-166.
23. Holmes, P. A; Lim, G. B. 1990. Separation process. U.S. Patent 4,910,145.
24. Hrabak, O. 1992. Industrial production poly- β -hydroxybutyrate. *FEMS Microbiol. Rev.* 103: 251-256.
25. Karr B. D., Waters K. J. and Emerich W. D. 1983. Analysis of Poly- β -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* Bacteroid by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 46: 1339-1344.
26. Kim, B. S; Lee, S. Y; Chang, H. N; 1992. Production of poly- β -hydroxybutyrate by fed-bach culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 14: 811-816.
27. Leaversuch, R. 1987. Industry weighs the need to make polymer degradable. *Mod. Plastic* 64: 52-55.
28. Lemoigne, M.1923. C. R. Herb. Séances Acad. Sci 176-1761

29. Lemoigne, M.1926a. C. R. Herb. Séaces Acad. Sci 94-1291
30. Lemoigne, M.1926b. C. R. Bull. Soc. Chim. Biol. 8. 770.
31. Lemoigne, M.1927. C. R. Ann. Inst. Pasteur. 41. 48.
32. Lemoigne, M; and Girard, H. 1943. C. R. Herb. Séaces Acad. Sci 271. 557.
33. Mac Fadin. Pruebas para la identificación de bacterias de importancia clínica, Ed. Panamericana, México. D.F.1993, pp. 121-125.
34. Martín, A. Introducción a la Microbiología del suelo. Ed. AGT, México 1980. pp. 326-351.
35. Mothes G and Wolfgang B. 1995. Methylobacterium rhodesianum MB 126 possesses two stereospecific crotonyl CoA hydratases. Can. J. Microbiol. Vol 41. (Suppl. 1): 68-72
36. Nour, S.M., Cleyet-Marel, J.C., Beck, D.and Effosse A., 1994. Genotypic and phenotypic diversity of *Rhizobium* isolated from Chickpea (*Cicer arietinum L*) Can. J. Microbiol; 40: 345-354.
37. Page J. W. 1995. Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future. Can. J. Microbiol. Vol 41. (Suppl. 1): 1-3.
38. Palmisano, A. C; and Pettigrew, C. A. 1992. Biodegradability of plastic. Bioscience. 42: 680-685.
39. Pepler, H. J. and Perlman, D., 1979 Microbial Technology, microbial processes; second Edition; Volumen:1; Academic Press; pp. 41-43, 418-425.
40. Reginensi, R. S. Producción de inoculantes para leguminosas usando como soporte begacillos de caña de azúcar. Tesis Maestría UNAM.

41. Rehm j.,Redd G. Volume 6b "Special Microbial Processes". Lafferty M.,Korsatko B.,Korsatko W."Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid" Chapter 6. Biotechnology 1988 (Federal Republic of Germany).
42. Reusch N. R. 1995. Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo. Can. J. Microbiol. Vol 41. (Suppl.1): 50-54.
43. Rhijn Van P., Vanderleyden J. 1995. The *Rhizobium*-Plant Symbiosis. Microbiological Reviews. Vol 59: 124-142.
44. Sang Yup Lee. 1995. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 49: 1-14.
45. Scragg, A. 1996. Biotecnología para ingenieros, Editorial Limusa. México D.F. pp: 192-195.
46. Schlegel, H. G. Gottschalk, G. VON BARTHA, R. 1961. Nature. 191,463.
47. Schlegel, H. G. Lafferty, R. And Krauss, I. 1970. Arch. Mikrobiol. 71.283.
48. Shively, J. M. 1974. Annu. Rev. Microbiol. 28.167.
49. Skibic Z. and Divjakovic V. 1996. Temperature influence on changes of parameters of the unit cell of biopolimer PHB. Polymer Vol.37: 505-507.
50. Slepecky A. R., Law H. J. 1960. A Rapid Spectrophotometric Assay of Alpha, Beta-Unsaturated Acids and Beta-Hydroxy Acid. Analytical Chemistry. Vol 32: 1697-1699.
51. Slepecky A. R., Law H. J. 1961. Assay of Poly- β -hydroxybutyric Acid. J. Bacteriol. Vol 82: 33-36.

52. Soto, G. N. Aislamiento, identificación y optimización de un medio de cultivo para una cepa nativa de *Vicia Villosa* (Veza de invierno) para la elaboración de un inoculante. Tesis de licenciatura.
53. Stainer, Y. Roger. Microbiología. 4 edición. Editorial Repla. México 1986: 334-338.
54. Steinbuechel, A. 1992. Biodegradable plastics. Curr. Opin. Biotechnol. 3: 291-297.
55. Sun W., Cao G. J., Teng K and Meighen A. E. 1994. Biosynthesis of Poly-3-hydroxybutyrate in the Luminescent Bacterium, *Vibrio Harveri*, and Regulation by the lux Autoinducer, N-(3-Hydroxybutanoyl) homoserine Lactone. J. of Biological Chemistry. Vol 269: 20785-20790.
56. Suzuki, T; Yamane, T; Shimizu, S. 1986. Mass production of poli- β -hydroxybutyric acid by fed-bach culture with controlled carbon nitrogen feeding. Appl. Microbial. Biotechnol. 24: 370-374.
57. Tombolini R., Povoio S. and Morea A. 1994. Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium Meliloti* unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate. Can. J. Microbiol. Vol 40: 823-829.
58. Tombolini R., Povoio S. Buson A and Nuti P. M. 1995. Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) Biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41. Microbiology. Vol 141: 2553-2559.
59. Williamson, D. H; and J. F. Wilkinson. 1958. The isolation and estimation of poly- β -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. J. Gen. Microbiol. 19:198-209.
60. Zinsser., Wolfgang K, Joklin, H. P. Williet. Microbiología, Edición 18, 1993, Editorial Médica Panamericana