

PRODUCCIÓN DE POLI- β -HIDROXIBUTIRATO POR *Pseudomonas* A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA PETROQUÍMICA

Gustavo Torres-Plasencia^{1*}, Álvaro Tresierra-Ayala²

¹Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonia Peruana, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Psje. Los Paujiles s/n. AA.HH. Nuevo San Lorenzo, Iquitos, Perú.

²Departamento Académico de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Pevs 5ta. Cdra. Iquitos, Perú

*e-mail: otivat21@hotmail.com

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la producción de poli- β -hidroxibutirato (PHB) por *Pseudomonas*, empleando borra oleosa como fuente carbonada; se aislaron cinco cepas a partir de borra oleosa de la Refinería Iquitos de Petroperú S.A-Operaciones Selva, las que posteriormente se cultivaron en agitación, a 37°C por 24 h, empleando el medio mineral de Ramsay *et al.* (1990); que contenía borra oleosa como única fuente de carbono en exceso y limitación de la fuente nitrogenada. Todas las cepas produjeron PHB durante el bioensayo; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre sus valores de concentración de PHB intracelular ($p > 0,05$), siendo el máximo valor promedio $657 \pm 98,75 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$.

Palabras Clave: *Pseudomonas*, biopolímeros, poli- β -hidroxibutirato, borra oleosa.

PRODUCTION OF POLY- β -HYDROXYBUTYRATE BY *Pseudomonas* FROM PETROCHEMICAL INDUSTRY WASTE

ABSTRACT

In order to evaluate the production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by *Pseudomonas*, using borra oleosa as carbon source, five strains were isolated from borra oleosa of Iquitos Refinery of Petroperú S.A-Jungle Operations; subsequently, these strains were cultured under stirring at 37 °C for 24 h, using the mineral medium of Ramsay *et al.* (1990), which contained borra oleosa as the sole carbon source in excess and limitation of nitrogen source. All strains produced PHB during the bioassay; however, significant differences were not observed between the values of intracellular PHB concentration ($p > 0.05$), the maximum average value was $657 \pm 98.75 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$.

Keywords: *Pseudomonas*, biopolymers, poly- β -hydroxybutyrate, borra oleosa.

INTRODUCCIÓN

Los plásticos son polímeros petroquímicos resistentes al ataque químico y biológico, que generan contaminación ambiental y visual. Actualmente, los biopolímeros como: los polihidroxicanoatos (PHA), constituyen la materia prima alternativa para la producción de plásticos biodegradables (McChalicher & Srienc, 2007), siendo el poli-β-hidroxibutirato (PHB), el PHA más caracterizado y acumulado con frecuencia por bacterias, que además de ser biodegradable, es biocompatible, por lo que es empleado en Ingeniería Tisular para la fabricación de prótesis u otros componentes médicos. Su costo de producción industrial es elevado en comparación a los plásticos petroquímicos, debido básicamente a la fuente de carbono que se emplea como materia prima, por lo que se ha sugerido utilizar otras fuentes de carbono, como los residuos de las actividades agrícolas e industriales (Platt & Rapra Technology Limited, 2006).

La borra oleosa es uno de los residuos de la industria petroquímica, la cual, como fuente de carbono y energía, es susceptible de degradación microbiana. Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la producción de PHB por cepas del género *Pseudomonas*, a partir de borra oleosa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento e Identificación de cepas de *Pseudomonas* a partir de muestras de borra oleosa

Muestras de 100 g de borra oleosa fueron obtenidas de la Refinería Iquitos de Petroperú S.A-Operaciones Selva (ubicada al margen izquierdo del río Amazonas aproximadamente a 14 Km río arriba de la ciudad de Iquitos), las que se colocaron en bolsas *Ziploc* de primer uso, para su procesamiento inmediato. En el laboratorio, cada muestra fue homogeneizada y 10 g se adicionaron a un matraz conteniendo 100 ml de Caldo Nutritivo, al que se le adicionó cristal violeta (0,2 g/l). Estas se incubaron a 37 °C durante 24 h y dos asadas de los cultivos se sembraron por duplicado en placas con Agar Cetrimide e incubaron bajo similares condiciones. Las cepas se identificaron mediante pruebas convencionales (Holt *et al.*, 1994) y fueron criopreservadas a -20°C.

Bioensayo para determinar capacidad de crecimiento y producción de PHB

100 µl de las cepas criopreservadas se sembraron en 100 ml de Caldo Nutritivo e incubaron en agitación, a 37°C durante 24 h. Luego, 8 ml de cada cultivo fueron centrifugados a 8000 rpm por 10 min. El pellet celular se resuspendió en 1 ml de solución salina estéril y 200 µl de la suspensión se inocularon en 200 ml de medio mineral de Ramsay *et al.* (1990), donde la fuente nitrogenada, (NH₄)₂SO₄, fue limitada (1 g/l) y la borra oleosa fue adicionada como única fuente carbono en exceso (10 g/l). Los cultivos se incubaron en agitación (150 rpm), a 37°C por 72 h. La capacidad de crecimiento y la producción de PHB fueron evaluados por espectrofotometría, mediante la determinación de la concentración de biomasa bacteriana y la concentración intracelular de PHB. Ambas mediciones fueron efectuadas en forma simultánea en periodos de 12 h, durante 72 h.

a) Concentración de biomasa bacteriana: Alícuotas de 4 ml de cada cultivo se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min. El pellet se resuspendió en 1 ml de agua milliQ estéril al que se le determinó su Densidad Óptica (DO₆₀₀), empleando un espectrofotómetro de UV/VIS Thermo Spectronic Mod. Genesis 6, contra un blanco de lectura de agua milliQ. Finalmente, la concentración de biomasa bacteriana se determinó a partir de la fórmula de una curva estándar elaborada a partir de la Escala de Mac Farland, que fue de: $y = 0,022x + 0,020$, para un R²: 0,997; donde "y": es la absorbancia obtenida a una DO₆₀₀ y "x": es la concentración de biomasa bacteriana expresada en (UFC x 10⁸ x ml⁻¹).

b) Concentración intracelular de PHB: Alícuotas de 4 ml de cada cultivo se emplearon para determinar la concentración intracelular de PHB, para lo cual se aplicó la metodología propuesta por Law & Slepecky (1961), donde, cada doce horas, se determinó su Densidad Óptica (DO_{235}), empleando un espectrofotómetro de UV/VIS Thermo Spectronic Mod. Genesis 6, contra un blanco de lectura de ácido sulfúrico 1M. Finalmente, la concentración intracelular de PHB se determinó a partir de la fórmula de una curva estándar elaborada a partir de PHB de origen natural (Sigma Aldrich Chemistry), que fue de: $y = 0,013x + 0,073$, para un $R^2: 0,997$; donde "y": es la absorbancia obtenida a una DO_{235} y "x": es la concentración intracelular de PHB expresada en $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$.

Las medias aritméticas de los resultados de las mediciones fueron calculadas y las comparaciones entre las cepas y los diferentes periodos de evaluación (12-72 h), empleando el análisis de varianza (ANOVA) doble vía, aplicándose comparaciones múltiples del Test de Tukey al $\alpha = 0,05$, cuando existían diferencias estadísticamente significativas.

RESULTADOS

Se aislaron cinco cepas de *Pseudomonas* (PsA01b; PsA05b; PsA06a; PsA07b; y PsB02b), a partir de borra oleosa, las cuales crecieron (Gráfico 1) y produjeron PHB (Gráfico 2), en el medio de Ramsay *et al* (1990), con sulfato de amonio como fuente nitrogenada limitada (1 g/l) y borra oleosa como fuente carbonada en exceso (10 g/l).

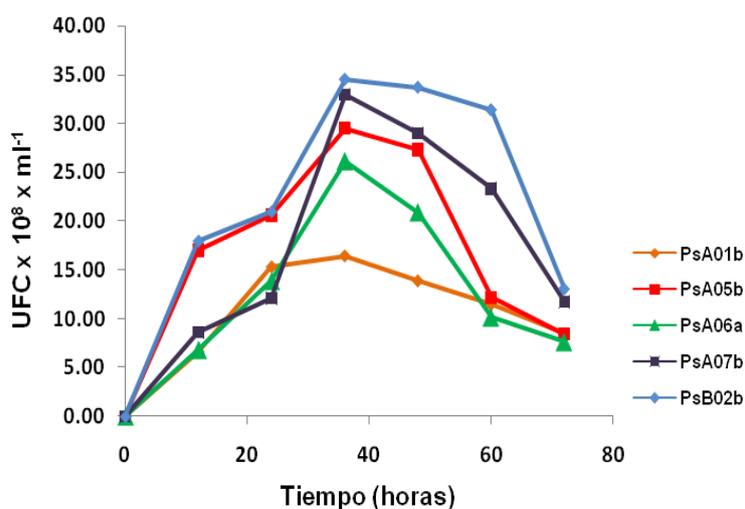


Gráfico 1. Curvas de crecimiento de las cinco cepas de *Pseudomonas*, expresadas en $\text{UFC} \times 10^8 \times \text{ml}^{-1}$, durante 72 h (registros cada 12 h).

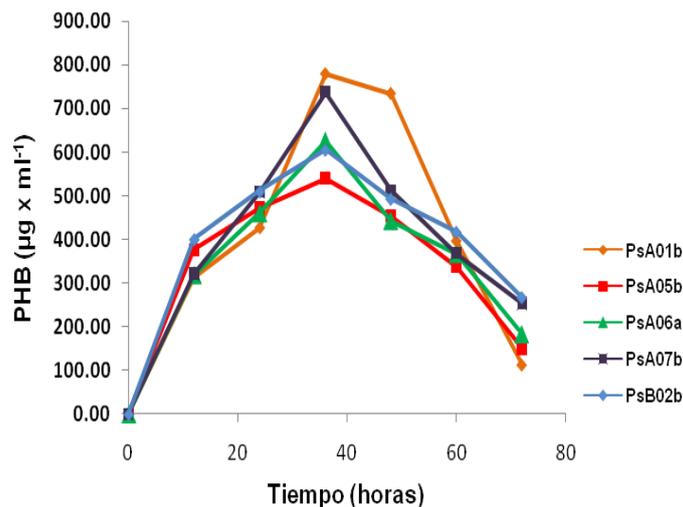


Gráfico 2. Producción de PHB por las cinco cepas de *Pseudomonas*, expresada en $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$, durante 72 h (registros cada 12 h).

Los valores de la concentración intracelular de PHB de las diferentes cepas (Tabla 1), no presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$).

Tabla 1. Media aritmética y desviación estándar de la concentración intracelular de PHB (en $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$), de las cepas de *Pseudomonas*, durante 72 h.

Tiempo (horas)	PsA01b	PsA05b	PsA06a	PsA07b	PsB02b	Promedio
12	313,08 ± 7,61	376,54 ± 8,16	318,08 ± 5,98	321,54 ± 4,35	400,00 ± 4,89	345,92 ± 39,85
24	426,92 ± 8,70	470,77 ± 8,70	459,23 ± 10,88	585,38 ± 11,97	510,00 ± 8,70	475,08 ± 35,08
36	778,85 ± 5,98	539,23 ± 9,79	624,62 ± 10,88	736,92 ± 9,79	605,38 ± 5,44	657,00 ± 98,51
48	733,85 ± 7,61	453,46 ± 4,89	441,92 ± 5,98	511,54 ± 4,35	493,08 ± 4,35	526,77 ± 119,19
60	396,54 ± 11,42	337,69 ± 8,70	366,54 ± 7,07	367,69 ± 3,26	417,31 ± 5,98	377,15 ± 30,61
72	113,08 ± 3,26	151,54 ± 1,09	183,08 ± 3,26	253,85 ± 3,26	267,69 ± 3,26	193,85 ± 66,11
Promedio	460,39 ± 254,45	388,21 ± 136,07	398,91 ± 148,72	450,00 ± 173,94	448,97 ± 115,20	

Efectuadas las comparaciones múltiples según el Test de Tukey a un nivel de significancia ($\alpha = 0,05$), entre las medias aritméticas de la concentración intracelular de PHB de todas las cepas con respecto a los diferentes periodos de evaluación del bioensayo, los resultados de las probabilidades (p) mostraron que: a las 36 y 48 h de incubación, existían diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,01$), con respecto a los periodos de las 12, 24, 60 y 72 h, lo que significa que entre las 36 a 48 h de incubación, existió una mayor producción de PHB en todas las cepas con respecto a los demás periodo de evaluación del bioensayo (Tabla 1).

DISCUSIÓN

El hecho que las cinco cepas de *Pseudomonas* hayan mostrado capacidad de crecer en el medio mineral de Ramsay *et al.* (1990), formulado con borra oleosa como única fuente de carbono, reafirma lo expresado por Krieg & Holt (1984), al manifestar que la mayoría de cepas de este género bacteriano pueden ser cultivadas en medios de composición nutricional sencilla ya que no suelen ser exigentes nutricionalmente al cultivarse *in vitro*, inclusive en medios minerales simples, que contienen sales de amonio o nitrato como fuente nitrogenada y compuestos orgánicos simples como fuentes de carbono y energía. La Petroleum Tubular Inspection of Peru S.R.L. (2000), destacó la capacidad degradativa que posee *Pseudomonas* sobre hidrocarburos, al aislar, seleccionar y purificar cepas autóctonas de suelos contaminados con borra oleosa, demostrando que la degradación bacteriana de hidrocarburos, se basa en su utilización como fuente de carbono y energía.

En cuanto a la capacidad productora de PHB (Tabla 1), en presencia de una fuente de carbono en exceso y limitación de fuente nitrogenada, las cinco cepas mostraron esta cualidad, en cantidades que no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Al respecto, Castro & Rendón (2003), indicaron que la formación del PHB se produce normalmente bajo condiciones de privación nutricional de elementos como: N, P, S, O ó Mg, y en presencia de una fuente de carbono en exceso. Además, Krieg & Holt (1984), refirieron que muchas especies de *Pseudomonas* acumulan PHB cuando son cultivadas bajo condiciones de limitación de nitrógeno.

La máxima concentración celular de PHB promedio fue de $657 \pm 98,51 \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (Tabla 1) donde el crecimiento bacteriano se encontró también en su máxima concentración de biomasa promedio de: $27,90 \pm 7,18 \text{ UFC} \times 10^8 \times \text{ml}^{-1}$, valores que fueron registrados a las 36 h de cultivo, cuando las cepas se encontraban en su pico máximo de crecimiento, ya que posteriores determinaciones registraron valores cada vez menores, tal como se observa a las 72 h de cultivo (Gráfico 1), donde ya se han agotado los nutrientes y las células aún viables, optan por emplear el PHB, que se almacenaba como sustancia de reserva, para ser utilizado como fuente de carbono y energía, conllevando a una disminución de su concentración. Esto concuerda con lo indicado por Matin *et al.* (1979), al manifestar que los PHA son utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes, donde el PHA es despolimerizado y luego metabolizado, siendo esta una estrategia de las bacterias para incrementar su supervivencia en ambientes cambiantes (Almeida *et al.*, 2004).

El Manual de Determinación Bacteriológica de Bergey (Holt *et al.*, 1994), refiere que las *Pseudomonas* productoras de pigmentos fluorescentes no acumulan PHB, lo cual contradice a este estudio, ya que durante su aislamiento, las cinco cepas produjeron colonias fluorescentes y fueron productoras de PHB. Quagliano & Miyazaki (1996), sostienen que la información de *Pseudomonas* sobre el PHB en el Manual Bergey, no se ajusta a los conocimientos más actualizados. Steinbüchel *et al.* (1992), concluyeron que bajo ciertas condiciones ambientales y genéticas, algunas *Pseudomonas* (*P. pseudoalcaligenes*, *P. viridiflava*, *P. corrugata* y *P. ficuserectae*) acumulan PHB.

CONCLUSIONES

- La borra oleosa posibilita el aislamiento de cepas de *Pseudomonas*.
- Las cepas de *Pseudomonas* aisladas e identificadas en el presente estudio son capaces de crecer y producir poli- β -hidroxibutirato, a partir de borra oleosa como fuente carbonada en exceso y sulfato de amonio como fuente nitrogenada limitada.
- Las cepas de *Pseudomonas* estudiadas producen similares cantidades de PHB.
- Las cepas de *Pseudomonas* productoras de pigmentos fluorescentes, acumulan PHB

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida A, Ruiz JA, López NI, Pettinari MJ. 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Química Viva*. 3, 122–133.
- Castro N & Rendón M. 2003. Aislamiento, caracterización y evaluación de *Actinomyces* nativos colombianos como productores de polihidroxialcanoatos. Trabajo para la obtención del grado de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. 74 pp.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Williams & Williams a Walerly Company, Maryland, USA. 787 pp.
- Krieg NR & Holt JG. 1984. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Vol I., Williams & Williams, Baltemon/London, Printed in USA. 964 pp.
- Law JH & Slepecky RA. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J Bacteriol* 82, 33–36.
- Matin A, Veldhuis C, Stegeman V, Veenhuis M. 1979. Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- β -hydroxybutyric acid and its role in starvation. *J Gen Microbiol* 112, 349–355.
- McChalicher C & Srienc F. 2007. Investigating the structure–property relationship of bacterial PHA block copolymers. *J Biotechnol* 132, 296–302.
- Petroleum Tubular Inspection of Peru S.R.L. 2000. Trabajos de Tratamiento de Borrás (Biorremediación de suelos en el Relleno Industrial Milla Seis de la Refinería Talara - Trabajos a campo de la Cia. PTI).
- Platt DK & Rapra Technology Limited. 2006. Biodegradable polymers: market report. Rapra Technology, Shrewsbury, Shropshire, U.K. p. 42–73.
- Quagliano JC & Miyazaki SS. 1996. Obtención de plásticos biodegradables polihidroxialcanoatos a partir de los géneros *Pseudomonas* y *Azotobacter*. *Rev. Fac. Agron.* 16: 199–206.
- Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Brigete D, Bataille P, Ramsay J. 1990. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. *Appl Environm Microbiol* 56, 2093–2098.
- Steinbüchel A, Hustede E, Liebergesell M, Pieper U, Timm A, Valentin H. 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalcanoic acids in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 103, 217–230.

Recibido: 20 Setiembre / **Aceptado:** 19 Noviembre 2012