

Universidad Autónoma de Querétaro



Biosíntesis de polihidroxicanoatos dopados con nanopartículas de Plata utilizando glicerol crudo como fuente de carbono y *Pseudomonas* para aplicaciones antimicrobianas

Carmen Liliana Cruz Romero

Expediente 262918

Director de tesis. Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa

Sinodales:

Dra. Cyntia Rocío Flores Juárez

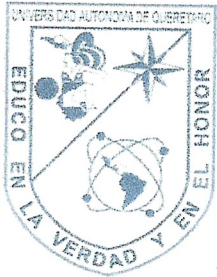
Dra. Vanessa Vallejo Becerra

Dra. Alejandra Álvarez López

Universidad Autónoma de Querétaro, Campus Aeropuerto

Línea de investigación: Nanotecnología

Tipo de investigación: Aplicada



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Ingeniería**



**Especialidad en Ingeniería en Nanotecnología**

**Biosíntesis de polihidroxicanoatos dopados con nanopartículas de Plata utilizando glicerol crudo como fuente de carbono y *Pseudomonas* para aplicaciones antimicrobianas**

**Tesis**

**Que como parte de los requisitos para obtener el grado de**

**INGENIERO EN NANOTECNOLOGÍA**

**Presenta:**

**Carmen Liliana Cruz Romero**

**Dirigido por:**

**Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa**

**Dr. Juan de Dios Galindo de la Rosa**  
**Presidente**

**Dra. Vanessa Vallejo Becerra**  
**Secretario vocal**

**Dra. Cyntia Rocío Flores Juárez**  
**Suplente 1**

**Dra. Alejandra Álvarez López**  
**Suplente 2**

## Resumen

La nanotecnología es un campo de investigación multidisciplinario, dentro las ramas en las cuales interviene activamente se encuentra la física, la química, la biología y las ciencias de los materiales, por ejemplo, en el desarrollo inteligente de nanocompuestos con propiedades físico-químicas especializadas, como la minimización del deterioro de los alimentos o mantener la inocuidad de los mismos. En la presente investigación se desarrolló un nanocomposito a base de polihidroxicanoatos (PHAs) extraídos de las cepas *P. aeruginosa* y *P. putida* y producidos con glicerol crudo, desecho de la industria procesadora de biodiesel, y glicerol grado reactivo como fuente de carbono, comparando la producción de PHAs, funcionalizándolos con nanopartículas de plata (AgNPs) para brindarles propiedades antimicrobianas. Los resultados obtenidos a través de las caracterizaciones físico-químicas realizadas, XRD, TGA, FTIR, SEM, UVvis, DLS, Potencial Z y pruebas antimicrobianas de Kirby-Bauer, mostraron la síntesis y extracción exitosa de los PHAs, con una producción de PHAs muy similar entre la utilización de ambas fuentes de carbono, glicerol crudo y glicerol grado reactivo en ambas cepas, sin embargo, con características físicas distintas, como lo fueron las superficies analizadas a través del SEM. Presentando un comportamiento distinto al interaccionar con las AgNPs, con un mejor desempeño antibacterial para los PHAs funcionalizados con AgNPs, provenientes del glicerol grado reactivo y la cepa *P. aeruginosa*, lo cual es atribuido probablemente tanto metabolismo de cada cepa bacteriana, como a los contaminantes presentes en el glicerol crudo en comparación con el glicerol grado reactivo.

**Palabras clave:** Polihidroxicanoatos, nanopartículas de plata, glicerol crudo, *P. aeruginosa* y *P. putida*.

## Abstract

Nanotechnology is a multidisciplinary research field within the branches in which it actively intervenes are physics, chemistry, biology, and materials sciences, for example, in the intelligent development of nanocomposites with specialized physical-chemical properties, such as minimizing food spoilage or maintaining food safety. In the present investigation, a nanocomposite was developed based on polyhydroxyalkanoates (PHAs) extracted from the *P. aeruginosa* and *P. putida* strains and produced with crude glycerol, waste from the biodiesel processing industry, and reactive grade glycerol as a carbon source. PHAs production was compared, and each PHAs were functionalized with silver nanoparticles (AgNPs) to provide them with antimicrobial properties. The results obtained through the physical-chemical characterizations carried out, XRD, TGA, FTIR, SEM, UVvis, DLS, Potential Z, and Kirby-Bauer antimicrobial tests, showed the successful synthesis and extraction of PHAs, with a production of PHAs very similar between the use of both carbon sources, crude glycerol and reactive grade glycerol in both strains, however, with different physical characteristics, such as the surfaces analyzed through SEM. Presenting a different behavior when interacting with AgNPs, with better antibacterial performance for PHAs functionalized with AgNPs, coming from reactive grade glycerol and the *P. aeruginosa* strain, which is probably attributed to the metabolism of each bacterial strain and the contaminants present in crude glycerol compared to reagent grade glycerol.

**Keywords:** Polyhydroxyalkanoates, silver nanoparticles, crude glycerol, *P. aeruginosa* and *P. putida*.

## **Agradecimientos**

A mis padres:

No hay nada más difícil que no poder agradecerles que la persona que soy, en donde estoy y a donde voy es gracias a ustedes. Están conmigo porque los llevo siempre.

A los seres humanos que me acompañan en la vida:

Es un placer y un gusto crecer a su lado y aprender de ustedes, profundamente gracias por decidir acompañarme en este y en los momentos que nos regale la vida.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	8
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	13
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>OBJETIVOS</b> .....	16
<b>ANTECEDENTES</b> .....	16
<b>Producción de PHAs</b> .....	16
<i>Pseudomonas</i> .....	18
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
<i>Pseudomonas putida</i> .....	22
<b>Papel de la membrana externa en la absorción y utilización de la fuente de carbono</b> .....	26
<b>Ruta metabólica para la producción de PHA por Pseudomonas</b> .....	29
<i>Ruta metabólica para la producción de PHA por Pseudomonas</i> .....	29
<i>Glicerol crudo</i> .....	30
<i>Aspectos generales de la asimilación de glicerol en bacterias</i> .....	32
<i>Bioquímica y genética de la utilización de glicerol por Pseudomonas</i> .....	34
<b>Características generales de polihidroxicanoatos</b> .....	40
<i>Biocompatibilidad</i> .....	41
<i>Empaquetado alimentario y actividad antimicrobiana</i> .....	42

<b>Nanotecnología</b> .....	<b>45</b>
<i>Nanocompuestos</i> .....	46
<i>Nanopartículas de Plata</i> .....	48
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>50</b>
<b>Polihidroxicanoatos PHA</b> .....	<b>50</b>
<i>Inoculación e incubación</i> .....	50
<i>Extracción de PHAs para P. aeruginosa y P. Putida</i> .....	52
<i>Métodos de Tinción por Negro Sudán</i> .....	53
<i>Cuantificación de PHB a través del ensayo espectrofotométrico para ácido poli-β - hidroxibutírico</i> .....	53
<i>Espectroscopía infrarroja (IR) para el biopolímero</i> .....	54
<i>Evaluación de las propiedades térmicas para el biopolímero</i> .....	54
<b>Nanopartículas de Plata AgNps</b> .....	<b>54</b>
<i>Síntesis de Nanopartículas de Plata</i> .....	54
<i>Propiedades físicas</i> .....	56
<i>Espectroscopía de ultravioleta (UV-Vis)</i> .....	56
<i>Dispersión dinámica de la luz (DLS)</i> .....	56
<i>Potencial Z</i> .....	56
<b>Nanocompuesto</b> .....	<b>56</b>
<i>Síntesis de nanocompuesto</i> .....	56
<i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i> .....	57
<i>Espectroscopía infrarroja (IR)</i> .....	57
<i>Actividad antimicrobiana del compósitos AgNPs-PHA</i> 57	
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>58</b>
<b>Caracterizaciones microbiológicas</b> .....	<b>58</b>

<i>Tinción de P. aeruginosa</i> .....	58
<i>Evaluación de la síntesis de PHA en las diferentes cepas de Pseudomonas putida y aeruginosa.</i> .....	59
<i>Cálculos de constantes cinéticas</i> .....	60
<b>Caracterizaciones de los PHAs</b> .....	<b>65</b>
<i>Análisis termogravimétrico</i> .....	65
<i>Calorimetría diferencial de barrido</i> .....	66
<i>Difracción de Rayos X</i> .....	67
<b>Caracterizaciones de AgNPs</b> .....	<b>67</b>
<i>Uv vis</i> .....	67
<i>Caracterización por DLS</i> .....	68
<i>Potencial Zeta</i> .....	69
<b>Caracterizaciones de PHAs con AgNPs</b> .....	<b>70</b>
<i>Espectroscopía infrarroja (IR)</i> .....	70
<i>Observación morfológica por SEM</i> .....	73
<i>Evaluación antimicrobiana del composito AgNPs-PHA</i> .....	76
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>80</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>82</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>101</b>



## Índice de tablas

Tabla 1. Vías de síntesis para polihidroxicanoatos (PHA) y las enzimas involucradas.

Tabla 2. Clasificación de PHAs.

Tabla 3. Producción de PHA de acuerdo al sustrato utilizado.

Tabla 4. Datos TGA / DTG correspondientes a PHA-CR-GLI y PHA-GLI.

Tabla 5. Zona de inhibición (mm) resultante (media  $\pm$  DE) de los ensayos de Kirby-Bauer contra cepas de control de *S. epidermidis*. PHA con 0.05mg/kg y 0.5mg/kg p/p de AgNPs.

## Índice de figuras

Figura 1. Vías metabólicas para la síntesis de PHAs por bacterias.

Figura 2. Vías conservadas para el metabolismo del glicerol en bacterias.

Figura 3. Vías bioquímicas y organización genética de genes implicados en el metabolismo del glicerol en *Pseudomonas putida* KT2440.

Figura 4. Metabolismo del glicerol en *Pseudomonas putida*.

Figura 5. Estructura de los polihidroxicanoatos (Miu et al., 2022).

Figura 6. Inoculación e incubación PHAs.

Figura 7. Extracción de PHAs para *P. aeruginosa* y *P. putida*.

Figura 8. Síntesis de AgNPs y cóposito.

Figura 9. Tinción de Gram y tinción por Sudán Black.

Figura 10. Tasa de crecimiento bacteriano de las cepas.

Figura 11. Tasa de consumo de sustrato y producción de PHAs.

Figura 12. Análisis Termogravimétrico y Análisis Térmico Diferencial para el PHAs obtenido a partir cepa *P. aeruginosa*.

Figura 13. Curvas de calentamiento DSC para el PHA obtenido a partir de la cepa *P. aeruginosa*.

Figura 14. Difractograma de rayos X de PHA obtenido a partir de la cepa *P. aeruginosa* y glicero grado reactivo (PHA A.G)

Figura 15. Espectro de absorción UV-vis de AgNP.

Figura 16. Distribución del tamaño de partícula basada en la intensidad de una suspensión acuosa de nanopartículas de plata obtenidas del análisis DLS.

Figura 17. Gráfico de las medidas del potencial zeta en función del pH para nanopartículas de plata suspendidas en agua y acidificadas con soluciones de ácido clorhídrico.

Figura 18. Análisis FTIR de 4000 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  (fig. a y b) PHA a partir de *P. aeruginosa* y glicerol grado reactivo, y de 2000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (fig. c y d) PHA a partir de *P. aeruginosa* y glicerol crudo.

Figura 19. Análisis FTIR de 4000 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  (fig. a y b) PHA a partir de *P. putida* y glicerol grado reactivo, y de 2000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (fig. c y d) PHA a partir de *P. putida* y glicerol crudo.

Figura 20. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de las películas formadas a partir de *P. aeruginosa* con glicerol grado reactivo.

Figura 21. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de las películas formadas a partir de *P. aeruginosa* con glicerol crudo.

Figura 22. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de las películas formadas a partir de *P. putida* con glicerol grado reactivo.

Figura 23. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de las películas formadas a partir de *P. putida* con glicerol crudo.

Figura 24. Visualización física de los distintos PHAs.

Figura 25. Halo de inhibición antimicrobiana de los discos impregnados con PHAs-AgNPs producidos con la cepa *P. aeruginosa*, con dos distintas concentraciones de AgNPs, 0.05mg/kg (fig. a y c) y con 0.5mg/kg (fig. b y d).

Figura 26. Halo de inhibición antimicrobiana de los discos impregnados con PHAs-AgNPs producidos con la cepa *P. putida*, con dos distintas concentraciones de AgNPs, 0.05mg/kg (fig. a y c) y con 0.5mg/kg (fig. b y d).

## 1. Introducción

La producción mundial de resinas y fibras ha aumentado de 2 millones de toneladas en 1950, a 380 millones de toneladas en el 2015, una Tasa de Crecimiento Anual Compuesta (TCAC) de 8.4%, aproximadamente 2.5 veces la TCAC del producto interno bruto mundial durante ese período (PlasticsEurope, 2016). La cantidad total de resinas y fibras fabricadas desde 1950 hasta 2015 fue de 7,800 millones de toneladas, donde la mitad, 3,900 millones de toneladas, se produjeron en los últimos 13 años (Geyer *et al.*, 2017). Aunado a la crisis de los combustibles fósiles, la búsqueda y el desarrollo de sustitutos químicos/materiales alternativos es fundamental para reducir la dependencia de la humanidad a los recursos fósiles, así como a los polímeros. Uno de los posibles candidatos sustitutos son los polihidroxicanoatos (PHAs). El PHA es un biopolímero valioso y neutral en carbono que los microorganismos podrían producir a partir de diversas fuentes de carbono renovables, lo que lo convierte en un material sostenible y respetuoso con el medio ambiente (Tan *et al.*, 2014).

Los biopolímeros se encuentran en cualquier organismo y constituyen, la mayor fracción de materia seca celular. Según su estructura química, los biopolímeros pertenecen a ocho clases: (1) ácidos nucleicos como ADN y ARN, (2) poliamidas como proteínas y poli (aminoácidos), (3) polisacáridos como celulosa, dextrano y almidón, (4) polioésteres (PTE), que se informaron muy recientemente, como el poli (3-mercaptopropionato), (5) polianhídridos con el polifosfato como ejemplo, (6) poliisoprenoides como el caucho natural o Gutta Percha, (7) polifenoles como lignina y (8) polioxoésteres orgánicos como polihidroxicanoatos (PHA), Polimalato y Cutina (Steinbu, 2005).

Los polihidroxicanoatos son poliésteres alifáticos, sintetizados por bacterias que se originan en una amplia gama de hábitats y nichos ecológicos, como fuentes renovables, ácidos orgánicos, recursos fósiles y desechos (Grigore *et al.*, 2019). Las plantas presentan menos de un 10% de masa seca en producción, mientras que las bacterias pueden alcanzar cerca de un 90% (Verlinden *et al.*, 2007).

Los PHAs son piezoeléctricos y perfectamente isotácticos/ópticamente activos. Son hidrófobos, insolubles en agua, inertes e indefinidamente estables en el aire y también son

termoplásticos y / o elastoméricos, no tóxicos y tienen una pureza alta dentro de la célula. El PHA tiene una resistencia a la degradación UV mucho mejor que el polipropileno, pero es menos resistente a los solventes. Hasta la fecha, se han incorporado más de 150 unidades de monómeros diferentes al PHA biológico (Laycock *et al.*, 2013).

Sus propiedades físicas varían desde frágiles y rígidos, altamente cristalinos, desde biotermoplásticos (p. Ej. Poli (3-hidroxi butirato), PHB), hasta elastómeros amorfos, similares al caucho o al pegamento (p. Ej., PHA de longitud de cadena media, mcl-PHA), dependiendo en la cantidad de átomos de carbono que contienen sus unidades monoméricas (Pereira *et al.*, 2019). Dentro de los PHAs, el PHB es uno de los más estudiados y es sintetizado por diferentes bacterias (Gumel *et al.*, 2013).

El petróleo como principal fuente de energía utilizada en el mundo, pero con disponibilidad limitada, de acuerdo con algunas proyecciones, se cree que las reservas se agotarán por completo para 2050 (Campbell & Laherrère, 1998), es por esto que los biocombustibles, como el etanol y el biodiesel, se encuentran entre las fuentes más prometedoras para la sustitución de combustibles fósiles. El biodiesel se produce a partir de grasas animales y aceites vegetales, que generan aproximadamente 10% (p/p) de glicerol como subproducto principal. El exceso de glicerol generado puede convertirse así en un problema ambiental, ya su eliminación es costosa. De esta manera una de las aplicaciones potenciales es su uso como fuente de carbono y energía para el crecimiento microbiano (Paulo *et al.*, 2009), además de que Gurrieff y Lant han realizado una evaluación del ciclo de vida y, un análisis financiero demostró que la producción de PHAs por medio de cultivos mixtos a partir de recursos renovables es una alternativa financiera y ambientalmente atractiva (Gurrieff & Lant, 2007).

Debido a las propiedades que proporcionan los PHAs, como la biocompatibilidad y una lenta degradación hidrolítica, se ha impulsado su implementación en el empaquetado, así como en aplicaciones médicas, ya existen productos de PHAs comercializados para el empaquetado de cosméticos y comida (Castro-Mayorga *et al.*, 2014), y en el área médica la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó su uso como biomaterial para su uso como sutura absorbible (Rai, 2010). Es por ello por lo que la incorporación de agentes antimicrobianos en matrices PHAs sería una tecnología prometedora para envasado y empaquetado de alimentos, así como en el área biomédica. Entre los agentes antimicrobianos

más utilizados, las nanopartículas de plata (AgNP) se han convertido en una de las tecnologías más investigadas para prevenir brotes microbianos (Castro-Mayorga et al., 2014). Son las nanopartículas (NPs) más ampliamente producidas (la producción anual global estimada es de aproximadamente 55 toneladas) (Piccinno et al., 2012) y las NPs más comercializadas, y con mucho las más utilizadas en productos de consumo (Gaillet & Rouanet, 2015).

## **2. Planteamiento del problema**

El aumento de la población humana tiene dentro de sus consecuencias el aumento de materiales de desecho siendo el plástico uno de los principales exponentes. En el 2015, se habían generado aproximadamente 6,300 millones de toneladas de desechos plásticos, de los cuales alrededor del 9% habían sido reciclados, el 12% incinerados y el 79% acumulados en vertederos o en el medio ambiente natural. Si las tendencias actuales de producción y gestión de residuos continúan de esta manera, cerca de 20,000 millones de toneladas de residuos estarán en vertederos o en el entorno natural para el 2050 (Geyer et al., 2017).

Ante este panorama, y tomando en cuenta que la mayoría de los plásticos basan su fabricación en un recurso finito, es necesario desarrollar nuevas tecnologías de producción, así como buscar alternativas de materia prima. Es por eso que los polihidroxialcanoatos, de origen biológico, biodegradables y con propiedades físicas y de biocompatibilidad, son una alternativa para la sustitución de plásticos de origen petroquímico, ya que poseen características similares a los polímeros de gran demanda, como lo es el polipropileno (Teeka et al., 2010).

Debido a que una de las aplicaciones potenciales de los PHAs es como sustituyente de algunos polímeros actuales en uso en embalaje de alimentos y cosméticos, así como en aplicaciones médicas, hace necesario que los PHAs sean materiales altamente esterilizables o que presenten propiedades antimicrobianas, lo cual advierte un problema, ya que diversas biopelículas se han relacionado con la persistencia de infecciones crónicas bacterianas (Dinjaski et al., 2013), por lo cual la adición de algún agente antimicrobiano, como lo son las AgNPs, se convierte en una respuesta ante esta necesidad.

Por otro lado, la producción de plásticos biodegradables a gran escala está limitada principalmente debido al gasto relativo del sustrato. Los costos de sustrato representan aproximadamente el 40% de los costos totales de producción de PHA (Teeka et al., 2010), es por ello que encontrar una fuente como lo es el glicerol crudo, el cual es un subproducto de la producción de biodiesel, disminuirá el costo de los PHAs y simultáneamente el riesgo que representa la acumulación de este subproducto, ya que no puede eliminarse en el medio ambiente (Paulo et al., 2009).

### 3. Justificación

Existen más de 300 especies de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, donde los polihidroxicanoatos actúan como un almacén de carbono. Los PHAs son sintetizados en presencia de exceso de carbono cuando otros nutrientes como el oxígeno, fósforo o nitrógeno se encuentran limitados, se acumulan como inclusiones citoplasmáticas (Anderson & Dawes, 1990) y pueden almacenarse en altas concentraciones dentro de la célula, ya que no alteran sustancialmente su estado osmótico (Laycock *et al.*, 2013), debido a su baja solubilidad y alto peso molecular que ejerce una presión osmótica insignificante sobre el organismo. (Rai, 2010).

Entre las bacterias Gram negativas se encuentran *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas putida*, *P. oleovorans* y *Azotobacter vinelandii*; además, una cepa de *Escherichia coli* (Tan et al., 2014). Respecto a las bacterias Gram positivas, se han reportado como productoras de PHAs varias especies del género *Bacillus*, incluyendo *B. megaterium* y *B. cereus* (Verlinden et al., 2007), así como *actinomycetes* del género *Streptomyces* (Wang et al., 2011).

Específicamente las *Pseudomonas* son potencialmente seleccionadas para la producción de PHAs debido a las enzimas que poseen, como lo es la PHA sintasa (PhaC1 y PhaC2 Ps), porque tienen una amplia especificidad de sustrato hacia los monómeros con cadenas de 4 a 12 átomos de carbono (Tsuge et al., 2005). Dentro de las *Pseudomonas sp.* que han sido reportados como productores de mcl-PHA, un ejemplo bien conocido es *Pseudomonas putida* que sintetiza un mcl-PHA compuesto principalmente por 3-4 monómeros de hidroxioctanoato (Pereira et al., 2019).

Varios investigadores han informado la producción de biopolímeros a través de la fermentación microbiana utilizando glicerol crudo como fuente de carbono, el abundante excedente de glicerol de la producción de biodiesel hace que la utilización de glucosa, como otras posibles fuentes de carbono, sea más costosa en comparación con el glicerol crudo. Además, la glucosa compite directamente con la producción de alimentos, que no es el caso del glicerol. El glicerol tiene un mayor grado de reducción que los azúcares y también es más barato y está más disponible (Garlapati et al., 2016).

Por otro lado, las múltiples aplicaciones de los PHAs hacen necesario que se asegure que este biopolímero se mantenga estéril y libre de cualquier bacteria que pueda presentarse, como lo es el caso de las biopelículas producidas a partir de *S. aureus* y asociadas a la persistencia de infecciones crónicas (Kiedrowski & Horswill, 2011). De acuerdo a las excelentes propiedades antibacteriales reportadas respecto a la adición de AgNPs se convierten en solución viable, aunado a la capacidad de estabilización de las AgNPs producida por los PHAs, como se reporta en la literatura (Castro-Mayorga et al., 2014).

#### **4. Hipótesis**

Se podrá sintetizar polihidroxicanoatos de cadena mediana, a partir de glicerol crudo proveniente de biodiésel, a través de las bacterias *P. aeruginosa* y *P. putida*, para su posterior utilización como agente estabilizador de AgNPs, lo cual le brindará a la matriz de polihidroxicanoato propiedades antimicrobianas.



## **5. Objetivos**

### ***5.1 Objetivo general***

Sintetizar polihidroxicanoatos de cadena mediana a partir de glicerol crudo proveniente del biodiesel utilizando *Pseudomonas* y doparlo con nanopartículas de plata para la producción de biopolímeros con propiedades antimicrobianas.

### ***5.2 Objetivos específicos***

- Identificar y evaluar los parámetros operacionales para la producción de polihidroxicanoatos a partir de *P. aureginosa*, y *P. putida* por medio de glicerol crudo.
- Sintetizar y extraer polihidroxicanoatos de las bacterias *P. aureginosa*, y *P. putida*.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas de los polihidroxicanoatos sintetizados.
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de Plata por método de reducción química.
- Evaluar propiedades fisicoquímicas del compuesto polihidroxicanoatos-AgNPs.
- Evaluar las propiedades antimicrobianas que le brindarán las AgNPs a la matriz de polihidroxicanoatos.

## **6. Antecedentes**

### ***6.1 Producción de PHAs***

Las bacterias tienen la capacidad de sintetizar PHAs en las fases de crecimiento, estacionaria y exponencial. La acumulación de PHA no asociada al crecimiento ocurre en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano con limitación de N, P, Mg y oxígeno y fuentes de carbono en exceso; mientras que la producción de PHA asociada al crecimiento se realiza en condiciones equilibradas (Mohapatra *et al.*, 2017).

Tabla 1 Vías de síntesis para polihidroxicanoatos (PHA) y las enzimas involucradas					
No.	Vía	Abreviación	Enzima	Especie	Referencias
1	Vía I	PhaA	B-Cetotilasa	<i>Ralstonia eutropha</i>	(Sudesh et al 2000)
2		PhaB	NADPH dependiente de acetoacetyl-CoA reductasa		
3		PhaC	PHA sintasa		
4	Vía asociada	PhaZ	PHA despolimerasa	<i>Aeromonas hydrophila 4AK4</i>	(Sudesh et al 2000)
5			Dímero hidrolasa	<i>Pseudomonas stutzeri 1317</i>	
6			(R) -3-Hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	<i>R. eutropha</i>	
7			Acetoacetyl-CoA sintetasa	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	
8	Vía II	FabG	3-cetoacetyl-CoA reductasa	<i>Pseudomonas putida KT2442,</i>	(Sudesh et al 2000)
9			Epimerasa	<i>A. hydrophila 4AK4,</i>	(Mittendorf et al 1998)
10		PhaJ	(R) -Enoil-CoA hidratasa / enoil-CoA hidratasa I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
11			Acil-CoA oxidasa, putativa		
12			Enoil-CoA hidratasa I, putativa		
13	Vía III	PhaG FabD	3-hidroxiacil-ACP-CoA transferasa Malonil-CoA-ACP transacilasa	<i>Pseudomonas mendocina,</i> <i>recombinant Escherichia coli</i>	(Sudesh et al 2000) (Taguchi et al 2008)
14	Vía IV		Acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADH	<i>Rhizobium (Cicer) sp. CC 1192</i>	(Chohan Copeland, 1997)
15		SucD	Semialdehído deshidrogenasa succínica	<i>Clostridium kluyveri</i>	(Valentin Dennis, 1997)
16	Vía V	4hbD	4-hidroxiacetyl-CoA deshidrogenasa		
17		OrfZ	4-hidroxiacetyl-CoA: transferasa de CoA		
18	Vía VI		Lactonasa, putativa	<i>Mutantes y recombinantes de Alcaligenes eutrophus</i>	(Xie & Chen, 2002)
19			Hidroxiacetyl-CoA sintasa, putativa		
20	Vía VII		Alcohol deshidrogenasa, putativa	<i>A. hydrophila 4AK4</i>	
21	Vía VIII	ChnA	Ciclohexanol deshidrogenasa	<i>Acinetobacter sp. SE19, Brevibacterium epidermidis HCU</i>	(Brzostowicz 2002)
22		ChnB	Ciclohexanona monooxigenasas		
23		ChnC	Caprolactona hidrolasa		
24		ChnD	6-hidroxihexanoato deshidrogenasa		
25		ChnE	6-oxohexanoato deshidrogenasa		
26			Semialdehído deshidrogenasa, putativa		
27			6-hidroxihexanoato deshidrogenasa, putativa		
28			Hidroxiacetyl-CoA sintasa, putativa		

(Chen, 2010).

De acuerdo con Kessler y Witholt: “La regulación del metabolismo de PHA puede tener lugar a diferentes niveles: (1) activación de la expresión del gen pha debido a señales ambientales específicas, como la inanición de nutrientes; (2) activación de las enzimas sintéticas de PHA

por componentes celulares específicos o intermedios metabólicos; (3) inhibición de enzimas metabólicas de vías competidoras y, por lo tanto, enriquecimiento de intermediarios necesarios para la síntesis de PHA; o (4) una combinación de estos (Kessler & Witholt, 1998). Se han reportado ocho diferentes vías de síntesis de PHAs, las cuales se resumen en la tabla 1.

Se han caracterizado aproximadamente 150 componentes de los PHAs diferentes que representan una clase muy diversa de polímeros bacterianos.

En el citoplasma de las bacterias, los gránulos de PHA se presentan como inclusiones insolubles en agua. Las proteínas asociadas a gránulos juegan un papel importante en la síntesis y degradación de PHA y en la formación de gránulos de PHA. La superficie de un gránulo de PHAs está recubierta con una capa de fosfolípidos y proteínas. Las fascinas, una clase de proteínas, son los compuestos predominantes en la interfaz de un gránulo. Las fascinas influyen en el número y el tamaño de los gránulos de PHA (Steinbu, 2005).

Los gránulos de PHA bacterianos tienen mayormente entre 200 y 500 nm de diámetro. Existe una densa membrana de entre 15 y 20 nm en la superficie de estos gránulos. Análisis químicos han demostrado que los cuerpos de inclusión contienen aproximadamente 97.5% de PHAs, 2% de proteínas y 0.5% de lípidos. La membrana que rodea a los gránulos, de acuerdo al modelo de Mayer y Hopper se compone de 4nm de ancho que corresponden a estructuras lineales, proteínas que conectan a las estructuras globulares y una bicapa lipídica que tiene un grosor aproximadamente de 8 nm. (Steinbu, 2005).

## **6.2 *Pseudomonas***

Las *Pseudomonas* (familia *Pseudomonadaceae*) son organismos magníficamente adaptados con una amplia distribución en el medio ambiente del agua, el suelo, las plantas, los insectos y las aguas residuales. La extraordinaria versatilidad nutricional de estas bacterias les permite sobrevivir en condiciones extremas de frío, así como de calor. Se dice clásicamente que las *Pseudomonas* son aerobias obligadas, pero al demostrar esta versatilidad pueden crecer en condiciones anaeróbicas si se proporciona arginina en un medio de cultivo complejo. La clave de la versatilidad nutricional y la distribución ubicua de las *Pseudomonas* residen en el

único cromosoma circular, superenrollado en el citoplasma. Los genes biosintéticos cruciales que se han mapeado hasta la fecha no están agrupados, y el intercambio de información genética, fundamental para la adaptación de la bacteria a su entorno, puede ocurrir por transducción, transformación y conjugación.

El género *Pseudomonas* contiene más de 140 especies, la mayoría de las cuales son saprófitas. La mayoría de las especies no pueden crecer bajo condiciones ácidas ( $\text{pH} \leq 4,5$ ), y no requieren factores de crecimiento (Poblete-Castro et al., 2020). Las especies de *Pseudomonas* abarcan un grupo de forma de bastón común, gramnegativas, uno o más flagelos polares que proporcionan motilidad, de naturaleza aeróbica, cultivo sin esporas, prueba de catalasa positiva, prueba de oxidasa positiva, saprófitos no patógenos que colonizan el suelo, el agua y los ambientes de la superficie de las plantas. También segrega pioverdina, un sideróforo verde amarillo fluorescente en condiciones de limitación de hierro, la *Pseudomonas fluorescens* también produce un tipo adicional de sideróforo como la tioquindobactina (Scales et al., 2014). Es un aerobio obligado, a excepción de algunas cepas que pueden utilizar  $\text{NO}_3$  como aceptor de electrones en lugar de  $\text{O}_2$  (Palleroni, 2015).

Más de 25 especies están asociadas con humanos. La mayoría de las *pseudomonas* conocidas por causar enfermedades en humanos están asociadas con infecciones oportunistas. Estos incluyen *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. maltophilia* y *P. putrefaciens* (Baron, 1996). Existe un grado limitado de variabilidad entre las cepas identificadas como *P. putida* y *P. fluorescens* (Gill et al., 1994).

Este grupo de bacterias se caracteriza por su extrema versatilidad metabólica. Entre los compuestos orgánicos que son capaces de metabolizar se encuentran hidratos de carbono, ácidos alifáticos, aminas, amidas, aminoácidos, compuestos aromáticos y alcoholes (Revelles, 2014). Esta adaptación a diferentes entornos se logra en gran medida a través de la expresión de diferentes conjuntos de genes en diferentes circunstancias. En las bacterias, parte de esta regulación a menudo está controlada por diferentes factores  $\alpha$ , que pueden iniciar la transcripción mediante el reconocimiento de diferentes elementos aguas arriba. El número de factores  $\alpha$  en un organismo puede considerarse como una medida de su adaptabilidad (Martínez-Bueno et al., 2002).

Además de los ácidos grasos 16:1  $\omega$ 9c, 16:0 y 18:1  $\omega$ 7c típicos de la mayoría de las proteobacterias, las especies de *Pseudomonas* tienen como ácidos grasos celulares 3-OH 10:0, 3-OH 12:0 y 12:0, así como el Q -9 ubiquinona. La mayoría de las especies también tienen el componente saturado 12:0 2-OH y la ausencia de niveles significativos de 3-OH 14:0 196. Un pequeño número de especies también puede producir ácidos grasos 14:0 (Urakami et al., 1992). Se ha observado que el fosfatidil glicerol, la fosfatidil etanolamina y el difosfatidil glicerol ('cardiolipina') son los componentes principales, con una serie de componentes secundarios no caracterizados también presentes. Estos comprenden las composiciones químicas celulares típicas de las especies del género *Pseudomonas* (sensu stricto). El valor diferencial de los componentes lipídicos de varios taxones bacterianos se encuentra en las combinaciones globales de las especies lipídicas, no necesariamente en presencia de un solo componente lipídico. El porcentaje de contenido en G-C del ADN está entre 58-69% en *Pseudomonas* (Revelles, 2014).

Los genomas de *Pseudomonas* suelen tener tamaños entre 6 y 7 Mbp), en comparación con los más de cien genomas bacterianos secuenciados, solo unos pocos son más grandes que los genomas de *Pseudomonas* (p. ej., el genoma de *Bradyrhizobium japonicum* de 9,1 Mbp). Las repeticiones globales en la *Pseudomonas* incluyen regiones duplicadas del cromosoma, como múltiples grupos de ARNr. El nivel promedio de repeticiones globales en los genomas bacterianos es de alrededor del 4 % (Ramos, 2004).

Los genomas de *Pseudomonas* también difieren de muchos otros genomas bacterianos en que tienen un sesgo hacia la subrepresentación de los tramos de purina, mientras que, en promedio, la mayoría de los genomas bacterianos tienden hacia la sobrerrepresentación de los tramos de purina. Es probable que este sesgo se deba a factores ambientales 33, 35, por lo general son bacterias del suelo (Weinel, Ussery, et al., 2002).

### **6.2.1 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es una Gram-negativa que mide de 0,5 a 0,8  $\mu$ m por 1,5 a 3,0  $\mu$ m. No se conocen etapas de reposo. Casi todas las cepas son móviles mediante un flagelo polar única y algunas cepas tienen dos o tres flagelos. En algunas especies también se pueden

formar flagelos laterales de longitud de onda corta (Palleroni, 2015). Es un aerobio no fermentativo que deriva su energía de la oxidación en lugar de la fermentación de carbohidratos. Aunque puede usar más de 75 compuestos orgánicos diferentes, puede crecer en medios que solo suministran acetato para carbono y sulfato de amonio para nitrógeno. Además, aunque es un aerobio, puede crecer anaeróbicamente, utilizando nitrato como un receptor de electrones. Este organismo crece bien de 25 °C a 37 °C, pero puede crecer lentamente o al menos sobrevivir a temperaturas cada vez más altas (Baron, 1996). La mayoría, si no todas, las especies no crecen en condiciones ácidas (pH 4,5 o inferior). La mayoría de las especies no requieren factores de crecimiento orgánicos (Palleroni, 2015).

*P. aeruginosa* tiene un mayor nivel de repeticiones locales que los otros genomas de *Pseudomonas*. Esto se debe en parte al menor contenido de AT (33%) que los otros genomas. A medida que la composición de la base se desvía más del contenido de 50 % de AT, aumentan las posibilidades de encontrar repeticiones locales. Entre los genomas de *Pseudomonas* secuenciados hasta la fecha, el genoma de *P. aeruginosa* tiene el contenido de AT más bajo (33 %), mientras que comparado con las cepas *P. fluorescens*, *P. Putida* y *P. syringae* pv. *Tomato*, tienen un 38-42 % de AT. Los cuatro genomas de *Pseudomonas* contienen alrededor de 5450 (+/- 100) genes y entre 4 y 7 operones de ARNr. Las repeticiones locales pueden desempeñar un papel en las mutaciones del ADN, aunque para organismos ricos en GC como *Pseudomonas*, el papel de las repeticiones locales es menos claro. Finalmente, todos los genomas de *Pseudomonas* tienen una mayor fracción de repeticiones directas que de repeticiones invertidas (tanto global como localmente); esta es una tendencia que se observa en la mayoría de los genomas bacterianos. (Jensen et al., 1999; Ramos, 2004).

Al individualizarse de la mayoría de las bacterias gramnegativas, *P. aeruginosa* es positiva o negativa en una reacción oxidasa. Además, *P. aeruginosa* es permanentemente incapaz de fermentar lactosa, con la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoníaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares (Paz-Zarza et al., 2019). No producen xantomadinas, Catalasa positiva. Quimioorganotrófico. Las cepas de la especie incluyen en su composición los ácidos grasos hidroxilados C10:03OH y C12:0, y C12:02OH,

y ubiquinona Q-9. Ampliamente distribuida en la naturaleza. Algunas especies son patógenas para humanos, animales o plantas.

La desnitrificación y licuefacción de gelatina está presente en la gran mayoría de cepas. La hidrólisis de Tween 80 es débil y a la reacción lecitinasa es negativa (Palleroni, 2015).

*P. aeruginosa* se encuentra en el agua, las plantas, el suelo y en la epidermis de los animales. En la naturaleza, se encuentra comúnmente como plancton nadando a través del agua o como una biopelícula, grupos de bacterias que comparten el mismo fenotipo y propiedades químicas comunes (Jenny y Kingsbury, 2018). No forma esporas y es capaz de causar una variedad de infecciones tanto en huéspedes inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Tiene amplia versatilidad, resistencia a los antibióticos y una amplia gama de defensas dinámicas, lo que la convierten en un organismo extremadamente difícil de tratar en la medicina moderna (Wilson y Pandey, 2020). La especie se puede dividir internamente en varios subgrupos (tipos) útiles para fines epidemiológicos (Palleroni, 2015).

*P. aeruginosa* es considerablemente más resistente a los compuestos antibacterianos, entre ellos los antibióticos, y esto se atribuye, en parte, a la baja permeabilidad de su membrana externa. Por otro lado, esta especie es más sensible que otras especies de *pseudomonas* fluorescentes a la acción del quelante etileno-diaminotetraacetato (EDTA). Hay un alto contenido de fosfato en la membrana externa de *P. aeruginosa* y el quelante puede eliminar los cationes divalentes, principalmente magnesio, a los que puede deberse la estabilidad de la pared celular (Wilkinson, 1968).

La acumulación de polihidroxicanoatos comúnmente ocurre con longitudes de monómero superiores a C4 cuando crecen en alcanos o gluconato. No producen protésica y no están rodeadas por cápsula.

### **6.2.2 *Pseudomonas putida***

*Pseudomonas putida* es una bacteria gramnegativa, con forma de varilla, no fermentadora que se encuentra ubicuamente en el medio ambiente. Alberga un amplio espectro de enzimas metabólicas, lo que permite que la especie se adapte a varios nichos, incluidos los hábitats asociados al suelo y al agua (Peter et al., 2017).

*Pseudomonas putida* pertenece al grupo fluorescente de las especies de *Pseudomonas*, un grupo de patógenos oportunistas que causan principalmente infecciones nosocomiales. Sin embargo, se han reportado pocos casos de bacteriemia por *P. putida* en pacientes adultos (Yoshino et al., 2011).

Las cepas de *Pseudomonas putida* son bacterias de crecimiento rápido, frecuentemente aisladas de la mayoría de los suelos y aguas templados, particularmente de los suelos contaminados. Son los oportunistas nutricionales por excelencia y un paradigma de microorganismos metabólicamente versátiles que reciclan desechos orgánicos en compartimentos aeróbicos y microaerófilos del medio ambiente, y que juegan un papel clave en el mantenimiento de la calidad ambiental (Ramos, 2004). La ubicuidad de *P. putida* refleja su elevada capacidad para adaptarse a una enorme variedad de condiciones fisico-químicas presentes en los distintos hábitats donde vive. Esta habilidad representa la capacidad que tiene la cepa de integrar las señales recibidas del medio extracelular con el estado fisiológico celular, conllevando la activación de una apropiada y compleja red de regulación que controla el metabolismo celular (Regenhardt et al., 2002).

La cepa KT2440 2, 53 de *P. putida* es probablemente la *Pseudomona* de laboratorio saprofita mejor caracterizada que ha conservado su capacidad para sobrevivir y funcionar en el medio ambiente. La bacteria es un derivado libre de plásmido de una bacteria que degrada el tolueno, originalmente designada *Pseudomonas arvilla* cepa mt-2 (Nozaki, 1963) y posteriormente reclasificada como *P. putida mt\_2* (Nakazawa, 2002; Weinel, Nelson, et al., 2002). Es la primera bacteria Gram-negativa del suelo certificada por el Comité Asesor de ADN Recombinante de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos como la cepa huésped de un sistema de bioseguridad del vector huésped (HV1) para la clonación de genes en bacterias gramnegativas del suelo". Un amplio espectro de herramientas genéticas versátiles, en particular minitransposones y herramientas basadas en estos, han sido desarrollados para su análisis, manipulación y uso como huésped de genes clonados de otros organismos del suelo (De Lorenzo & Timmis, 1994; Herrero et al., 1990; Mermod et al., 1984). KT2440 se está explotando en el desarrollo de una variedad de aplicaciones biotecnológicas, que incluyen el diseño de nuevas rutas catabólicas para los contaminantes (Aranda-Olmedo et al., 2002; Burger et al., 2000; Rojo et al., 1987), la producción por



biocatálisis de intermediarios, incluidos los sintones quirales para síntesis químicas (Williams y Worsey, 1976) y la mejora de la calidad de los combustibles fósiles, por ejemplo por desulfurización". KT2440 también puede colonizar la rizosfera de una variedad de plantas de cultivo, como el maíz, el trigo, la fresa, la caña de azúcar y la espinaca, y se está utilizando para desarrollar nuevos biopesticidas y promotores del crecimiento vegetal que funcionan en la rizosfera de la planta (Ramos, 2004).

El análisis del genoma sugiere que el carbono y la energía pueden derivarse del metabolismo de una variedad de compuestos que incluyen acetoína, fructosa, butirato, betaína, glucosa, gluconato, glutarato, glicerol, hidantoína, lactato, malato, manosa, ribosa, sorbato y sacarosa, entre otros, y que el nitrógeno y la energía pueden derivarse del catabolismo de los aminoácidos alanina, arginina, aspartato, asparagina, glutamina, glutamato, glicina, histidina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, serina, valina, lisina, prolina e hidroxiprolina (Ramos, 2004).

Se han descrito 105 islas genómicas con diferentes porcentajes en GC (Nelson et al., 2002). Estas islas genómicas están principalmente implicadas en la captación y degradación de compuestos orgánicos, transporte de iones, síntesis y secreción de metabolitos secundarios, siendo las principales responsables de la elevada versatilidad metabólica presente en *P. putida*.

El genoma de la cepa KT2440 consta de un único cromosoma circular de 6.181.863 pares de bases (pb), cuyo contenido de G+C varía entre el 43% y el 69% (ventanas de 4 kpb), y tiene un valor medio del 61,6%. El contenido de G + C exhibe una distribución similar a la de Gauss con un máximo de 63,3% y un sesgo hacia valores más bajos. Este sesgo resulta principalmente de las islas de genes, la secuencia del genoma del fago y los transposones y es aún más evidente en la distribución de frecuencias de las secuencias de tetranucleótidos. A este respecto, la composición espacial de tetranucleótidos del genoma de *P. putida* es intermedia entre el genoma homogéneo de la cepa PAOI de *P. aeruginosa*, que contiene solo unas pocas islas pequeñas y el genoma de la cepa DC3000 de *P. syringae*, que exhibe una distribución bipartita.

El genoma de *P. putida* codifica 184 proteínas que están relacionadas con elementos móviles, incluidos 82 genes para transposasas, 8 intrones del grupo II. Se identificaron tres genomas

de bacteriófagos, y una región similar a un fago codifica una piocina de tipo R, una bacteria probablemente derivada de un fago. El genoma de *P. syringa* e OC3000 contiene el doble de genes relacionados con elementos móviles, mientras que el de *P. aeruginosa* PAOI contiene muy pocos (Ramos, 2004).

El genoma de KT2440 contiene más de 100 regiones de composición atípica de oligonucleótidos, incluidas varias islas de genes que pueden haber sido adquiridas por transferencia horizontal de genes. Nueve de estas islas tienen más de 20 kb y codifican, además de enzimas para la movilización, funciones como absorción y metabolismo de aminoácidos y opina, resistencia al arseniato, resistencia a metales pesados (p. ej., cobre, cadmio), respuesta al estrés oxidativo (peroxidasa), biosíntesis de metabolitos, proteínas reguladoras y un sistema de modificación de restricción tipo I. Estas funciones secundarias pueden contribuir a la aptitud y versatilidad de *P. putida* en su hábitat natural (Ramos, 2004).

*P. putida* KT2440 tiene capacidades de transporte muy amplias, con aproximadamente 370 sistemas de transporte de membranas citoplásmicas, un 15 % más que *P. aeruginosa*, y constituye aproximadamente el 12 % del genoma completo. La familia más grande corresponde al transportador ATP-Binding Cassette (ABC) (94 miembros parálogos), de los cuales se predice que una proporción significativa se dedicará a la absorción de aminoácidos. Esto es coherente con la capacidad de KT2440 para colonizar las raíces de las plantas, ya que los exudados de las raíces son ricos en aminoácidos y refleja su énfasis fisiológico en el metabolismo de los aminoácidos y sus derivados para competir con éxito en la rizosfera (Ramos, 2004).

KT2440 codifica varios sistemas de captación para osmoprotectores, solutos compatibles como glicina betaína o prolina betaína, incluidos transportadores ABC para glicina (PP0871-PP0868) y prolina betaína (PP294-PP296 y PP2774-PP2775), un transportador MFS de prolina betaína (PP2941) y seis miembros de la familia de transportadores de colina/carnitina/betaína (PP5374, PP5061, PP3957, PP3628, PP0229 y PP2692 (putativo)). Los cinco transportadores del ácido gamma-aminobutírico (GABA; PP4106, PP2911, PP4756, PP2543 y PP0284), de los cuales *P. aeruginosa* codifica solo una copia, pueden estar involucrados en la captación de ácido butírico, que puede ser subsecuentemente convertidos en ácidos polihidroxicarboxílicos (bioplásticos). KT2440 también tiene los

determinantes para 11 transportadores de eflujo de aminoácidos de la familia LysE (*P. aeruginosa* solo tiene uno) que presumiblemente juegan un papel clave en la prevención de la acumulación de niveles inhibitorios de aminoácidos o sus análogos en la célula. También consistente con su capacidad para colonizar las raíces de las plantas, KT2440 tiene un transportador de opinión de la familia ABC predicho (PP4453-PP4455), que se ha descrito previamente para otros microorganismos de la rizosfera, como *A. tumefaciens* y *S. meliloti*, y enzimas para el metabolismo de las opiniones (PP4452-PP4460), lo que sugiere que es capaz de explotar las opiniones producidas por plantas inducidas en la rizosfera por otras especies de bacterias (Lyi et al., 1999).

### **6.3 Papel de la membrana externa en la absorción y utilización de la fuente de carbono**

Las *Pseudomonas* son reconocidas por su capacidad para metabolizar más de 80 compuestos orgánicos de carbono, incluidos azúcares, aminoácidos, ácidos carboxílicos, compuestos aromáticos simples, hidrocarburos parafínicos y terpenos. Otro sello distintivo del género es su resistencia intrínseca a muchos antibióticos, detergentes, tintes y otros compuestos tóxicos debido a la baja permeabilidad de las membranas externas de *Pseudomonas* combinada con mecanismos de resistencia secundarios como el eflujo y la hidrólisis enzimática que aprovechan el movimiento lento de los compuestos en la célula. Por lo tanto, uno de los aspectos más intrigantes de la fisiología de *Pseudomonas* es cómo estos organismos absorben la miríada de compuestos estructuralmente diversos que se encuentran en sus entornos a pesar de las propiedades de barrera de la membrana externa. Diferentes sustratos son absorbidos por diferentes transportadores (Stanier et al., 1966). Además, algunos sustratos pueden tener más de un sistema de transporte que difieren entre sí en el modo de acción, la cinética de transporte y/o los patrones de expresión, lo que permite al organismo optimizar su capacidad de absorción en función de las condiciones ambientales (Palleroni, 2015).

Como la membrana externa se encuentra en la interfaz del medio ambiente y el interior de la célula, juega un papel clave en la determinación de qué compuestos ingresan a la célula. La membrana exterior es una barrera semipermeable a las sustancias hidrófobas y, en colaboración con los sistemas de salida, limita el paso de pequeñas moléculas anfipáticas, hidrófobas y cargadas, dando a las bacterias Gram-negativas una ventaja selectiva sobre sus

contrapartes Gram-positivas en ambientes ricos en antibióticos, detergentes u otros compuestos tóxicos. A diferencia de otras membranas biológicas, la membrana externa es una bicapa asimétrica. La hoja interna está compuesta de fosfolípidos y es similar en composición a la de la membrana citoplasmática. La hoja exterior puede tener algunas moléculas de fosfolípidos, pero está compuesta principalmente de lipopolisacárido (LPS). Son las propiedades químicas del LPS las que determinan en gran medida las propiedades de barrera de la membrana exterior. Los patógenos que producen una forma truncada de LPS llamada lipooligosacárido (LOS) son más susceptibles a los antibióticos y detergentes hidrofóbicos que los patógenos que producen LPS (Hancock, 1991). Los fosfatos en la región central de LPS se unen a iones de magnesio y forman puentes cruzados electrostáticos no covalentes con moléculas de LPS adyacentes. Estos restos de fosfato también contribuyen a la gran carga superficial negativa neta de las bacterias.

Además de su papel como barrera, la membrana externa actúa como filtro de selectividad, permitiendo el paso de pequeños solutos hidrofílicos (Hancock y Brinkman, 2002). Esta permeabilidad selectiva está mediada por canales de proteínas llenos de agua llamados porinas. Las moléculas hidrófilas de hasta 600 Da atraviesan estos canales por difusión simple, por lo que la cinética de captación depende en gran medida del gradiente de concentración del soluto. Además, las porinas son débilmente selectivas de iones debido a la presencia de aminoácidos cargados en la boca del canal (Bauer et al., 1989; Schirmer, 1998). Hay cuatro clases de porinas, porinas generales, específicas, cerradas y de eflujo. Las porinas generales discriminan entre solutos basándose únicamente en sus propiedades fisicoquímicas (es decir, tamaño, carga, hidrofilia y grado de concentración). Las porinas específicas tienen sitios de unión a sustrato saturables, estereoespecíficos y a menudo se asocian (quizás de manera transitoria) con proteínas de unión a sustrato periplásmico y transportadores de membrana citoplasmática. Estas porinas son necesarias para el crecimiento a bajas concentraciones de sustrato porque se acelera la difusión de sustratos en estas condiciones. De lo contrario, las proteínas de unión periplásmica de los transportadores de membrana citoplásmica de alta afinidad estarían saturadas como máximo en un 5 % (Hengge & Boos, 1983; Nikaido & Vaara, 1985), lo que hace que la tasa de permeabilidad de la membrana externa limite el crecimiento. Además, al igual que las porinas generales, las porinas específicas también pueden actuar como filtros de selectividad al absorber niveles bajos de

compuestos estructuralmente no relacionados (Nikaido, 1994). Las porinas cerradas toman moléculas grandes como los complejos de sideróforo de hierro y la vitamina B12. Estos canales se unen específicamente a sus sustratos y, con el aporte de energía a través de la proteína TonB, se abren y permiten el paso del sustrato (Klebba & Newton, 1998). Las porinas de eflujo, también llamadas túneles de canal, están involucradas junto con los componentes de la membrana interna (bombas y proteínas conectoras) en la excreción de moléculas tóxicas de la célula, lo que ayuda a determinar las propiedades de barrera de la membrana externa (Hancock & Brinkman, 2002; Poole, 2001).

La membrana externa de *P. aeruginosa* es aproximadamente 13 veces menos permeable que la de *E. coli*. Esta diferencia en la permeabilidad se puede atribuir en parte a la composición de porinas de las membranas externas de estos organismos. La membrana externa de *P. aeruginosa* solo contiene una porina general débilmente activa, OprF y una gran cantidad de porinas específicas (OprB, OprD, OprP, OprO). Además de estas porinas específicas conocidas, *P. aeruginosa* tiene una nueva familia de porinas de 19 miembros que se cree que son específicas para una variedad de metabolitos de *Pseudomonas* (6). El análisis de los genomas parcialmente secuenciados de *P. putida*, *P. fluorescens* y *P. syringae* indica que las grandes familias parálogas de porinas son comunes a este género.

De esta forma, las fuentes de carbono en las bacterias se metabolizan de manera diferencial. Se han estudiado tres vías para la síntesis de monómeros de PHA en bacterias (Fig. 1). La vía I utiliza azúcares como glucosa y fructosa para producir homopolímero de PHB. Los copolímeros se producen a través de las vías II y III. Las fascinas influyen en el número y el tamaño de los gránulos de PHA (Mohapatra et al., 2017).

Para la optimización de la producción de PHA, el consumo de fuentes de carbono es uno de los parámetros importantes a estudiar, ya que es uno de los factores determinantes de los costos (Abid et al., 2016). Hay una creciente base de conocimiento en el uso de otras materias primas como alcoholes y glicerol.

### **6.3.1 Ruta metabólica para la producción de PHA por *Pseudomonas***

La Figura 1 esquematiza las principales vías metabólicas de síntesis de PHAs, siendo la vía II, la vía de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, se descifró cuando se descubrió que *Pseudomonas fluorescentes*, como *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*, acumulan PHA en unidades de cadena media de alcanos, alcoholes, alcanosatos y aceites (Taguchi et al., 2001).

Aquí, los ácidos grasos se convierten primero en los correspondientes tioésteres de acil-CoA que luego se oxidan por  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos a través de trans-2- enoil-CoA y (S) - 3-hidroxiacil-CoA para formar 3-cetoacil-CoA. El 3 cetoacil-CoA se escinde luego por una  $\beta$ -cetotilasa para formar acetil-CoA y un acil-CoA que comprende dos átomos de carbono menos en comparación con el acil CoA que ingresó al primer ciclo. Los ciclos posteriores siguen hasta que el acil-CoA original se convierte completamente en acetil-CoA. Las enzimas enoil-CoA hidratasa (codificada por phaJ) y 3-cetoacil-CoA reductasa (codificada por fabG) participan activamente en la conversión de los intermedios de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en sustratos adecuados, es decir (R) -3-Hidroxiacil-CoA para el PHA sintasa para polimerizar (Rai, 2010).

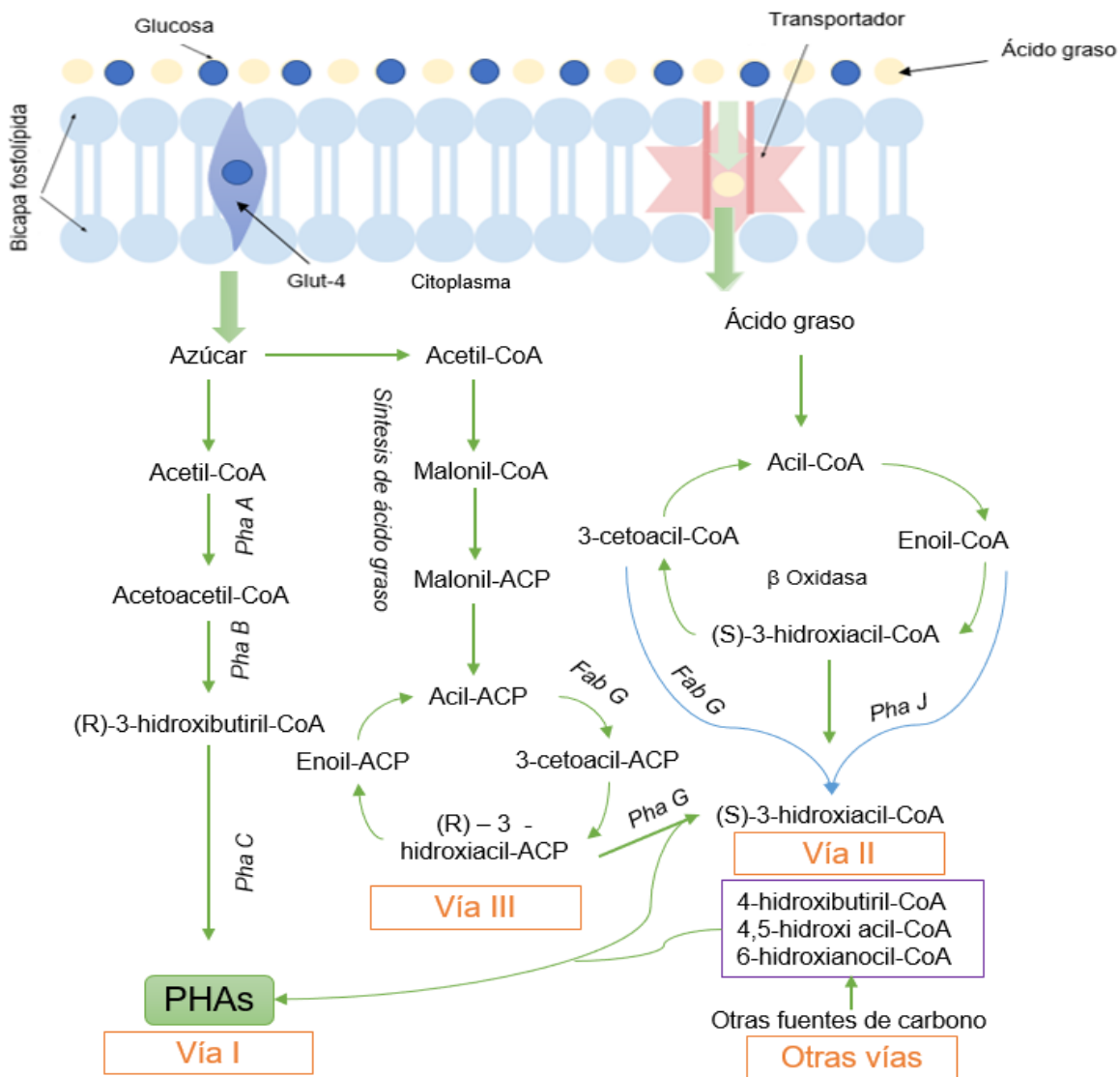


Figura 1. Vías metabólicas para la síntesis de PHAs por bacterias. (Mohapatra et al., 2017).

### 6.3.2 Glicerol crudo

La biología sintética y la ingeniería metabólica contemporáneas ofrecen la posibilidad de ampliar la gama de sustratos de las fábricas de células microbianas más allá de los azúcares que normalmente se utilizan como fuentes de carbono (Calero & Nikel, 2019; Prather, 2019).

El biodiésel es un combustible compuesto por ésteres monoalquílicos (metílicos, etílicos o propílicos) de ácidos grasos de cadena larga derivados de aceites vegetales o grasas animales

(Hollinshead et al., 2014). Su valor como combustible ha sido reconocido ya en el siglo XIX: la transesterificación de un aceite vegetal catalizada por una base se llevó a cabo cuatro décadas antes de que el primer motor diesel entrara en funcionamiento (Henriques, 1898). El principal subproducto de este proceso de producción es el glicerol: aprox. se generan 10 kg de glicerol crudo por cada 100 kg de biodiésel producido. Se estima que el mercado de biodiesel alcanzó los 37 mil millones de galones en 2016 con un crecimiento anual del 42% que indirectamente produce 4 mil millones de galones de glicerol crudo (Garlapati et al., 2016). El exceso de glicerol crudo producido en la industria de los biocombustibles condujo a una disminución del precio del glicerol y, hace algunos años, muchas plantas de producción de biodiesel incluso lo consideraban un desecho (con un costo de eliminación asociado). Como consecuencia de esta situación global, los últimos 10 años han sido testigos del auge del glicerol como un sustrato muy atractivo para las fermentaciones bacterianas (Mota et al., 2017). Convertir el glicerol crudo en productos de valor agregado se convirtió así en una necesidad relevante para mejorar la viabilidad de la economía de los biocombustibles (Pagliaro & Rossi, 2008), y se han explorado enfoques tanto químicos como biológicos para convertir el glicerol en productos más valiosos.

Debido a la naturaleza más reducida de los átomos de carbono en el glicerol en comparación con los azúcares (por ejemplo, glucosa y xilosa, sustratos habituales en bioprocesos), el polirol se procesa principalmente a través del metabolismo oxidativo en procesos aeróbicos. Dado que se debe oxidar menos carbono en CO<sub>2</sub> para generar poder reductor, el uso de glicerol ofrece potencialmente mayores rendimientos en el sustrato que cuando se usan azúcares (Poblete-Castro et al., 2020).

El glicerol crudo, se compone principalmente de ácidos grasos libres y ésteres metílicos de ácidos grasos que pueden inducir una utilización selectiva del sustrato de carbono para el crecimiento bacteriano y la biosíntesis de PHAs. Es generado en grandes cantidades y se ha propuesto como una materia prima atractiva para la producción bacteriana de productos de valor agregado como los PHAs (Fontaine *et al.*, 2017).

De acuerdo con diversos estudios (Ito et al., 2005; Mu et al., 2006; Ngo et al., 2011; Selemba et al., 2009b, 2009a), demuestran que posee un alto contenido energético, característica favorable para la bioconversión del glicerol crudo en productos valiosos. Han caracterizado



el glicerol crudo procedente de plantas de fabricación de biodiésel para obtener una idea más amplia de las impurezas presentes en el mismo. Chi et al. (2007) reportaron la presencia de 16% de impurezas en una muestra de glicerol crudo recolectado de una refinería de biodiesel. Según ellos, las principales impurezas presentes en la muestra fueron jabón, ácidos grasos libres, metanol, triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos sin reaccionar (Chi et al., 2007). Para una muestra de glicerol crudo recolectada de una planta de fabricación de biodiesel en Japón; Ito et al. (2005) reportaron la presencia de 540 g/l de carbono orgánico total (COT) con cenizas (8%, p/v), metanol (25%, p/p), 0,04% (p/p) de diacilglicerol y 0,01% (p/p) monoacilglicerol (Ito et al., 2005). En otro informe de Tang et al. (2009), la presencia de sulfato de sodio 25,8 2,7 % (p/p), metanol 1,5 0,2 % (p/p), agua y otros compuestos 5,2 1,0 % (p/p), se confirmaron para una muestra de glicerol crudo (Tang et al., 2009). Una muestra de glicerol crudo del proceso de fabricación de biodiesel también puede contener una pequeña cantidad del aceite usado para la transesterificación (Chi et al., 2007) y cualquier otra impureza presente en dicho aceite.

Varios estudios han descrito el uso de glicerol por especies de *Pseudomonas*, y estudios bioquímicos y genéticos han revelado una operación metabólica, regulación genética y respuestas fisiológicas bastante diferentes en comparación con otras bacterias (Poblete-Castro et al., 2020).

Dada la alta capacidad de las *Pseudomonas* para hacer frente a compuestos tóxicos, p. Ej. CH<sub>3</sub>OH, presente en glicerol crudo en concentraciones relativamente altas, las células de *Pseudomonas* exhiben esencialmente el mismo patrón de crecimiento en comparación con los cultivos que contienen glicerol puro (Poblete-Castro et al., 2020).

### ***6.3.3 Aspectos generales de la asimilación de glicerol en bacterias***

El procesamiento de glicerol en bacterias puede seguir esencialmente sólo dos posibles rutas bioquímicas, la naturaleza reducida de sus átomos de carbono dificulta el catabolismo de este sustrato en ausencia de aceptores de electrones externos (NO<sub>3</sub> o fumarato). Independientemente de la vía seguida, los pasos de fosforilación y deshidrogenación

finalmente convierten el glicerol en dihidroxiacetona-P (DHAP), ya sea de forma aeróbica o anaeróbica (Fig. 2).

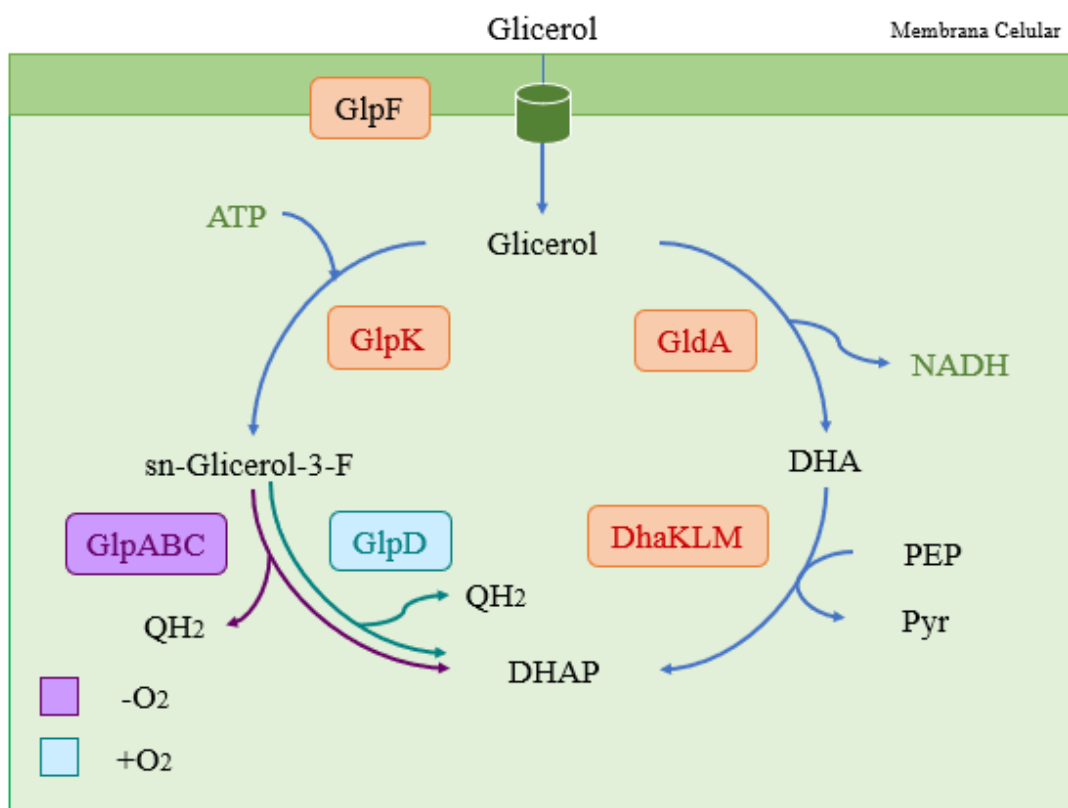


Figura 2. Vías conservadas para el metabolismo del glicerol en bacterias (Poblete-Castro et al., 2020)

En la mayoría de las bacterias gramnegativas, las vías catabólicas alternativas conducen en última instancia a la generación de dihidroxiacetona-P (DHAP), que luego se canaliza hacia intermediarios glucolíticos clave a través del metabolismo posterior. Aparte de la fosforilación directa dependiente de ATP del glicerol intracelular (glicerol dentro) indicada a la izquierda, el poliol puede oxidarse en dihidroxiacetona (DHA) y luego fosforilarse usando fosfoenolpiruvato (PEP) como donante de fosforilo (como se muestra a la derecha), generando piruvato (Pyr). Las enzimas implicadas en el metabolismo del glicerol son GlpF, facilitador (transportador) del glicerol; GlpK, glicerol quinasa; GlpABC, sn-glicerol-3-P deshidrogenasa (anaeróbica); GlpD, sn-glicerol-3-P deshidrogenasa (aeróbica); GldA, glicerol deshidrogenasa; y DhaKLM, DHA quinasa. QH<sub>2</sub> denota una quinona reducida (por

ejemplo, ubiquinona o menaquinona), que sirve como cofactor para una enzima que contiene flavina. Los pasos enzimáticos indicados en rojo son independientes de la presencia de oxígeno, mientras que las dos posibles reacciones de deshidrogenación de sn-glicerol-3-P se identifican con diferentes colores dependiendo de la disponibilidad de aceptores de electrones (alternativos).

El DHAP se incorpora al metabolismo central del carbono como un precursor clave que se procesa aún más por las mismas rutas glicolíticas desplegadas cuando las bacterias crecen en los azúcares. Además de la incorporación directa de metabolitos derivados de glicerol en biomasa, este compuesto también se puede convertir en una serie de subproductos reducidos para cumplir con el equilibrio redox y de carbono. (Bouvet et al., 1995) describieron especies bacterianas, pertenecientes a los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, capaces de fermentar glicerol. En estas especies, existe una vía reductora para la utilización de glicerol, en la que el sustrato se deshidrata primero mediante una enzima dependiente de vitamina B12 para formar 3 hidroxipropionaldehído que se reduce aún más a 1,3-PDO por una oxidorreductasa unida a NADH (1,3- PDO deshidrogenasa), regenerando así NAD +.

#### **6.3.4 Bioquímica y genética de la utilización de glicerol por *Pseudomonas***

Las especies de *Pseudomonas* poseen más de 300 sistemas de absorción de nutrientes conocidos y supuestos, que les permiten metabolizar una gran cantidad de compuestos orgánicos y habitan muchos nichos ecológicos diversos (Silby et al., 2011). La membrana externa de estas bacterias actúa como una barrera semipermeable, excluyendo muchas clases de moléculas potencialmente tóxicas de la célula. Los nutrientes utilizan canales llenos de agua especializados llamados porinas para atravesar esta barrera física (Chevalier et al., 2017); la entrada real en la célula de *Pseudomonas* está mediada por una de las cuatro clases de transportadores de membrana citoplasmática como sigue: facilitadores de glicerol/agua, fosfotransferasa sistemas, transportadores activos primarios y transportadores activos secundarios (Tamber & Hancock, 2003). El primer transportador de GlpF que se identificó en una especie de *Pseudomonas* fue descrito en *P. aeruginosa* PAO1 por (Schweizer et al., 1997). Los autores también describieron un segundo gen dentro del mismo grupo, glpK, que codifica el glicerol quinasa y vincula funcionalmente el transporte de sustrato con el

metabolismo con la arquitectura genómica del grupo. El transportador GlpT presente en algunas especies de *Pseudomonas* (como *P. aeruginosa* PAO1 y *P. fluorescens* SBW25) parecen actuar como simportador de sn-glicerol-3-P / fosfomicina adual (Hirakawa et al., 2018). Tal mecanismo no ha sido identificado en *P. putida* KT2440.

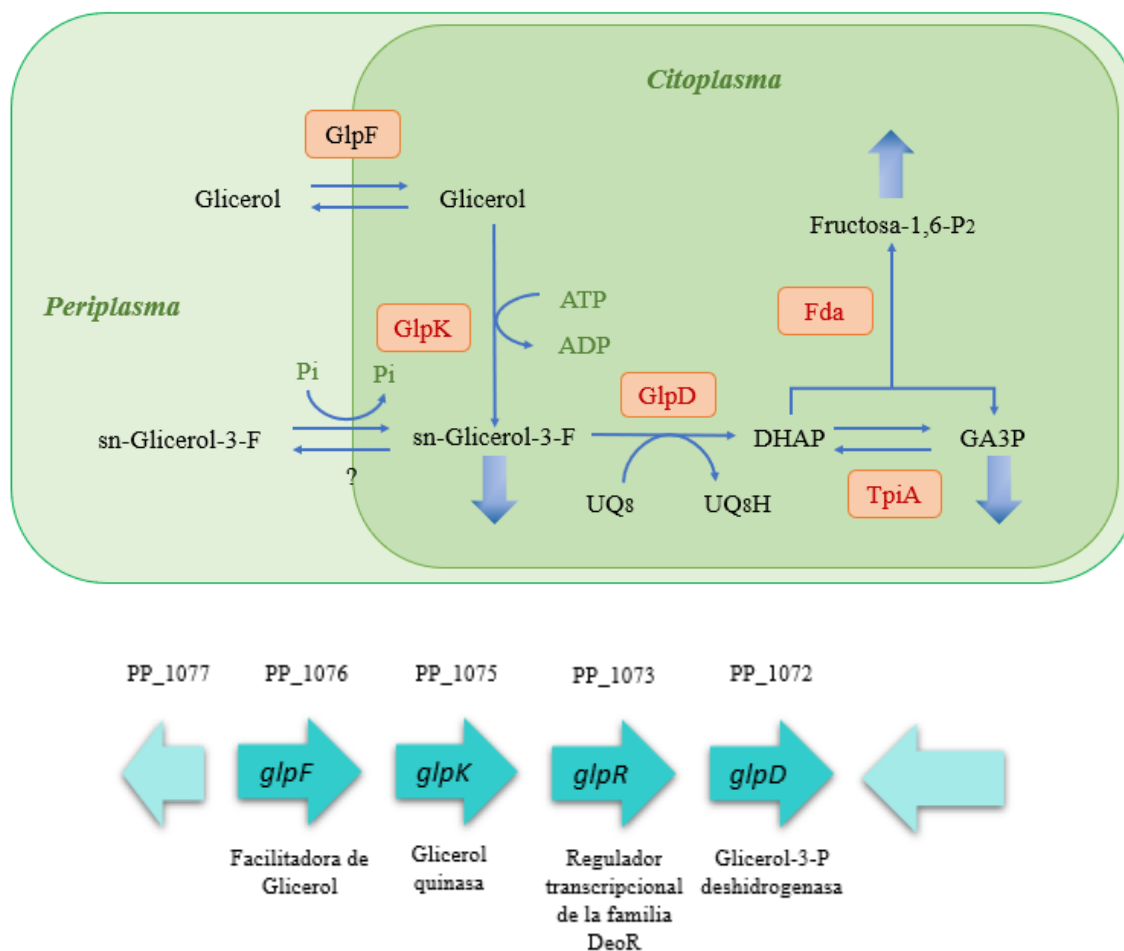


Figura 3. Vías bioquímicas y organización genética de genes implicados en el metabolismo del glicerol en *Pseudomonas putida* KT2440 (Belda et al., 2016).

En la mayoría de las bacterias gramnegativas, las vías catabólicas alternativas conducen en última instancia a la generación de dihidroxiacetona-P (DHAP), que luego se canaliza hacia intermediarios glucolíticos clave a través del metabolismo posterior. Aparte de la fosforilación directa dependiente de ATP del glicerol intracelular (glicerol dentro) indicada a la izquierda, el poliol puede oxidarse en dihidroxiacetona (DHA) y luego fosforilarse usando

fosfoenolpiruvato (PEP) como donante de fosforilo (como se muestra a la derecha), generando piruvato (Pyr). Las enzimas implicadas en el metabolismo del glicerol son GlpF, facilitador (transportador) del glicerol; GlpK, glicerol quinasa; GlpABC, sn-glicerol-3-P deshidrogenasa (anaeróbica); GlpD, sn-glicerol-3-P deshidrogenasa (aeróbica); GldA, glicerol deshidrogenasa; y DhaKLM, DHA quinasa. QH<sub>2</sub> denota una quinona reducida (por ejemplo, ubiquinona o menaquinona), que sirve como cofactor para una enzima que contiene flavina. Los pasos enzimáticos indicados en rojo son independientes de la presencia de oxígeno, mientras que las dos posibles reacciones de deshidrogenación de sn-glicerol-3-P se identifican con diferentes colores dependiendo de la disponibilidad de aceptores de electrones (alternativos).

Mediante la recopilación de información genética, se reconstruyó la vía del metabolismo del glicerol para *P. aeruginosa* y *P. putida*, y se encontró que era similar al conjunto de reacciones bioquímicas aeróbicas para el procesamiento del glicerol en *E. coli* (mostrado en la Fig. 3A para *P. putida* KT2440). La secuencia de reacciones catalizadas por la GlpK quinasa dependiente de ATP y la GlpD deshidrogenasa dependiente de ubiquinol genera DHAP, que actúa como punto de entrada del glicerol en el metabolismo central del carbono y como fuerza impulsora para el transporte y consumo de sustrato.

La DHAP, a su vez, se divide esencialmente en gluconeogénesis (a través de fructosa-1,6-P2) y catabolismo descendente (a través de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, GA3P; ver también Fig. 3A). Hasta ahora no se han identificado enzimas similares a GlpABC o GldA de *E. coli* (ver Fig. 2) en especies de *Pseudomonas*, lo que indica que las vías dependientes de oxígeno para la utilización de glicerol es la ruta preferida en este género [caracterizada por la abundancia especies estrictamente aeróbicas (Silby et al., 2011)].

La bioquímica relativamente simple que subyace a la utilización del glicerol se refleja en una arquitectura genética bastante conservada de los genes *glp* en todas las especies, con *P. putida* KT2440 como ejemplo arquetípico (Fig. 3B). En la cepa KT2440, los genes considerados esenciales para el metabolismo del glicerol se organizan en un grupo genómico que incluye *glpF* (PP\_1076, aquaglyceroporin), *glpK* (PP\_1075, glycerolkinase), *glpR* (PP\_1074, un

regulador transcripcional que pertenece a la familia DeoR) y glpD (PP\_1073, la principal sn-glicerol-3-P deshidrogenasa).

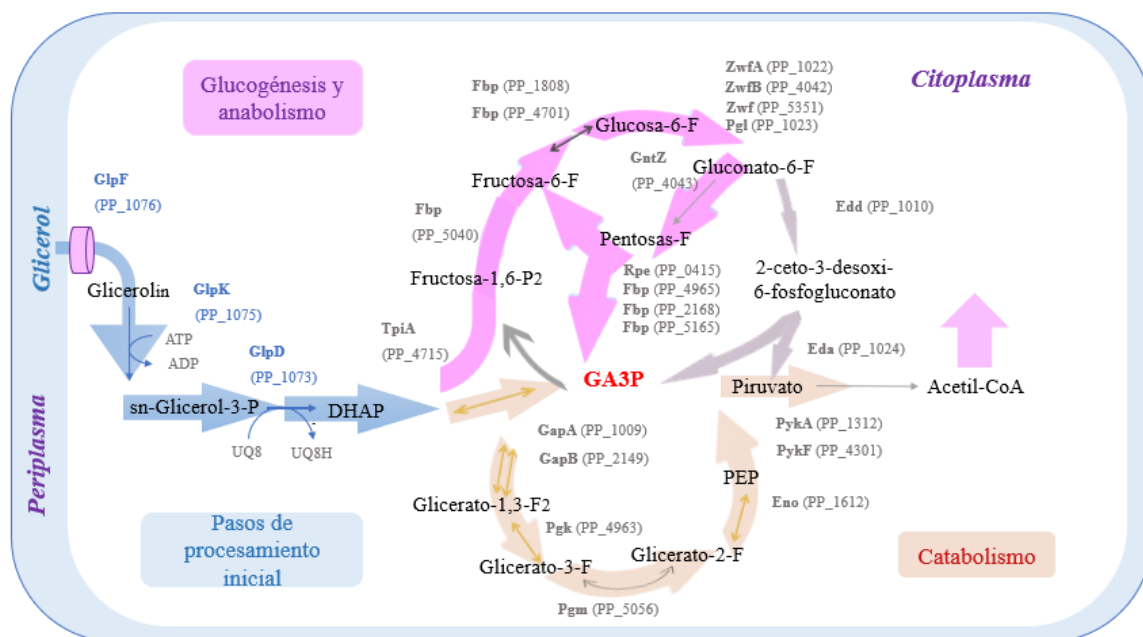


Figura 4. Metabolismo del glicerol en *Pseudomonas putida* (Poblete-Castro et al., 2020).

En la figura 4 se muestra el metabolismo del glicerol en *Pseudomonas putida* KT2440 implica una combinación de vías de procesamiento especiales acopladas a las vías glucolítica y gluconeogénica. En este esquema se muestran las reacciones dentro del metabolismo del carbono central en la cepa KT2440 afectadas por el crecimiento en glicerol según lo indicado por el transcriptoma y los análisis de flujo metabólico. La red bioquímica esboza las principales vías involucradas en el procesamiento del carbono junto con las enzimas que catalizan las conversiones correspondientes. En algunos casos, las reacciones se han agrupado para simplificar el diagrama (por ejemplo, dentro de la ruta de las pentosas fosfato no oxidativas) y solo se muestran algunas isoformas de las enzimas correspondientes. El metabolismo adicional de la acetil-coenzima A (acetil-CoA) se indica mediante una flecha morada. El gliceraldehído-3-P (GA3P) se destaca como un nodo clave que conecta los principales bloques metabólicos (indicados en el diagrama como "pasos de procesamiento inicial", "gluconeogénesis y anabolismo" y "catabolismo") activo en las células cultivadas con glicerol. DHAP, dihidroxiacetona-P; PEP, fosfoenolpiruvato. Los datos transcriptómicos y fluxómicos utilizados (Poblete-Castro et al., 2020)

La organización estructural del grupo de genes *glp* está altamente conservada tanto en *P. putida* KT2440 como en *P. aeruginosa* PAO1, aunque la orientación relativa de los genes está invertida. Además, el grupo de genes *glp* de la cepa KT2440 (es decir, PP\_1076 a PP\_1073) exhibe un alto grado de identidad de secuencia con *glpF* (83%), *glpK* (82%), *glpR* (80%) y *glpD* (72%) de *P. aeruginosa* PAO1 (PA\_3581 a PA\_3584). Existe una relación íntima entre la organización genética de los genes *glp*, la regulación transcripcional ejercida por la proteína GlpR y la red bioquímica desplegada por *Pseudomonass*, cuyas células crecen en glicerol.

Los niveles de expresión de *glpF*, *glpK* y *glpD* son significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) cuando las células se cultivan en glicerol sugiere que todas las enzimas involucradas en el metabolismo del glicerol son inducidas por el glicerol. Esto puede explicar la larga fase de retraso que se puede presentar en el crecimiento de las células con glicerol, ya que las células necesitan este tiempo para inducir la expresión de las enzimas Glp para la utilización eficiente de glicerol (Wang y Nomura, 2010).

El crecimiento en glicerol impone una respuesta metabólica particular en *P. putida* caracterizada por la activación de las rutas glucolítica y gluconeogénica (Fig. 4). Las características más destacadas de la respuesta de todo el genoma al sustrato incluyen (i) la regulación al alza de la transcripción del transporte de glicerol y los genes catabólicos (es decir, el grupo de genes *glp*), (ii) la regulación a la baja de rutas alternativas para el procesamiento del carbono, (iii) la activación de una respuesta gluconeogénica general y (iv) la conjunta ralentización de las actividades a través del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) y el bucle gluconato / 2-cetogluconato para el procesamiento oxidativo de las hexosas. Por lo tanto, el estado de consumo de glicerol parece favorecer la acumulación de biomasa al tiempo que evita la pérdida de carbono como  $\text{CO}_2$  o durante la formación de subproductos oxidados [p. Ej. algunos ácidos orgánicos se producen típicamente cuando las células de *Pseudomonass* crecen sin azúcares (Fuhrer et al., 2005)]. Aparte de estas características fisiológicas generales, se pueden identificar varios nodos reguladores en la red bioquímica que permiten una utilización del sustrato eficiente y estrictamente controlada.

La fosforilación de glicerol dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  y ATP a sn-glicerol-3-P catalizada por GlpK es el paso regulador y limitante clave en la utilización de glicerol en *E. coli* (Zwaig et

al., 1970). En esta especie, la actividad de GlpK está modulada por múltiples factores, como lo es la concentración de ATP, inhibición alostérica mediada por fructosa-1,6-P<sub>2</sub> e inhibición directa por el componente citosólico IIA<sup>Glc</sup> del sistema de azúcar fosfotransferasa (Applebee et al., 2011). Es plausible que algunas de estas características reguladoras se mantengan en las especies de *Pseudomonas*, con la probable excepción de la interacción con el sistema de azúcar fosfotransferasa, ya que el transporte de glucosa en *Pseudomonas* procede a través de un mecanismo diferente (Daddaoua et al., 2009; Del Castillo et al., 2007; Pflüger-Grau & de Lorenzo, 2014). Además de la regulación enzimática de los propios componentes del catabolismo del glicerol, están en juego patrones reguladores más generales en el metabolismo central del carbono.

Como se indicó en la sección anterior, el DHAP es un metabolito clave que conecta el glicerol con el metabolismo central. El catabolismo procede a través del procesamiento de GA3P a través de la actividad de GA3P deshidrogenasa. El genoma de *P. putida* KT2440 codifica dos isoenzimas GA3P deshidrogenasa genuinas, es decir, GapA (PP\_1009) y GapB (PP\_2149), que se identifican fácilmente dada su similitud con las mismas enzimas homólogas en microorganismos relacionados. Debido a la reversibilidad del paso de oxidación de GA3P en glicerato-1,3-P<sub>2</sub>, GA3P deshidrogenasa juega un papel fundamental actuando en su modo descendente [es decir, glucólisis, canalización de GA3P en la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)] y en gluconeogénesis (Lessie & Phibbs Jr, 1984). Este paso bioquímico se encuentra en el núcleo de las vías metabólicas glucolíticas y gluconeogénicas en la mayoría de los microorganismos, y decide la dirección en la que procede el flujo de carbono. Aparte de GapA y GapB, la cepa KT2440 posee otras dos isoenzimas deshidrogenasa GA3P (codificadas por PP\_0665 y PP\_3443). La secuenciación del ARN indicó que gapB, PP\_0665 y PP\_3443 se ven afectados transcripcionalmente por la presencia de glicerol. Si bien PP\_0665 no parece contribuir a la actividad total de GA3P deshidrogenasa en *P. putida* cultivada con glicerol, los análisis bioquímicos in vitro con un derivado de DPP\_3443 de la cepa KT2440 acredita un papel para PP\_3443 como fuente de una actividad GA3P deshidrogenasa relevante para el metabolismo del glicerol. y su dependencia de cofactor (NADP +) apunta a un probable papel gluconeogénico (Nikel et al., 2014).



El metabolismo del glicerol se basa en rutas catabólicas funcionales y activas del azúcar en *P. aeruginosa* PAO1 (Blevins et al., 1975; Heath & Gaudy, 1978). Uno de los nodos clave para la regulación metabólica de la utilización de glicerol es la actividad de la deshidrogenasa GA3P, que parece requerir un metabolismo activo de las hexosas-P. En consecuencia, se encontró que los genes que codifican enzimas dentro de la rama gluconeogénica del ciclo EDMP y la ruta de la pentosa fosfato (PP) en *P. putida* KT2440 estaban estimulados transcripcionalmente por el crecimiento en glicerol (Fig. 4). Además, dado que HexR (PP\_1021) es un represor transcripcional que controla genes que codifican pasos clave de estas rutas, incluido gapA (Udaondo et al., 2018), existe una estrecha conexión entre el uso de azúcares y glicerol como fuentes de carbono. El metabolito 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, un intermedio de la vía Entner-Doudoroff (ED) (Nikel et al., 2015), actúa como un efector específico de la proteína HexR (Del Castillo et al., 2008), que respalda aún más el papel de un ciclo de EDMP activo para permitir la utilización de glicerol.

### 7 Características generales de polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos son una clase de compuestos versátil, en la que se han demostrado más de 100 polímeros, que se diferencian por el número de átomos de carbono en la cadena principal o el radical R, (Lee, 1996; Steinbüchel, 1991), según la fórmula, como se ve en la tabla 2 de acuerdo a la literatura (Miu et al., 2022).

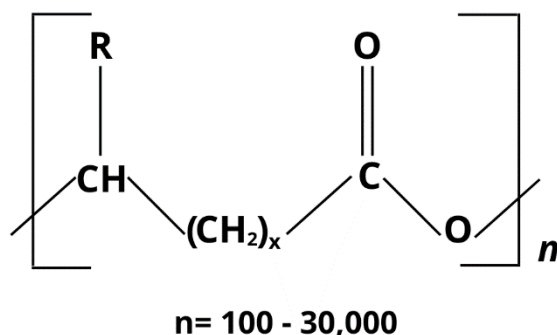


Figura 5. Estructura de los polihidroxicanoatos (Miu et al., 2022).

**Tabla 2. Clasificación de PHAs.**

<b>x</b>	<b>R (radical)</b>	<b>Nombre monómero</b>	<b>Adición de monómero</b>	<b>Nombre de polímero</b>	<b>Adición de polímero</b>
<b>1</b>	H	3- hidroxipropionato	3HP	Poli-(3- hidroxipropionato)	3PHP
	CH <sub>3</sub> -	3-hidroxibutirato	3HB	Poli-(3- hidroxibutirato)	3PHB
	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -	3- hidroxivalerato	3HV	Poli-(3- hidroxivalerato)	3PHV
	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	3- hidroxicaproato	3HC	Poli-(3- hidroxicaproato)	3PHC
	CH <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	3- hidroxiheptanoato	3HH	Poli-(3- hidroxiheptanoato)	3PHH
	CH <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -	3- hidroxioctanoato	3HO	Poli-(3- hidroxioctanoato)	3PHO
	CH <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> -	3- hidroxinonanoato	3HN	Poli-(3- hidroxinonanoato)	3PHN
	CH <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH <sub>2</sub> -	3- hidroxidecanoato	3HD	Poli-(3- hidroxidecanoato)	3HD
	CH <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CH <sub>2</sub> -	3- hidroxoundecanoato	3HUD	Poli-(3- hidroxoundecanoato)	3HUD
	CH <sub>3</sub> - (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>2</sub> -	3- hidroxidodecanoato	3HDD	Poli-(3- hidroxidodecanoato)	3PHDD
<b>2</b>	H	4- hidroxibutirato	4HB	Poli-(4- hidroxibutirato)	4PHB
<b>3</b>	H	5- hidroxivalerato	5HV	Poli-(5- hidroxivalerato)	5PHB

### **7.1 Biocompatibilidad**

Los PHAs han recibido especial atención debido a sus propiedades, como la biocompatibilidad y la biodegradabilidad, en 2007 la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) aprobó su uso como biomaterial para su uso como sutura absorbible ( Rai, 2010). La biocompatibilidad de los PHAs, como cualquier otro biomaterial, depende de varios factores como la forma, la porosidad de la superficie, la hidrofilia de la superficie, la energía de la superficie, la química del material y la degradación (Brandl et al., 1995).

Los PHA son materiales biodegradables que, bajo la influencia de las condiciones aeróbicas, se degradan en dióxido de carbono y agua, y bajo la influencia de las condiciones anaeróbicas en dióxido de carbono y metano. En la naturaleza, los microorganismos son capaces de degradar los PHA con mayor frecuencia utilizando las despolimerasas de PHA (Grigore et al., 2019).

La biocompatibilidad de los PHAs también proviene del hecho de que algunos monómeros incorporados en la cadena de polímeros aparecen naturalmente en el cuerpo humano. Por ejemplo, el ácido 3-hidroxibutírico es un metabolito normal que se encuentra en la sangre

(Grigore et al., 2019). Por ejemplo, Zhu C. y Chen Q. informaron una fuerte proliferación de condrocitos en mezclas a base de andamios de P (3HB) y poli (3 hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (P (3HB-co-3HHx)) (Zhu & Chen, 2014). Dentro de la literatura también se encuentra el uso de P (3HB) y copolímeros relacionados, en particular poli (3 hidroxibutirato-co-3-hidroxi valerato) (P (3HB-co-3HV)), que se han utilizado como portadores para la administración de fármacos (Ke et al., 2017).

Un aspecto crítico en la utilización de estos PHAs en aplicaciones médicas está representado por los métodos de extracción que afectarán su pureza. Se ha informado que la extracción con solvente es el mejor método para obtener el polímero PHA con alta pureza a partir de biomasa (Verlinden et al., 2007).

## ***7.2 Empaquetado alimentario y actividad antimicrobiana***

Hoy en día, el empaquetamiento o embalaje juega un papel cada vez más importante en toda la cadena alimentaria “desde el campo hasta la mesa” (Beigmohammadi et al., 2016) . El empaque es un intermediario entre productores y consumidores que ayuda a la conservación de la calidad inicial de los productos envasados, brindando información y características de los productos envasados a los consumidores. Debido a una parte indispensable de los procesos alimentarios, el envasado tiene un papel importante en la cadena de suministro de alimentos. La función más imperativa del envasado es retardar el deterioro del valor de los productos alimenticios, extender su vida útil y mantener la calidad e inocuidad de los alimentos envasados.

Uno de los principales problemas en el procesamiento de alimentos es la protección contra las enfermedades transmitidas por los alimentos, que aún representan un problema mundial de salud pública. Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que la ingesta de alimentos insalubres contaminados con virus, parásitos o sustancias químicas, producen anualmente más de 200 enfermedades, afectando a cerca de 600 millones de personas y causando 420 000 muertes. Entre los patógenos de transmisión alimentaria más comunes se encuentran la *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli enterohemorrágica* y *Staphylococcus* , todos ellos relacionados con distintos factores como el uso desenfrenado de

productos químicos en el cultivo, la agricultura, la fabricación, la cocina, el envasado, la distribución y la venta es también otra preocupación importante de la intoxicación alimentaria que conlleva graves riesgos para la salud y enfermedades a largo plazo que amenazan la vida, como el cáncer. (Al-mamun *et al.*, 2018).

El género *Staphylococcus* actualmente comprende más de 50 especies, todas conocidas como colonizadores comunes de la piel y las membranas mucosas de muchas especies animales, incluidos los humanos. *S. aureus* es uno de los patógenos más importantes de humanos y animales y una de las principales causas de enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo. Además, el tema de la resistencia a los antimicrobianos de *S. aureus*, en particular de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), está recibiendo una atención generalizada con importantes iniciativas para mejorar la notificación y desarrollar nuevas estrategias de prevención y control (Robinson *et al.*, 2016).

El reservorio ecológico más grande de cepas de *S. aureus* que causan enfermedades en humanos es la nariz humana. Aunque la portación nasal está fuertemente asociada con las infecciones estafilocócicas, solo una pequeña minoría de portadores enfermará alguna vez (Brown *et al.*, 2014). Por el contrario, la alta tasa de portadores humanos contribuye a la frecuente aparición de intoxicación alimentaria estafilocócica, que se ha atribuido en gran medida a una manipulación defectuosa de los alimentos. Por lo tanto, el control de la enfermedad transmitida por alimentos por *S. aureus* se basa en medidas de higiene para evitar la contaminación de los alimentos.

La intoxicación alimentaria estafilocócica (SFP) es la intoxicación alimentaria más frecuente en todo el mundo. En los EE. UU., los Centros para el Control de Enfermedades estiman que ocurren 240 000 casos por año, lo que resulta en 1000 hospitalizaciones y seis muertes (Scallan *et al.*, 2011). En Europa, el número de brotes de SFP notificados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) está aumentando, con 434 brotes de SFP en 2015, lo que equivale al 10 % de todos los brotes notificados (Fetsch & Johler, 2018).

Para aumentar la eficacia de las funciones que deben cumplir los embalajes, se incorporan algunos agentes antimicrobianos en el sistema de envasado. El envasado antimicrobiano crea interacciones entre los materiales de envasado, la atmósfera intrínseca y los alimentos que están diseñados principalmente para ampliar la vida útil de los alimentos, mejorar la salud y

mantener los cambios de calidad de los alimentos envasados. Además, los empaques antimicrobianos tienen una relación más estrecha con la mejora de la seguridad alimentaria (Fasihnia et al., 2018). El envasado antimicrobiano extiende la fase de retraso del crecimiento microbiano o reduce la tasa de crecimiento y el recuento final de microorganismos (Brody et al., 2001). Este novedoso sistema de empaquetamiento ha recibido una atención crítica considerable en la industria alimentaria y de envasado como resultado del creciente interés por productos mínimamente procesados y sin conservantes. Los bajos niveles de conservantes totales en los sistemas de envasado, en comparación con la cantidad de conservantes añadidos directamente a los alimentos, también son deseables (Beigmohammadi et al., 2016; Galić et al., 2011).

Los plásticos derivados del petróleo, por ejemplo, polietileno (PE), polipropileno (PP) y poliestireno (PS), son los materiales plásticos dominantes para el envasado debido a su alta resistencia, peso ligero, bajo costo, fácil procesabilidad y buenas propiedades protectoras contra el agua. Entre los plásticos poliolefinicos, el PE es uno de los más utilizados por su excelente procesabilidad, inercia química, inocuidad en contacto con alimentos, buenas propiedades térmicas y bajo costo (Arora & Padua, 2010; Attaran, Hassan, & Wahit, 2015; Berk, 2008; Hong y Rhim, 2012; Peacock, 2000). La forma de película de PE se utiliza principalmente en los mercados.

La buena biocompatibilidad y la lenta degradación hidrolítica de los PHA han impulsado su implementación tanto en envases como en aplicaciones médicas. En las áreas de envasado de alimentos y cosméticos, los PHA ya se comercializan como envases cosméticos, botellas de champú, tapas, cartones de leche y películas, barreras contra la humedad en pañales y toallas sanitarias, bolígrafos y peines, entre otros. De la misma manera se ha puesto atención en su rol como acarreadores biodegradables para la dosificación a largo plazo de medicamentos, hormonas, insecticidas y herbicidas (Castro-Mayorga et al., 2014).

De esta manera, la incorporación de sustancias antimicrobianas en el PHA podría permitir la producción de materiales biodegradables que podrían usarse para la liberación selectiva de los antimicrobianos en envases de alimentos, superficies de contacto con alimentos o aplicaciones médicas. Sin embargo, existen infecciones asociadas a biopelículas, lo cual representa un problema para su utilización en cualquier industria, ya que las infecciones

bacterianas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo (Castro-Mayorga et al., 2014).

Las superficies antimicrobianas que impidan el crecimiento de biopelículas se considerará una estrategia eficaz para inhibir el establecimiento y la propagación de infecciones microbianas. La acción antimicrobiana se puede obtener liberando el biocida directamente en el alimento o en el espacio que lo rodea (Vermeiren et al., 2002) y puede ser ejercida por materiales tanto orgánicos como inorgánicos (Malhotra et al., 2015). Los primeros son en su mayoría ácidos orgánicos, enzimas y polímeros, los últimos son nanopartículas de metales u óxidos metálicos. Los materiales orgánicos antimicrobianos son menos estables a altas temperaturas en comparación con los inorgánicos, mientras que los metales y las nanopartículas de óxidos metálicos soportan condiciones de procesamiento más duras (Metak, 2015; Metak y Ajaal, 2013).

## 8. *Nanotecnología*

La nanotecnología es un campo de investigación multidisciplinario emergente, que entrelaza la física, la química, la biología y las ciencias de los materiales. Recientemente, la nanotecnología se ha asociado con la tecnología de envasado de alimentos para desarrollar películas de nanocompuestos activos con propiedades funcionales especializadas para minimizar el deterioro de los alimentos, mejorar la vida útil y garantizar la seguridad de los alimentos. El nanocompuesto es un sistema sólido multifásico, que se compone de dos o más componentes que incluyen matriz polimérica como fase continua y materiales nanométricos como fase discontinua con al menos una dimensión en tamaño de 1-100 nm (Kanmani & Rhim, 2014). Sin embargo, el uso de materiales orgánicos en el sistema de envasado de alimentos ha sido limitado debido a su naturaleza menos estable al calor. Sistemas de nanocompuestos que emplean nanopartículas (metales como Cu, Ag y Au, respectivamente); nanomateriales (óxidos metálicos como ZnO, TiO<sub>2</sub> y MgO, respectivamente); y los nanotubos de carbono también se han centrado en el desarrollo de materiales de envasado antimicrobianos eficaces (Kalia, 2019). Los materiales nanoestructurados inorgánicos como la plata, el oro, el cobre y el zinc tienen una propiedad más estable al calor y una alta relación de área de superficie a volumen con una mayor reactividad de superficie, se informa que las

nanopartículas inorgánicas tienen propiedades funcionales únicas que incluyen estabilidades antimicrobianas, catalíticas, ópticas, eléctricas y térmicas (Rai et al., 2012; Sharma et al., 2009). Por lo tanto, la aplicación de nanopartículas (NP) se ha incrementado enormemente y se ha expandido a diferentes campos, incluida la industria del embalaje. Recientemente, los investigadores se han esforzado en el desarrollo de películas de nanocompuestos mediante la adición de varios nanomateriales inorgánicos, como películas antimicrobianas basadas en nanopartículas de PBAT y ZnO (Venkatesan & Rajeswari, 2017), películas de nanocompuestos de polietileno de arcilla orgánica (Fasihnia et al., 2018), bio-nanocompuestos ecológicos de almidón / TiO<sub>2</sub> para mejorar propiedades mecánicas y transmitancia de UV (Goudarzi et al., 2017), por lo general, se forma una fuerte interacción interfacial entre el relleno y la matriz polimérica de dichas películas de nanocompuestos dan como resultado propiedades físico-químicas mejoradas de las películas preparadas.

### *8.1 Nanocompuestos*

Generalmente, los nanocompuestos híbridos exhiben un sinergismo de las propiedades de los componentes iniciales. Una fase orgánica puede capturar partículas que contienen metal en una "trampa" de un tipo peculiar, por ejemplo, en una red oxopolimérica o una unidad polimérica con parámetros apropiados. Los nanocompuestos poliméricos son mezclas de polímeros con cargas inorgánicas u orgánicas con cierta geometría. El uso de rellenos, que tienen al menos una dimensión en el rango nanométrico, produce nanocompuestos poliméricos. Además de las nanopartículas como refuerzo, cuya función principal es mejorar las características mecánicas y de barrera de los materiales de empaque, existen varios tipos de nanoestructuras responsables de otras funciones, proporcionando actividad antimicrobiana (Azeredo, 2009). Actualmente, se encuentran disponibles numerosos procedimientos para la preparación de materiales nanocompuestos. Recientemente, los principales enfoques sintéticos (evaporación de metal elemental con su deposición en matrices poliméricas, polimerización inducida por plasma, evaporación al vacío de metales, descomposición térmica de precursores en presencia de polímeros y reducción de iones metálicos mediante diferentes procedimientos, incluido el electroquímico, etc.) han sido analizados en revisiones (Pomogailo, 1997) . Sin embargo, la distribución uniforme de los componentes es generalmente difícil de lograr cuando se preparan nanocompuestos híbridos

con el uso de los procedimientos antes mencionados, lo que da como resultado la falta de uniformidad de las propiedades del material. Los siguientes tres procedimientos principales son los más comúnmente empleados: (1) el método sol-gel; (2) intercalación de polímeros y nanopartículas en estructuras estratificadas (incluida la polimerización in situ) con el uso de enfoques aplicados en la química de estructuras intracristalinas (sistemas "huésped ± huésped"); una combinación de polimerización y formación de partículas de tamaño nanométrico, que proporciona una dispersión homogénea de un componente inorgánico (que a menudo es un relleno específico) en una matriz polimérica. Se debe tener en cuenta que los nanocompuestos que contienen no solo moléculas sintéticas sino también naturales, incluidas macromoléculas biológicamente activas, pueden ser convenientemente preparados utilizando los procedimientos anteriores. Estos procedimientos se han utilizado para construir biosensores, electrodos enzimáticos y otros materiales basados en enzimas. Estos materiales ya han encontrado uso en bioquímica, medicina, biotecnología y tecnología de control ambiental (Search et al., 2000).

Otro enfoque para modificar las superficies de materiales orgánicos e inorgánicos se basa en el injerto de polímeros sintéticos en la superficie del sustrato, lo que mejora la funcionalidad química y altera la topología de la superficie de los materiales orgánicos e inorgánicos nativos. Estas nanopartículas inorgánicas injertadas con polímeros se consideran partículas nanocompuestas orgánicas-inorgánicas (Kango et al., 2013).

Debido a que los monómeros generalmente tienen un peso molecular bajo por su naturaleza, pueden penetrar las nanopartículas agregadas y reaccionar con los sitios activados en la superficie de las nanopartículas. El volumen intersticial dentro de los agregados de nanopartículas se llena parcialmente con cadenas macromoleculares injertadas y las nanopartículas agregadas se separan aún más (Kango et al., 2013).

Los nanocompuestos más comunes utilizados como películas antimicrobianas para el envasado de alimentos se basan en la plata, que es bien conocida por su fuerte toxicidad para una amplia gama de microorganismos con estabilidad a alta temperatura y baja volatilidad (Soares et al., 2004; Kuma & Munstedt, 2005; Gammarillo et al., 2011). En la literatura se cuenta con una amplia investigación disponible sobre la seguridad de los iones de plata, por ejemplo en Estados Unidos, la Administración de Alimentos y Medicamentos ha agregado a



su lista de sustancias en contacto con alimentos un sistema basado en Ag + (es decir, AgION, AgION Technologies Inc., Wakefield, Mass., EE. UU., plata al 5% envasada en un portador cristalino inerte) como compuestos antimicrobianos para su uso como aditivos en polímeros en contacto con alimentos; Nobile et al., desarrollaron una película activa con nanopartículas de plata que se utilizó con éxito para inhibir o reducir el crecimiento de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, microorganismo que deteriora los alimentos resistentes al calor, en bebidas ácidas (Nobile et al., 2004).

## ***8.2 Nanopartículas de plata***

Las nanopartículas (NPs) son partículas que varían en tamaño entre 1 y 100 nanómetros de diámetro, esta característica dimensional proporciona propiedades o comportamientos específicos a estos materiales. Las propiedades funcionales de las NPs dependen principalmente de sus características fisicoquímicas: estas partículas pueden existir en forma agregada o discreta, así como que su absorción, distribución, metabolismo y excreción son diferentes en comparación con una entidad química convencional, debido a sus características específicas. Es por esto que las NPs hoy en día, se incluyen en muchos procesos industriales y están involucrados en la composición de una amplia variedad de productos y sistemas utilizados en la vida cotidiana (alimentos y bebidas, protectores solares, textiles, etc.) (Gaillet & Rouanet, 2015). Las nanopartículas de plata (AgNPs) son las NPs más producidas (la producción anual global estimada es de aproximadamente 55 toneladas) y las más comercializadas. (Gaillet & Rouanet, 2015).

Actualmente, los microorganismos son cada vez más resistentes a los antibióticos y esto reduce su efectividad, en respuesta a esta situación las AgNPs se han convertido en una alternativa importante al uso de antibióticos, gracias a que son efectivas contra un amplio espectro de bacterias, hongos y virus, poseen propiedades antiinflamatorias y promueven la epitelización y la cicatrización. De esta manera, la incorporación de AgNPs en diferentes matrices se ha convertido en una forma efectiva de producir materiales con propiedades antimicrobianas de amplio espectro a largo plazo, ya sea para envases, aplicaciones médicas u otras. Uno de los principales desafíos para producir este tipo de antimicrobianos es la síntesis de nanopartículas estables, ya que su efectividad antimicrobiana depende en gran

medida de su tamaño, distribución de tamaños y estado de aglomeración. (Castro-Mayorga et al., 2014).

Las nanopartículas de plata que tienen un tamaño en el rango de 10 a 100 nm han mostrado un gran potencial bactericida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Morones et al., 2005). Muchos científicos han estudiado la actividad bactericida de las nanopartículas de plata contra las cepas patógenas, resistente a múltiples fármacos (MDR) y multirresistentes a bacterias y se ha demostrado que las nanopartículas de plata son las armas poderosas contra las bacterias MDR como *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a la ampicilina. *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* resistente a eritromicina, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina (VRSA) (Rai et al., 2012).

Dentro de los métodos de síntesis para las AgNPs el método de reducción química es uno de los enfoques simples y fáciles para la síntesis ascendente de nanopartículas de plata y se ha encontrado que la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas está influenciada por el tipo y la cantidad de agente reductor y el tipo de estabilizador utilizado. Algunos de los reactivos de cobertura incluyen sales de citrato, ácido oleico, aminosilanos y polielectrolitos para estabilizar las nanopartículas. En lugar de usar polielectrolitos para conjugar nanopartículas, se han utilizado biomacromoléculas para estabilizar las nanopartículas de modo que las nanopartículas sean bioactivas y biocompatibles, así como también proporciona funcionalidades adicionales para futuras interacciones biológicas. Se ha reportado que la estabilización a través de un tipo PHB, con tamaños de  $11 \pm 5$  nm, estables por cuarenta días (Castro-Mayorga et al., 2014).

La literatura describe la ventana de concentración en la que las nanopartículas son tóxicas para las bacterias y no para las células de mamíferos, característica dependiente del tamaño, y morfología que presenten las nanopartículas, de modo que la matriz cargada de nanopartículas podría diseñarse con la intención de que al ser liberadas las nanopartículas en el medio fisiológico puedan mantener un ambiente estéril contra microorganismos sin inhibir el crecimiento de células de mamíferos en la región específica del sitio de aplicación prevista. Existen diversas vías por las cuales las nanopartículas estabilizadas promueven la actividad antibacteriana (Zewde et al., 2016). El efecto biocida de la mayoría de las nanopartículas

metálicas depende de su estabilidad y resistencia a la aglomeración y agregación, así como la concentración de NPs. Por lo tanto, las partículas no agregadas podrían interactuar fuertemente con la pared celular debido a su alta energía superficial y movilidad (Castro-Mayorga et al., 2014).

De acuerdo con la literatura (Cheon et al., 2019) la dependencia morfológica de la actividad antimicrobiana de las AgNPs puede explicarse por la diferencia en la liberación de iones de Ag dependiendo de la forma. Por lo tanto, es posible controlar la actividad antimicrobiana controlando la forma y el tamaño de las NP de Ag. Se ha reportado que las AgNPs con formas esféricas comparadas con NPs en forma de placa, de disco y triangulares y evaluadas con el método de disco de papel contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, muestran la mayor actividad antimicrobiana contra *E. coli*. De la misma manera se confirmó en este estudio, que una mayor concentración de AgNPs con forma esféricas da como resultado una mayor actividad antibacteriana.

## **9. Metodología**

### **9.1 Polihidroxicanoatos PHA**

#### ***9.1.1 Inoculación e incubación de bacterias para producción de PHA***

Todos los productos químicos de grado analítico utilizados en el estudio se adquirieron de Merck Millipore, Sigma, Fisher o BDH. La cepa *P. aeruginosa* fue donada por el Cinvestav de su Colección Nacional de Cepas Microbianas y la cepa *P. putida* fue donada de la colección del Dr. José Antonio Cervantes de la Universidad Autónoma de Querétaro.

El inóculo de enriquecimiento para el crecimiento en placa de las cepas bacterianas, se llevó a cabo en medio basal mínimo salino, con composición de glucosa 10 g, 3 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.2 g  $\text{MgSO}_4$  y 15 g agar bacteriológico, a 36 ° C. Posteriormente se preparó el medio cultivo de crecimiento líquido enriquecido con glicerol grado reactivo y glicerol crudo, se prepararon suspendiendo 3 asadas de cada cepa en diferentes matraces Erlenmeyer, uno con 0.5 mL de glicerol grado reactivo (Gli) y otro con 0.5 mL de glicerol crudo (Cr-Gli) y

ambos con 100 mL de Tryptic Soy Broth. El proceso de incubación se realizó a 150 rpm, 37°C durante una semana. Se evaluó el crecimiento bacteriano utilizando el espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV-vis). El muestreo se llevó a cabo en distintos periodos de incubación y cada día se monitorearán diferentes propiedades del proceso para optimizar las condiciones de producción de los PHA, que incluyen: utilización de la fuente de carbono (p/p%), rendimiento de biomasa (g/l) y rendimiento de PHA (g/l). Los experimentos se realizaron por triplicado.

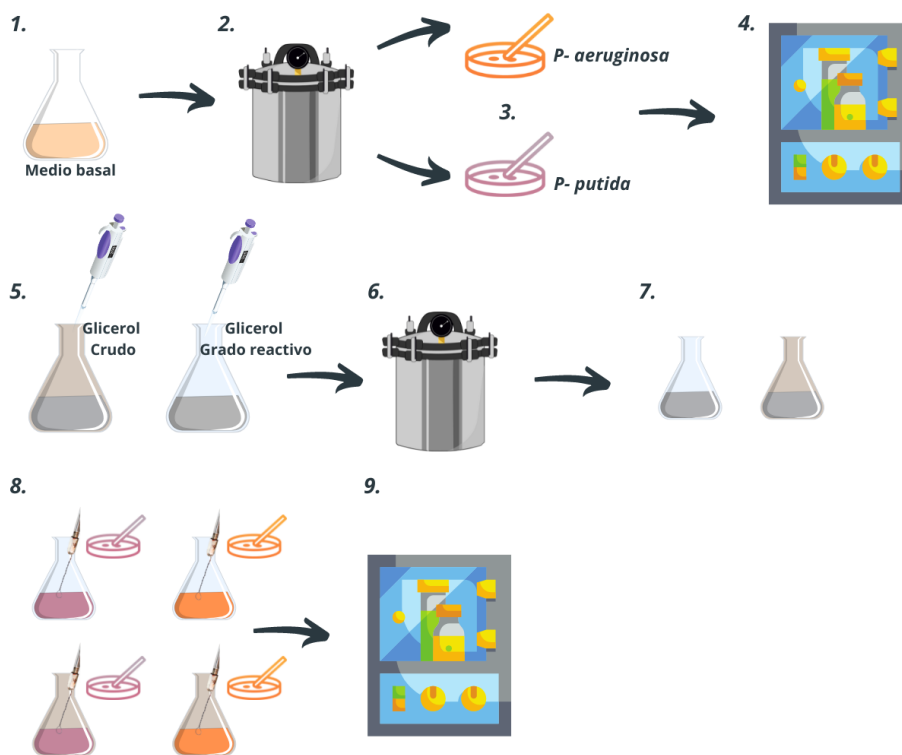


Figura 6. Inoculación e incubación PHAs. Paso 1: Preparación del medio de cultivo basal para ambas cepas bacterianas; Paso 2: Esterilización del medio de cultivo; Paso 3: Inoculación de las cepas bacterianas, en naranja se representa la cepa *P. aeruginosa* y en rosa la cepa *P. putida*. Paso 4: inoculación de ambas cepas. Paso 5: Preparación de medios de cultivo enriquecidos con glicerol grado reactivo, matraces en azul, y glicerol crudo en café; Paso 6: Esterilización de los medios de cultivo enriquecidos. Paso 7: Se conservan los medios de cultivo enriquecidos y se llevan a temperatura ambiente. Paso 8: Incubación de cada cepas bacterianas en los distintos medios de cultivo enriquecidos con glicerol grado reactivo y glicerol crudo.

### 9.1.2 Extracción de PHAs para *P. aeruginosa* y *P. putida*

El método utilizado para la extracción del biopolímero fue la extracción por solvente ya que este método no degrada el polímero (Jacquel et al., 2008). Las células se separaron por centrifugación a 10.000 rpm y 4°C, durante 15 min. Se hizo un lavado con acetona para eliminar cualquier materia orgánica de la superficie celular (Abid et al., 2016). Posteriormente se sometió a un nuevo lavado con un tensioactivo aniónico Triton X-100 para hacer las células permeables y extraer los orgánulos (Koley & Bard, 2010). Más adelante, estas células se resuspendieron en 50 ml de cloroformo, y se colocaron en un agitador orbital a 180 rpm a 30 ° C durante 24 h para la extracción de biopolímero (Tan et al., 2014). La solución con el precipitado (cloroformo) se evaporó y el concentrado con los polímeros de PHA se pesó (Tan et al., 2014) (Abid et al., 2016) (Tan et al., 2014).

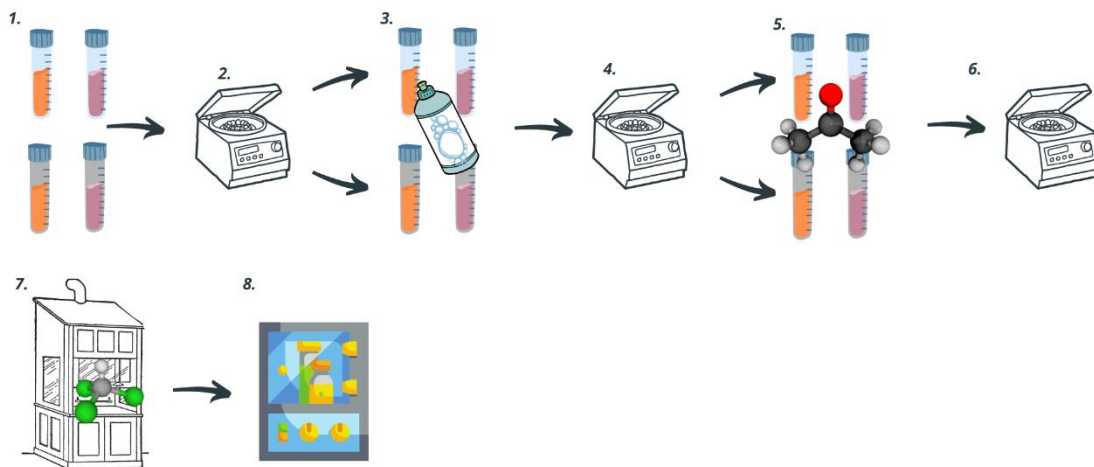


Figura 7. Extracción de PHAs para *P. aeruginosa* y *P. putida*. Paso 1: En color naranja la cepa *P. aeruginosa*, y en color rosa la cepa *P. putida*, los tubos falcon en azul representan al sustrato glicerol grado reativo mientras que los tubos falcon en gris representan al sustrato glicerol crudo. Paso 2: Centrifugación para separar y remover el medio de cultivo; Paso 3: Lavado con el tensioactivo Tritón X-100; Paso 4: Centrifugación, para romper la membrana celular y remover el contenido biológico. Paso 5: Lavado con acetona; Paso 6: Centrifugación para extraer el PHA. Paso 7: Adición de cloroformo para separar cualquier impureza del biopolímero. Paso 8: Evaporación del cloroformo dentro de la incubadora para obtener concentrado de PHAs.

### ***9.1.3 Métodos de Tinción por Negro Sudán***

El método utilizado fue el descrito en (Mesquita et al., 2015), se depositó cuidadosamente y uniformemente un frotis de suspensión de biomasa (10 ml) en un portaobjetos de vidrio y se secó completamente. Los portaobjetos se tiñeron con Negro Sudán (0.3% p/v en etanol al 60% v/v) durante 10 min y posteriormente se tiñeron con safranina O (0.5% p/v en agua desionizada) durante 10 s. Las muestras se examinaron mediante Microscopio Digital con Pantalla. Modelo VE-M5LCD con un aumento total de 1000x bajo inmersión en aceite y las bacterias que presentan un color azul-negro se informan como organismos acumuladores de PHA intracelular.

### ***9.1.4 Cuantificación de PHB a través del ensayo espectrofotométrico para ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico***

Se realizó una estimación de la cantidad de polímero producido a partir de la suposición de que el tipo de PHA obtenido fue el ácido poli- $\beta$ -hidroxibutírico, es un procedimiento gravimétrico basado en el hecho de que este polímero es soluble solo en cloroformo hirviendo, de modo que todos los contaminantes se eliminan mediante extracción con otros solventes (Lemoigne, 1926). El principio de este método se basa en dos observaciones: primero, que el poli- $\beta$ -hidroxibutirato se puede convertir cuantitativamente en ácido crotónico mediante calentamiento en ácido sulfúrico concentrado, y segundo, que el máximo de absorción ultravioleta del ácido crotónico se desplaza a 235 m $\mu$  cuando el ácido sulfúrico concentrado es el disolvente (Law & Slepecky, 1960). Los espectros UV-visible se registraron mediante el espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS. Las medidas se realizaron en una celda de cuarzo de 10 mm. Para el ensayo espectrofotométrico, se transfirió una muestra del polímero en cloroformo a un tubo de ensayo limpio. Se evaporó el cloroformo y se añadieron 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se tapó el tubo y se calentó durante 10 min a 100°C en un baño de agua. La solución se enfría y, después de mezclar a fondo, se transfirió una muestra a una celda de sílice y se midió la absorbancia a 235 m $\mu$  frente a un blanco de ácido sulfúrico.

### **9.1.5 Espectroscopía infrarroja (IR) para el biopolímero**

Se realizó la detección del espectro infrarrojo de PHA aislado mediante espectroscopía infrarroja dispersiva. Los espectros infrarrojos se registraron en un espectrómetro Spectrum Two FT-IR Spectrometer.

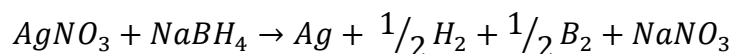
### **9.1.6 Evaluación de las propiedades térmicas para el biopolímero**

Se realizó un análisis de termogravimetría (TGA) y un estudio de calorimetría diferencial de barrido según lo descrito en la literatura (Abid et al., 2016), con el fin de determinar la estabilidad térmica de los polímeros de PHA. Las muestras se calentaron a una velocidad de 10 ° C / min desde la temperatura ambiente a 600 ° C en una atmósfera de nitrógeno. Se registrará la temperatura de descomposición (Td). El DSC se realizará de -80 a 180 °C a una velocidad de 10°C/min bajo una atmósfera de nitrógeno. Se registró la temperatura de transición vítrea (Tg), la temperatura de fusión (Tm), la temperatura de cristalización (Tc), el calor de fusión por fusión ( $\Delta H_m$ ) y el calor de fusión por cristalización ( $\Delta H_c$ ), respectivamente (Abid et al., 2016).

## **9.2 Nanopartículas de Plata AgNps**

### **9.2.1 Síntesis de Nanopartículas de Plata**

La síntesis de AgNPs se realizó por reducción química de nitrato de plata borohidruro de sodio de acuerdo con la siguiente reacción:



El método a seguir fue el previamente reportado por Castro-Mayorga et al., 2014. Se prepararon cuatro suspensiones diferentes de cada tipo PHAs no purificados y AgNP.

Se realizó la síntesis de tres distintas concentraciones de AgNPs, 0.05µg/ml, 0.5µg/ml y 50 µg/ml. Un exceso de borohidruro de sodio fue necesario para reducir la plata y estabilizar la forma de las AgNPs, se utilizó una relación de 3:1 de una solución de NaBH<sub>4</sub> 2mM y AgNO<sub>3</sub>

1mM. Se añadió  $\text{AgNO}_3$  gota a gota (aproximadamente 1 gota por segundo) a la solución previamente preparada de  $\text{NaBH}_4$  y se colocó en baño de hielo, en una placa de agitación magnética. La adición completa tomó alrededor de 15 minutos, después de lo cual se detuvo la agitación y se retiró la barra de agitación.

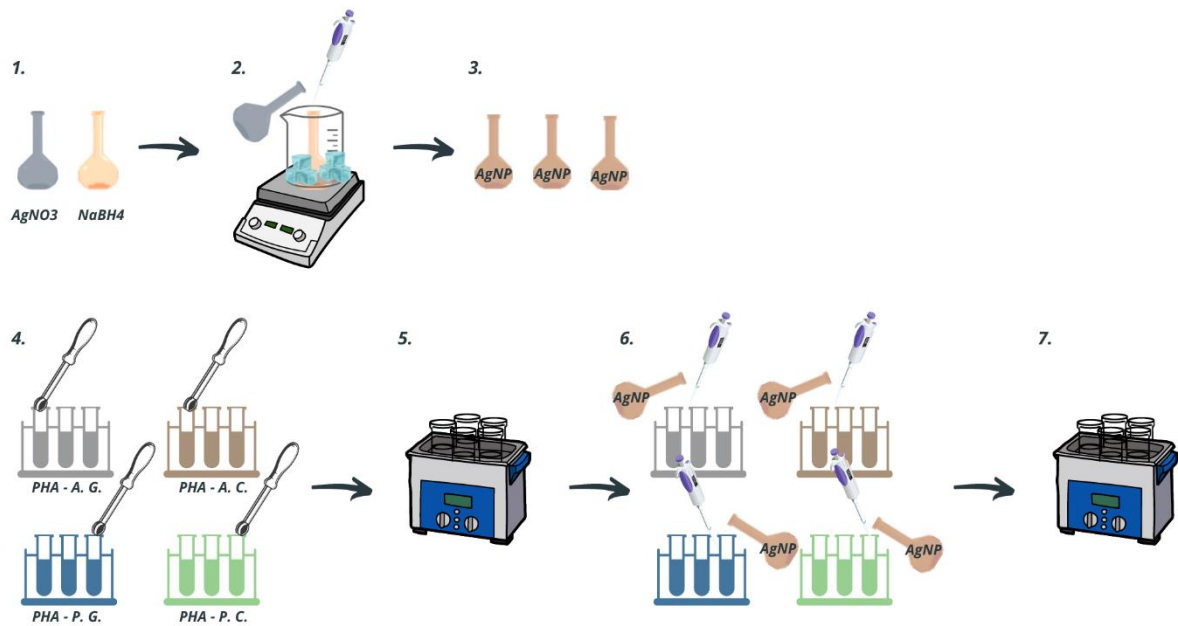


Figura 8. Síntesis de AgNPs y cóposito. Paso 1: Preparación de las soluciones de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaNO}_3$  a una concentración de 1mM y 2mM correspondiente; Paso 2: Baño de hielo y agitación en plato magnético de la solución  $\text{NaBH}_4$  con la adición gota a gota de la solución de  $\text{AgNO}_3$ ; Paso 3: Obtención de las 3 distintas concentraciones de AgNPs: 0.05  $\mu\text{g/ml}$ , 0.5  $\mu\text{g/ml}$  y 50  $\mu\text{g/ml}$ . Paso 4: Resuspensión en agua destilada de los 4 distintos tipos PHAs: obtenido a partir de *P. aeruginosa* y glicerol grado reactivo PHA-A.G., *P. aeruginosa* y glicerol crudo PHA - A.C., *P. putida* y glicerol grado reactivo PHA-P.G., *P. putida* y glicerol crudo PHA - P.C. Paso 5: Sonicación de los PHAs durante 3 horas. Paso 6: Adición de las tres distintas concentraciones, de 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg y 50 mg/kg de AgNPs a cada tipo de PHAs. Paso 7: Sonicación de los PHAs durante 3 horas.



### **9.2.2 Propiedades físicas**

#### **9.2.3 Espectroscopía de ultravioleta (UV-Vis)**

Los espectros UV-visible se registraron mediante el espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS. Las medidas se realizaron en una celda de cuarzo de 10 mm. Los espectros UV-vis se registraron en un rango de longitud de onda de 320 a 500 nm. Para las mediciones de muestra, la línea de base siempre se estableció con un blanco relevante.

#### **9.2.4 Dispersión dinámica de la luz (DLS)**

Para los análisis DLS, se analizó la suspensión de AgNP en agua destilada en una concentración de 1:5 con el instrumento Anton Paar Litesizer 500. Las mediciones se realizaron a 25 °C y se realizaron por quintuplicado para comprobar la sedimentación y la estabilidad de la solución.

#### **9.2.5 Potencial Z**

El estado de agregación se determinó analizando la carga a distintos pH para poder determinar condiciones óptimas de solución para la mezcla física de las AgNP con el PHA. Se utilizó Anton Paar Litesizer 500 para determinar el potencial zeta de las nanopartículas de plata.

### **9.3 Nanocompuesto**

#### **9.3.1 Síntesis de nanocompuesto**

Se empleó una variación del método descrito por Steinbu et al., se resuspendieron los 4 tipos de PHAs obtenidos y extraídos (0.002% en p/v) en agua destilada y se mantuvieron bajo sonicación durante 3 horas. Posteriormente se realizaron mezclas físicas de cada tipo de biopolímero con las tres distintas concentraciones de AgNPs, para alcanzar una concentración de 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg y 50 mg/kg de AgNPs en PHA, y se sonicaron durante 3 horas. Finalmente, se almacenaron para las pruebas antimicrobianas. (Steinbu, 2005).

### **9.3.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La morfología de los nanocompuestos se examinó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con un Microscopio de Barrido Electrónico JSM-6010LA. Las muestras seleccionadas fueron los PHAs con una concentración de 0.5 mg/kg AgNPs, posteriormente fueron secadas a 40°C durante 1 h en la estufa para obtener películas, y para el análisis se recubrieron con una capa de Au para brindarles propiedades conductoras.

### **9.3.3 Espectroscopía infrarroja (IR)**

Se analizaron las suspensiones de nanopartículas de plata con polihidroxialcanoatos (AgNPs-PHA). Se realizó la detección del espectro infrarrojo de PHA aislado mediante espectroscopía infrarroja dispersiva. Los espectros infrarrojos se registraron en un espectrómetro Spectrum Two FT-IR Spectrometer.

### **9.3.4 Actividad antimicrobiana del compósitos AgNPs-PHA**

Las pruebas antimicrobianas se llevaron a cabo por triplicado utilizando 1 carga de *Staphylococcus aerus*, en fase de crecimiento, se realizaron antibiogramas a partir de una modificación del método de Kirby-Bauer. La cepa fue inoculada en la superficie de una placa de agar Estafilococos BD Bioxon, sobre el cual se colocaron discos de papel filtro impregnados con cada tipo PHA obtenido, seleccionándose los biopolímeros con concentración de AgNPs de 0.05 mg/kg y 0.5mg/kg, así como los controles correspondientes de cada biopolímero sin AgNPs. Las placas se incubaron por 48 horas a 35- 37°C. Se midió la zona de inhibición resultante (área sin crecimiento de colonias bacterianas) y se comparó con los cementos de control negativo.

## 10. Resultados

### 10.1 Caracterizaciones microbiológicas

#### 10.1.1 Tinción de *P. aeruginosa*

La Fig. 5a muestra la cepa *Pseudomona aeruginosa* presenta la tinción de la cepa antes de iniciar la producción de PHA, mientras que la Fig. 5b muestra la tinción de la cepa durante el día 5 de la producción de PHA. Se tomaron frotis de células bacterianas y se tiñeron de acuerdo con el procedimiento de Gram, distinguiéndose en color rosado su pared Gram negativa, las muestras se examinaron mediante microscopio con un aumento total de 1000x bajo inmersión en aceite. Como bacterias gramnegativas, se muestran bacterias en forma de bastoncillo, asporógenas y monoflageladas. Tienen un aspecto nacarado.

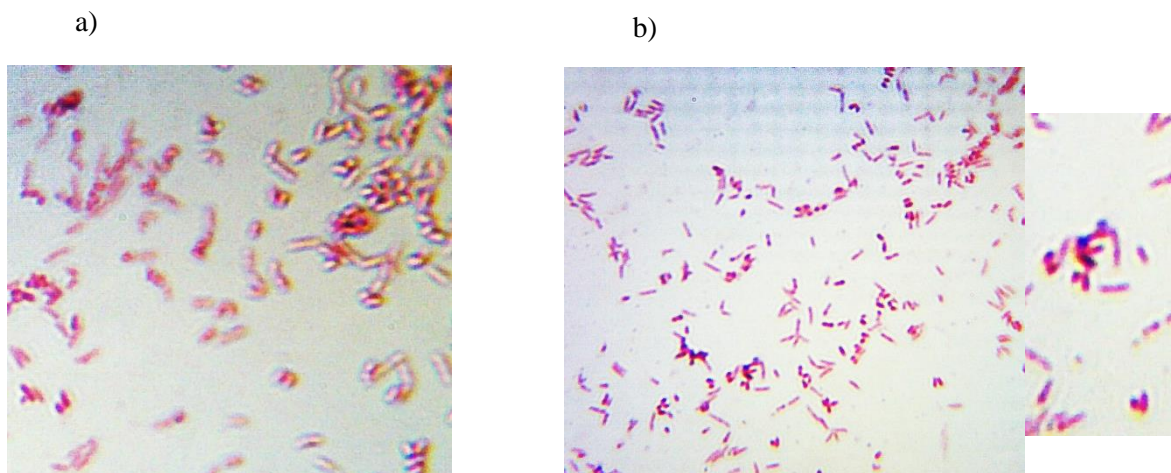


Figura 9. Tinción de Gram y tinción por Sudán Black. a) Muestra la tinción de Gram de *P. aeruginosa* mientras que la b) se muestra un frotis de de suspensión de biomasa por tinción de Sudan Black donde se observan las posibles acumulaciones de PHA dentro de granulos color negro-morado.

Se pueden distinguir estos posibles gránulos de PHA ya que son de naturaleza hidrofóbica, por lo tanto, al teñir esto con tintes lipofílicos como el negro Sudán, que muestra una mayor solubilidad en materiales lipofílicos que en la solución de tinción altamente polar, que en este caso fue etanol, por lo tanto, se deduce que el colorante negro Sudán migra fácilmente hacia las inclusiones de polihidroxicanoatos, dado que los gránulos se encuentran rodeados de una monocapa de fosfolípidos que contiene polimerasas y despolimerasas (López et al., 2015). Este colorante lipofílico permite la detección in vivo de los PHA, evidenciando la

naturaleza lipídica de los gránulos, que se colorean de gris a negro, en contraste con el rosado de las células vegetativas.

### ***10.1.2 Evaluación de la síntesis de PHA en las diferentes cepas de Pseudomonas putida y aeruginosa.***

La Fig. 6 muestra las curvas de crecimiento para la cepa *P. putida* y *P. aeruginosa*. La fase exponencial aparece en ambos casos cerca de las 10 horas transcurridas. Se observó que la cepa *P. putida* presenta una adaptación al medio de cultivo más rápida y con mayor capacidad de sobrevivir en comparación a la *P. aeruginosa*, dado que su fase de crecimiento se prolonga y retarda la muerte celular sugiriendo (Muthu Kumar A, 2017) que utiliza la materia orgánica producida como fuente de materia y energía más eficientemente, característica que se reporta en la literatura (Nakazawa, 2002; Weinel, Nelson, et al., 2002). El crecimiento de *P. putida* y *P. aeruginosa* desarrollado sobre e glicerol crudo y el glicerol grado reactivo fuente de carbono se midió en diferentes puntos de tiempo (Fig. 6). El crecimiento de células de *P. aeruginosa* en glicerol crudo fue el más rápido en las primeras 24 h, y el tiempo de duplicación fue de 0.508 h durante la fase exponencial y su DO600 alcanzó un mayor valor que la de los otros tres escenarios. Las células *P. aeruginosa* cultivadas en glicerol grado reactivo mostraron una fase de retraso significativa en las primeras 10 h comparadas con las otras células, sin embargo, su velocidad de crecimiento incrementó después de 10 h. Su tiempo de duplicación fue de 1.0066 h durante la fase exponencial. Respecto a la cepa *P. putida* se presentó un crecimiento un poco más retardado en comparación con la cepa *P. aeruginosa*, el tiempo de duplicación durante la fase exponencial para las células *P. putida* en glicerol crudo fue de 1.7354 h y para las células *P. putida* cultivada en glicerol grado reactivo de 4.1806 h. Se observa que el comportamiento general de crecimiento de las bacterias no cambia significativamente al suplementar el medio, llevando así todas sus etapas conocidas de cinética y obteniendo el PHA como metabolito de tipo secundario, característica típica que se reporta de las *Pseudomas* (Poblete-Castro et al., 2020; Spiers et al., 2000), ya que en la literatura se encuentra que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes que al parecer codifican enzimas involucradas en la síntesis de PHA para células cultivadas en distintas fuentes de carbono como pueden ser glucosa, glicerol,

citrato o ácido láurico, por lo que se sugiere que los genes que codifican las enzimas implicadas en la síntesis de PHA a partir de glicerol en *Pseudomonas* son glpF, glpK y glpD pueden ser los que actúan también en el proceso del glicerol crudo.

### 10.1.2.1

### Cálculos de constantes cinéticas

Ecuación exponencial de crecimiento  $y = Ae^{Bx}$

$x$  = tiempo de duplicación

$A$  y  $B$  son parámetros de la ecuación exponencial de crecimiento

$$\ln(y) = \ln(Ae^{Bx})$$

$$\ln(y) = [\ln(A)]Bx$$

$$x = \frac{\ln(y)}{[\ln(A)]B}$$

$$x = \frac{\ln\left(\frac{y}{A}\right)}{B}, \text{ cuando } y = 1 \rightarrow x = x_1 = \frac{\ln\left(\frac{1}{A}\right)}{B},$$

$$\text{cuando } y = 2 \text{ (y es el doble)} \rightarrow x_2 = x = \frac{\ln\left(\frac{2}{A}\right)}{B}$$

$$Td = x_2 - x_1 = \frac{(\ln 2 - \ln A) - (\ln 1 - \ln A)}{B}, \quad \ln 1 = 0$$

$$Td = \frac{\ln 2}{B} = \frac{0.693}{B}$$

Tiempo de duplicación *P. aeruginosa* a partir de glicerol grado reactivo

$$y = 0.1632e^{0.6886x}$$

$$x = \frac{\ln(2)}{0.6886}$$

$$x = 1.0066 \text{ h}$$

Tiempo de duplicación *P. aeruginosa* a partir de glicerol crudo

$$y = 0.1528e^{1.3632x}$$

$$x = \frac{\ln(2)}{1.3632}$$

$$x = 0.5084 \text{ h}$$

Tiempo de duplicación *P. putida* a partir de glicerol grado reactivo

$$y = 0.8764e^{0.1658x}$$

$$x = \frac{\ln(2)}{0.1658}$$

$$x = 4.1806 \text{ h}$$

Tiempo de duplicación *P. putida* a partir de glicerol crudo

$$y = 0.2883e^{0.3994x}$$

$$x = \frac{\ln(2)}{0.3994}$$

$$x = 1.7354 \text{ h}$$

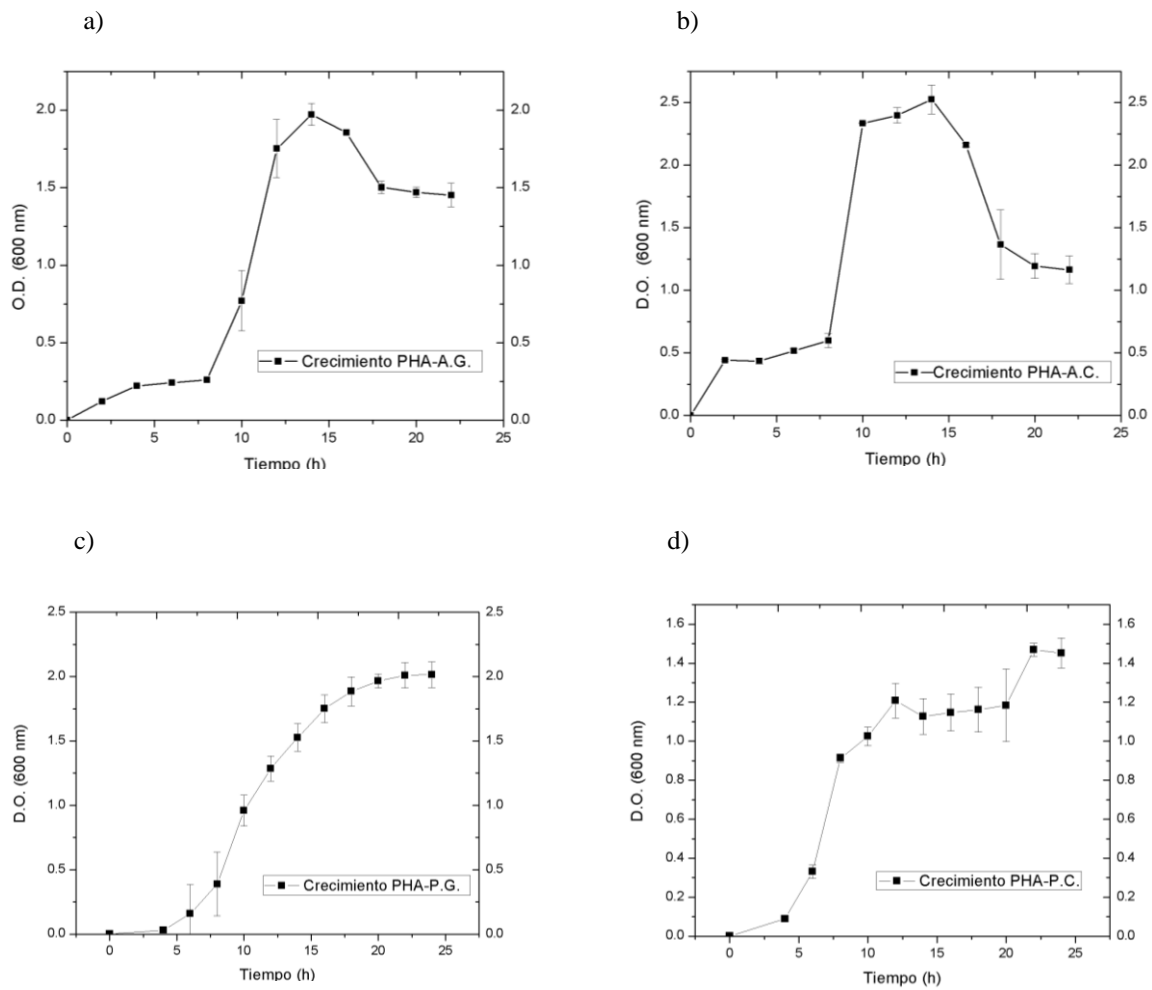


Figura 10. Tasa de crecimiento bacteriano de las cepas *P. aeruginosa* (fig. a y b) y *P. putida* (fig. c y d), las cepas de acumulación de polihidroxicanoato cultivadas en medio basal de sales mínimas modificadas (MMSB) con glicerol grado reactivo (fig. a y c) y glicerol (fig. b y d) crudo como única fuente de carbono. Los valores son la media de tres experimentos independientes.

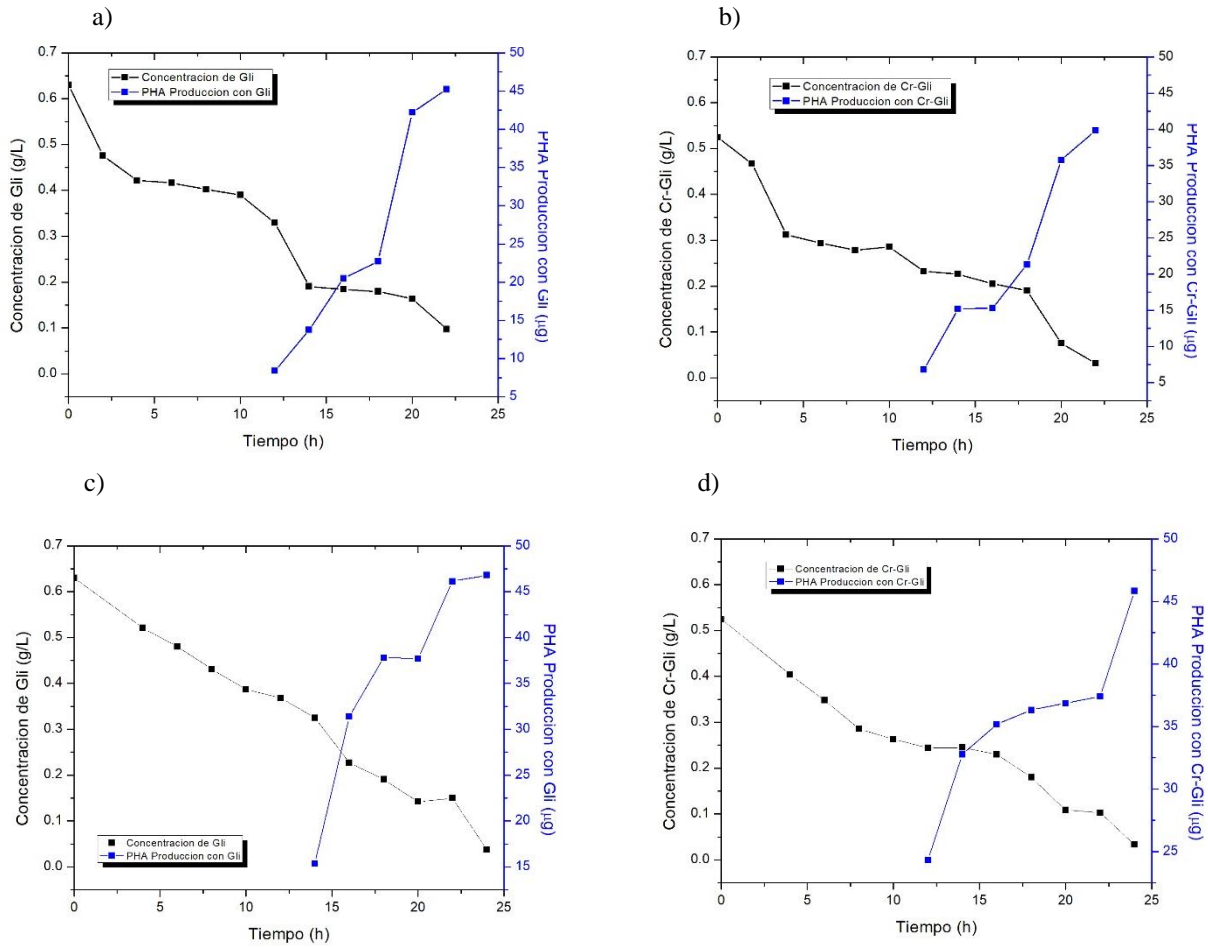


Figura 11. Tasa de consumo de sustrato y producción de PHAs. Tasa de consumo del sustrato en negro, glicerol (fig. a y c), glicerol crudo (fig. b y d) y la producción de biopolímero en azul de las cepas *P. aeruginosa* (fig. a y b) y *P. putida* (fig. c y d).

En la Fig. 7 muestra el consumo de glicerol grado reactivo y glicerol crudo y la producción de PHA durante 22 horas y 24 horas para la cepa *P. aeruginosa* y *P. putida* respectivamente, donde la producción máxima de PHA comienza alrededor de la hora 18 en ambas cepas *P. aeruginosa* y *P. putida* que corresponde al final de la fase estacionaria, observando que la producción del biopolímero es un metabolito secundario.

Para la cepa *P. aeruginosa* transcurridas 22 horas se logró extraer 39.82 µg de biopolímero, con aún un 3.2% de glicerol crudo presente en el medio, mientras que para el medio enriquecido con glicerol grado reactivo se obtuvo 45.21 µg de biopolímero con un 9.8% de glicerol remanente. Por otro lado, para la cepa *P. putida* se obtuvieron después de 22 horas



37.39  $\mu\text{g}$  de PHAs, con aún un 3.0% de glicerol crudo presente en el medio, mientras que para el medio con glicerol grado reactivo 46.13  $\mu\text{g}$  de polímero con 14.8% de glicerol remanente. Se observa una mejor producción de PHAs a partir de glicerol crudo con la cepa *P. aeruginosa*, probablemente debido a que la cepa *P. aeruginosa* tiene un mayor nivel de repeticiones locales que el genoma de la cepa *P. putida*, lo que pudo haber desempeñado un papel en las mutaciones del ADN y de esta forma se reflejó en la adaptación de la cepa a los contaminantes del glicerol, generando a una mayor tolerancia y capacidad de almacenamiento y conversión del glicerol crudo aún con contaminantes a PHAs, sin embargo, la producción de biopolímero comparado con el producido a partir de glicerol grado reactivo disminuyó en ambas cepas.

A pesar de que el consumo de glicerol crudo, donde la producción máxima de PHA comienza antes en comparación con los resultados de glicerol grado reactivo para la cepa *P. putida*, aproximadamente después de 16 horas transcurridas, no logra alcanzar una mayor producción de biopolímero ni mejor rendimiento en la utilización de este sustrato.

Posiblemente las diferencias entre la producción y asimilación de los sustratos entre cada cepa bacteriana, se deban a su metabolismo central, por ejemplo, la *P. aeruginosa* codifica solo una copia de los cinco transportadores del ácido gamma-aminobutírico (GABA; PP4106, PP2911, PP4756, PP2543 y PP0284), que pueden estar involucrados en la captación de ácido butírico, que puede ser subsecuentemente convertidos en ácidos polihidroxicanoicos (bioplásticos). Por otro lado, la *P. putida* tiene solo dos transportadores de dicarboxilato de la familia TRAP incompletos (PP1167, PP1169) en comparación con al menos cuatro en *P. aeruginosa*, solo un transportador de azúcar PTS (para fructosa (PP0795, PP0792-793)).

Finalmente, se obtuvo una cantidad baja de PHAs extraída de ambas cepas y a partir de las dos fuentes de carbono, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Fontaine et al., 2017; Getachew & Berhanu, 2016; Guo et al., 2013; Shamala et al., 2009), aproximadamente un 10% posiblemente debido a que en el proceso de extracción existen diversas pérdidas, por ejemplo, al realizar múltiples lavados.

**Tabla 3. Producción de PHA de acuerdo al sustrato utilizado**

Sustrato	Cepa bacteriana	
	<i>P. aeruginosa</i> (g/l)	<i>P. putida</i> (g/l)
Glicerol	0.084757708	0.099539043
Glicerol crudo	0.08499393	0.097921247

## 10.2

## Caracterizaciones de los PHAs

### 10.2.1 Análisis termogravimétrico

La temperatura de degradación inicial ( $T_{on}$ ), las temperaturas máximas de degradación de PHA-Gli y PHA-Cr-Gli ( $T_{max}$ ) se calcularon a partir de la primera derivada de las curvas TGA (DTG), mientras que la temperatura con una pérdida de peso del 10% ( $T_{10\%}$ ), y el residuo (rPHA600%) se calculó a partir de curvas TGA y los resultados se compilan en la tabla 4.

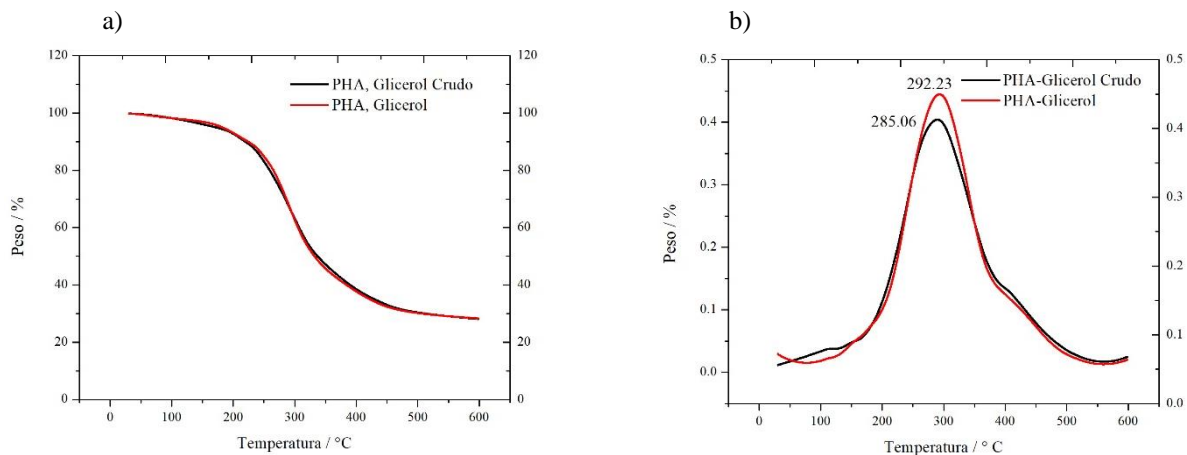


Figura 12. Análisis Termogravimétrico y Análisis Térmico Diferencial para el PHA obtenido a partir cepa *P. aeruginosa*. Análisis Termogravimétrico (TGA) para *P. aeruginosa* (fig. a) y Análisis Térmico Diferencial (DTG) para *P. aeruginosa* (fig. b), en rojo glicerol y en negro glicerol crudo.

**Tabla 4. Datos TGA / DTG correspondientes a PHA-CR-GLI y PHA-GLI**

Característica	$T_{on}, \text{°C}$	$T_{10\%}, \text{°C}$	$T_{max}, \text{°C}$	$rPHA_{600}$ %
Muestra				
<i>PHA-Cr-Gli</i>	201.22	219.70	285.06	28.16
<i>PHA-Gli</i>	204.05	224.05	292.23	28.4

### 10.2.2 Calorimetría diferencial de barrido

La Fig. 9 muestra las primeras curvas de calentamiento de PHA a partir de glicerol crudo (PHA-Cr-Gli) y de glicerol puro (PHA-Gli). La muestra de PHA-Gli presenta su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) a  $67.13 \text{ °C}$ , mientras que la muestra de PHA-Cr-Gli tiene dos temperaturas de transición vítrea diferentes, a  $57.33 \text{ °C}$  y  $159.78 \text{ °C}$ , la primera ( $57.33 \text{ °C}$ ) temperatura mucho más baja ( $-10,0 \text{ °C}$ ) que la primer  $T_g$  de la muestra PHA-Cr-Gli, mostrando una mayor flexibilidad a temperatura ambiente. El punto de fusión de PHA-Gli ( $177,03 \text{ °C}$ ) es ligeramente superior al de PHA-Cr-Gli ( $176,7 \text{ °C}$ ), el punto de fusión es prácticamente el mismo para ambos polímeros.

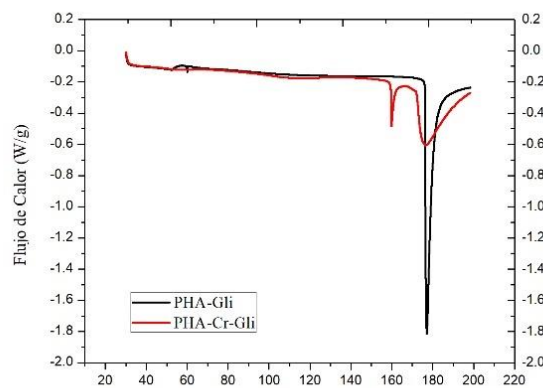


Figura 13. Curvas de calentamiento DSC para el PHA obtenido a partir de la cepa *P. aeruginosa*. Primeras curvas de calentamiento DSC, patrón negro correspondiente a PHA-Cr-Gli y patrón rojo a las de PHA-Gli.

### 10.2.3 Difracción de Rayos X

El espectro XRD del PHA-Gly exhibió bandas anchas alrededor de  $2\theta = 20.10^\circ$ ,  $30.24^\circ$  y  $39.91^\circ$  (Fig. 10). El pico cerca de  $20,10^\circ$ , así como la joroba a  $30,26^\circ$ , según la literatura (Frone et al. 2020) se pueden atribuir al patrón XRD del poli (3-hidroxibutirato) (P (3HB)). Por otro lado, las señales desplazadas pueden atribuirse a algo de humedad residual en el material, mientras que las bandas anchas probablemente se deben a la contribución tanto del pico cristalino del mcl-PHA como de la fase amorfa P (3HB) descrita en la literatura (Sedlacek et al., 2020).

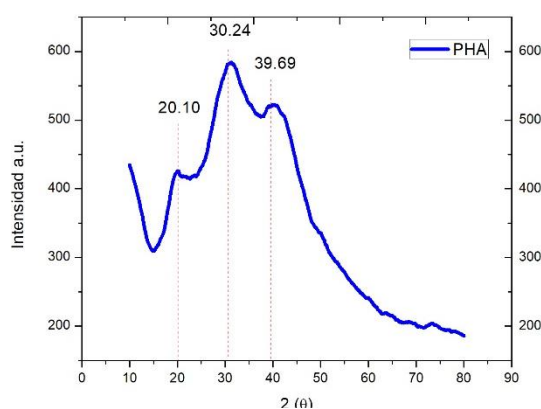


Figura 14. Diffractograma de rayos X de PHA obtenido a partir de la cepa *P. aeruginosa* y glicero grado reactivo (PHA A.G)

## 10.3

## Caracterizaciones de AgNPs

### 10.3.1 Uv vis

Se ha demostrado que los espectros de absorción UV-VIS son bastante sensibles a la formación de nanopartículas de plata porque las nanopartículas de plata exhiben una señal de absorción intensa debido a la excitación del plasmón de superficie (describe la excitación colectiva de los electrones de conducción en un metal) (Karim et al., 2012). Para caracterizar las AgNP sintetizadas, se registraron los espectros U.V-vis. El cambio de color de blanco a amarillo ilustra la formación de las nanopartículas de plata con una señal a 395 nm y se confirmó además la formación de AgNP mediante el método de reducción química. La Fig. 11 muestra los espectros UV-Vis de los AgNP en el rango de 200 a 1000 nm. La banda de absorción en la región de luz visible (340–550 nm, señal de plasmón a 400 nm) es típica para AgNP (Yamamoto et al., 2004).

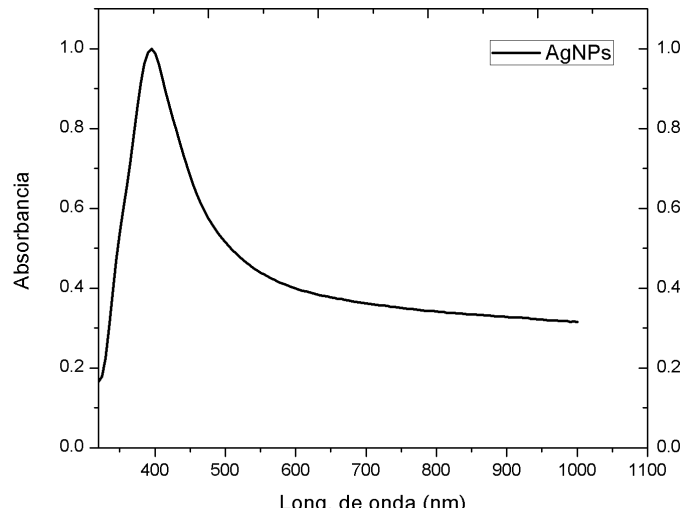


Figura 15. Espectro de absorción UV-vis de AgNP

### 10.3.2 Caracterización por DLS

La distribución del tamaño de partícula mostró dos poblaciones, la población principal (90% de la muestra) con una media de diámetro hidrodinámico de 95nm y una segunda población (10% de la muestra) con una media de 4nm (Figura 16). Distribución de tamaño de partícula. La distribución del tamaño de partícula de los datos de mostraron un índice de polidispersidad de (IP= 0,2716).

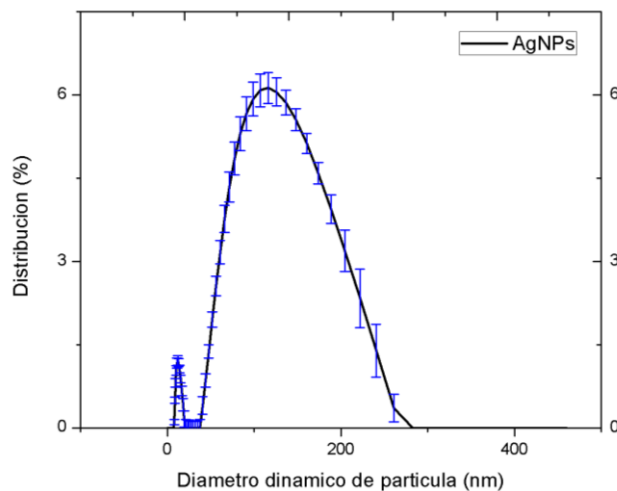


Figura 16. Distribución del tamaño de partícula basada en la intensidad de una suspensión acuosa de nanopartículas de plata obtenidas del análisis DLS.

### 10.3.3 Potencial Zeta

El estado de agregación se determinó analizando el potencial zeta, que es el potencial eléctrico en la unión entre la capa de iones difusos que rodea la superficie de la partícula y la solución. Se utilizó Anton Paar Litesizer 500 para determinar el potencial zeta de las nanopartículas en suspensión a distintos pH. Se encontró que las AgNPs conservan una carga superficial que va de -38mV a -25mV con un pH de 9.3 hasta uno de 5.8 respectivamente, presentando una relación similar a lo previamente reportado (Elzey & Grassian, 2010) , donde la estabilidad de las AgNPs en general disminuye conforme se reduce el valor del pH, ya que en pH cercanos a 1.5 aparece el punto isoeléctrico. Por otro lado, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Elzey & Grassian, 2010) y a la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) (Schuster, 1987) se sugiere que la suspensión de AgNPs es estable y no se encuentra aglomerada en este rango de pH, ya que muestra una fuerza repulsiva dominante, que es la suma de las fuerzas atractivas de van der Waals (VA) y las fuerzas electrostáticas repulsivas (VR) entre partículas a medida que se someten al movimiento browniano. Este comportamiento se le puede referir a que el Borohidruro de Sodio además de reducir el Nitrato de Plata estabiliza las AgNPs al adsorberse en la superficie de las mismas conduciéndolas a una carga superficial negativa lo que genera un el conjunto de fuerzas repulsivas. Finalmente se determinó así el rango del pH en el cual realizar la mezcla física de AgNPs y PHA.

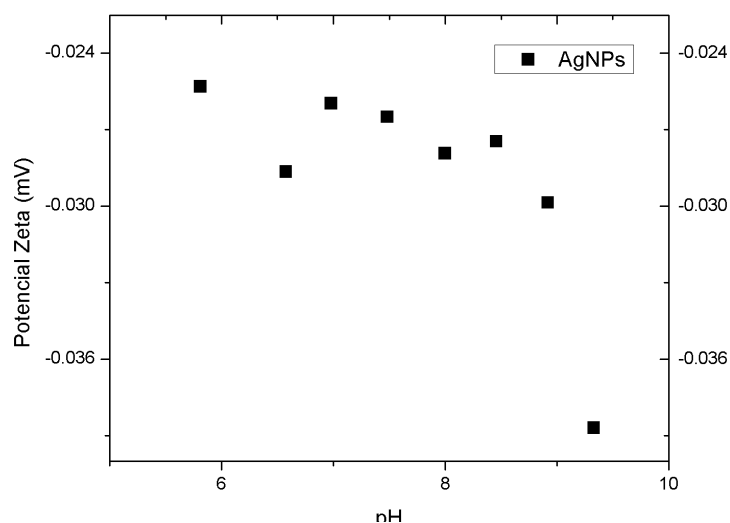


Figura 17. Gráfico de las medidas del potencial zeta en función del pH para nanopartículas de plata suspendidas en agua y acidificadas con soluciones de ácido clorhídrico.

## 10.4

## Caracterizaciones de PHAs con

### AgNPs

#### 10.4.1 Espectroscopía infrarroja (IR)

La muestra de PHA extraída se sometió a FT-IR de reflectancia total atenuada no destructiva. La absorción infrarroja observada entre  $3274\text{ cm}^{-1}$  y  $3277\text{ cm}^{-1}$  se asignó a enlaces intermoleculares de hidrogeno (Furukawa et al., 2007). La banda de absorción entre  $2922\text{ cm}^{-1}$  y  $2956\text{ cm}^{-1}$  se asignó a las vibraciones asimétricas de estiramiento C-H de los grupos metilo, de las cadenas monoméricas laterales. La absorción entre  $2848\text{ cm}^{-1}$  a  $2866\text{ cm}^{-1}$  se asignó a  $\text{CH}_3$  (Ahmad Mohammed Gumel et al., 2012). Se reporta a la banda de absorción entre  $1724\text{ cm}^{-1}$  a  $1749\text{ cm}^{-1}$ , como una banda marcadora de PHA asignada a la vibración de estiramiento del enlace éster de carbonilo (C=O) (Getachew & Berhanu, 2016; Ahmad Mohammed Gumel et al., 2012; Shamala et al., 2009; Tufail et al., 2017). Las vibraciones entre  $1624\text{ cm}^{-1}$  y  $1641\text{ cm}^{-1}$  son señales características que lo identifican como poli-3-hidroxi-butirato (P3HB). Las vibraciones que se presentan entre  $1447\text{ cm}^{-1}$  y  $1463\text{ cm}^{-1}$  se asignaron al ácido poli (3-hidroxi-butírico-co-hidroxi-valérico), P(HB-co-HV). Las absorciones entre  $1165\text{ cm}^{-1}$  y  $1322\text{ cm}^{-1}$  se deben a la vibración de estiramiento C–O–C asimétrica, la señal entre  $1230\text{ cm}^{-1}$  y  $1247\text{ cm}^{-1}$  se ha reportado como característica del PHB (Getachew & Berhanu, 2016; Shamala et al., 2009).

Se encontró un espectro similar para los materiales PHA-AgNPs respecto al espectro de cada uno de los materiales que no contienen AgNP, se observa una disminución en la intensidad de los señales tras la adición de AgNP en cada una de las muestras, como lo reporta la literatura, casi el mismo espectro para los PHA que contienen nanopartículas (A. M. Gumel et al., 2014; Kalaoglu-Altan et al., 2021). Los polímeros con AgNP sintetizados a partir de *P. aeruginosa* (Fig. 14a y 14b) independientemente del sustrato, presentaron una mayor disminución en la intensidad de las señales, en comparación con los provenientes de *P. putida* (Fig. 15a y 15b), esta disminución podría sugerir una mayor interacción de carácter electrostático entre las AgNP y los PHAs.

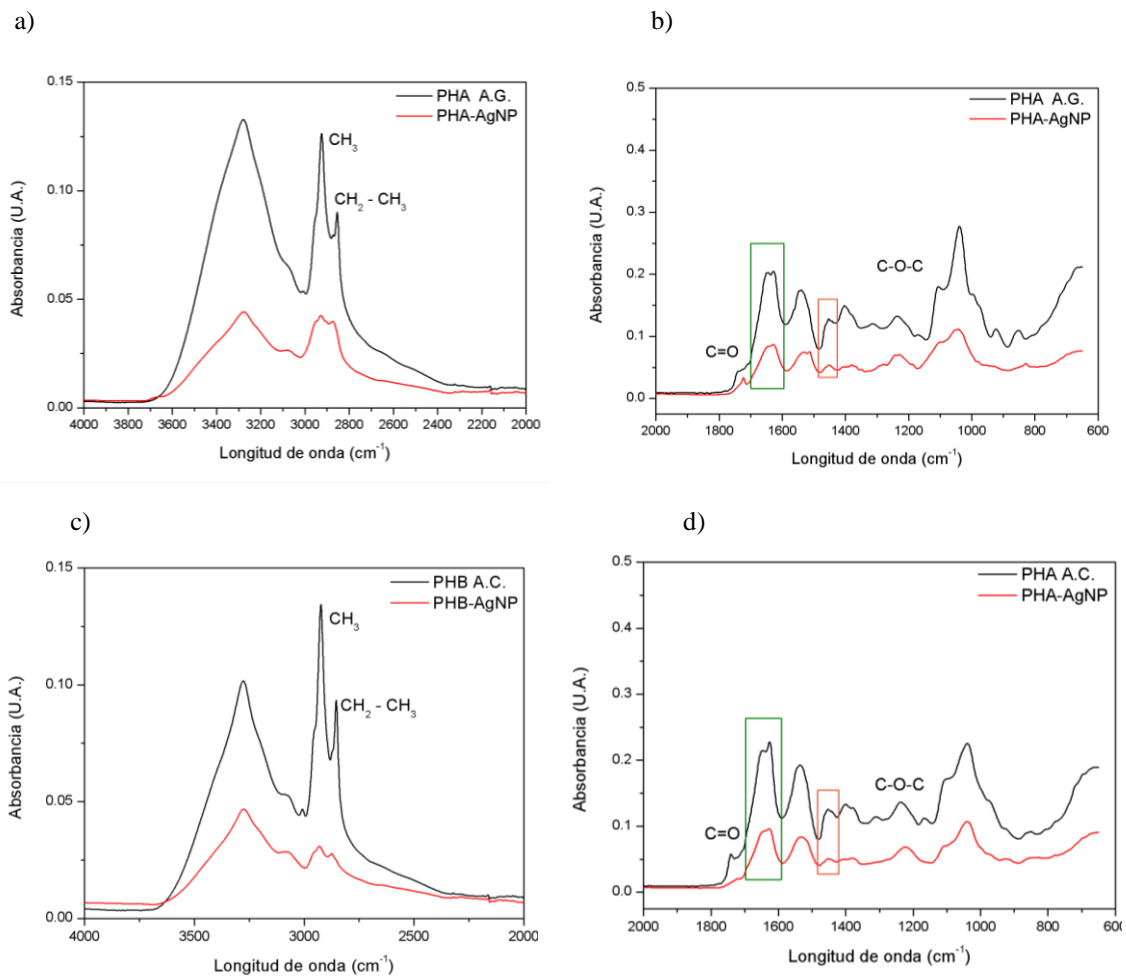


Figura 18. Análisis FTIR de 4000 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  (fig. a y b) PHA a partir de *P. aeruginosa* y glicerol grado reactivo, y de de 2000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (fig. c y d) PHA a partir de *P. aeruginosa* y glicerol crudo. La señal característica del P3HB se remarca en verde mientras que la correspondiente al P(HB-co-HV) en naranja.



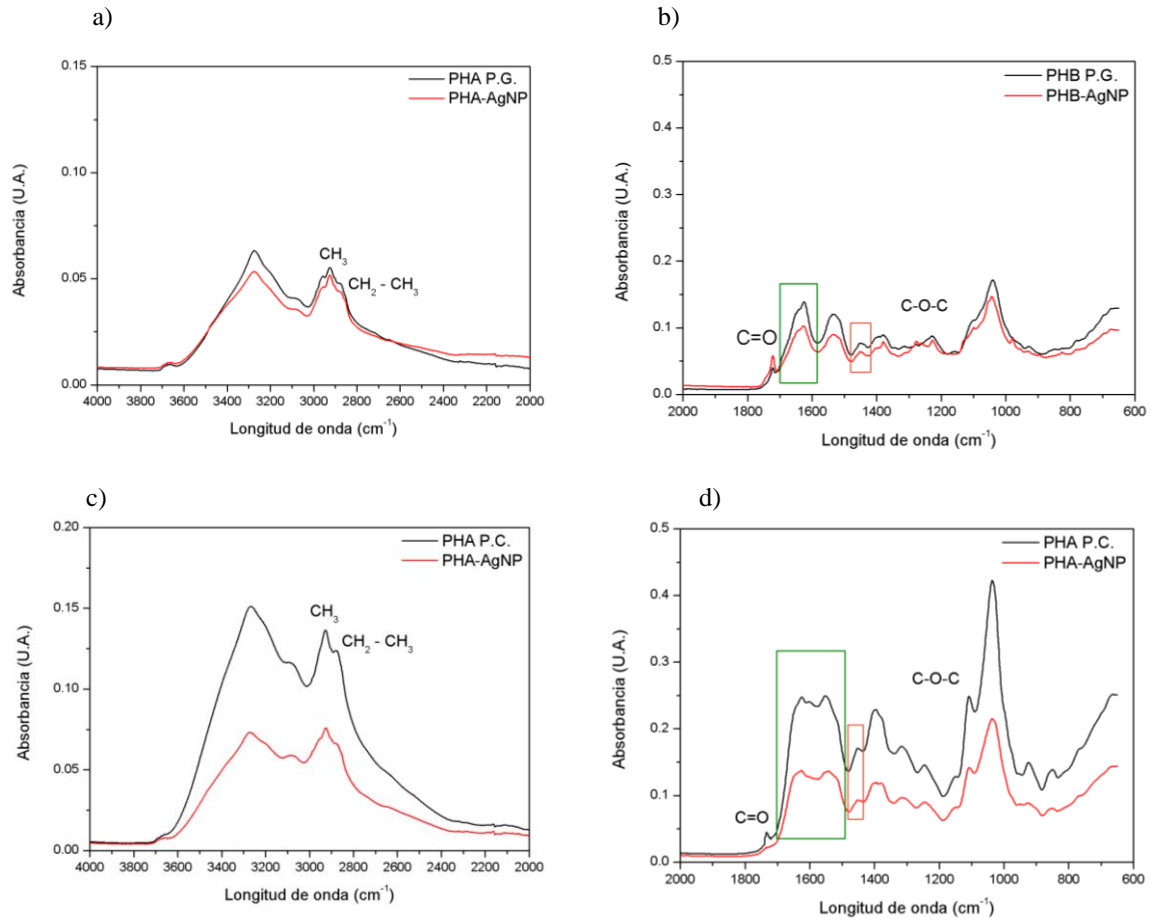


Figura 19. Análisis FTIR de 4000 a 2000  $\text{cm}^{-1}$  (fig. a y b) PHA a partir de *P. putida* y glicerol grado reactivo, y de de 2000 a 500  $\text{cm}^{-1}$  (fig. c y d) PHA a partir de *P. putida* y glicerol crudo. La señal característica del P3HB se remarca en verde mientras que la correspondiente al P(HB-co-HV) en naranja.

#### 10.4.2 Observación morfológica por SEM

Se realizó un estudio de la morfología de los materiales mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), cada material fue examinado sin AgNP y con 25 ppm de AgNP. Todas las muestras presentaron una superficie con porosidad. Las muestras correspondientes a la bacteria *P. aeruginosa* presentaron una morfología con mayor uniformidad en comparación con las morfologías formadas por la *P. putida*; específicamente el PHA obtenido de la *P. aeruginosa* y glicerol grado reactivo, que presentó una superficie granulada, como también se reporta en la literatura (Shamala et al., 2009) (Fig. 16c y 16d), cuenta con mayor uniformidad que el PHAs formado a partir de glicerol crudo, esta última presentó una morfología similar a bastoncillos entrelazados (Fig. 17c y 16d). La morfología que presentan los PHAs obtenidos a partir de *P. putida* utilizando glicerol grado reactivo como sustrato, presenta menos uniformidad que los PHAs obtenidos a partir de *P. aeruginosa* y glicerol. Mientras que la morfología obtenida por la *P. putida* y glicerol crudo fue similar a un panal de abejas (Fig. 19c y 19d), como se encuentra reportado en la literatura (Shamala et al., 2009). Morfológicamente los PHAs no se presentaron cambios significativos tras la adición de AgNP, únicamente se observó un aumento de rugosidad, creando valles y crestas, posiblemente debido a la interacción entre las AgNP y los PHAs. Se observó una mayor formación de valles y crestas en la obtenida a partir de *P. aeruginosa* y glicerol grado reactivo como sustrato (Fig. 16b y 16d).

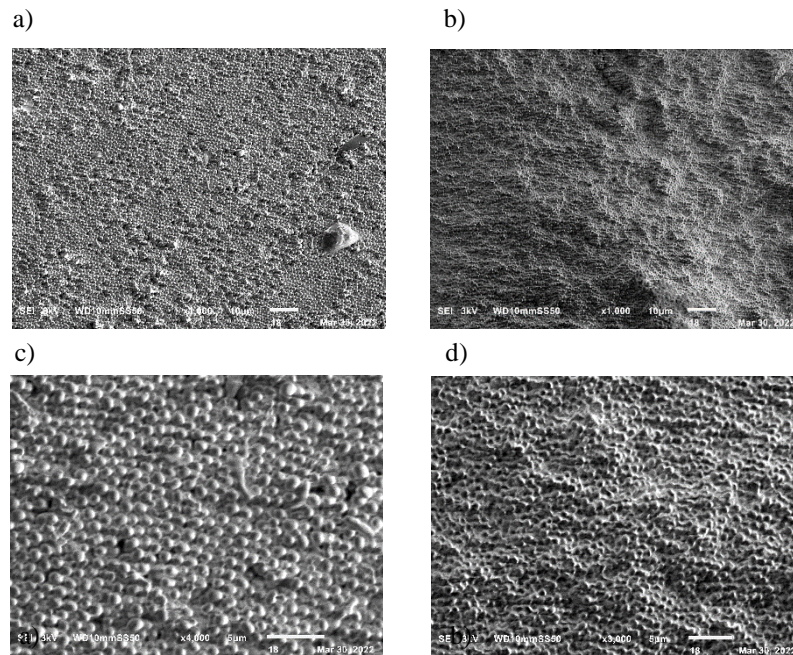


Figura 20. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de las películas formadas a partir de *P.aeuruginosa* con glicerol grado reactivo. Las películas de control sin AgNPs (fig. a y c) y las películas con AgNPs (fig. b y d), en aumento 1,00 K X (fig. a y b) y de 4,00 K X (fig. c y d).

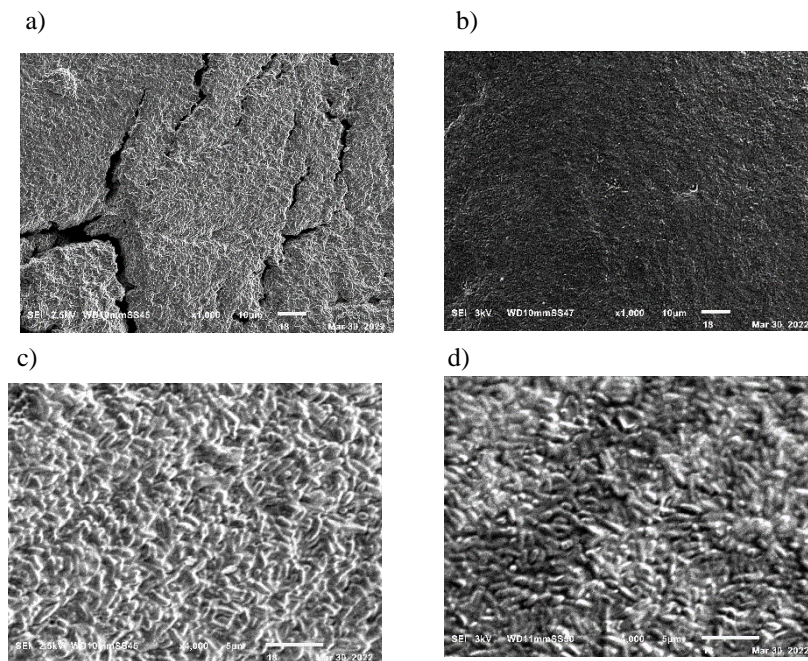


Figura 21. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de las películas formadas a partir de *P. aeruginosa* con glicerol crudo. Las películas de control sin AgNPs (fig. a y c) y las películas con AgNPs (fig. b y d), en aumento 1,00 K X (fig. a y b) y de 4,00 K X (fig. c y d).



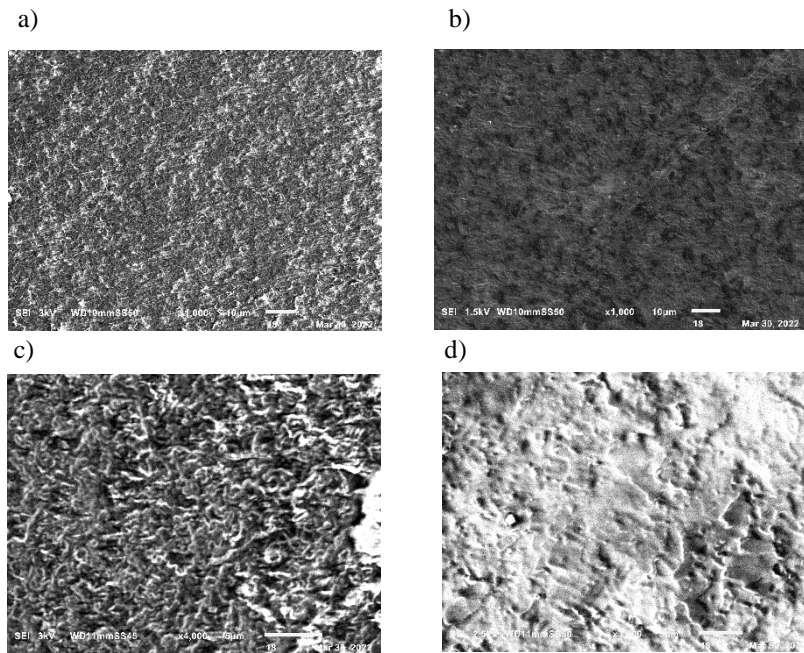


Figura 22. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de las películas formadas a partir de *P. putida* con glicerol grado reactivo. Las películas de control sin AgNPs (fig. a y c) y las películas con AgNPs (fig. b y d), en aumento 1,00 K X (fig. a y b) y de 4,00 K X (fig. c y d).

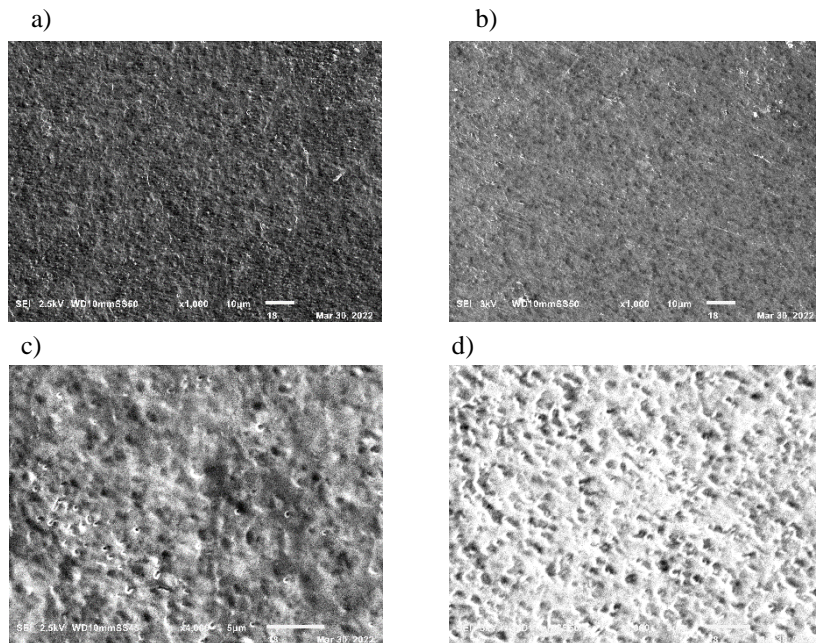


Figura 23. Micrografías electrónicas de barrido que muestran la morfología de las películas formadas a partir de *P. putida* con glicerol crudo. Las películas de control sin AgNPs (fig. a y c) y las películas con AgNPs (fig. b y d), en aumento 1,00 K X (fig. a y b) y de 4,00 K X (fig. c y d).

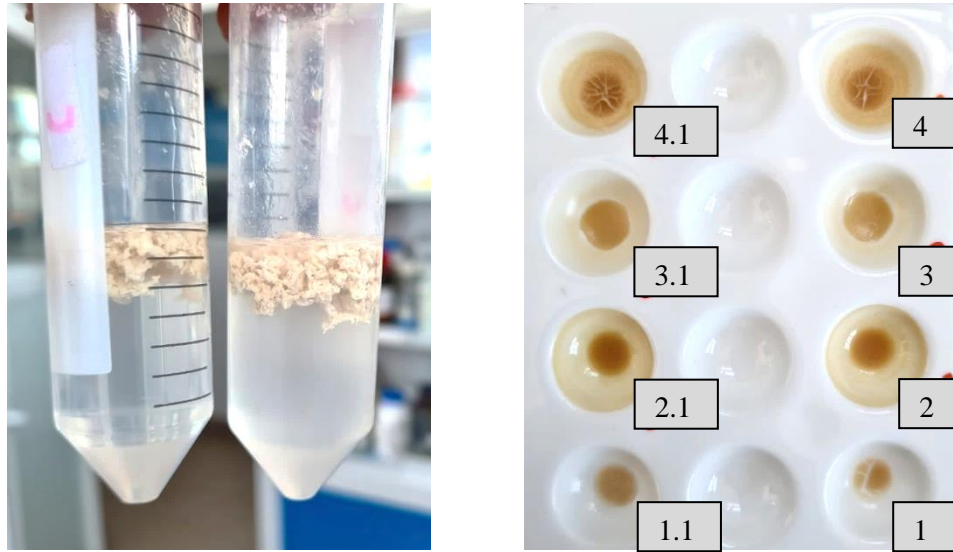


Figura 24. Visualización física de los distintos PHAs. La fig. a muestra el PHAs extraído de la cepa *P. aeruginosa* antes del proceso de secado y adición de las AgNPs, a la derecha se muestra el producido con glicerol grado reactivo y a la izquierda el obtenido con glicerol crudo. La fig. b. muestra los PHAs tras la adición de las AgNPs en dos distintas concentraciones, a la derecha 0.05mg/kg (1, 2, 3 y 4), a la izquierda 0.5mg/kg (1.1, 2.1, 3.1 y 4.1). Los PHAs correspondientes a la *P. aeruginosa* (1 y 1.1 con glicerol reactivo y 2 y 2.1 con glicerol crudo), los PHAs correspondientes a la *P. putida* (3 y 3.1 con glicerol reactivo y 4 y 4.1 con glicerol crudo).

#### 10.4.3 Evaluación antimicrobiana del compuesto AgNPs-PHA

Se realizó el estudio antimicrobiano a partir de la prueba de discos, con dos distintas concentraciones de AgNPs 0.05mg/kg y 0.5mg/kg para cada tipo PHA obtenido. En la tabla 5 es posible observar una marcada diferencia para ambas cepas, entre el diámetro inhibitorio de las muestras con 0.05mg/kg (fig 20a, 20c y fig. 21a, 21c) y 0.5mg/kg (fig. 20b, 20d y fig. 21b, 21d) de AgNPs, así como en sus controles específicos sin AgNPs. El biopolímero obtenido a partir de la cepa *P. aeruginosa* presenta un mayor diámetro inhibitorio en comparación al obtenido por la *P. putida*, posiblemente debido a una mejor interacción con las AgNP y mayor retención de las mismas. Sin embargo, se observa que en todos los tipos de biopolímeros con AgNPs la actividad antimicrobiana se difunden radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración de los biopolímeros con AgNPs en el medio es incapaz de inhibir al crecimiento de la cepa *S. epidermis*.

**Tabla 5. Zona de inhibición (mm) resultante (media  $\pm$  DE) de los ensayos de Kirby-Bauer contra cepas de control de *S. epidermidis*. PHA con 0.05mg/kg y 0.5mg/kg p/p de AgNPs.**

<i>Biopolímero</i>	<i>PHA</i>	<i>0.05mg/kg-AgNP</i>	<i>0.5mg/kg-AgNP</i>
PHA-A.G.	0	5.2 $\pm$ 1.1	19.5 $\pm$ 4.2
PHA-A.C.	0	2.3 $\pm$ 1.3	18.7 $\pm$ 1.2
PHA-P.G.	0	6.0 $\pm$ 2.9	14.3 $\pm$ 4.9
PHA-P.C.	0	5.6 $\pm$ 1.1	16.1 $\pm$ 3.5

Se postula que la estructura de la pared celular primaria, es decir, cada una de las cadenas de glucano y/o ramas peptídicas, puede verse afectada por las AgNP. Aunque existen algunos informes sobre el mecanismo de AgNPs en *S. aureus* como una bacteria modelo Grampositiva (Feng et al., 2000; Jung et al., 2008), no existe documentación detallada sobre su mecanismo de acción. Sin embargo, se sugiere que el mecanismo de acción antibacterial de las AgNP posiblemente actúe de manera similar a los agentes antimicrobianos más utilizados para el tratamiento de infecciones bacterianas. En la literatura se reporta tres mecanismos de acción diferentes de las AgNP inician el proceso con la adhesión a la superficie de la membrana celular y alteración de sus funciones energéticas, como la permeabilidad y la respiración. Seguido de la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana en *S. aureus* (Song et al., 2006). Se ha informado que la actividad antimicrobiana de las AgNPs coloidal está influenciada por diferentes características de las partículas, como el tamaño y la forma (Ahmed et al., 2016; Chung et al., 2016; Kaviya et al., 2011). Las partículas más pequeñas que tienen un área de superficie más grande disponible para la interacción tendrán un efecto bactericida más fuerte que las partículas más grandes (Shrivastava et al., 2007). Esto está moderadamente de acuerdo con los resultados que se muestran en las caracterizaciones de DLS, donde muestran la población principal (90% de la muestra) con una media de diámetro hidrodinámico de 95nm y una segunda población (10%

de la muestra) con una media de 4nm, donde las nanopartículas más pequeñas pueden estar desempeñando así, una mejor inhibición de crecimiento bacteriano.

En segundo lugar, las AgNPs pueden penetrar en las bacterias y causar más daño, posiblemente al interactuar con compuestos que contienen azufre y fósforo, como el ADN (Gibbins & Warner, 2005). Además, se cree que las AgNPs después de penetrar en las bacterias han inactivado sus enzimas, generando peróxido de hidrógeno y provocando la muerte de las células bacterianas (Raffi et al., 2008; Shockman & Barren, 1983). Así como, que se cree que la alta afinidad de la plata por el azufre o el fósforo es la clave elemento de su propiedad antibacteriana, en que el azufre y el fósforo se encuentran en abundancia en toda la membrana celular. Las AgNPs reaccionan con proteínas que contienen azufre dentro o fuera de la membrana celular, lo que a su vez afecta la viabilidad celular (Guzman et al., 2012).

En tercer lugar, las AgNPs liberan iones de plata, que contribuyen adicionalmente al efecto bactericida (Feng et al., 2000). De hecho, en la literatura han (Morones et al., 2005) demostraron que las AgNPs (en las que la plata está presente en forma de  $Ag^0$ ) también contienen concentraciones micromolares de  $Ag^+$ , y han demostrado que tanto  $Ag^+$  como  $Ag^0$  contribuyen a la actividad antibacteriana. El mecanismo de inhibición por iones de plata sobre microorganismos es parcialmente conocido. Se cree que el ADN pierde su capacidad de replicación y las proteínas celulares se inactivan con el tratamiento con iones de plata (Gupta et al., 2008; Kumar et al., 2008). Se ha demostrado que concentraciones más altas de iones  $Ag^+$  interactúan con componentes citoplasmáticos y ácidos nucleicos (Guzman et al., 2012).



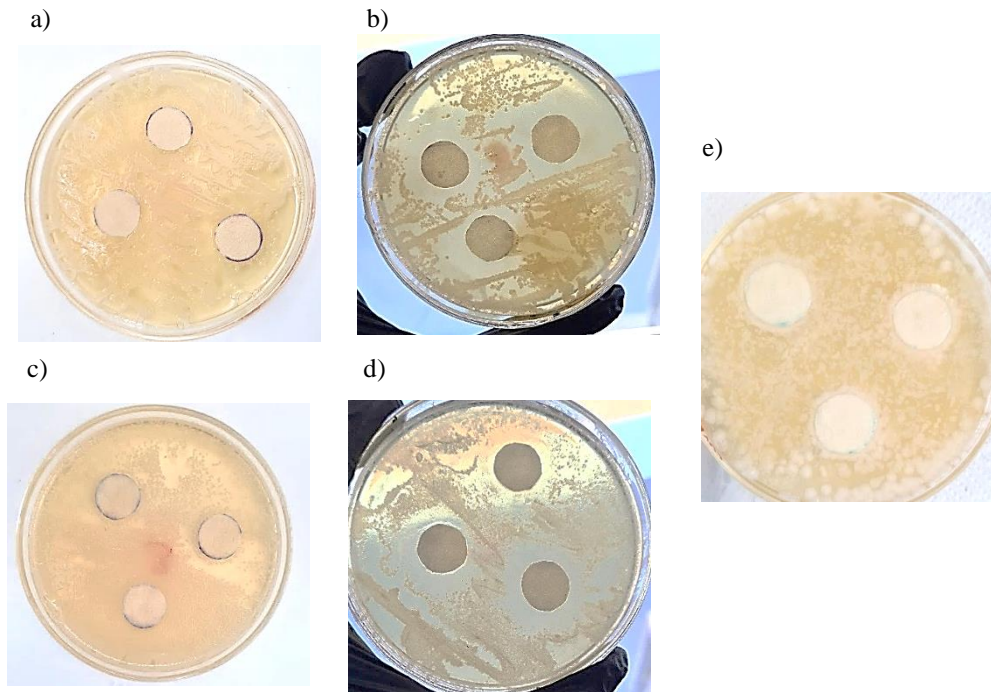


Figura 25. Halo de inhibición antimicrobiana de los discos impregnados con PHAs-AgNPs producidos con la cepa *P. aeruginosa*, con dos distintas concentraciones de AgNPs, 0.05mg/kg (fig. a y c) y con 0.5mg/kg (fig.b y d). Las figuras a y b, corresponden a los PHAs producidos a partir de glicerol grado reactivo, mientras que las figuras c y d, los PHAs formados con glicerol crudo. Se presenta al blanco (fig. e).

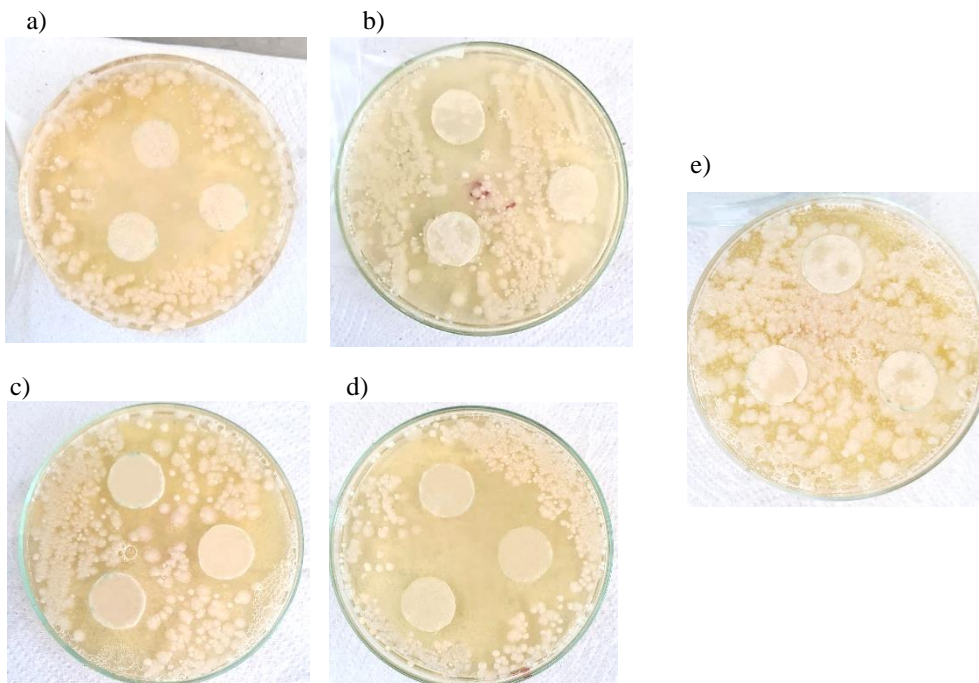


Figura 26. Halo de inhibición antimicrobiana de los discos impregnados con PHAs-AgNPs producidos con la cepa *P. putida*, con dos distintas concentraciones de AgNPs, 0.05mg/kg (fig. a y c) y con 0.5mg/kg (fig.b y d). Las figuras a y b, corresponden a los PHAs producidos a partir de glicerol grado reactivo, mientras que las figuras c y d, los PHAs formados con glicerol crudo. Se presenta al blanco (fig. e).



## 11 Conclusiones

A partir de los resultados de los análisis de FTIR, TGA y DSC se concluye que las cepas *P. aeruginosa* y *P. putida* produjeron satisfactoriamente polihidroxialcanoatos de cadena corta, obteniendo en ambos casos posiblemente en su mayoría una mezcla de P3HB y P(HB-co-HV) a partir de los dos sustratos utilizados: glicerol grado reactivo y glicerol crudo. La utilización del sustrato glicerol grado reactivo para la producción de PHA en ambas cepas, resultó en una mayor producción de PHA, a partir de la cepa *P. aeruginosa* transcurridas 22 horas, a pesar de que se logró extraer una baja cantidad de PHAs en comparación con la literatura, se logró extraer 39.82  $\mu\text{g}$  de polímero con aún un 3.2% de glicerol crudo presente en el medio, mientras que para el medio enriquecido con glicerol grado reactivo se obtuvo 45.21  $\mu\text{g}$  de polímero con un 9.8% de glicerol remanente; en comparación, para la cepa *P. putida*, se obtuvieron después de 22 horas 37.39  $\mu\text{g}$  con aún un 3.0% de glicerol crudo presente en el medio, mientras que para el medio con glicerol grado reactivo 46.13  $\mu\text{g}$  de polímero con 14.8% de glicerol remanente.

Se sugiere que la cepa *P. putida* produjo una menor cantidad de PHAs y su crecimiento fue más lento, ya que su versatilidad metabólica y capacidades de resistencia al estrés le brindaron una mayor capacidad de adaptación enfocada al crecimiento de la cepa más allá que a la producción del biopolímero, aunque actualmente se desconocen las funciones metabólicas, fisiológicas o reguladoras específicas de muchos de los determinantes revelados por la secuencia de su genoma.

De acuerdo con los estándares obtenidos y utilizados para las condiciones de síntesis de PHAs a partir de glicerol crudo así como de glicerol grado reactivo, se observó una variación en la cantidad de biopolímero obtenido, ya que se sugiere que debido a las propiedades mismas del glicerol crudo, en específico contaminantes, hicieron interferencia con el metabolismo de ambas cepas bacterianas, *P. aeruginosa* y *P. putida*, lo que ocasionó una disminución de la producción, en un 11.9% y 18.9% respectivamente para los PHAs obtenidos a partir de glicerol crudo, sin embargo, se sugiere que es un sustrato aún con potencial para la producción de PHAs. Posiblemente para la cepa *P. aeruginosa* debido a la mayor tolerancia a los contaminantes del glicerol crudo, se obtuvo una producción del 88.1%,

mientras que la cepa *P. putida* una de 81.1%, en comparación con lo producido a partir de glicerol grado reactivo.

El polímero que se obtuvo del sustrato glicerol grado reactivo y glicerol crudo presentó propiedades térmicas y físicas muy similares de acuerdo con las técnicas de caracterización DSC, TGA y XRD, que revelaron tenían valores muy cercanos referente a sus propiedades físicas, como Tm, Tg, Td y cristalinidad.

Referente a las AgNPs, la estabilidad que reflejó el gráfico de potencial zeta obtenido en el rango de pH 6 a 10, fue de -26mV y -40mV respectivamente, fue una característica positiva que se reflejó en la manipulación de las mismas para sintetizar el compuesto de AgNPs-PHA, por lo que se infiere que la variación del método utilizado de sinterización de AgNP, Castro-Mayorga et al., 2014 es exitoso para este compuesto.

Se sugiere que existe una mayor interacción entre el biopolímero y las AgNPs para el compuesto formado a partir de glicerol grado reactivo y la cepa *P. aeruginosa*, en comparación al resto de compuestos, debido a su morfología inicial de forma granular, antes de la adición de las AgNPs, ya que el análisis FTIR del compuesto donde se compara el espectro del biopolímero antes y después de la adición de las AgNPs, presentó mayores cambios en las intensidades de las señales, ya que probablemente las AgNPs se encuentran embebidas en las cadenas poliméricas reduciendo así, las vibraciones de los distintos grupos funcionales, además de que de acuerdo al tamaño obtenido de las AgNPs que reportó el DLS menor a 100nm para la mayor parte de la población, pudo facilitar una posible internalización AgNPs a través de las cadenas poliméricas del compuesto.

## 12 Referencias

- Abid, S., Raza, Z. A., & Hussain, T. (2016). Production kinetics of polyhydroxyalkanoates by using *Pseudomonas aeruginosa* gamma ray mutant strain EBN-8 cultured on soybean oil. *3 Biotech*, *6*(2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0452-4>
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of Advanced Research*, *7*(1), 17–28.
- Al-mamun, M., Chowdhury, T., Biswas, B., & Absar, N. (2018). Leading Concern for Human Health. In *Food Safety and Preservation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814956-0.00011-1>
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, *54*(4), 450–472. <https://doi.org/10.1128/membr.54.4.450-472.1990>
- Applebee, M. K., Joyce, A. R., Conrad, T. M., Pettigrew, D. W., & Palsson, B. Ø. (2011). Functional and metabolic effects of adaptive glycerol kinase (GLPK) mutants in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(26), 23150–23159.
- Aranda-Olmedo, I., Tobes, R., Manzanera, M., Ramos, J. L., & Marqués, S. (2002). Species-specific repetitive extragenic palindromic (REP) sequences in *Pseudomonas putida*. *Nucleic Acids Research*, *30*(8), 1826–1833.
- Azeredo, H. M. C. d. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, *42*(9), 1240–1253. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.019>
- Baron, S. (1996). *Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae)--Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Bauer, K., Struyve, M., Bosch, D., Benz, R., & Tommassen, J. (1989). One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(28), 16393–16398.

- Beigmohammadi, F., Peighambaroust, S. H., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Peighambaroust, S. J., & Khosrowshahi, N. K. (2016). Antibacterial properties of LDPE nanocomposite films in packaging of UF cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.059>
- Belda, E., Heck, R. G. A. Van, Fraser, C., Klenk, H., Sekowska, A., Vallenet, D., & Martins, V. A. P. (2016). *The revisited genome of Pseudomonas putida KT2440 enlightens its value as a robust metabolic chassis*. 00, 1–22. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13230>
- Blevins, W. T., Feary, T. W., & Phibbs Jr, P. V. (1975). 6-Phosphogluconate dehydratase deficiency in pleiotropic carbohydrate-negative mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 121(3), 942–949.
- Bouvet, O. M. M., Lenormand, P., Ageron, E., & Grimont, P. A. D. (1995). Taxonomic diversity of anaerobic glycerol dissimilation in the Enterobacteriaceae. *Research in Microbiology*, 146(4), 279–290. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)81051-5](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)81051-5)
- Britania. (2011). Simmons Citrato Agar. *Laboratorios Britania S. A.*, 2. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a29779bd2be8.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a29779bd2be8.pdf)
- BRITANIA. (2015). Lisina Hierro Agar. *Laboratorios Britania*, 1–2. <http://www.britanialab.com/productos/B02106 REV 01-LISINA HIERRO AGAR.pdf>
- BRITANIA. (2021). Triple Sugar Iron Agar. *HiMedia Laboratories*, 2–3. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6070971eb11bd.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070971eb11bd.pdf)
- Brody, A. L., Strupinsky, E. P., & Kline, L. R. (2001). *Active packaging for food applications*. CRC press.
- Brown, A. F., Leech, J. M., Rogers, T. R., & McLoughlin, R. M. (2014). *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Frontiers in Immunology*, 4, 507.
- Burger, M., Woods, R. G., McCarthy, C., & Beacham, I. R. (2000). Temperature regulation of protease in *Pseudomonas fluorescens* LS107d2 by an ECF sigma factor and a transmembrane activator. The GenBank accession numbers for the sequences reported

- in this paper are AF228766 and AF228767. *Microbiology*, *146*(12), 3149–3155.
- Calero, P., & Nikel, P. I. (2019). Chasing bacterial chassis for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms. *Microbial Biotechnology*, *12*(1), 98–124.
- Campbell, C. J., & Laherrère, J. H. (1998). The end of cheap oil. *Scientific American*, *278*(3), 78–83.
- Castro-Mayorga, J. L., Martínez-Abad, A., Fabra, M. J., Olivera, C., Reis, M., & Lagarón, J. M. (2014). Stabilization of antimicrobial silver nanoparticles by a polyhydroxyalkanoate obtained from mixed bacterial culture. *International Journal of Biological Macromolecules*, *71*, 103–110.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.059>
- Chen, G.-Q. (2010). Plastics completely synthesized by bacteria: polyhydroxyalkanoates. In *Plastics from bacteria* (pp. 17–37). Springer.
- Cheon, J. Y., Kim, S. J., Rhee, Y. H., Kwon, O. H., & Park, W. H. (2019). Shape-dependent antimicrobial activities of silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *14*, 2773–2780. <https://doi.org/10.2147/IJN.S196472>
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Dufour, A., & Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(5), 698–722.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux020>
- Chi, Z., Pyle, D., Wen, Z., Frear, C., & Chen, S. (2007). A laboratory study of producing docosahexaenoic acid from biodiesel-waste glycerol by microalgal fermentation. *Process Biochemistry*, *42*(11), 1537–1545.
- Chung, I.-M., Park, I., Seung-Hyun, K., Thiruvengadam, M., & Rajakumar, G. (2016). Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: their characteristic properties and therapeutic applications. *Nanoscale Research Letters*, *11*(1), 1–14.
- Condalab. (2019). Base de Agar Urea ( Christensen ) ISO Test microbiológico. *Condalab*, 2–3. [www.condalab.com](http://www.condalab.com)

- Daddaoua, A., Krell, T., & Ramos, J.-L. (2009). Regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas*: the phosphorylative branch and Entner-Doudoroff enzymes are regulated by a repressor containing a sugar isomerase domain. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21360–21368.
- Dalynn biologicals. (2004). *Pseudomonas F Agar*. 800, 1.
- De Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1994). [31] Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5-and Tn10-derived minitransposons. *Methods in Enzymology*, 235, 386–405.
- Del Castillo, T., Duque, E., & Ramos, J. L. (2008). A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2331–2339.
- Del Castillo, T., Ramos, J. L., Rodríguez-Herva, J. J., Fuhrer, T., Sauer, U., & Duque, E. (2007). Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *Journal of Bacteriology*, 189(14), 5142–5152.
- dela Cruz, T. E. E., & Torres, J. M. O. (2012). Gelatin hydrolysis test protocol. *Am Soc Microbiol*.
- Dinjaski, N., Fernández-gutiérrez, M., Selvam, S., Parra-ruiz, F. J., Lehman, S. M., San, J., García, E., García, J. L., García, A. J., & Auxiliadora, M. (2013). Biomaterials PHACOS , a functionalized bacterial polyester with bactericidal activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials*, 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.059>
- Elzey, S., & Grassian, V. H. (2010). Agglomeration, isolation and dissolution of commercially manufactured silver nanoparticles in aqueous environments. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1945–1958. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9783-y>
- Fasihnia, S. H., Peighambardoust, S. H., & Peighambardoust, S. J. (2018). Nanocomposite films containing organoclay nanoparticles as an antimicrobial (active) packaging for potential food application. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(2), 1–10.

<https://doi.org/10.1111/jfpp.13488>

- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), 662–668.
- Fetsch, A., & Johler, S. (2018). *Staphylococcus aureus* as a foodborne pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 88–96.
- Fontaine, P., Mosrati, R., & Corroler, D. (2017). International Journal of Biological Macromolecules Medium chain length polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Pseudomonas putida* mt-2 is enhanced by co-metabolism of glycerol / octanoate or fatty acids mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.115>
- Fuhrer, T., Fischer, E., & Sauer, U. (2005). Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. *Journal of Bacteriology*, 187(5), 1581–1590. <https://doi.org/10.1128/JB.187.5.1581-1590.2005>
- Furukawa, T., Sato, H., Murakami, R., Zhang, J., Noda, I., Ochiai, S., & Ozaki, Y. (2007). Comparison of miscibility and structure of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)/poly(l-lactic acid) blends with those of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(l-lactic acid) blends studied by wide angle X-ray diffraction, differential scanning calorimetry. *Polymer*, 48(6), 1749–1755. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.01.020>
- Gaillet, S., & Rouanet, J. (2015). Silver nanoparticles : Their potential toxic effects after oral exposure and underlying mechanisms – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 77, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.019>
- Galić, K., Ščetar, M., & Kurek, M. (2011). The benefits of processing and packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 22(2–3), 127–137.
- Garlapati, V. K., Shankar, U., & Budhiraja, A. (2016). Bioconversion technologies of crude glycerol to value added industrial products. *Biotechnology Reports*, 9, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.11.002>

- Getachew, A., & Berhanu, A. (2016). Production of Sterilized Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoates (Smcl- Pha) as a Biofilm to Tissue Engineering Application. *Journal of Tissue Science & Engineering*, 7(2). <https://doi.org/10.4172/2157-7552.1000167>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). *Production , use , and fate of all plastics ever made*. July, 25–29.
- Gibbins, B., & Warner, L. (2005). The role of antimicrobial silver nanotechnology. *Med Device Diagnostic Indust Mag*, 1, 1–2.
- Gill, S., Belles-Isles, J., Brown, G., Gagne, S., Lemieux, C., Mercier, J. P., & Dion, P. (1994). Identification of variability of ribosomal DNA spacer from pseudomonas soil isolates. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(7), 541–547. <https://doi.org/10.1139/m94-087>
- Goudarzi, V., Shahabi-Ghahfarrokhi, I., & Babaei-Ghazvini, A. (2017). Preparation of ecofriendly UV-protective food packaging material by starch/TiO<sub>2</sub> bio-nanocomposite: Characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.065>
- Grigore, M. E., Grigorescu, R. M., Iancu, L., Ion, R. M., Zaharia, C., & Andrei, E. R. (2019). Methods of synthesis, properties and biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: a review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(9), 695–712. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1605866>
- Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., Ishak, K. A., & Ahmad, N. (2014). Carbon nanofibers-poly-3-hydroxyalkanoates nanocomposite: Ultrasound-assisted dispersion and thermostructural properties. *Journal of Nanomaterials*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/264206>
- Gumel, Ahmad Mohammed, Annuar, M. S. M., & Heidelberg, T. (2012). Biosynthesis and Characterization of Polyhydroxyalkanoates Copolymers Produced by *Pseudomonas putida* Bet001 Isolated from Palm Oil Mill Effluent. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045214>



- Gumel, Annuar, & Chisti, Y. (2013). Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), 580–605. <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0527-1>
- Guo, W., Duan, J., Geng, W., Feng, J., Wang, S., & Song, C. (2013). Comparison of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthases from *Pseudomonas mendocina* NK-01 with the same substrate specificity. *Microbiological Research*, 168(4), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.11.003>
- Gupta, P., Bajpai, M., & Bajpai, S. K. (2008). Investigation of antibacterial properties of silver nanoparticle-loaded poly (acrylamide-co-itaconic acid)-grafted cotton fabric. *Journal of Cotton Science*.
- Gurieff, N., & Lant, P. (2007). Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. *Bioresource Technology*, 98(17), 3393–3403.
- Guzman, M., Dille, J., & Godet, S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8(1), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.007>
- Hancock. (1991). Bacterial outer membranes: evolving concepts. *ASM American Society for Microbiology News*, 57(4), 175–182.
- Hancock, R. E. W., & Brinkman, F. S. L. (2002). Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 17–38.
- Heath, H. E., & Gaudy, E. T. (1978). Relationship between catabolism of glycerol and metabolism of hexosephosphate derivatives by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 136(2), 638–646.
- Hengge, R., & Boos, W. (1983). Maltose and lactose transport in *Escherichia coli* Examples of two different types of concentrative transport systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 737(3–4), 443–478.
- Henriques, R. (1898). Über partielle Verseifung von Ölen und Fetten II. *Angewandte*

*Chemie*, 11(30), 697–702.

- Herrero, M., De Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 172(11), 6557–6567.
- Hollinshead, W., He, L., & Tang, Y. J. (2014). Biofuel production: an odyssey from metabolic engineering to fermentation scale-up. *Frontiers in Microbiology*, 5, 344.
- Ito, T., Nakashimada, Y., Senba, K., Matsui, T., & Nishio, N. (2005). Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(3), 260–265.
- Jacquel, N., Lo, C. W., Wei, Y. H., Wu, H. S., & Wang, S. S. (2008). Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.029>
- Jenny, M., & Kingsbury, J. (2018). Properties and Prevention: A Review of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biology and Medical Research*, 2(3), 1–8.
- Jensen, L. J., Friis, C., & Ussery, D. W. (1999). Three views of microbial genomes. *Research in Microbiology*, 150(9–10), 773–777.
- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., & Park, Y. H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2171–2178.
- Kalaoglu-Altan, O. I., Baskan, H., Meireman, T., Basnett, P., Azimi, B., Fusco, A., Funel, N., Donnarumma, G., Lazzeri, A., Roy, I., Danti, S., & De Clerck, K. (2021). Silver nanoparticle-coated polyhydroxyalkanoate based electrospun fibers for wound dressing applications. *Materials*, 14(17). <https://doi.org/10.3390/ma14174907>
- Kalia, V. C. (2019). Biotechnological applications of polyhydroxyalkanoates. *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*, 1–420. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3759-8>

- Kango, S., Kalia, S., Celli, A., Njuguna, J., Habibi, Y., & Kumar, R. (2013). Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review. *Progress in Polymer Science*.  
<https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.02.003>
- Kanmani, P., & Rhim, J.-W. (2014). Physical, mechanical and antimicrobial properties of gelatin based active nanocomposite films containing AgNPs and nanoclay. *Food Hydrocolloids*, *35*, 644–652.
- Karim, Z., Adnan, R., & Ansari, M. S. (2012). Low concentration of silver nanoparticles not only enhances the activity of horseradish peroxidase but alter the structure also. *PLoS ONE*, *7*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041422>
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., & Viswanathan, B. (2011). Green synthesis of silver nanoparticles using *Polyalthia longifolia* leaf extract along with D-sorbitol: study of antibacterial activity. *Journal of Nanotechnology*, *2011*.
- Kessler, B., & Witholt, B. (1998). Synthesis, recovery and possible application of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates: A short overview. *Macromolecular Symposia*, *130*, 245–260. <https://doi.org/10.1002/masy.19981300122>
- Kiedrowski, M. R., & Horswill, A. R. (2011). New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1241*(1), 104–121.
- Klebba, P. E., & Newton, S. M. C. (1998). Mechanisms of solute transport through outer membrane porins: burning down the house. *Current Opinion in Microbiology*, *1*(2), 238–247.
- Koley, D., & Bard, A. J. (2010). Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(39), 16783–16787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011614107>
- Kumar, A., Vemula, P. K., Ajayan, P. M., & John, G. (2008). Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nature Materials*, *7*(3), 236–241.

- Law, J. H., & Slepecky, R. A. (1960). *Ralph a. slepecky. 1958.*
- Laycock, B., Halley, P., Pratt, S., Werker, A., & Lant, P. (2013). The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. *Progress in Polymer Science*, 38(3–4), 536–583. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003>
- Leboffe, M. J., & Pierce, B. E. (2015). *Microbiology: laboratory theory and application.* Morton Publishing Company.
- Lee, S. Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1), 1–14.
- Lessie, T. G., & Phibbs Jr, P. V. (1984). Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annual Review of Microbiology*, 38(1), 359–388.
- López, N. I., Pettinari, M. J., Nickel, P. I., & Méndez, B. S. (2015). Polyhydroxyalkanoates: much more than biodegradable plastics. *Advances in Applied Microbiology*, 93, 73–106.
- Lyi, S. M., Jafri, S., & Winans, S. C. (1999). Mannopinic acid and agropinic acid catabolism region of the octopine-type Ti plasmid pTi15955. *Molecular Microbiology*, 31(1), 339–347.
- Martínez-Bueno, M. A., Tobes, R., Rey, M., & Ramos, J. (2002). Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environmental Microbiology*, 4(12), 842–855.
- Mermod, N., Lehrbach, P. R., Reineke, W., & Timmis, K. N. (1984). Transcription of the TOL plasmid toluate catabolic pathway operon of *Pseudomonas putida* is determined by a pair of co-ordinately and positively regulated overlapping promoters. *The EMBO Journal*, 3(11), 2461–2466.
- Mesquita, D. P., Amaral, A. L., Leal, C., Oehmen, A., Reis, M. A. M., & Ferreira, E. C. (2015). Polyhydroxyalkanoate granules quantification in mixed microbial cultures using image analysis: Sudan Black B versus Nile Blue A staining. *Analytica Chimica Acta*, 865(1), 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.018>

- Miu, D. M., Eremia, M. C., & Moscovici, M. (2022). Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as Biomaterials in Tissue Engineering: Production, Isolation, Characterization. *Materials*, *15*(4). <https://doi.org/10.3390/ma15041410>
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., & Samantaray, D. (2017). Bacillus and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *12*(December), 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, *16*(10), 2346.
- Mota, C., Pinto, B. P., Lima, A. L., & De Glycerol, A. (2017). Versatile Renewable Feedstock for the Chemical Industry. *Cham: Springer*.
- Mu, Y., Teng, H., Zhang, D.-J., Wang, W., & Xiu, Z.-L. (2006). Microbial production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* using crude glycerol from biodiesel preparations. *Biotechnology Letters*, *28*(21), 1755–1759.
- Muthu Kumar A. (2017). Wood waste - carbon source for Polyhydroxyalkanoates ( PHAs ) production. *International Journal of Forestry and Wood Science*, *4*(1), 36–40.
- Nakazawa, T. (2002). Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environmental Microbiology*, *4*(12), 782–786.
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., Fouts, D. E., Gill, S. R., Pop, M., & Holmes, M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, *4*(12), 799–808.
- Ngo, T. A., Kim, M.-S., & Sim, S. J. (2011). High-yield biohydrogen production from biodiesel manufacturing waste by *Thermotoga neapolitana*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *36*(10), 5836–5842.
- Nikaido, H. (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *The Journal of Biological Chemistry (Print)*, *269*(6), 3905–3908.

- Nikaido, H., & Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*, 49(1), 1–32.
- Nikel, P. I., Chavarría, M., Fuhrer, T., Sauer, U., & De Lorenzo, V. (2015). Pseudomonas putida KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 25920–25932.
- Nikel, P. I., Kim, J., & de Lorenzo, V. (2014). Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in Pseudomonas putida KT 2440. *Environmental Microbiology*, 16(1), 239–254.
- Nobile, M. A. del, Cannarsi, M., Altieri, C., Sinigaglia, M., Favia, P., Iacoviello, G., & D'agostino, R. (2004). Effect of Ag-containing nano-composite active packaging system on survival of Alicyclobacillus acidoterrestris. *Journal of Food Science*, 69(8), E379–E383.
- Nozaki, M. (1963). Metapyrocatechase. I. Purification, crystallization and some properties. *Biochem. Z.*, 338, 582–590.
- Pagliari, M., & Rossi, M. (2008). *The future of glycerol*.
- Palleroni, N. J. (2015). Pseudomonas . In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210>
- Paulo, G., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol : A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>
- Pereira, J. R., Araújo, D., Marques, A. C., Neves, L. A., Grandfils, C., Sevrin, C., Alves, V. D., Fortunato, E., Reis, M. A. M., & Freitas, F. (2019). Demonstration of the adhesive properties of the medium-chain-length polyhydroxyalkanoate produced by

*Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* from glycerol. *International Journal of Biological Macromolecules*, *122*, 1144–1151.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.064>

Peter, S., Oberhettinger, P., Schuele, L., Dinkelacker, A., Vogel, W., Dörfel, D., Bezdán, D., Ossowski, S., Marschal, M., & Liese, J. (2017). Genomic characterisation of clinical and environmental *Pseudomonas putida* group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics*, *18*(1), 1–11.

Pflüger-Grau, K., & de Lorenzo, V. (2014). From the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system to selfish metabolism: a story retraced in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters*, *356*(2), 144–153.

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., & Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, *14*(9), 1109.

PlasticsEurope, E. (2016). Plastics—the facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data. In *Plastics Europe*. Brussels Belgium.

Poblete-Castro, I., Wittmann, C., & Nikel, P. I. (2020). Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microbial Biotechnology*, *13*(1), 32–53. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13400>

Pomogailo, A. D. (1997). Polymer-immobilised nanoscale and cluster metal particles. *Russian Chemical Reviews*, *66*(8), 679.

Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *3*(2), 255–264.

Prather, K. L. J. (2019). Chemistry as biology by design. *Microbial Biotechnology*, *12*(1), 30.

Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A., & Hasan, M. M. (2008). Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224.

*Journal of Materials Science and Technology*, 24(2), 192–196.

Rai. (2010). *Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates and its Medical Applications*. 324.

Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. (2012). *Silver nanoparticles : the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria*. 841–852.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05253.x>

Ramos, J. L. (2004). *Pseudomonas*.

Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D. U., Strömpl, C., Moore, E. R. B., & Timmis, K. N. (2002). Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environmental Microbiology*, 4(12), 912–915.

Revelles, O. (2014). *L-LISINA EN Pseudomonas putida KT2440 ” Olga M<sup>a</sup> Revelles López Universidad de Granada 2005* (Issue September).

Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., & Kariuki, S. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110(7), 377–380.

Rojo, F., Pieper, D. H., Engesser, K.-H., Knackmuss, H.-J., & Timmis, K. N. (1987). Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics. *Science*, 238(4832), 1395–1398.

Scallan, E., Griffin, P. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., & Hoekstra, R. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 16.

Schirmer, T. (1998). General and specific porins from bacterial outer membranes. *Journal of Structural Biology*, 121(2), 101–109.

Schuster, D. (1987). *Encyclopedia of Emulsion Technology: Basic theory, measurement, applications* (Vol. 3). CRC Press.

Schweizer, H. P., Jump, R., & Po, C. (1997). Structure and gene-polypeptide relationships of the region encoding glycerol diffusion facilitator (glpF) and glycerol kinase (glpK)



of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *143*(4), 1287–1297.

<https://doi.org/10.1099/00221287-143-4-1287>

Search, H., Journals, C., Contact, A., Iopscience, M., & Address, I. P. (2000). *Hybrid polymer-inorganic nanocomposites*. 53.

<https://doi.org/10.1070/RC2000v069n01ABEH000506>

Sedlacek, P., Pernicova, I., Novackova, I., Kourilova, X., Kalina, M., Kovalcik, A., Koller, M., Nebesarova, J., Krzyzanek, V., Hrubanova, K., Masilko, J., Slaninova, E., Trudicova, M., & Obruca, S. (2020). *Introducing the Newly Isolated Bacterium Material Study on the Produced Copolymers*.

Selembo, P. A., Perez, J. M., Lloyd, W. A., & Logan, B. E. (2009a). Enhanced hydrogen and 1, 3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, *104*(6), 1098–1106.

Selembo, P. A., Perez, J. M., Lloyd, W. A., & Logan, B. E. (2009b). High hydrogen production from glycerol or glucose by electrohydrogenesis using microbial electrolysis cells. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(13), 5373–5381.

Shamala, T. R., Divyashree, M. S., Davis, R., Kumari, K. S. L., Vijayendra, S. V. N., & Raj, B. (2009). Production and characterization of bacterial polyhydroxyalkanoate copolymers and evaluation of their blends by fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. *Indian Journal of Microbiology*, *49*(3), 251–258.  
<https://doi.org/10.1007/s12088-009-0031-z>

Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, *145*(1–2), 83–96.

Shockman, G. D., & Barren, J. F. (1983). Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *37*(1), 501–527.

Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, *18*(22), 225103.

- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). Pseudomonas genomes: Diverse and adaptable. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(4), 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Song, H. Y., Ko, K. K., Oh, L. H., & Lee, B. T. (2006). Fabrication of silver nanoparticles and their antimicrobial mechanisms. *Eur Cells Mater*, 11(Suppl 1), 58.
- Spiers, A. J., Buckling, A., & Rainey, P. B. (2000). The causes of Pseudomonas diversity. *Microbiology*, 146(10), 2345–2350. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2345>
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J., & Doudoroff, M. (1966). The aerobic pseudomonads a taxonomic study. *Microbiology*, 43(2), 159–271.
- Steinbu, A. (2005). Poly ( 3-hydroxybutyrate ) Granule-Associated Proteins : Impacts on Poly ( 3-hydroxybutyrate ) Synthesis and Degradation †. 552–560.
- Steinbüchel, A. (1991). Polyhydroxyalkanoic acids. In *Biomaterials* (pp. 123–213). Springer.
- Taguchi, K., Tsuge, T., Matsumoto, K., Nakae, S., Taguchi, S., & Doi, Y. (2001). Investigation of metabolic pathways for biopolyester production. *Riken Review*, 71–74.
- Tamber, S., & Hancock, R. E. W. (2003). *Frontiers in Bioscience* 8, s472-483, May 1, 2003] ON THE MECHANISM OF SOLUTE UPTAKE IN PSEUDOMONAS. 472–483.
- Tan, G. Y. A., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y., & Wang, J. Y. (2014). Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*, 6(3), 706–754. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>
- Tang, S., Boehme, L., Lam, H., & Zhang, Z. (2009). Pichia pastoris fermentation for phytase production using crude glycerol from biodiesel production as the sole carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 157–162.
- Teeka, J., Imai, T., Cheng, X., & Reungsang, A. (2010). Screening of PHA-Producing Bacteria Using Bio- diesel-Derived Waste Glycerol as a Sole Carbon Source. 8(4), 373–381.

- Tsuge, T., Yano, K., Imazu, S., Numata, K., Kikkawa, Y., Abe, H., & Taguchi, S. (2005). *Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate ( PHA ) Copolymer from Fructose Using Wild-Type and Laboratory-Evolved PHA Synthases*. 112–117.  
<https://doi.org/10.1002/mabi.200400152>
- Tufail, S., Munir, S., & Jamil, N. (2017). Variation analysis of bacterial polyhydroxyalkanoates production using saturated and unsaturated hydrocarbons. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 629–636.  
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.008>
- Udaondo, Z., Ramos, J., Segura, A., Krell, T., & Daddaoua, A. (2018). Regulation of carbohydrate degradation pathways in *Pseudomonas* involves a versatile set of transcriptional regulators. *Microbial Biotechnology*, 11(3), 442–454.
- Urakami, T., Araki, H., Oyanagi, H., Suzuki, K.-I., & Komagata, K. (1992). Transfer of *Pseudomonas aminovorans* (den Dooren de Jong 1926) to *Aminobacter* gen. nov. as *Aminobacter aminovorans* comb. nov. and Description of *Aminobacter aganoensis* sp. nov. and *Aminobacter niigataensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(1), 84–92.
- USO, A. Y., & LITRO, F. T. X. (n.d.). *Kit x unidad, 10 unidades, 20 unidades de medio de cultivo en tubo, listos para usar*.
- Ussery, D., Soumpasis, D. M., Brunak, S., Stærfeldt, H. H., Worning, P., & Krogh, A. (2002). Bias of purine stretches in sequenced chromosomes. *Computers & Chemistry*, 26(5), 531–541.
- Venkatesan, R., & Rajeswari, N. (2017). ZnO/PBAT nanocomposite films: Investigation on the mechanical and biological activity for food packaging. *Polymers for Advanced Technologies*, 28(1), 20–27. <https://doi.org/10.1002/pat.3847>
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437–1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- Wang, Q., & Nomura, C. T. (2010). Monitoring differences in gene expression levels and

- polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *110*(6), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.08.001>
- Wang, Zhou, X. R., Liu, Q., & Chen, G. Q. (2011). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*(5), 1497–1507. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2964-x>
- Weinel, C., Nelson, K. E., & Tümmler, B. (2002). Global features of the *Pseudomonas putida* KT2440 genome sequence. *Environmental Microbiology*, *4*(12), 809–818.
- Weinel, C., Ussery, D. W., Ohlsson, H., Sicheritz-Ponten, T., Kiewitz, C., & Tümmler, B. (2002). Comparative genomics of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Pseudomonas putida* KT2440: orthologs, codon usage, repetitive extragenic palindromic elements, and oligonucleotide motif signatures. *Genome Letters*, *1*(4), 175–187.
- Wilkinson, S. G. (1968). Studies on the cell walls of *Pseudomonas* species resistant to ethylenediaminetetra-acetic acid. *Microbiology*, *54*(2), 195–213.
- Williams, P. A., & Worsey, M. J. (1976). Ubiquity of plasmids in coding for toluene and xylene metabolism in soil bacteria: evidence for the existence of new TOL plasmids. *Journal of Bacteriology*, *125*(3), 818–828.
- Wilson, M. G., & Pandey, S. (2020). *Pseudomonas Aeruginosa*. *StatPearls [Internet]*.
- Yamamoto, S., Fujiwara, K., & Watarai, H. (2004). Surface-enhanced Raman scattering from oleate-stabilized silver colloids at a liquid/liquid interface. *Analytical Sciences*, *20*(9), 1347–1352.
- Yoshino, Y., Kitazawa, T., Kamimura, M., Tatsuno, K., Ota, Y., & Yotsuyanagi, H. (2011). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: Five case reports and a review of the literature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *17*(2), 278–282. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0114-0>
- Zewde, B., Ambaye, A., Stubbs Iii, J., & Raghavan, D. (2016). A review of stabilized silver nanoparticles—Synthesis, biological properties, characterization, and potential areas of applications. *JSM Nanotechnol. Nanomed*, *4*(1043), 1–14.

Zwaig, N., Kistler, W. S., & Lin, E. C. C. (1970). Glycerol kinase, the pacemaker for the dissimilation of glycerol in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *102*(3), 753–759.

## 13 Anexos

### 1. Pruebas bioquímicas de caracterización de cepas bacterianas

#### *a. Prueba del Citrato*

Suspender 24,2 g/l del polvo Simmons Citrato Agar en agua desionizada o destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición durante 1 o 2 minutos para disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar y solidificar en posición inclinada (Britania, 2011).

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacaes como única fuente de nitrógeno en su metabolismo, provocando una alcalinización del medio. Se cultiva el microorganismo en agar citrato de Simmons. Este medio contiene citrato de sodio y fosfato de amonio como fuentes de carbono y de nitrógeno respectivamente, y azul de bromotimol, como indicador de pH. Sólo las bacterias capaces de metabolizar el citrato podrán multiplicarse en este medio y liberarán iones amonio lo que, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte alcalinización del medio que será aparente por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul (USO & LITRO, n.d.).

#### *b. Prueba T.S.I. Agar (Triple Azúcar Hierro)*

Suspender 62,5 g/l del polvo T.S.I. en agua desionizada o destilada. Dejar reposar 5 minutos. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Distribuir en tubos, llenándolos con un volumen que ocupe hasta la tercera parte de los mismos. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Enfriar y dejar solidificar el agar en pico de flauta profundo (BRITANIA, 2021).

Este agar es usado para la diferenciación de bacilos gram negativos entéricos basado en la fermentación de carbohidratos (sacarosa, lactosa y dextrosa) y la producción de ácido

sulfhídrico. En microorganismos como el *Proteus* y *Citrobacter* que son fermentadores de la sacarosa, se puede enmascarar el indicador de sulfhídrico en el medio.

El agar TSI contiene tres azúcares: dextrosa, lactosa y sacarosa; rojo de fenol para detectar la fermentación de estos carbohidratos, y sulfato ferroso para detectar la producción de ácido sulfhídrico. La degradación o fermentación del azúcar con formación de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador Rojo de fenol que vira de anaranjado-rojizo a amarillo, o por un viraje a rojo intenso en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido por algunos gérmenes a ácido sulfhídrico, el cual reacciona con la sal férrica produciendo sulfuro de hierro de color negro.

### c. Prueba de licuefacción de gelatina

Prepare el medio mezclando 5 g/l de peptona, 3 g/l de extracto de carne y 120 g/l en agua destilada o desionizada y calentando suavemente hasta que se disuelva. Dispense de 2 a 3 ml de medio en tubos de cultivo. Esterilice en autoclave el medio a 121o C (15 psi) durante 15 minutos. Deje que el medio entubado se enfríe en posición vertical antes de usarlo. Guarde el medio preparado a una temperatura de 2 a 8o C. El medio en tubo almacenado a una temperatura de 2 a 8o C se puede utilizar hasta su fecha de caducidad. No utilice el medio en tubos si muestra signos de contaminación microbiana, decoloración, secado u otros signos de deterioro (dela Cruz & Torres, 2012).

La prueba de licuefacción de gelatina se utiliza como medio de cultivo gelatina nutritiva, en esta prueba se pretende determinar la capacidad de *Pseudomonas sp.* de producir enzimas de tipo proteolíticas (gelatinasas) que licuan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación. La hidrólisis de gelatina se detecta utilizando un medio de gelatina nutritiva (Leboffe & Pierce, 2015). Este medio contiene digerido péptico de tejido animal (peptona), extracto de carne y gelatina. La gelatina sirve tanto como agente solidificante como sustrato para la actividad gelatinasa. Cuando los tubos de gelatina nutritiva se estabinoculan con una bacteria gelatinasa positiva, las gelatinasas secretadas hidrolizarán la gelatina dando como resultado la licuefacción del medio (Leboffe & Pierce, 2015). Dado que la gelatina se digiere y ya no puede gelificarse, el medio

permanecerá líquido cuando se coloque dentro de un refrigerador o en un baño de hielo. Un medio de gelatina nutritiva inoculado con una bacteria gelatinasa negativa permanecerá sólido después del tratamiento en frío. El medio puede inocularse con bacterias aeróbicas y anaeróbicas e incubarse según corresponda.

*d. Prueba de Lisina Hierro*

Suspender 35 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar y dejar solidificar en posición inclinada (BRITANIA, 2015).

Los cultivos que producen rápidamente una lisina decarboxilasa originan una reacción alcalina (color púrpura) en todo el medio. Los organismos que no descarboxilan la lisina producen una pendiente alcalina y un fondo ácido (color amarillo). Los cultivos que producen sulfhídrico originan un ennegrecimiento intenso en el medio (USO & LITRO, n.d.).

*e. Prueba de producción de fluoresceína en Agar Pseudomonas F*

Suspender 38 g/l del polvo Agar Pseudomonas F de agua desionizada o destilada. Agregar 10 ml de glicerina. Calentar con agitación constante para homogeneizar el producto. Llevar a ebullición para que se disuelva por completo. Distribuir en tubos u otros recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Distribuirse en placas de Petri estériles (Dalynn biologicals, 2004).

El medio contiene digerido pancreático de caseína y digerido péptico de tejido animal que proporciona al organismo nitrógeno, aminoácidos, vitaminas y otros oligoelementos importantes para el crecimiento. Se añade glicerol como fuente alternativa de carbono. El sulfato de magnesio es una sal catiónica que actúa como activador de la producción de pigmentos, pero la presencia de fosfato dipotásico estimula la producción de fluoresceína al mismo tiempo que inhibe la producción de piocianina por *Pseudomonas*. La fluoresceína es



un pigmento de color amarillo verdoso que se difunde en el medio que rodea las colonias y emite fluorescencia con luz ultravioleta (254 nm) (Dalynn biologicals, 2004).

*f. Producción de Urea en Agar Christensen*

Disolver 29 g del medio Base de Agar Urea (Christensen) en 100 ml de agua destilada y esteriliza. Por otro lado, disolver por separado 15 gramos de agar (Cat. 1800 o Cat. 1802) en 900 ml de agua destilada hirviendo y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar el agar a 50 °C y añadirlo a los 100 ml de la Base de Agar Urea (Christensen) ya estéril. Mezclar bien y dispensar asépticamente en tubos estériles. Dejar que el medio se solidifique en una posición inclinada. No sobrecalentar (Condalab, 2019).

La Base de Agar Urea se utiliza en pruebas puntuales para la detección rápida de la actividad ureasa y, cuando se combina con los resultados de otras pruebas de detección rápida, es el método más común para detectar la producción de ureasa en enterobacterias. La peptona de gelatina proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. El fosfato monopotásico proporciona capacidad tamponadora. La urea es una fuente de nitrógeno para aquellos organismos que producen ureasa. El rojo fenol es el indicador de pH. El agar es el agente solidificante (Condalab, 2019).

2. Constancias

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA, UNIDAD QUERÉTARO  
OTORGA EL PRESENTE

# DIPLOMA

A:

Carmen Liliana Cruz Romero

Por su participación en el curso:

**"Análisis del tamaño y estabilidad coloidal de partículas en formulaciones industriales: Importancia y aplicaciones"**

Con una duración de 25 horas, en modalidad presencial y con evaluación.  
Que se celebró del 11 al 13 de octubre de 2021

Querétaro, Qr; a 13 de octubre de 2021

Dr. Juan Bautista Furtado Romo  
Director

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
PODER EJECUTIVO FEDERAL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIA APLICADA  
Y TECNOLOGÍA AVANZADA  
UNIDAD QUERÉTARO  
DIRECCIÓN

"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"





**Sociedad Mexicana de  
Biotecnología y Bioingeniería**



**XIX CONGRESO NACIONAL  
DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

**MODALIDAD  
VIRTUAL**

**27 SEPTIEMBRE - 1º OCTUBRE, 2021**

OTORGA LA PRESENTE

**CONSTANCIA** A:

Valeria Ramírez, Liliana Cruz, Alejandra. Álvarez, Juan de Dios Galindo, Vanessa Vallejo

Por la presentación del e-póster:

**BIOSÍNTESIS DE POLIHIDROXIALCANOATOS UTILIZANDO GLICEROL CRUDO COMO FUENTE DE CARBONO Y  
PSEUDOMONAS**

en el **XIX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,**  
27 de septiembre - 1º de octubre, 2021

  
Dr. Jaime Ortega López

**PRESIDENTE SMBB**

  
Dra. Romina Rodríguez Sanoja

**PRESIDENTA COMITÉ ORGANIZADOR**

  
Dr. Alvaro R. Lara

**PRESIDENTE COMITÉ CIENTÍFICO**