

## Producción de plásticos biodegradables a partir de bacterias de hábitats salinos aisladas de la Laguna de Ayarza

*Production of biodegradable plastics from saline habitats bacteria isolated from Laguna de Ayarza*

Ricardo Figueroa <sup>1</sup>, Osberth Morales <sup>1</sup>, Gustavo Álvarez<sup>2</sup>, María Bran <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,

<sup>2</sup>Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala

\*Autor al que se dirige la correspondencia: [mdebran@yahoo.com](mailto:mdebran@yahoo.com)

Recibido: 25 de abril 2022 / Revisión: 03 de octubre 2022 / Aceptado: 21 de octubre 2022

### Resumen

La contaminación por plásticos petroquímicos es una grave amenaza para el medio ambiente que requiere implementar alternativas como los bioplásticos para lograr un desarrollo sostenible. Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros utilizados para la producción de plásticos biodegradables y que han llamado la atención como sustitutos de los plásticos de base fósil. Sin embargo, el costo de producción de los PHA constituye una barrera para su producción industrial a gran escala. Las bacterias de hábitats salinos son microorganismos prometedores para la síntesis de PHA debido a sus características tales como altos requisitos de salinidad que previenen la contaminación microbiana, la alta presión osmótica intracelular que permite una fácil lisis celular para purificar los PHA y la capacidad para usar un amplio espectro de sustratos. La presente investigación planteó determinar las cepas nativas de bacterias halófilas y halotolerantes de la Laguna de Ayarza capaces de producir PHA, establecer la capacidad que tienen de utilizar residuos agrícolas para la producción de PHA y determinar su eficiencia. Esto se logró a través de la inoculación de las cepas productoras de PHA en medios de fermentación con pulpa de café, cáscaras de plátanos y salvado de trigo lo que permitió determinar las cepas más eficientes. Se encontró que las bacterias productoras de PHA pertenecen a las especies: *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus idriensis*, *Bacillus megaterium*, *Exiguobacterium acetylicum*, *E. aurantiacum*, *Pseudomonas cuatrocieneegasensis* y *Staphylococcus capitis* y que las cepas AP21-14, AP21-10 y AP21-03 mostraron los mejores resultados que podrían ser prometedores para la producción a nivel industrial.

Palabras clave: Biopolímeros, biprocesamiento, desechos plásticos, extremófilos, polihidroxitirato

### Abstract

Pollution by petrochemical plastics is a serious threat to the environment that requires the implementation of alternatives such as bioplastics to achieve sustainable development. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers used for the production of biodegradable plastics and have drawn attention as substitutes for fossil-based plastics. However, the cost of producing PHAs constitutes a barrier to their large-scale industrial production. Bacteria from saline environments are promising microorganisms for PHA synthesis due to their characteristics such as high salinity requirements that prevent microbial contamination, high intracellular osmotic pressure that allows easy cell lysis to purify PHAs, and the ability to use a broad spectrum of substrates. This research project aimed to determine the native strains of halophilic and halotolerant bacteria from Laguna de Ayarza capable of producing PHA, establish their ability to use agricultural residues for the production of PHA, and determine their efficiency. This was achieved through the inoculation of the PHA-producing strains in fermentation media with coffee pulp, banana peels and wheat bran, which allowed determining the most efficient strains. It was found that the PHA-producing bacteria belong to the species: *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus idriensis*, *Bacillus megaterium*, *Exiguobacterium acetylicum*, *E. aurantiacum*, *Pseudomonas cuatrocieneegasensis* and *Staphylococcus capitis* and that the strains AP21-14, AP21-10 and AP21-03 showed the best results that could be promising for production at an industrial level.

Keywords: Biopolymers, biprocessing, plastic waste, extremophiles, polyhydroxybutyrate



## Introducción

Los productos plásticos son ampliamente utilizados en nuestra vida diaria, su uso en textiles, electrodomésticos, productos para el cuidado de la salud, juguetes y en materiales de empaque es inevitable (Thakur et al., 2018; Wang et al., 2016). Desde 1940, los plásticos sintéticos o petroquímicos han revolucionado a la sociedad, debido a sus propiedades como la fuerza mecánica, su ligereza, flexibilidad y durabilidad, además de ser un material de bajo costo y con la capacidad de reemplazar productos hechos de otros materiales como el papel, el vidrio y los metales (Hottle et al., 2013). En el 2015 a nivel mundial la producción de plástico se incrementó a 300 millones de toneladas (Mellinas et al., 2016) y de acuerdo a Mekonnen y colaboradores (2013) al menos 34 millones de toneladas de desechos plásticos son generados por año, de los cuales el 93% llega a los océanos y vertederos.

Los PHA son una clase de poliésteres de origen natural que podrían sustituir a los plásticos convencionales debido a sus propiedades fisicoquímicas. Estos son acumulados por una variedad de microorganismos intracelularmente en forma de gránulos y almacenados en respuesta a un estrés ambiental o limitación de nutrientes como reserva de carbono y energía (Lee et al., 1999). Bajo condiciones limitantes de una fuente de carbono, se ha informado que los PHA se degradan por las despolimerasas intracelulares y posteriormente se metabolizan para la producción de energía (Jain & Tiwari, 2014). El poli-3-hidroxi-butarato (PHB) y sus copolímeros con 3-hidroxi-valerato (3HV) conocido como poli-(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV), han sido documentados como los representantes más conocidos de la familia de los PHA (Khanna & Srivastava, 2005).

A pesar de sus ventajas los PHA producidos a partir de fuentes de carbono estándar tienen ciertas limitaciones como el alto costo de producción. En este sentido los residuos agrícolas representan una fuente de carbono renovable y poco utilizada que debería considerarse como materia prima para otros procesos industriales en lugar de ser desechos (Sadh et al., 2018). Los microorganismos de ecosistemas salinos han sido estudiados en los últimos años para la producción de PHA. Estos representan un grupo de microorganismos distintivo y diverso que tiene la habilidad de sobrevivir en hábitats hipersalinos como lagos, salinas, marismas y suelos salinos. Las bacterias halófilas son una potencial fuente de biosurfactantes, carotenoides, bacteriodopsinas y la mayoría tiene la capacidad de acumular

gránulos de PHA intracelulares (Edbeib et al., 2016). Su capacidad para desarrollarse en condiciones con alta salinidad disminuye los requerimientos de esterilidad y problemas de contaminación durante la fermentación y por lo tanto disminuye los costos de producción, por lo que han sido consideradas como prometedoras y rentables para la producción de PHA (Mitra et al., 2020).

En esta investigación se planteó establecer el potencial de las cepas nativas de bacterias del lago salado Laguna de Ayarza para la producción de PHA, determinar la capacidad que tienen de utilizar pulpa de café, cáscaras de plátanos y salvado de trigo para la producción de PHA y determinar el rendimiento de producción de polihidroxi-alcanoatos de las bacterias de hábitats salinos, a través de la fermentación en medios suplementados con residuos agrícolas. La importancia de esta investigación radicó en encontrar cepas de bacterias halotolerantes y halófilas productoras de bioplásticos que hagan más efectiva la producción de PHA y sean de interés para la producción industrial a gran escala, como una alternativa en la elaboración de productos que actualmente son a base de plásticos petroquímicos, además también agregó valor a la preservación de la Laguna de Ayarza como fuente de cepas con potencial biotecnológico.

## Materiales y Métodos

### Muestreo, aislamiento y mantenimiento de las cepas

Para el aislamiento de las bacterias halófilas productoras de PHA se recolectaron aleatoriamente 30 muestras de agua en la Laguna de Ayarza, Departamento de Santa Rosa, Guatemala ubicada a 14°24'23.0" Norte y 90°07'01.6" Oeste. Las muestras de agua fueron de 200 mL y se recolectaron en frascos de vidrio estériles de boca ancha a una profundidad de aproximadamente 20 cm de la superficie. Después de tomar las muestras, estas fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio del Departamento Microbiología del Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Posteriormente 1 mL de cada muestra fue enriquecido agregándolo a 10 mL de medio EGM (1% p/v de glucosa, 0.5% p/v de extracto de levadura y 25% v/v de agua del lago) e incubado a 30 °C por 48 h. Se seleccionaron las muestras que evidenciaron desarrollo microbiano, a partir de las cuales se prepararon diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  y se inocu-

laron 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución en cajas de Petri con agar EGM (1% p/v de glucosa, 0.5% p/v de extracto de levadura y 25% v/v de agua del lago). Las cajas de Petri fueron incubadas a 25° por 72 h y se analizaron para cuantificar el total de colonias. Posteriormente las colonias fueron resembradas hasta lograr su purificación, luego se almacenaron en tubos con agar EGM a 4 °C (Fuentes et al., 2013).

### Tamizaje de las cepas productoras de PHA

La habilidad de las cepas halófilas aisladas para producir PHA fue evaluada utilizando medio EGM modificado compuesto por 1% p/v de glucosa como sustrato, 0.25% p/v de extracto de levadura y 25% v/v de agua del lago, la modificación fue para crear condiciones limitantes de nitrógeno (Gunaratne et al., 2004).

### Tinción con Negro de Sudan

La tinción de Negro de Sudan se llevó a cabo a partir de cultivos de 48 h de crecimiento en agar EGM. El colorante al 1% fue filtrado antes de utilizarlo. Las cepas fueron fijadas por calor en portaobjetos y teñidas durante 10 min, luego fueron aclaradas con Xilol para eliminar el exceso de colorante. Las muestras fueron observadas al microscopio en búsqueda de gránulos negros o grisáceos intracelulares los cuales son indicativos de la producción de PHA, la cantidad de gránulos fue reportada cualitativamente en cruces. Las cepas que produjeron la mayor cantidad de gránulos fueron utilizadas en los pasos posteriores (Koller et al., 2017).

### Determinación de la capacidad de producir polihidroxicanoatos en medio EGM

Las cepas de bacterias halófilas seleccionadas se cultivaron en 10 mL de medio EGM modificado a 30 °C hasta que alcanzaron una concentración de 0.5 del estándar de McFarland. Posteriormente 5 mL del cultivo anterior se inoculó en 45 mL de caldo EGM y se incubó a 30 °C con agitación constante a 150 rpm hasta que se alcanzó una concentración de 9 del estándar de McFarland. Una vez alcanzada dicha concentración, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. El sedimento se lavó dos veces con agua desmineralizada y se deshidrató en horno a 45 °C hasta alcanzar peso constante. Para la cuantificación de los PHA, se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio al 5% por 2 h a los tubos con la biomasa deshidratada, posteriormente se

agregó 1 mL de cloroformo por 20 min para separar la biomasa del polímero. Luego los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min y se obtuvieron dos fases, la superior corresponde al hipoclorito de sodio con restos celulares y la inferior a la de cloroformo con los PHA. Con una pipeta Pasteur se extrajo la fase inferior de cloroformo y se depositó en otro tubo de ensayo el cual se colocó en un horno a 40 °C por 24 h para la evaporación del cloroformo (Guzmán et al., 2017).

### Verificación del polímero y rendimiento a través del coeficiente de rendimiento

Una vez evaporado el cloroformo de los tubos, el polímero obtenido se pesó y se verificó su naturaleza, para ello se digirió el sedimento con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado durante 30 min a 90 °C en baño maría. Luego se dejó enfriar y se realizó un barrido con espectrofotómetro en un rango de 220 a 250 nm, el polímero se identificó como PHA cuando se observó un pico máximo de absorbancia a 235 nm. Finalmente, con los pesos de la biomasa celular y de los PHA se calculó el coeficiente de rendimiento del producto con relación a la biomasa o cantidad de PHA obtenido por biomasa formada, con la siguiente ecuación (Guzman et al., 2017):

$$\text{Coeficiente}(Y) = \frac{\text{MasadelosPHA}}{\text{Biomasacelular}} \quad (1)$$

### Determinación de la capacidad de producir polihidroxicanoatos en medio a partir de residuos agrícolas

Para la preparación del medio de fermentación, los residuos agrícolas pulpa de café, cascara de plátano y salvado de trigo se deshidrataron por 72 h a temperatura ambiente y se molieron en fracciones de entre 0.5 a 2 mm. A partir de los residuos agrícolas molidos se prepararon 3 medios de fermentación EGM modificados, cada uno 6 g/L de un residuo agrícola distinto, 0.25% p/v de extracto de levadura y 25% v/v de agua del lago. Una vez preparados los medios de fermentación, las cepas seleccionadas se cultivaron en 10 mL de cada uno de los medios EGM modificados a 30 °C hasta que alcanzaron una concentración de 0.5 del estándar de McFarland. Posteriormente 5 mL del cultivo se inoculó en 45 mL de cada uno de los medios EGM modificados y se incubó a 30 °C con agitación constante a 150 rpm hasta alcanzar una concentración de 9 del estándar de McFarland. Una vez alcanzada

dicha concentración, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. El sedimento se lavó dos veces con agua desmineralizada y se deshidrató en horno a 45 °C hasta alcanzar peso constante. Para la purificación de los PHA, se agregó 1 mL de hipoclorito de sodio al 5% por 2 h a los tubos con la biomasa deshidratada, luego se agregó 1 mL de cloroformo por 20 min para separar la biomasa del polímero. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min y se obtuvieron dos fases, la inferior corresponde a la de cloroformo con los PHA. Finalmente, con una pipeta Pasteur se extrajo el cloroformo de la fase inferior y se depositó en otro tubo de ensayo y el cual se colocó en un horno a 40 °C por 24 h para la evaporación del cloroformo. Posteriormente se verificó el polímero y se obtuvo el coeficiente de rendimiento para cada cepa bacteriana (Koller et al., 2017).

### Identificación de las cepas

La identificación se realizó de acuerdo al microorganismo, a través de características macroscópicas, pruebas bioquímicas, espectrometría de masas y microscopía. Para las características macroscópicas, dependiendo del microorganismo se utilizó agar nutritivo, agar sangre, manitol sal y agar MacConkey. Para las pruebas bioquímicas se utilizó catalasa, oxidasa, ureasa, producción de indol, prueba de rojo de metilo, reacción de Voges-Proskauer, utilización del citrato e hidrólisis del almidón (Holland et al., 1996; Muhammadi et al., 2015).

### Procesamiento y análisis de la información

Se realizó un análisis exploratorio de los resultados obtenidos. Para los datos obtenidos en la producción de PHA a partir de glucosa y a partir de los residuos agrícolas se llevó a cabo una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para evidenciar diferencias entre los coeficientes de rendimiento se realizó un análisis de varianza (anova) y una posterior prueba de comparación de medias de Tukey, con el .05 de significancia. Los resultados fueron procesados en Excel 2013 y el programa R (Du et al., 2012).

## Resultados

Se logró aislar 35 cepas de bacterias a partir de las muestras de agua recolectadas en la Laguna de Ayarza, Santa Rosa, Guatemala (Tabla 1). Los granulos de polihidroxialcanoatos fueron inicialmente observados con microscopía de luz y de contraste de fases. De las 35 cepas aisladas se determinó que 10 resultaron positivas para la producción de polihidroxialcanoatos en medio EGM y medios con pulpa de café, cascara de plátano y salvado de trigo (Tabla 2). Entre las bacterias productoras de PHA se encontraron las siguientes especies: *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus idriensis*, *Bacillus megaterium*, *Exiguobacterium acetylicum*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Pseudomonas cuatrocieneegasensis* y *Staphylococcus capitis*.

Se observó que las mayores concentraciones del polímero en medio EGM fueron producidas por la cepa AP21-14 (*Alcaligenes faecalis*), AP21-10 (*Alcaligenes faecalis*) y AP21-03 (*Staphylococcus capitis*). De las cepas que mostraron mayor rendimiento en la producción de polihidroxialcanoatos no se encontró diferencia entre la AP21-14 y la AP21-10 que produjeron en promedio 1.21 g/L del polímero. Asimismo, al evaluar las cepas en medio enriquecido con pulpa de café, se encontró que las mayores concentraciones fueron producidas por las cepas AP21-03, AP21-10 y AP21-16 (*Pseudomonas cuatrocieneegasensis*), de estas la cepa AP21-03 y AP21-10 no mostraron diferencia significativa y reportaron un promedio de 0.88 g/L de PHA.

Al evaluar las cepas en medio enriquecido con cascara de plátano se observó que las que produjeron mayor concentración del polímero fueron la AP21-03, AP21-14 (*Alcaligenes faecalis*) y AP21-10. No se encontró diferencia entre las cepas AP21-10 y AP21-14 que produjeron 0.85 g/L del polímero. Además, al desarrollar las cepas en medio enriquecido con salvado de trigo, se encontró que las cepas que produjeron mayor concentración del PHA fueron la AP21-10, AP21-03 y AP21-16, de estas no se encontró diferencia significativa entre la AP21-10 y AP21-03 que produjeron 1.03 g/L del polímero.

**Tabla 1***Identificación de cepas por espectrometría de masas*

Cepa	Código	Identificación
Cepa 1	AP21-01	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Cepa 2	AP21-02	Bacilos gram positivo
Cepa 3	AP21-03	<i>Staphylococcus capitis</i>
Cepa 4	AP21-04	<i>Bacillus megaterium</i>
Cepa 5	AP21-05	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>
Cepa 6	AP21-06	Bacilos gram negativo
Cepa 7	AP21-07	<i>Bacillus idriensis</i>
Cepa 8	AP21-08	Cocos gram positivo
Cepa 9	AP21-09	Bacilos gram negativo
Cepa 10	AP21-10	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Cepa 11	AP21-11	Bacilos gram positivo
Cepa 12	AP21-12	Bacilos gram negativo
Cepa 13	AP21-13	Bacilos gram positivo
Cepa 14	AP21-14	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Cepa 15	AP21-15	Bacilos gram positivo
Cepa 16	AP21-16	<i>Pseudomonas cuatrocieneegasensis</i>
Cepa 17	AP21-17	Bacilos gram negativo
Cepa 18	AP21-18	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>
Cepa 19	AP21-19	<i>Pseudomonas cuatrocieneegasensis</i>
Cepa 20	AP21-20	Cocos gram positivo
Cepa 21	AP21-21	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>
Cepa 22	AP21-22	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>
Cepa 23	AP21-23	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Cepa 24	AP21-24	Bacilos gram positivo
Cepa 25	AP21-25	Bacilos gram negativo
Cepa 26	AP21-26	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Cepa 27	AP21-27	Bacilos gram negativo
Cepa 28	AP21-28	Bacilos gram positivo
Cepa 29	AP21-29	Bacilos gram positivo
Cepa 30	AP21-30	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Cepa 31	AP21-31	Bacilos gram positivo
Cepa 32	AP21-32	Cocos gram positivo
Cepa 33	AP21-33	Cocos gram positivo
Cepa 34	AP21-34	Cocos gram positivo
Cepa 35	AP21-35	Bacilos gram positivo

**Tabla 2**

*Promedios de producción de polihidroxialcanoatos por cepas aisladas de la Laguna de Ayarza, Santa Rosa, Guatemala en diferentes medios de cultivo*

Cepa	Código	Producción de PHA en medio EGM	Producción de PHA en medio con pulpa de café (g/L) <sup>1</sup>	Producción de PHA en medio con cascara de plátanos (g/L) <sup>1</sup>	Producción de PHA en medio con salvado de trigo (g/L) <sup>1</sup>
Cepa 1	AP21-01	0.90 (0.15) a	0.70 (0.17) a	0.72 (0.19) a	0.82 (0.15) a
Cepa 2	AP21-02	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 3	AP21-03	1.02 (0.23) b	0.93 (0.23) b	0.90 (0.22) b	1.02 (0.19) b
Cepa 4	AP21-04	0.65 (0.17) c	0.64 (0.26) a	0.19 (0.15) c	0.54 (0.19) c
Cepa 5	AP21-05	0.79 (0.19) d	0.76 (0.17) c	0.72 (0.10) a	0.56 (0.24) c
Cepa 6	AP21-06	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 7	AP21-07	0.70 (0.22) e	0.62 (0.17) a	0.30 (0.18) d	0.67 (0.19) c
Cepa 8	AP21-08	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 9	AP21-09	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 10	AP21-10	1.20 (0.19) b	0.92 (0.22) b	0.88 (0.18) b	1.07 (0.19) b
Cepa 11	AP21-11	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 12	AP21-12	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 13	AP21-13	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 14	AP21-14	1.22 (0.21) b	0.69 (0.15) f	0.85 (0.17) be	0.89 (0.17) d
Cepa 15	AP21-15	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 16	AP21-16	1.00 (0.23) f	0.92 (0.16) b	0.78 (0.29) a	0.87 (0.16) e
Cepa 17	AP21-17	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 18	AP21-18	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 19	AP21-19	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 20	AP21-20	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 21	AP21-21	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 22	AP21-22	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 23	AP21-23	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 24	AP21-24	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 25	AP21-25	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 26	AP21-26	0.99 (0.25) a	0.77 (0.20) b	0.53 (0.16) f	0.66 (0.20) c
Cepa 27	AP21-27	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 28	AP21-28	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 29	AP21-29	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 30	AP21-30	0.88 (0.14) g	0.39 (0.21) g	0.51 (0.16) g	0.50 (0.20) c
Cepa 31	AP21-31	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 32	AP21-32	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 33	AP21-33	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 34	AP21-34	0.00	0.00	0.00	0.00
Cepa 35	AP21-35	0.00	0.00	0.00	0.00

*Nota.* <sup>1</sup>Gramos por litro de polihidroxialcanoato. <sup>a, b, c, d, e, f, g.</sup> Letras distintas indican diferencia significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ( $p = .05$ ).

## Discusión

Se aislaron 35 cepas microbianas en la Laguna de Ayarza, de las cuales 10 resultaron positivas para la producción de polihidroxialcanoatos al desarrollarse en Medio EGM, pulpa de café, cáscara de plátano y salvado de trigo (Tabla 2). Entre las especies encontradas está *A. faecalis*, *B. idriensis*, *B. megaterium*, *E. acetylicum*, *E. aurantiacum*, *P. cuatrocieneegasensis* y *S. capititis*. Además, se encontró que las cepas AP21-10, AP21-14 y AP21-03 produjeron las mayores concentraciones del polímero, en los cuatro medios probados (EGM y enriquecidos con pulpa de café, cáscara de plátano y salvado de trigo) con una media de 1.00 (0.16) g/L, 0.88 (0.41) g/L y 0.98 (0.12) g/L respectivamente.

Se ha reportado que los PHA producidos por microorganismos que habitan en ecosistemas con altas concentraciones de sales se dan bajo condiciones de exceso de carbono y limitantes de nitrógeno (Obruca et al., 2020). En este sentido en algunos estudios donde se ha utilizado medio EGM como sustrato se han reportado rendimientos promedio de 0.8 g/L de polihidroxialcanoatos con *Halomonas nitroreducens* (Cervantes-Uc et al., 2014) estos resultados son similares a los producidos por la cepa AP21-14 correspondiente a *A. faecalis* que al desarrollarse en Medio EGM y enriquecido con pulpa de café, cáscara de plátano y salvado de trigo, mostró una producción de 0.88 g/L en promedio. Por otra parte, durante este estudio también se encontraron cinco cepas de *A. faecalis* capaces de producir PHA (identificadas con los códigos AP21-01, AP21-10, AP21-14, AP21-26 y AP21-30) las cuales evidenciaron los mayores valores medios de producción por litro de sustrato. Diversas especies de *Alcaligenes* han sido reportadas por otros autores como productoras de PHA principalmente poli(3-hidroxi butirato) (PHB) y poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBV); se ha reportado que su diversidad metabólica, capacidad de utilizar compuestos aromáticos y metales pesados, así como su capacidad para eliminar productos tóxicos, ha vuelto de interés a este género para la producción de PHA (Yajima et al., 2020).

En otras investigaciones también se ha reportado a *Staphylococcus* como un género capaz de adaptarse a distintas condiciones ambientales por su amplio potencial para producir diversas enzimas para aprovechar los nutrientes del medio y competir con otros microorganismos e incluso evadir las defensas naturales de animales y seres humanos (Seo & Bohach, 2014). El

género *Staphylococcus* ha sido utilizado también para la producción de PHA a partir de medios sintéticos y también de productos agrícolas y residuos industriales como las semillas de sésamo, melaza, cáscaras de plátano, papa, mango, efluentes textiles, aceites residuales y polvo de proteína y se han reportado producciones promedio de hasta 1.71 g/L de distintos PHA (Joyline & Aruna, 2019). En este estudio se encontró que la cepa AP21-03 correspondiente a *S. capititis* presentó un rendimiento promedio de 1.12 g/L en medio EGM, 0.84 g/L en medio enriquecido con pulpa de café, 0.93 g/L en medio con cáscara de plátano y 1.02 g/L en medio con salvado de trigo, lo cual es similar al rendimiento que presentan otras cepas de *Staphylococcus* en otros desechos agroindustriales (Joyline & Aruna, 2019). Asimismo, *Staphylococcus* ha sido considerado un microorganismo de interés para la producción de PHA ya que tiene un amplio potencial de adaptación a distintos sustratos y también por su tolerancia a elevadas concentraciones de sal lo que lo hacen apto para reducir los costos de producción de polímeros biodegradables. Aunque *S. capititis* no había sido reportado para la producción de polihidroxialcanoatos, se ha encontrado que *S. epidermidis*, *S. aureus* y otras especies han logrado producir PHB, PHBV y P4HB (Reddy & Mohan, 2012).

Por otra parte, aunque la cepas de *B. megaterium* y *B. idriensis* encontradas mostraron los menores rendimientos de producción de PHA en medio EGM y enriquecidos con pulpa de café, cáscara de plátano y salvado de trigo (0.54 g/L y 0.53 g/L respectivamente), esto puede ser el resultado de los sustratos utilizados, no obstante, algunas especies de *Bacillus* han sido ampliamente aplicadas por su potencial para producir polímeros de PHA con propiedades específicas, por ejemplo: en un estudio se reportó que la cepa BPPI-14 y BPPI-19 de *Bacillus* sp. produjeron ácido hidroxibutírico (4HB) y poli-(3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato), los cuales presentan propiedades fisicoquímicas similares a las del polipropileno (Mohammed et al., 2019). En esta investigación se utilizó medio EGM y medios enriquecidos con pulpa de café, cáscara de plátano y salvado de trigo como fuente de carbono lo que pudo limitar la síntesis de PHA. Además, otras investigaciones han reportado la producción de PHB cuando se ha utilizado glucosa como única fuente de carbono y también se ha evidenciado la producción de otros PHA como el PHVB y P4HV (Katircioğlu et al., 2003). Otras investigaciones también han reportado que se pueden obtener diversos tipos de polihidroxialcanoatos dependiendo la fuente

de carbono en la que es cultivado *B. cereus*, entre estos se ha reportado el PHV, PHBHV. Por lo tanto, aunque las condiciones limitantes de nitrógeno y el exceso de carbono son las principales variables a considerar para la producción de PHA, las condiciones de cultivo y los sustratos también tienen un efecto directo con relación al tipo de polímero producido (Rathika et al., 2018).

Respecto al género *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomonas cuatrocieneegasensis* pocos estudios los han reportado para la síntesis de polihidro-xialcanoatos, Kanekar y colaboradores (2008) aislaron a *E. aurantiacum* del lago salado Lonar de la India y la reportaron como productora de PHA, sin embargo, no indicaron el rendimiento de producción el cual para la presente investigación fue de 0.70 g/L (Tabla 2) en promedio en los sustratos utilizados reportados anteriormente. Asimismo, Dong-Heon y colaboradores (2010) lograron aislar a *P. cuatrocieneegasensis* a partir de aguas contaminadas con un derrame de petróleo en Taean, Corea. Dichos autores encontraron que *P. cuatrocieneegasensis* es capaz de producir PHA al utilizar medios sintéticos con glucosa como fuente de carbono con rendimientos de hasta 1.10 g/L los cuales son similares a los encontrados en la presente investigación.

Las especies de bacterias aisladas en esta investigación podrían ser aplicadas a nivel industrial por su capacidad para producir polihidro-xialcanoatos a partir de residuos agrícolas y como alternativa a la utilización de plásticos petroquímicos. Los valores de rendimiento obtenidos con pulpa de café, cascará de plátano y salvado de trigo, también son prometedores y comparables a otros reportados en la literatura. Sin embargo, para aumentar la producción de PHA, aún hacen falta estudios que permitan evaluar otros residuos agrícolas como fuente de carbono.

### Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala por el cofinanciamiento del presente estudio (DIGI AP21-2021), a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y a la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala por el apoyo y aval otorgado, a la empresa LABYMED por el apoyo brindado para la identificación por espectrometría de masas de las bacterias aisladas y al Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios.

### Contribución de los autores

Coordinación, elaboración y revisión del Documento: todos los autores  
 Diseño de la recolección de datos o del trabajo en campo: todos los autores  
 Recolección o contribución de datos o realización del trabajo de campo: todos los autores  
 Limpieza, sistematización, análisis o visualización de datos: todos los autores  
 Participación en análisis de datos, estructura y en la escritura del documento: todos los autores.

### Materiales suplementarios

Este artículo no tiene archivos complementarios.

### Referencias

- Cervantes-Uc, J. M., Catzin, J., Vargas, I., Herrera-Kao, W., Moguel, F., Ramirez, E., Rincón-Arriaga, S., & Lizama-Uc, G. (2014). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, *Halomonas nitroreducens*, isolated from hypersaline ponds. *Journal of Applied Microbiology*, *117*(4), 1056-1065. <https://doi.org/10.1111/jam.12605>
- Dong-Heon, L., Suan-Ran, M., Young-Hyun, P., Jung-H, K., Hoon, K., Parales, R., & Hyung-Yeel, K. (2010). *Pseudomonas taeanensis* sp. nov., isolated from a crude oil-contaminated seashore. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(12), 175-182. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018093-0>
- Du, C., Sabirova, J., Soetaert, W., & Ki Carol Lin, S. (2012). Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Current chemical biology*, *6*(1), 14-25. <https://doi.org/10.2174/187231312799984394>
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: Biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(8), Artículo 135. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2081-9>



- Fuentes, Á., Carreño, C., & Llanos, C. (2013). Rendimiento de exopolisacáridos emulgentes producidos por bacterias halófilas nativas en tres concentraciones de melaza de *Saccharum officinarum* L. "caña de azúcar". *Scientia Agropecuaria*, 4(2), 111-120. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2013.02.04>
- Gunaratne, L. M. W. K., Shanks, R. A., & Amarasinghe, G. (2004). Thermal history effects on crystallisation and melting of poly (3-hydroxybutyrate). *Thermochimica Acta*, 423(1-2), 127-135. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2004.05.003>
- Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., & Casos, I. (2017). Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. *Scientia Agropecuaria*, 8(2), 109-118. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03>
- Holland, R. D., Wilkes, J. G., Rafii, F., Sutherland, J. B., Persons, C. C., Voorhees, K. J., & Lay Jr, J. O. (1996). Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 10(10), 1227-1232. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19960731\)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19960731)10:10<1227::AID-RCM659>3.0.CO;2-6)
- Hottle, T. A., Bilec, M. M., & Landis, A. E. (2013). Sustainability assessments of bio-based polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 98(9), 1898-1907. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdegstab.2013.06.016>
- Jain, R., & Tiwari, A. (2014). Homology modelling of PHA synthases in *Cupriavidus necator*. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*, 3(3), 214-223.
- Joyline, M., & Aruna, K. (2019). Production and characterization of polyhydroxyalkanoates (pha) by *Bacillus megaterium* strain jha using inexpensive agro-industrial wastes. *International Journal of Recent Scientific Research*, 10(7), 33359-33374.
- Kanekar, P. P., Joshi, A. A., Kelkar, A. S., Borgave, S. B., & Sarnaik, S. S. (2008). Alkaline Lonar lake, India - a treasure of alkaliphilic and halophilic bacteria. En M. Sengupta & R. Dalwani(Eds.), *The 12th World Lake Conference* (pp. 1765-1774).
- Katircioğlu, H., Aslim, B., Yüsekdao, Z. N., Mercan, N., & Beyatli, Y. (2003). Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative *Bacillus mutant* strains by SDS-PAGE of total cell protein. *African Journal of Biotechnology*, 2(6), 147-149. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1029>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607-619. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053>
- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M. M., & Brauneegg, G. (2017). Producing Microbial Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters in a Sustainable Manner. *New Biotechnology*, 37(Part A), 24-38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
- Lee, S. Y., Choi, J.-I., Han, K., & Song, J. Y. (1999). Removal of endotoxin during purification of poly (3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2762-2764. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.6.2762-2764.1999>
- Mekonnen, T., Mussone, P., Khalil, H., & Bressler, D. (2013). Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(43), 13379-13398. <https://doi.org/10.1039/C3TA12555F>
- Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Garrigos, M. del C., & Jiménez, A. (2016). Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2). <https://doi.org/10.1002/app.42631>
- Mitra, R., Xu, T., Xiang, H., & Han, J. (2020). Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories*, 19, Artículo 86. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01342-z>
- Mohammed, S., Panda, A. N., & Ray, L. (2019). An investigation for recovery of polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Bacillus* sp. BPPI-14 and *Bacillus* sp. BPPI-19 isolated from plastic waste landfill. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 1085-1096. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.155>

- Muhammadi, S., Afzal, M., & Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 8(3-4), 56-77. <https://doi.org/10.1080/17518253.2015.1109715>
- Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., Sedrlova, Z., & Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4795-4810. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1>
- Rathika, R., Janaki, V., Shanthi, K., & Kamala-Kannan, S. (2018). Bioconversion of agro-industrial effluents for polyhydroxyalkanoates production using *Bacillus subtilis* RS1. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(10), 5725-5734. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2155-3>
- Reddy, M. V., & Mohan, S. V. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. *Bioresour Technol*, 114, 573-582. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.127>
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5, Artículo 1. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>
- Seo, K. S., & Bohach, G. A. (2014). Staphylococcus aureus. En M. P. Doyle, F. Diez-Gonzalez & C. Hill (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and frontiers* (4<sup>th</sup> ed., pp. 547-573). <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch21>
- Thakur, S., Chaudhary, J., Sharma, B., Verma, A., Tamulevicius, S., & Thakur, V. (2018). Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 13, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.04.013>
- Wang, Y., Sun, Z., Tian, J., Wang, H., Wang, H., & Ji, Y. (2016). Influence of Environment on Ageing Behaviour of the Polyurethane Film. *Materials Science*, 22(2), 1392-1320. <https://doi.org/10.5755/j01.ms.22.2.12935>
- Yajima, T., Nagatomo, M., Wakabayashi, A., Sato, M., Taguchi, S., & Maeda, M. (2020). Bioconversion of biphenyl to a polyhydroxyalkanoate copolymer by *Alcaligenes denitrificans* A41. *AMB Express*, 10, Artículo 155. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01093-5>