

Optimización de la biosíntesis de polihidroxialcanoatos por bacterias nativas de Guatemala utilizando suero lácteo como sustrato

Optimization of the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates by native Guatemalan bacteria using whey as a substrate

Ricardo Figueroa¹, Osberth Morales¹, Gustavo Álvarez², María del Carmen Bran ^{1*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,

²Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala

*Autor al que se dirige la correspondencia: mdcbran@yahoo.com

Recibido: 24 de junio 2023 / Revisión: 24 de octubre 2023 / Aceptado: 13 de mayo 2024

Resumen

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son polímeros biodegradables que podrían sustituir a los plásticos producidos a base de petróleo debido a sus propiedades, como la biodegradabilidad, biocompatibilidad, inocuidad y termoplaticidad. A pesar de sus beneficios, la utilización a gran escala de los PHA se ve limitada por deficiencias en los procesos de producción, especialmente en cuanto a los costos asociados con las materias primas. Se ha estimado que mejoras en el proceso de producción de PHA a través de la utilización de residuos de desecho como el suero lácteo o los desechos agroindustriales, pueden reducir significativamente el costo de producción, hasta en un 50%. En esta investigación, se propuso evaluar el potencial biotecnológico de bacterias nativas para la producción de PHA, utilizando el suero lácteo como sustrato. Se empleó la metodología de cloroformo-hipoclorito para la extracción de los biopolímeros, y la cantidad de PHA fue determinada por espectrofotometría. Se encontró que de las 40 cepas evaluadas, 28 fueron capaces de utilizar el suero lácteo como sustrato. Además, se determinó que las mejores condiciones de fermentación fueron una temperatura de 37 °C y un pH de 7 a 150 RPM. Las condiciones de fermentación probadas en esta investigación podrían ser aplicadas a escala superior para la producción de PHA, principalmente por la similitud de rendimiento de producción del biopolímero que se obtiene respecto a medios químicamente definidos y la reducción de costos que aportaría la utilización de subproductos de la industria láctea.

Palabras clave: Biopolímeros, plásticos biodegradables, reutilización de desechos

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biodegradable polymers that could replace petroleum-based plastics due to their properties, such as biodegradability, biocompatibility, safety, and thermoplasticity. Despite their benefits, the large-scale utilization of PHA is limited by deficiencies in the production processes, especially regarding the costs associated with raw materials. It has been estimated that improvements in PHA production process through the utilization of waste residues such as whey or agro-industrial waste can significantly reduce production costs by up to 50%. In this research, the biotechnological potential of native bacteria for PHA production using whey as a substrate was evaluated. The chloroform-hypochlorite methodology was employed for biopolymer extraction, and the amount of PHA was determined by spectrophotometry. It was found that out of the 40 evaluated strains, 28 were capable of utilizing whey as a substrate. Additionally, it was determined that the optimal fermentation conditions were a temperature of 37 °C, pH of 7, and 150 RPM. The fermentation conditions tested in this research could be applied on a larger scale for PHA production, primarily due to the similarity in biopolymer production yield obtained compared to chemically defined media and the cost reduction that the utilization of dairy industry by-products would provide.

Keywords: Biopolymers, biodegradable plastics, waste reuse



Introducción

Gran parte de los plásticos producidos a partir de derivados del petróleo no son biodegradables y generan serios problemas ambientales, tales como la acumulación de millones de toneladas en el medio ambiente y la liberación de sustancias tóxicas cuando son incinerados o expuestos a temperaturas elevadas (Masood et al., 2015). También, los desechos plásticos que llegan a los ecosistemas marinos se disgregan en pequeñas partículas conocidas como microplásticos y causan impacto negativo en la vida marina y en consecuencia también en el ser humano. Estos hechos han estimulado la búsqueda y producción de polímeros biodegradables menos nocivos que permitan reducir el impacto tanto ecológico como ambiental (Zhang et al., 2020).

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son uno de los polímeros biodegradables que tienen el potencial de reemplazar a los plásticos producidos a base de petróleo. Esto se debe a sus múltiples propiedades, como la biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad y termoplaticidad, las cuales los hacen adecuados para diversas aplicaciones, como la producción de envases o materiales para la industria farmacéutica y alimenticia. Sin embargo, a pesar de sus beneficios, la utilización a gran escala se encuentra limitada por deficiencias en los procesos de producción, como los costos asociados con las materias primas, el bajo rendimiento en la generación del polímero y la falta de microorganismos que se adapten a condiciones específicas de fermentación y estén fácilmente disponibles para el sector productivo (Pagliano et al., 2021).

En este sentido, algunos procesos biotecnológicos basados en microorganismos no han sido lo suficientemente competitivos debido a su alta demanda de energía durante los procesos de esterilización, su gran consumo de agua dulce y la predominancia de diseños de fermentación por lotes en lugar de continuos. Además, la producción a gran escala de productos biotecnológicos industriales a menudo implica el uso considerable de recursos agrícolas que podrían destinarse a la producción de alimentos, generando dilemas éticos (Kalia et al., 2021). Por lo tanto, es importante basar la biotecnología industrial en procesos que se centren en el ahorro de energía, la producción continua, la independencia del agua potable y la no utilización de sustratos alimentarios como materia prima. De esta manera, los avances en este tipo de tecnologías permitirían que la biotecnología coexista con las industrias

ya establecidas para suministrar materiales y combustibles a una sociedad más sostenible (Wen et al., 2012).

En este contexto y a pesar de los beneficios que los PHA podrían ofrecer como sustitutos de los plásticos convencionales, la producción a gran escala se ve limitada debido, en parte, a los costos de los sustratos y a la falta de optimización en los procesos de producción y recuperación. No obstante, en los últimos años, se han llevado a cabo estudios enfocados en reducir los costos de producción de los PHA. Se han probado diversos residuos de la industria agrícola, como la celulosa, lignocelulosa y almidones, ricos en compuestos de carbono. Además, se ha utilizado algas marinas, efluentes de la industria del biodiésel ricos en glicerol y residuos de la industria de alimentos con alto contenido de lípidos, que tienen el potencial de convertirse en biopolímeros biodegradables (Pérez et al., 2019). Estas investigaciones han buscado encontrar fuentes alternativas y sostenibles para la producción de PHA, ampliando así sus posibilidades de aplicación en diversos campos.

Por otra parte, se ha estimado que la mejora en el proceso de producción de PHA a través de la utilización de residuos como materiales de desecho puede reducir significativamente el costo de producción, hasta en un 50%. Sin embargo, aunque se han realizado estudios relacionados con los sustratos más económicos y que generan mayores rendimientos, esto también está asociado a la disponibilidad y accesibilidad de estas materias primas para las industrias locales en cada país. Asimismo, los microorganismos utilizados son fundamentales no solo para mejorar los costos, sino también para crear procesos fermentativos eficientes. Tanto la capacidad de almacenamiento de gránulos de PHA como la forma de polimerización son determinantes en las propiedades fisicoquímicas de los productos finales (Sathya et al., 2018).

En este sentido, la optimización juega un papel crucial en la reducción de costos y en la creación de procesos fermentativos eficientes. Es esencial que las cepas microbianas cuenten con las condiciones nutricionales adecuadas de carbono, nitrógeno y fósforo, así como un control adecuado del pH, la temperatura y la aireación, ya que estos factores tienen un impacto directo en el rendimiento de producción de PHA. Además, cuando se utilizan residuos de la industria como materia prima, es importante asegurar que estos aporten condiciones limitadas de fósforo y nitrógeno, pero sean abundantes en compuestos de carbono. También, como parte del diseño de fermentación,

los demás parámetros deben adaptarse y ser específicos para cada cepa microbiana, por lo que es crucial determinar las condiciones óptimas que permitan su desarrollo y favorezcan la acumulación de PHA (Mahenshwari et al., 2018).

En el presente estudio se propuso establecer el potencial biotecnológico de bacterias nativas para la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando suero lácteo como sustrato y optimizando las condiciones de temperatura y pH. Por ello la importancia de esta investigación se fundamenta en dar a conocer no solo el potencial biotecnológico de las bacterias nativas sino también su potencial como microorganismos capaces de generar un valor agregado a los desechos de la industria láctica, así también reducir los costos de producción de los PHA y establecer parámetros de fermentación que sean aplicables a escala mayores.

Materiales y Métodos

Revitalización de las cepas bacterianas

A partir de cultivos puros de cepas de bacterias nativas caracterizadas como positivas para la producción de polihidroxialcanoatos al utilizar medios químicamente definidos y que están almacenadas en el cepario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se realizaron cultivos en agar tripticasa soya (TS). Estos fueron incubados por 48 horas a 37 °C. Posteriormente se reaislaron en agar TS y luego, a partir de cada una de las cepas bacterianas se realizaron 10 subcultivos, también en agar TS, estos sirvieron para las siguientes etapas de la metodología. Los cultivos para trabajo fueron almacenados a 4 °C hasta su utilización (Kourmentza et al., 2018).

Preparación de medios de cultivo con suero lácteo

Para la preparación de los medios de cultivo con suero lácteo (SL) se utilizó suero proveniente de los desechos de la producción de queso de la industria láctica de Guatemala. Dicho suero lácteo se acidificó con HCl 5 N hasta llegar a pH de 4.5, esto se realizó con el fin de precipitar las proteínas. Posteriormente la solución se esterilizó a 121 °C por 15 minutos, luego se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, después fueron centrifugadas a 5000 RPM en tubos

cónicos para remover los agregados proteicos. El sobrenadante de la solución anterior se hizo pasar por filtros de papel Whatman No. 3. A la solución filtrada se le ajustó nuevamente el pH con NaOH 5 N hasta alcanzar un pH de 7 y se le agregaron los componentes de un medio mínimo mineral (3.0 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.2 g/l $\text{Na}_2\text{SO}_4 \times 10\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/l KCl, 0.05 g/l K_2HPO_4 , 0.5 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) (Pantazaki et al., 2009).

Tamizaje de las cepas bacterias para determinar la producción de PHA en suero lácteo

La capacidad de las cepas bacterianas nativas para producir PHA fue evaluado utilizando medios de cultivo adicionados con suero lácteo. Se inoculó cada una de las cepas bacterianas reactivadas en agar SL, luego se incubó a 37 °C por 72 horas, posteriormente se realizaron tinciones de cada cultivo bacteriano con el colorante Negro de Sudan al 1%, esta tinción se llevó a cabo agregando el colorante a las láminas portaobjetos durante 10 minutos, luego aclarando con Xilol para eliminar el exceso de colorante y finalmente las preparaciones fueron observadas al microscopio para determinar la presencia de inclusiones de PHA en las bacterias (Gunaratne et al., 2004).

Determinación de la biomasa bacteriana

La concentración celular, definida como el peso seco de las células por litro de caldo de cultivo, se determinó tomando alícuotas de 150 ml del cultivo en crecimiento, se centrifugaron a 5000 RPM, luego las células bacterianas se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con fosfato. Las células lavadas se filtraron al vacío utilizando filtros de 0.45 μm , posteriormente los filtros se secaron por 48 h a 80 °C y finalmente se pesaron. Todos los cultivos y mediciones se realizaron con cinco repeticiones (Guzmán et al., 2017).

Producción de PHA en medios con suero lácteo

Las cepas bacterianas reactivadas se inocularon en 10 ml del medio con suero lácteo y se incubaron a 37 °C por 24h hasta alcanzar la concentración de 0.5 en la escala de McFarland. Luego 5 ml del cultivo

anterior fue inoculado en 145 ml de medio con suero lácteo y se incubó a 37 °C por 72 horas con agitación constante de 150 rpm. Una vez finalizada la incubación se tomaron alícuotas de 150 ml en tubos cónicos, estos tubos se centrifugaron a 3000 RPM por 15 minutos. Al sedimento de células bacterianas se le realizaron dos lavados con agua desmineralizada, posteriormente se deshidrataron en el horno a 80 °C por 48 horas. Para la cuantificación de los PHA se utilizó la metodología de cloroformo-hipoclorito la cual consiste en agregar 10 ml de hipoclorito de sodio al sedimento y dejarlo reaccionar durante 2 horas como mínimo, posteriormente se agrega cloroformo por 20 minutos, finalmente los tubos se centrifugan a 3500 rpm, se decantan y el sedimento se deja secar a 80° por 48 horas para lograr evaporar el cloroformo y poder medir el peso seco (Gunaratne et al., 2004).

Evaluación del efecto de la temperatura en el proceso de fermentación

Para evaluar el efecto de la temperatura, los cultivos de trabajo de las cepas bacterianas fueron inoculados en 10 ml del medio y se incubaron a 37 °C por 24h. Luego 5 ml de los cultivos anteriores fueron inoculados en 145 ml de medio SL y se incubó a 20 y 37 °C por 48 horas con agitación constante de 150 rpm. Una vez finalizada la incubación se tomaron alícuotas de 50 ml en tubos cónicos, estos tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. Al sedimento de bacterias se le realizaron dos lavados con agua desmineralizada, posteriormente se deshidrataron en el horno a 80 °C por 48 horas. Para la cuantificación de los PHA se utilizó la metodología de cloroformo-hipoclorito (Guzmán et al., 2017).

Evaluación del efecto del pH en el proceso de fermentación

Una vez optimizadas las condiciones de temperatura, se optimizó el pH. Para ello los cultivos de trabajo de las cepas bacterianas fueron inoculados en 10 ml del medio SL y se incubaron a 37 °C por 24h. Luego 5 ml de los cultivos anteriores fueron inoculados en 145 ml de medio SL modificado a pH 4.5 y 7 y se incubaron a la temperatura que mostró el mayor rendimiento por 72 horas con agitación constante de 150 rpm. Una vez finalizada la incubación se cuantificó el contenido

de PHA utilizando la metodología de cloroformo-hipoclorito (Guzmán et al., 2017).

Procesamiento y análisis de la información

Para los datos obtenidos a partir de cada objetivo específico, se realizó un análisis exploratorio de los resultados donde se determinó la media, mediana, varianza, desviación estándar y se observó el comportamiento de las variables en gráficos de cajas e histogramas, posteriormente se realizaron pruebas de normalidad con los estadísticos de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilks. Para probar la hipótesis igualdad o diferencia entre la producción de polihidroxialcanoatos a partir de suero lácteo y los efectos de la temperatura y pH y si se cumple con los supuestos de normalidad, independencia y homocedasticidad se realizó un Anova de un factor y una prueba posterior de Tukey con el 0.05 de significancia. Los registros de los resultados se llevaron en Microsoft Excel, los análisis estadísticos se realizaron con SPSS®. Todas las determinaciones se llevaron a cabo utilizando cinco repeticiones.

Resultados

Se encontró que 28 de las 40 cepas evaluadas producen polihidroxialcanoatos (PHA) al utilizar suero lácteo como sustrato (Tabla 1). Las cepas productoras de PHA encontradas fueron *Achromobacter* sp. (DES320), *Alcaligenes faecalis* (AP21-01, AP21-10, AP21-14, AP21-26 y AP21-30), *Bacillus* sp. (DES311, DES323 y DES328), *B. cereus* (DES325), *B. idriensis* (AP21-07), *B. megaterium* (AP21-04), *B. simplex* (DES314), *B. subtilis* (DES309 y DES330), *Exiguobacterium aurantiacum* (AP21-05), *Micrococcus luteus* (DES312), *Pantoea agglomerans* (DES316), *Proteus mirabilis* (DES319), *Pseudomonas cuatrocieneegasensis* (AP21-16), *Staphylococcus* sp. (DES304), *S. capitis* (AP21-03), *S. pasteurii* (DES301 y DES307) y cuatro cepas de bacilos gram negativo (DES310, DES317, DES321 y DES327).

Luego de evaluar la capacidad para producción de polihidroxialcanoatos a 20 y 37 °C se encontró que las cepas AP21-01, AP21-03, AP21-04, AP21-05, AP21-10, AP21-14, AP21-16, AP21-30, DES301, DES304, DES307, DES309, DES311, DES314, DES316, DES317, DES319, DES321, DES325, DES327 y DES330 produjeron mayores concentraciones de PHA a 37 °C

Tabla 1

Producción de polihidroxialcanoatos por cepas bacterianas nativas utilizando suero lácteo a diferentes condiciones de temperatura y pH a 150 RPM

Cepa	Producción a 20 °C, 150 RPM (g/l) ¹	Producción a 37 °C, 150 RPM (g/l) ¹	Producción a pH 7, 150 RPM, 37 °C (g/l) ¹	Producción a pH 4.5, 150 RPM, 37 °C (g/l) ¹
AP21-01	0.80 (0.18) ghi	0.83 (0.05) ghi	0.69 (0.12) h	0.73 (0.55) h
AP21-02	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-03	1.04 (0.30) hij	1.15 (0.03) k	1.23 (0.02) klm	0.90 (0.13) h
AP21-04	0.25 (0.11) abcde	0.37 (0.10) defg	0.35 (0.01) def	0.10 (0.20) abcde
AP21-05	0.43 (0.20) cdefg	0.47 (0.09) fg	0.48 (0.02) fg	0.35 (0.19) fgh
AP21-06	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-07	0.97 (0.12) hi	0.89 (0.05) hij	1.15 (0.04) ijk	0.81 (0.05) h
AP21-08	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-09	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-10	1.25 (0.35) j	1.41 (0.23) l	1.33 (0.12) lm	0.80 (0.03) h
AP21-11	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-12	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-13	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-14	0.50 (0.12) defg	0.97 (0.24) j	0.57 (0.20) gh	0.25 (0.04) cefg
AP21-15	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00a
AP21-16	0.49 (0.21) efg	0.82 (0.23) ghi	0.43 (0.15) efg	0.19 (0.03) bcedf
AP21-17	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-18	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-19	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-20	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
AP21-26	1.01 (0.31) hij	0.90 (0.25) ij	1.36 (0.12) m	0.48 (0.09) hi
AP21-30	1.00 (0.13) hij	1.15 (0.14) k	1.12 (0.23) ijk	0.36 (0.09) gh
DES301	0.80 (0.11) hi	0.97 (0.17) j	1.05 (0.07) ij	0.09 (0.01) abc
DES304	1.21 (0.18) ij	1.33 (0.03) l	1.27 (0.04) klm	0.00 (0.00) a
DES307	0.67 (0.16) gh	0.78 (0.26) ghi	0.35 (0.07) def	0.00 (0.00) a
DES309	1.00 (0.18) hij	1.15 (0.04) k	1.15 (0.32) i	0.23 (0.03) cdefg
DES310	0.20 (0.18) abcdef	0.12 (0.09) ab	0.13 (0.17) ab	0.10 (0.01) abcd

Tabla 1 (continuación)

Cepa	Producción a 20 °C, 150 RPM (g/l) ¹	Producción a 37 °C, 150 RPM (g/l) ¹	Producción a pH 7, 150 RPM, 37 °C (g/l) ¹	Producción a pH 4.5, 150 RPM, 37 °C (g/l) ¹
DES311	0.30 (0.21) abcde	0.36 (0.02) def	0.10 (0.23) abc	0.00 (0.00) a
DES312	1.01 (0.14) hij	0.89 (0.06) hij	1.20 (0.15) jkl	0.02 (0.01) a
DES314	0.20 (0.12) abc	0.28 (0.02) cd	0.40 (0.09) def	0.00 (0.00) a
DES316	0.13 (0.10) ab	0.17 (0.01) bc	0.28 (0.07) cde	0.18 (0.01) bcdef
DES317	0.27 (0.18) abcde	0.35 (0.02) de	0.18 (0.36) a	0.15 (0.01) abcde
DES319	0.39 (0.36) abcde	0.48 (0.02) g	0.69 (0.12) gh	0.23 (0.01) cdefg
DES320	1.15 (0.22) ij	1.00 (0.02) j	1.26 (0.30) klm	0.25 (0.01) defg
DES321	0.09 (0.01) ab	0.19 (0.02) bc	0.18 (0.07) abc	0.10 (0.01) abcd
DES323	0.23 (0.08) abcd	0.15 (0.02) b	0.50 (0.10) fg	0.07 (0.01) ab
DES325	0.18 (0.03) abcd	0.36 (0.02) def	0.25 (0.02) bcd	0.06 (0.01) ab
DES327	0.57 (0.12) fgh	0.78 (0.02) gh	0.69 (0.02) h	0.15 (0.03) bcdef
DES328	0.36 (0.05) bcdefg	0.29 (0.02) cd	0.43 (0.01) efg	0.23 (0.02) cdefg
DES330	0.29 (0.01) abcdef	0.45 (0.02) efg	0.23 (0.01) bcd	0.18 (0.01) bcdef

Nota. ¹Gramos por litro de polihidroxialcanoato. ^{a, b, c, d, e, f, g.} Letras distintas indican diferencia significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p = .05$).

con una agitación de 150 RPM. Asimismo, no se encontró diferencia significativa entre la cantidad de biopolímero producido por las cepas AP21-10 (1.41 [0.23] g/l) y DES304 (1.33 [0.03] g/l) que mostraron los valores más elevados de producción a 37° (Tabla 1).

Al evaluar la producción de PHA a pH 4.5 y 7 se encontró que las cepas AP21-03, AP21-04, AP21-05, AP21-07, AP21-10, AP21-14, AP21-16, AP21-26, AP21-30, DES301, DES304, DES307, DES309, DES310, DES311, DES312, DES314, DES316, DES317, DES319, DES320, DES321, DES323, DES325, DES327, DES328 y DES330 produjeron mayores concentraciones a pH 7, mientras que la cepa AP21-01 mostró mayor rendimiento a pH 4.5. No se encontró diferencia significativa entre las cepas AP21-03 (1.23 [0.02] g/l), AP21-10 (1.33 [0.12] g/l), y AP21-26 (1.36 [0.12] g/l) que mostraron los mayores rendimientos de producción a pH 7 (Tabla 1).

Discusión

Se encontró que 28 de las 40 cepas evaluadas resultaron positivas para la producción de polihidroxialcanoatos al desarrollarse en suero lácteo. Entre los géneros y especies capaces de utilizar dicho sustrato se encontró a *Achromobacter* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. idriensi*, *B. megaterium*, *B. simplex*, *B. subtilis*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Micrococcus luteus*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas cuatrocieneegasensis*, *Staphylococcus* sp., *S. capitis* y *S. pasteurii*. Asimismo, se encontraron mayores rendimientos de producción de PHA al cultivar las cepas bacterianas a 37 °C y a pH 7.0. Entre los mejores productores se encontraron las cepas AP21-03 (1.23 [0.02]), AP21-10 (1.33 [0.12]), y AP21-26 (1.36 [0.12]) al cultivarlas bajo las concentraciones descritas anteriormente.

Entre las cepas que mostraron mayor rendimiento se encontró a *Staphylococcus* sp. y *S. capitis*. En estudios realizados por Darshan y Nishith (2010) se reportó que distintas cepas de *Staphylococcus* muestran condiciones óptimas de producción de PHA al desarrollarse con agitación constante a 37 °C, asimismo, Marjadi y Dharaia (2014) al utilizar aceite de ajonjolí, lograron obtener ácido poli(3-hidroxibutírico) (PHB) a partir de *Staphylococcus epidermidis* en condiciones de incubación a 37 °C y agitación constante de 150 RPM. Las cepas encontradas en el presente estudio mostraron los mayores rendimientos al utilizar condiciones similares a las reportadas por Obruca y colaboradores (2011) que utilizaron suero lácteo y obtuvieron rendimientos de hasta 1.48 g/l de polihidroxialcanoatos luego de optimizar las condiciones de fermentación para *B. megaterium*.

En cuanto a las especies de *Bacillus* encontradas como productoras de polihidroxialcanoatos estas mostraron mayores rendimientos a pH 7 y temperatura de 37°. Mohanrasu y colaboradores (2020) reportan haber optimizado las condiciones de fermentación para *B. megaterium* también utilizando pH 7 y además utilizando diferentes fuentes de carbono (arabinosa, glucosa, glicerol, lactosa, ácido láctico, manitol, acetato de sodio, almidón y sacarosa a concentraciones de 20 g/l) y de nitrógeno (cloruro de amonio, sulfato de amonio, glicina, nitrato de potasio, proteasa peptona y urea a concentraciones de 2 g/l), dichos autores lograron obtener rendimientos de hasta 2.74 g/l, los cuales son mayores a los de la cepa AP21-04 que en las condiciones descritas anteriormente produjo 0.35 (0.01) g/l de PHA. Cabe resaltar que no se optimizaron las fuentes de carbono y nitrógeno lo cual sería recomendable para incrementar el rendimiento.

Las cepas AP21-07 de *B. idriensi* y DES309 de *B. subtilis* produjeron 1.15 g/l de PHA sin diferencias significativas, dichos valores resultaron menores a los reportados por Rathika y colaboradores (2019) que optimizaron las condiciones de fermentación para *B. subtilis* utilizando diferentes concentraciones de melazas y obtuvieron rendimientos de 2.01 g/l a las 24 horas. Asimismo, dichos autores reportaron disminución en la concentración de PHA luego de 72 horas atribuyéndolo a la desnaturalización del sistema enzimático para la síntesis de PHA y al consumo intracelular de las inclusiones del biopolímero como fuente de energía y carbono. Por lo tanto, la disminución en los valores de rendimiento encontrados en las cepas AP21-07 y DES309 pudo ser debido al período de incubación de

72 horas al que fueron sometidas durante la fermentación.

En otro estudio realizado por Yasin y Mayaly (2021) donde se evaluó la cepa ARY73 de *Bacillus cereus* y el efecto de la concentración de carbono desde el 1% hasta 8%, tres valores de pH 5, 7 y 9, distintos valores de temperatura, 25, 30, 35 y 40 °C y concentración de nitrógeno del 0.5 a 1.5 g/l, se establecieron rendimientos de 2.61 g/l al desarrollarse a 35° y pH 7, además se reportó disminución del rendimiento de producción de PHA en temperaturas superiores a los 37 °C. Dichos valores superan al rendimiento mostrado por la cepa DES325 por lo que se recomendaría controlar las concentraciones de carbono y nitrógeno en el medio de fermentación.

Respecto a la cepa AP21-01 de *A. faecalis*, ésta mostró mayor rendimiento al cultivarse a pH 4.5. En estudios realizados por Kesik y colaboradores (2006) se encontró en especies de *Alcaligenes* una capacidad aumentada de producir compuestos nitrogenados al desarrollarse en condiciones de pH inferiores a 4. Asimismo, en un estudio realizado por Chincholkar & Sayyed (2004) se reportó que la producción de PHA por *A. faecalis* resultó óptima tanto a pH neutro como a pH bajo, además, no se encontró ninguna diferencia significativa al experimentar en distintos rangos de pH. En el presente estudio se encontró también que las cepas AP21-10, AP21-14, AP21-26 y AP21-30 de *Alcaligenes faecalis* tienen mayores rendimientos al utilizar condiciones de fermentación con pH neutro.

El suero lácteo contiene concentraciones de lactosa de entre 3 y 5% dependiendo de la leche y el proceso al que fue sometida para la producción industrial de queso, asimismo conserva aproximadamente 0.9% de proteínas crudas como única fuente de nitrógeno (Khanafari et al., 2006). Koller y colaboradores (2008) utilizaron suero lácteo como sustrato para la obtención de PHA a partir de *Pseudomonas hydrogenovora* luego de optimizar las condiciones de fermentación a pH 7, temperatura de 37 °C y ajustar el contenido de carbono y nitrógeno utilizando glucosa y suero lácteo deshidratado, obtuvieron resultados hasta de 1.27 g/l de PHA. Dichos valores resultaron similares a los encontrados en las cepas con mayores rendimientos AP21-03 (1.23 [0.02]), AP21-10 (1.33 [0.12]), y AP21-26 (1.36 [0.12]).

Las condiciones de fermentación probadas en esta investigación podrían ser aplicadas a escalas superiores para la producción de PHA al utilizar suero lácteo como sustrato. Sin embargo, se sugiere ajustar las concentraciones de carbono y nitrógeno para lograr

mejorar los rendimientos y que sean equiparables a los obtenidos a partir de medios definidos reportados en la literatura. No obstante, los valores de rendimiento obtenidos a partir de suero lácteo no presentaron grandes diferencias con otros sustratos probados anteriormente (Bran et al., 2021), lo que los convierte en una alternativa viable. Esto permite aprovechar los subproductos de desecho de la industria de los lácteos y, al mismo tiempo, reducir los costos de producción de los PHA.

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 DES11-2022, número de partida presupuestaria 4.8.63.0.39), 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.

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: RF, MCB

Limpieza, sistematización, análisis o visualización de datos: RF, MCB

Participación en análisis de datos, estructura y en la escritura del documento: Todos los autores

Materiales suplementarios

Este artículo no tiene archivos complementarios.

Referencias

Bran, M., Morales, O., & Figueroa, R. (2021). Producción de plásticos biodegradables en Guatemala (fase II): bioplásticos de bacterias halófilas nativas a partir de residuos agrícolas. Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente, Proyecto AP21-2021. Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Dirección General de Investigación, Guatemala.
- Chincholkar, S. B. & Sayyed, R. Z. (2004). Production of poly - β -hydroxy butyrate from *Alcaligenes faecalis*. *Indian Journal of Microbiology*, 44(4), 269-272.
- Darshan, M. & Nishith, D. (2010). Screening of edible oil-contaminated soil for polyhydroxyalkanoates producing bacterial strains. *Journal of Life Sciences*, 4(4), 37-42.
- 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. <http://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/10.1016/j.tca.2004.05.003>
- Khanafari, A., Sepahei, A. A., & Mogharab, M. (2006). Production and recovery of poly- β -hydroxybutyrate from whey degradation by *Azotobacter*. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 3(3), 193-198.
- Kalia, V. C., Patel, S. K. S., Shanmugam, R., & Lee, J. K. (2021). Polyhydroxyalkanoates: trends and advances toward biotechnological applications. *Bioresource Technology*, 124737. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124737>
- Kesik, M., Blagodatsky, S., Papen, H., & Butterbach-Bahl, K. (2006). Effect of pH, temperature and substrate on N_2O , NO and CO_2 production by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Applied Microbiology*, 101(3), 655-667. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02927.x>
- Koller, M., Bona, R., Chiellini, E., Fernandes, E. G., Horvat, P., Kutschera, C., ... & Braunegg, G. (2008). Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. *Bioresource technology*, 99(11), 4854-4863.
- Kourmentza, C., Costa, J., Azevedo, Z., Servin, C., Grandfils, C., De Freitas, V., & Reis, M. A. M. (2018). *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and

- rhamnolipids. *Bioresource technology*, 247, 829-837. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.138>
- Marjadi, D. & Dharaiya, N. (2014). Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Staphylococcus epidermidis*. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 8(6), 319-329. <https://doi.org/10.5897/AJEST2014.1645>
- Masood, F., Yasin, T., & Hameed, A. (2015). Polyhydroxyalkanoates—what are the uses? Current challenges and perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 35(4), 514-521. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.913548>
- Mohanrasu, K., Rao, R. G. R., Dinesh, G. H., Zhang, K., Prakash, G. S., Song, D. P., ... & Arun, A. (2020). Optimization of media components and culture conditions for polyhydroxyalkanoates production by *Bacillus megaterium*. *Fuel*, 271, 117522.
- Obruca, S., Marova, I., Melusova, S., & Mravcova, L. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates from cheese whey employing *Bacillus megaterium* CCM 2037. *Annals of Microbiology*, 61, 947-953. [https://doi.org/10.1007/s13213-011-0218-](https://doi.org/10.1007/s13213-011-0218-0)
- Pagliano, G., Galletti, P., Samori, C., Zaghini, A., & Torri, C. (2021). Recovery of polyhydroxyalkanoates from single and mixed microbial cultures: a review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 54. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.624021>
- Pantazaki, A. A., Papaneophytou, C. P., Pritsa, A. G., Liakopoulou-Kyriakides, M., & Kyriakidis, D. A. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry*, 44(8), 847-853. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.002>
- Pérez, R., Casal, J., Muñoz, R., & Lebrero, R. (2019). Polyhydroxyalkanoates production from methane emissions in *Sphagnum* mosses: Assessing the effect of temperature and phosphorus limitation. *Science of The Total Environment*, 688, 684-690. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.296>
- Rathika, R., Janaki, V., Shanthi, K., & Kamala-Kannan, S. (2019). Bioconversion of agro-industrial effluents for polyhydroxyalkanoates production using *Bacillus subtilis* RS1. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 5725-5734.
- Sathya, A. B., Sivasubramanian, V., Santhiagu, A., Sebastian, C., & Sivashankar, R. (2018). Production of polyhydroxyalkanoates from renewable sources using bacteria. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(9), 3995-4012. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1259-7>
- Wen, Q., Chen, Z., Wang, C., & Ren, N. (2012). Bulking sludge for PHA production: Energy saving and comparative storage capacity with well-settled sludge. *Journal of Environmental Sciences*, 24(10), 1744-1752. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)61005-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)61005-X)
- Yasin, A. R., & Al-Mayaly, I. K. (2021). Study of the fermentation conditions of the *Bacillus cereus* strain ARY73 to produce polyhydroxyalkanoate (PHA) from glucose. *Journal of Ecological Engineering*, 22(8), 217-219.
- Zhang, Y., Kang, S., Allen, S., Allen, D., Gao, T., & Sillanpää, M. (2020). Atmospheric microplastics: A review on current status and perspectives. *Earth-Science Reviews*, 203, 103118. <https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2020.103118>