



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

REF.IIQB.399.01.2021
Guatemala, 8 de Enero del 2021

Señor Director
Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director:

Con un cordial saludo me dirijo a usted para adjuntar el informe final del proyecto: **“Producción de plásticos biodegradables en Guatemala (Fase I): aislamiento e identificación de bacterias productoras de bioplásticos, extracción y purificación”** con partida presupuestal 4.8.63.6.12.000, coordinado por la Licda. María del Carmen Brán González y avalado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y aval correspondiente.

Asimismo, la coordinadora del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por DIGI del informe final y del manuscrito científico. El manuscrito científico debe enviarse, por la coordinadora del proyecto, para publicación, al menos, en una revista de acceso abierto (*Open Access*) indexada y arbitrada por expertos en el tema investigado.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

“Id y enseñad a todos”

Licda. María del Carmen Brán González
Coordinadora del Proyecto



Dra. María Eunice Enríquez Cottón
Directora
Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

c.c. archivo
MEEC/tveh

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente –PUIRNA–

Informe final

Producción de plásticos biodegradables en Guatemala (Fase I): aislamiento e identificación de bacterias productoras de bioplásticos, extracción y purificación

Equipo de investigación

Lcda. María del Carmen Bran González (Coordinadora)

Lic. Osberth Morales Esquivel (Investigador)

Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos (Investigador)

Ing. Agr. Gustavo Álvarez Valenzuela (Investigador)

Guatemala, 08 de enero de 2021

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS –IIQB–

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Augusto Saúl Guerra Gutiérrez
Coordinador de Programa Investigación en Recursos Naturales y Ambiente

Licda. María del Carmen Bran González
Coordinadora de Proyecto

Lic. Ricardo Andrés Figueroa Ceballos
Investigador

Lic. Osberth Morales Esquivel
Investigador

Ing. Agr. Gustavo Álvarez
Investigador

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2020. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.6.12.000 (Proyecto número DES3-2020). Durante el año 2020 en el Programa Universitario de Investigación de Recursos Naturales y Ambiente.

Índice general

1. Resumen.....	5
2. Palabras clave.....	5
3. Abstract and keyword	6
4. Introducción	6
5. Planteamiento del problema.....	9
6. Preguntas de investigación.....	10
7. Delimitación en tiempo y espacio.....	11
8. Marco teórico	11
9. Estado del arte.....	18
10. Objetivo general	20
11. Objetivos específicos.....	20
12. Hipótesis	20
13. Materiales y métodos	20
14. Vinculación, difusión y divulgación	25
15. Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:	26
16. Análisis y discusión de resultados.....	30
17. Conclusiones	33
18. Impacto esperado.....	34
19. Referencias	34
20. Apéndice.....	42

Índice de tablas

Tabla 1.....	28
--------------	----

Índice de figuras

Figura 1.....	29
Figura 2.....	29

Producción de plásticos biodegradables en Guatemala (Fase I): aislamiento e identificación de bacterias productoras de bioplásticos, extracción y purificación

1. Resumen

En los últimos años la alta demanda de plásticos y la acumulación de sus desechos en mantos acuíferos y vertederos alrededor del mundo se ha convertido en un problema ambiental considerable. En este sentido, los polímeros biodegradables producidos por microorganismos o bioplásticos microbianos como los polihidroxialcanoatos (PHA) se consideran como una alternativa viable a los plásticos elaborados a base de derivados del petróleo o petroquímicos, ya que presentan propiedades físicas similares a las del polipropileno. Sin embargo, aunque se ha promovido la búsqueda de nuevos materiales y los PHA han sido considerados como una alternativa a los plásticos convencionales, aún hacen falta estudios para buscar microorganismos que presenten mayores rendimientos de producción de PHA. El objetivo de esta investigación fue el establecer el potencial de las cepas nativas de los suelos agrícolas de Tecpán-Guatemala, Chimaltenango para la producción de polihidroxialcanoatos, esto se logró a través del aislamiento de las cepas en cultivo puro y su posterior desarrollo en Medio Mínimo de Davis. Se realizaron 5 repeticiones para cada determinación y los resultados fueron analizados con un ANOVA con posterior prueba de Duncan. Se encontró que 18 cepas resultaron positivas para la producción de polihidroxialcanoatos estas corresponden a los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Pantoea* y *Proteus*. Asimismo las cepas DES304 (*Staphylococcus* sp.), DES309 (*Bacillus subtilis*) y DES301 (*Staphylococcus pasteurii*) mostraron los mayores rendimientos de producción del polímero. Además se determinó que los microorganismos del suelo degradaron parcialmente los polímeros de PHA producidos por las cepas aisladas.

2. Palabras clave

Biopolíesteres, biodegradación, biocompatibilidad, cepas productoras.

3. Abstract and keyword

In recent years, the high demand for plastics and the accumulation of their waste in aquifers and landfills around the world has become a considerable environmental problem. In this sense, biodegradable polymers produced by microorganisms or microbial bioplastics such as polyhydroxyalkanoates (PHAs) are considered a viable alternative to plastics made from petroleum derivatives or petrochemicals, since they have physical properties similar to those of polypropylene. However, although the search for new materials has been promoted and PHAs have been considered as an alternative to conventional plastics, studies are still needed to search for microorganisms that have higher PHA production yields. The objective of this research was to establish the potential of the native strains of the agricultural soils of Tecpán-Guatemala, Chimaltenango for the production of polyhydroxyalkanoates, this was achieved through the isolation of the strains in pure culture and their subsequent development in Minimal Davis Media. 5 repetitions were performed for each determination and the results were analyzed with an ANOVA with subsequent Duncan's test. It was found that 18 strains were positive for the production of polyhydroxyalkanoates, these correspond to the genera *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Pantoea* and *Proteus*. Likewise, strains DES304 (*Staphylococcus* sp.), DES309 (*Bacillus subtilis*) and DES301 (*Staphylococcus pasteurii*) showed the highest polymer production yields. Furthermore, it was determined that soil microorganisms partially degraded the PHA polymers produced by the isolated strains.

Keywords: Biopolyesters, biodegradation, biocompatibility, producer strains

4. Introducción

Actualmente los plásticos fabricados a base de derivados del petróleo, plásticos tradicionales o petroquímicos son materiales de uso cotidiano en hogares e industrias, principalmente por la versatilidad que ofrecen en cuanto a resistencia, plasticidad y bajos costos (Akaraonye, Keshavarz, & Roy, 2010). Debido a sus propiedades físicas los plásticos petroquímicos también han reemplazado con éxito a otros materiales como el vidrio, el cartón y a algunos metales, ya sea como materiales de empaque, recipientes o como componentes de maquinaria y equipos (Keshavarz & Roy, 2010).

A pesar de sus beneficios, los plásticos petroquímicos presentan la desventaja de ser recalcitrantes, es decir que no pueden ser degradados por los microorganismos sino que solo son escindidos por factores ambientales como la luz UV a partículas más pequeñas llamadas microplásticos (Calabrò & Grosso, 2018). Estas micropartículas se acumulan en los ecosistemas acuáticos y terrestres, son ingeridas por los animales y causan daños por su acumulación en tejidos y órganos (Strungaru, Jijie, Nicoara, Plavan, & Faggio, 2019). Otro impacto ambiental que generan los plásticos petroquímicos surge cuando los residuos son incinerados, ya que liberan gases tóxicos a la atmósfera como dioxinas, furanos, mercurio y bifenilos policlorados (Verma, Vinoda, Papireddy, & Gowda, 2016). Dichos impactos ambientales aunados a las tasas alarmantes de agotamiento del petróleo ha incrementado el rechazo por parte de los consumidores a este tipo de material y ha impulsado regulaciones en la utilización de los mismos (Filatov, Zaitseva, & Larionova, 2018).

Debido a los impactos ambientales que generan los plásticos petroquímicos, en muchos países se han implementado políticas para reducir su utilización. La mayoría de estas políticas se han dirigido a reducir el uso de bolsas, recipientes y utensilios plásticos. Sin embargo, dichas regulaciones han demostrado ser insuficientes para resolver el problema relacionado con la contaminación plástica, por lo tanto se han ideado medidas adicionales para abordar este problema. Estas medidas se centran en dos pilares principales: aumentar la recolección de residuos plásticos que ya se encuentran como contaminantes en océanos y vertederos e incluirlos en sistemas de reciclaje, y sustituir los polímeros tradicionales a base de petróleo por otros biodegradables, basados en materias primas renovables (Luckachan & Pillai, 2011), que son menos persistentes en el medio ambiente (Emadian, Onay, & Demirel, 2017). Si bien la primera opción se ha estudiado ampliamente, esta ha resultado insuficiente para solventar por sí sola la problemática de los desechos plásticos. La segunda opción es más reciente y su impacto en el mercado mundial del plástico aún es limitada. En 2017, la cantidad de plásticos biodegradables producidos a nivel mundial fue de aproximadamente 880,000 T, lo que corresponde a menos del 0.3 % de la cantidad total de plásticos (320,000,000 T) producidos en el mismo año (Calabrò & Grosso, 2018).

Unos de estos polímeros biodegradables son los polihidroxialcanoatos (PHA), los cuales se acumulan naturalmente como gránulos dentro de una variedad de microorganismos como reservas

energéticas. Los PHA se consideran una alternativa a los polímeros petroquímicos ya que su producción se basa en el uso de recursos renovables y además presentan la ventaja de ser biodegradables y biocompatibles (Muhammadi, Afzal, & Hameed, 2015). Los PHA pueden sustituir a diferentes plásticos como el polipropileno debido a sus propiedades físicas similares como su transición vítrea o su punto de fusión (Raza, Abid, & Banat, 2018). La estructura química de los PHA está influenciada principalmente por las cepas microbianas, la fuente de carbono y, finalmente, por la adición de precursores (Braunegg, Bona, Schellau, & Wallner, 2002). La enzima PHA-sintasa también desempeña un papel crucial en la forma de polimerización y en las propiedades finales del biopolímero (Kovalcik, Obruca, Fritz, & Marova, 2019). Bioquímicos, microbiólogos y bioingenieros han centrado su interés en la bioproducción de PHA utilizando diferentes sustratos y empleando diversos microorganismos con el objetivo de producir concentraciones industrialmente aceptables de PHA en biorreactores y aislar biopolíesteres y copoliésteres con diferentes composiciones químicas y propiedades físicas (Koller, Marsalek, Dias, & Braunegg, 2017; Kumar & Kim, 2018).

Sin embargo, los costos de producción de los PHA en comparación con los plásticos petroquímicos no biodegradables aún son mucho más altos por lo que no pueden competir en los sectores industriales más importantes. Además, otras desventajas son la insuficiencia de las instalaciones a nivel local en cada país, los estrictos requisitos para las condiciones de fermentación y la falta de cepas microbianas que produzcan rendimientos de producción aceptables de PHA (Kovalcik et al., 2017).

En este proyecto de investigación se estableció el potencial de las cepas nativas de microorganismos de suelos agrícolas para la producción de bioplásticos microbianos a base de PHA, para lo cual se aislaron bacterias capaces de producir gránulos de polihidroxialcanoatos y posteriormente se inocularon en caldo mínimo de Davis para evaluar el rendimiento de producción de PHA. Asimismo se evaluó la capacidad de las bacterias del suelo para degradar los polímeros producidos. La importancia de esta investigación fue el encontrar cepas productoras de bioplásticos de alto rendimiento a nivel local que puedan ser utilizadas en la elaboración de productos que actualmente son elaborados a base de plásticos petroquímicos.

5. Planteamiento del problema

En los últimos años la alta demanda de plásticos petroquímicos y la acumulación de sus desechos en mantos acuíferos y vertederos alrededor del mundo se ha convertido en un problema ambiental, principalmente por la formación de microplásticos (MP) que se acumulan en los tejidos y órganos de los seres vivos y ocasiona la muerte de millones de animales alrededor del mundo cada año y por las emisiones tóxicas que causa su incineración tales como dioxinas, furanos, mercurio y bifenilos policlorados (Ali, Zaki, & Obiad, 2017; Hahladakis, Velis, Weber, Iacovidou, & Purnell, 2018). Además también se ha convertido en una amenaza a la salud de los seres humanos no solo por el deterioro que causan las emisiones antes mencionadas en la atmosfera sino también porque se ha reportado una ingesta de entre 39,000 a 52,000 de micropartículas plásticas por persona cada año, dependiendo de la edad y el sexo (Cox et al., 2019).

La alta demanda de plásticos petroquímicos se debe principalmente a su bajo costo y a su larga durabilidad, lo cual es una ventaja en aplicaciones como la construcción, la elaboración de dispositivos electrónicos, materiales de empaque y en la manufactura de todo tipo de transportes (Gross & Kalra, 2002). A pesar de sus ventajas, los lentos períodos de degradación de los plásticos petroquímicos han provocado que estos se vuelvan omnipresentes en los ecosistemas, lo que ocasiona impactos en la salud de los animales ya que algunos los ingieren o se enredan. Además la presencia de dichos plásticos en los ecosistemas marinos ha favorecido la dispersión de especies lo que ha modificado las cadenas tróficas (Li et al., 2019).

Una de las alternativas a los plásticos petroquímicos son los bioplásticos microbianos o polihidroxialcanoatos (PHA), estos son biopolímeros producidos por microorganismos que presentan propiedades físicas similares a las del polipropileno, principalmente en cuanto a su temperatura de fusión y su transición vítrea. Además presentan la ventaja de ser biodegradables y biocompatibles por lo que no se acumulan en los ecosistemas ni resultan dañinos a los seres vivos (Haider, Völker, Kramm, Landfester, & Wurm, 2019). En la actualidad dichos bioplásticos microbianos tienen aplicaciones en salud, producción de textiles y como materiales de empaque (Gross & Kalra, 2002). A pesar de las ventajas que tienen los bioplásticos microbianos, todavía hay una producción excesiva de plásticos petroquímicos ya que se producen más de 250 millones de toneladas anualmente a nivel mundial (Haider et al., 2019). Esta producción excesiva se debe al

crecimiento exponencial de la población humana que genera una alta demanda de productos plásticos y también a los costos de producción de los bioplásticos microbianos que son mayores respecto a los convencionales (Getachew & Woldeesenbet, 2016). Por esta razón, muchos países han promovido programas especiales dirigidos al descubrimiento de nuevos materiales de uso común que puedan eliminarse fácilmente de la biosfera, y han diseñado estrategias novedosas destinadas a facilitar la transformación de contaminantes (Luengo, García, Sandoval, Naharro, & Olivera, 2003).

Sin embargo, aunque se ha promovido la búsqueda de nuevos materiales y los PHA han sido considerados como una alternativa a los plásticos petroquímicos, aún hacen falta estudios para buscar microorganismos que presenten mayores rendimientos de producción de PHA y que se adapten a sustratos económicos que permitan reducir los costos de producción. Los suelos agrícolas han mostrado ser una fuente importante de nuevos microorganismos productores de bioplásticos y en los últimos años, ya que se han logrado porcentajes de recuperación de hasta el 80 % de peso seco de PHA en microorganismos del suelo tales como *Rolstonia eutropha*, *Alcaligenes latus* y *Pseudomonas oleovorans* (Ali et al., 2017; Deepa & Vidhya, 2018). En Guatemala aún no existen estudios sobre producción de bioplásticos microbianos a pesar de que es considerado un país con megadiverso (Azudía, García y Ríos, 2008).

6. Preguntas de investigación

General

¿Tienen las cepas nativas de bacterias de suelos agrícolas de Tecpán-Guatemala, Chimaltenango el potencial para producir bioplásticos microbianos a base de polihidroxialcanoatos?

Específicas

¿Qué géneros de bacterias del suelo son capaces de producir gránulos de polihidroxialcanoatos en medio mínimo mineral?

¿Qué rendimiento de producción de polihidroxibutirato presentan las cepas microbianas al cultivarlas en caldo mínimo de Davis?

¿Qué capacidad tienen los microorganismos del suelo para degradar el polihidroxibutirato producido por las cepas microbianas?

7. Delimitación en tiempo y espacio

Delimitación en tiempo: El estudio se realizó en el periodo comprendido entre febrero a noviembre de 2020. Se inició con la recolección de las muestras de suelo en el mes de febrero, luego en el mes de marzo se realizó un tamizaje para la búsqueda de microorganismos productores de gránulos de polihidroxibutirato, posteriormente entre abril y agosto, se realizó la fase de fermentación para la producción de polihidroxibutirato, se realizó la extracción y la cuantificación del rendimiento para cada cepa. Luego en los meses de septiembre a diciembre se evaluó la degradabilidad del material y la identificación de los microorganismos. Finalmente en el mes de diciembre se realizó el análisis de los datos.

Delimitación espacial: Se realizó un muestreo en el mes de febrero en plantaciones de Tecpán-Chimaltenango, Guatemala, se colectaron muestras de suelo de la rizosfera para la recuperación de bacterias productoras de bioplásticos (14°41'52.5"N 90°57'03.1"W).

8. Marco teórico

Plásticos petroquímicos

Los plásticos producidos a base de derivados del petróleo o petroquímicos son actualmente los materiales más utilizados en el mundo. Aunque los primeros plásticos sintéticos, como la baquelita, aparecieron a principios del siglo XX la producción y uso a gran escala se remonta al año 1950. A partir de las últimas seis décadas, en términos de volumen, el uso de plásticos ha sobrepasado al de otros materiales elaborados por el hombre entre ellos el vidrio, el caucho o el papel (Geyer, Jambeck, & Law, 2017). Los plásticos se han convertido en un elemento indispensable en la vida cotidiana de las personas, su mayor aplicación es como material de empaque y desde su aparición ha cambiado la forma de ver a los materiales como reusables a materiales desechables de un solo uso. Como resultado los desechos plásticos han aumentado de menos del 1 % del total de residuos a 10 % en el año 2005 (Hoornweg, Bhada-Tata, & Kennedy, 2013).

La producción de plásticos petroquímicos tiene la desventaja de generar productos de desecho no biodegradables (Akaraonye, Keshavarz, & Roy, 2010). El que estos compuestos plásticos permanezcan en el ambiente se debe principalmente a su alta masa molecular y a su estructura compleja, lo que los vuelve difíciles de degradar y hace que puedan permanecer en cuerpos de agua, suelo y vertederos durante muchos años. Los plásticos petroquímicos generan un fuerte impacto ambiental, no solamente por su acumulación sino también porque su descomposición genera pequeños fragmentos o microplásticos y libera compuestos tóxicos por la fotodescomposición. La única forma de eliminar los desechos plásticos permanentemente es mediante un tratamiento térmico destructivo, como la combustión o la pirolisis (Barnes, Galgani, Thompson, & Barlaz, 2009).

La contaminación casi permanente del medio ambiente con desechos plásticos es una preocupación creciente ya que se ha encontrado este tipo de residuos en todas las cuencas oceánicas (Wagener et al., 2014). En el año 2010 se estimó que ingresaron al medio marino de 4 a 12 millones de toneladas métricas de desechos plásticos, generados en tierra. La contaminación también se ha reportado en los sistemas de agua dulce y los hábitats terrestres (Zubris & Richards, 2005). Esta situación ha impulsado un esfuerzo por parte de entidades públicas, organizaciones dedicadas a la preservación del medio ambiente, así como la comunidad científica para desarrollar alternativas como plásticos sustitutos ecológicos y biodegradables (Noda, Lindsey, & Caraway, 2010).

Alternativas a los plásticos petroquímicos

Los biopolímeros con propiedades similares al plástico se consideran alternativas para reemplazar los plásticos petroquímicos o convencionales; entre estas bioalternativas se encuentra el almidón termoplástico, el ácido poliláctico y los polihidroxialcanoatos (PHA) (Zhu, Romain, & Williams, 2016). Los PHA han tomado importancia debido a sus propiedades físicas como su elasticidad o temperaturas de fusión que permiten su adaptación para la fabricación de productos donde usualmente se utiliza plástico como materia prima. Los PHA han llamado la atención de microbiólogos, científicos de polímeros, ingenieros de procesos y científicos involucrados en biología sintética debido a que tienen el potencial de desplazar a diversos plastómeros y tecnómeros a base de petróleo que se utilizan actualmente (Koller et al., 2017).

Los PHA pertenecen a la familia de los llamados “plásticos verdes”, porque tienen una base biológica (son producidos a partir de recursos renovables), se biosintetizan (son productos intracelulares del metabolismo secundario de los microorganismos), son biodegradables, compostables y fermentables a productos como agua, CO_2 o CH_4 ; además, son biocompatibles, lo que los hace atractivos como materiales de elección para aplicaciones biomédicas. Asimismo, la producción de estos plásticos biológicos no agota los recursos fósiles debido a que se derivan de recursos renovables. Toda la vida útil de los PHA está integrada en el ciclo cerrado de carbono de la naturaleza, lo que implica que su degradación, en contraste con la degradación de los plásticos basados en el petróleo, no provoca un aumento del nivel de CO_2 en la atmósfera y por lo tanto, no amplifica ni acelera el cambio climático (Akiyama, Tsuge, & Doi, 2003).

Las materias primas normalmente utilizadas para fabricar PHA y otros plásticos biodegradables son recursos renovables como azúcares, carbohidratos o grasas y aceites de alto peso molecular, que son productos naturales y sustratos que participan en el ciclo del carbono. Por otro lado, la fabricación de plásticos convencionales utiliza recursos fósiles, estas materias primas no son renovables y son limitadas ya que se originan de almacenes de petróleo que se encuentran en el interior de la Tierra desde hace millones de años. Después del uso de los biopolímeros, estos se someten a procesos de biodegradación y compostaje por el metabolismo de los organismos vivos, que generan biomasa y CO_2 . Este CO_2 a su vez, se capta nuevamente en el proceso fotosintético de las plantas, algas y cianobacterias para reconstruir las materias primas renovables originalmente utilizadas para la síntesis de biopolímeros, lo que cierra el ciclo de anabolismo y catabolismo. Esto difiere drásticamente de los procesos de ciclo de vida de los plásticos petroquímicos, cuya degradación térmica provoca un desequilibrio de CO_2 a través de la combustión; el exceso de carbono que se ha eliminado del ciclo natural del carbono durante millones de años se libera repentinamente a la atmósfera como excedente de CO_2 . Llevaría millones de años recuperar los combustibles fósiles mediante la fijación fotosintética y la fosilización de la biomasa resultante (Koller, 2019)

Polihidroxicanoatos (PHA)

Los PHA son biopolímeros o poliésteres naturales del ácido 3-, 4-, 5- o 6- hidroxialcánico, son sintetizados por microorganismos como inclusiones granulares dentro de la estructura celular, están compuestos por lípidos y sirven para el almacenamiento de energía (Poli, Di Donato, Abbamondi, & Nicolaus, 2011). Fueron descubiertos por Lemoigne (1926) en *Bacillus megaterium* en forma de Ácido poli(R)-(3-hidroxibutírico). Los PHA en los microorganismos constan de un núcleo de poliéster rodeado de fosfolípidos o proteínas y son almacenados dentro del citoplasma donde existen como gránulos que varían en tamaño desde 0.2 a 0.5 μm (Dias et al., 2006; Li et al., 2018).

Hasta la fecha, más de 90 géneros de bacterias han sido identificadas como productoras de PHA en condiciones aerobias o anaerobias. Los microorganismos productores de PHA se pueden dividir en dos grupos con respecto a la producción de PHA. En el primer grupo, se encuentran los que requieren la limitación de un nutriente como el fósforo, nitrógeno, oxígeno o magnesio para acumular PHA y no lo acumulan durante la fase de crecimiento. El segundo grupo acumula PHA durante la fase de crecimiento y no requiere ninguna limitación de nutrientes (Muhammadi et al., 2015). Por ejemplo, las bacterias *R. eutropha*, *P. oleovorans* y *P. putida* pertenecen al primer grupo, mientras que algunas cepas de *Escherichia coli* pertenecen al segundo (Nitschke, Costa, & Contiero, 2011).

Los PHA microbianos son totalmente biodegradables lo que ha atraído mucha atención como materiales poliméricos alternativos que pueden producirse a partir de recursos renovables y de desechos orgánicos. Los PHA, varían ampliamente en su estructura y propiedades (flexibilidad, cristalinidad, temperatura de fusión, etc.), dependiendo de los microorganismos productores, las condiciones de la biosíntesis y el tipo de fuente de carbono (Mekonnen, Mussone, Khalil, & Bressler, 2013).

Síntesis de los PHA en bacterias

Los PHA son sintetizados por muchos organismos vivos. Los principales candidatos para la producción a gran escala son las plantas y las bacterias. Sin embargo, las células vegetales solo

pueden almacenar cantidades bajas de PHA (menos del 10 % de peso seco) ya que los altos niveles del polímero (10–40 % de peso seco) tienen efectos negativos en el crecimiento y desarrollo de la planta (Bohmert, Balbo, Steinbüchel, Tischendorf, & Willmitzer, 2002). En contraste, dentro de las bacterias, los PHA se acumulan a niveles de hasta el 90 % del peso seco de las células (Steinbüchel & Lütke-Eversloh, 2003).

La acumulación de PHA sirve a las bacterias como reserva natural de energía, cuando los suministros de nutrientes están desequilibrados. Estos polímeros se forman cuando el crecimiento bacteriano está limitado por el agotamiento de nitrógeno, fósforo u oxígeno y todavía existe una cantidad de carbono en el medio. Si bien la limitación más común es el nitrógeno, para algunas bacterias, como *Azotobacter* spp, la principal limitante es el oxígeno (Shang, Jiang, & Chang, 2003)

El primer PHA que se descubrió y, por lo tanto, el más estudiado es el polihidroxibutirato. La síntesis del PHB se basa en el acetil-coenzima-A (acetil-CoA), que se convierte en PHB por tres enzimas biosintéticas: la 3-cetotiolasa (PhaA), la acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) y la PHB sintasa (PhaC). Para la producción del PHB primero PhaA combina dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. En este punto la PhaB permite la reducción de acetoacetil-CoA por NADH a 3-hidroxibutiril-CoA. Finalmente, la PhaC polimeriza el 3-hidroxibutiril-CoA a PHB, liberando la coenzima-A. Durante el crecimiento bacteriano normal, la 3-cetotiolasa es inhibida por la coenzima A libre que sale del ciclo de Krebs. Pero cuando la entrada de acetil-CoA en el ciclo de Krebs está restringida (durante la limitación de nutrientes sin carbono), el exceso de acetil-CoA se canaliza hacia la biosíntesis de PHB (Tsuge et al., 2005).

Como los PHA son insolubles en agua estos son acumulados intracelularmente en forma de gránulos. Tener dicho almacén de energía es beneficioso para la célula bacteriana, principalmente porque su fisiología no se ve afectada. Además al polimerizar compuestos que individualmente serían solubles, la célula evita los cambios osmóticos lo que le permite prevenir la pérdida de nutrientes y tener costos energéticos bajos. La superficie de un gránulo de PHA está recubierta por una capa de fosfolípidos y proteínas. Las fasinas, una clase de proteínas, son los compuestos predominantes en la interfaz de un gránulo e influyen en el número y tamaño de los gránulos de PHA (Peters & Rehm, 2005).

Propiedades físicas de los PHA

Las bacterias producen PHA con una masa molecular promedio (M_n) de hasta 4×10^6 (Agus, Kahar, Abe, Doi, & Tsuge, 2006). Las características del material de estos biopolímeros son similares a los plásticos convencionales como el polipropileno. Las propiedades de PHB (homopolímero), PHBV, PHB4B (copolímeros-scl) y PHBHx (copolímero-mcl) se comparan con el polipropileno (PP). El homopolímero PHB es altamente cristalino (Padermshok et al., 2004), material rígido pero quebradizo. Cuando se hila en fibras, se comporta como un material elástico duro (Antipov et al., 2006). Los copolímeros como PHBV o PHA-mcl son menos rígidos y frágiles que los PHB, mientras conservan la mayoría de las otras propiedades mecánicas de PHB. El homopolímero PHB tiene una estructura cristalina helicoidal, esta estructura parece ser similar en varios copolímeros (Padermshok et al., 2004).

El comportamiento en cuanto al punto de fusión y la cristalización de los PHA ha sido estudiado por Gunaratne y Shanks (2005) quienes determinaron que los PHA muestran múltiples puntos de fusión cuando son fundidos, recristalizados y fundidos nuevamente. El punto de degradación terminal ha sido investigado por Carrasco y colaboradores (2006) quienes determinaron que la descomposición del PHB comienza a los 246.3 °C, mientras que para el PHBV es de 260.4 °C. Esto indica que los copolímeros presentan mayor estabilidad térmica.

Biodegradabilidad de los PHA

Además de sus propiedades físicas, una característica importante de los PHA es su biodegradabilidad. Los microorganismos en la naturaleza pueden degradar los PHA mediante el uso de PHA hidrolasas y PHA despolimerasas. Las actividades de estas enzimas pueden variar y dependen de la composición del polímero y las condiciones ambientales. La tasa de degradación de un pedazo de PHB es típicamente de unos pocos meses (en aguas residuales anaeróbicas) o años (en agua de mar). La luz ultravioleta puede acelerar la degradación de los PHA. Los PHA han demostrado ser biocompatibles, lo que significa no tienen efectos tóxicos en organismos vivos. Dentro de los mamíferos, el polímero se hidroliza solo lentamente. Después de un período de

implantación de 6 meses en ratones, la pérdida de masa fue inferior al 1.6% (Madison & Huisman, 1999)

Bacterias productoras de PHA

Los PHA son producidos por muchos microorganismos. *Cupriavidus necator* (anteriormente conocido como *Ralstonia eutropha* o *Alcaligenes eutrophus*) es el que se ha estudiado más extensamente. La empresa Imperial Chemical Industries (ICI) fue la primera en utilizar esta cepa bacteriana para la producción del copolímero PHBV con el nombre comercial Biopol. Recientemente, Metabolix Inc adquirió las patentes de Biopol. Actualmente producen 50000 T por año. En la actualidad, la fermentación bacteriana con *Cupriavidus necator* es el proceso más rentable e incluso si la producción cambia a otras bacterias, es posible utilizar genes de *Cupriavidus necator*. Algunas otras cepas importantes que se estudiaron recientemente incluyen: *Bacillus* spp, *Alcaligenes* spp, *Pseudomonas* spp, *Aeromonas hydrophila*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Escherichia coli*, *Burkholderia sacchari* y *Halomonas boliviensis*. Łabuzek y Radecka (2001) encontraron que las cepas de *Bacillus* formadoras de esporas pueden producir un nuevo PHA. Sin embargo, debido a que las condiciones ambientales, que inducen la producción de biopolímeros, también son favorables para la producción de esporas, existe un conflicto entre los dos procesos metabólicos y la producción de biopolímeros puede reducirse. Por lo tanto, es prometedor evaluar mutantes no formadores de esporas por su potencial para producir PHA. La ingeniería genética también es una herramienta poderosa en la optimización del metabolismo microbiano para la producción de polímeros. Las cepas de *Escherichia coli* se han modificado genéticamente para producir PHB con pesos moleculares de hasta 10^7 Da a partir de glucosa (Park, Choi, & Lee, 2005).

Técnicas de recuperación de los PHA intracelulares

Después de la producción de PHA, las células bacterianas que contienen el polímero deben separarse por medio de centrifugación. La mayoría de los métodos para recuperar PHA intracelular implican el uso de solventes orgánicos, como acetona, cloruro de metileno o dicloroetano. Sin embargo, la necesidad de grandes cantidades de solvente hace que el procedimiento no sea económico y sea ambientalmente poco atractivo (Jiang, Ramsay, & Ramsay, 2006). Para

aplicaciones médicas, la extracción con solventes es un buen método, porque los PHA resultantes tienen una alta pureza. Como alternativa a la extracción con solventes orgánicos, existen procedimientos enzimáticos acuosos, tratamientos con amoníaco o digestión con hipoclorito de sodio y surfactantes. Recientemente, se ha utilizado la extracción con fluidos supercríticos, flotación por aire disuelto y disolución selectiva de la masa celular (Luckachan & Pillai, 2011).

9. Estado del arte

Usos de los PHA

Los plásticos utilizados actualmente para aplicaciones de embalaje y revestimiento pueden ser reemplazados parcial o totalmente por PHA. La amplia gama de propiedades físicas de los PHA y el rendimiento que se puede obtener mediante modificación química o mezcla con otros polímeros proporcionan una amplia gama de posibles aplicaciones (Masood, Yasin, & Hameed, 2015).

El principal uso al que se enfoca actualmente la producción de PHA es a la producción de materiales de embalaje como envases y películas envolventes. Además, ya se ha descrito su uso para artículos de higiene personal biodegradables, como los pañales y sus envoltorios. Los PHA también se han utilizado en toners de impresión y adhesivos para recubrimientos (Albuquerque & Malafaia, 2018). Asimismo, los bioplásticos ya se utilizan en productos electrónicos, como los teléfonos móviles. En agricultura se utilizan para la encapsulación de semillas, fertilizantes de liberación lenta, películas plásticas biodegradables para protección de cultivos y contenedores biodegradables para instalaciones de invernaderos (Kalia, 2019)

Usos en medicina

Los PHA también tienen numerosas aplicaciones médicas. La principal ventaja en el campo de la cirugía es que se puede insertar un bioplástico microbiano biodegradable en el cuerpo humano y no es necesario retirarlo posteriormente. El PHA tiene una biocompatibilidad ideal, ya que es un producto del metabolismo celular y también el ácido 3-hidroxibutírico (el producto de la degradación) normalmente está presente en la sangre en concentraciones de hasta 3 mmol/l (Zinn, Witholt, & Egli, 2001). Los PHA se usan también como material para suturas, vendajes, aparatos

ortopédicos, barreras de adhesión, guías nerviosas y andamios de médula ósea. Los PHA pueden ser útiles en los procesos de curación ósea, junto con la hidroxiapatita pueden funcionar como compuestos bioactivos y biodegradables para aplicaciones en reemplazo y regeneración de tejidos duros (Chen & Wu, 2005). Sin embargo, debido al alto nivel de especificaciones para los plásticos utilizados en el cuerpo humano, no todos los PHA se pueden utilizar en aplicaciones médicas. Por ejemplo, los PHA que estén en contacto con la sangre deben de estar libres de endotoxinas bacterianas y en consecuencia, existen altos requisitos para los métodos de extracción y purificación (Nigmatullin, Thomas, Lukasiewicz, Puthussery, & Roy, 2015).

Perspectivas

Los PHA son candidatos muy competitivos para reemplazar a los plásticos petroquímicos en la mayoría o la totalidad de las aplicaciones. El alto costo de producción en comparación con los plásticos convencionales a base de petróleo sigue siendo un gran obstáculo para el crecimiento y la expansión de los PHA. En la biosíntesis, generalmente se produce una mezcla de más de un monómero en lugar de un solo tipo de PHA. La producción de un solo monómero en lugar de múltiples sería beneficioso, pero es un gran desafío por resolver. Todavía se necesita investigación y desarrollo para reducir el costo de la síntesis y obtener métodos efectivos de recuperación y procesamiento para mejorar su comercialización. La aplicación para la cual van a ser destinados los PHA está directamente asociada con el costo que este vaya a tener. Por ejemplo, en el campo médico se buscan procesos de extracción con alta pureza y de bajo costo (Raza et al., 2018).

La detección de nuevos microorganismos y las posibilidades de realizar modificaciones genéticas para aumentar los rendimientos de producción, también deben investigarse más a fondo. Una mayor reducción del costo de producción podría abrir nuevos horizontes de aplicaciones y se podría mejorar la calidad de vida de los seres humanos. El costo actual de la producción y recuperación de PHA es de aproximadamente \$ 5.77 USD / kg (Leong et al., 2017), que debería reducirse aún más para competir con los productores de plásticos petroquímicos. Los PHA también pueden transformar las tecnologías farmacéuticas y la futura inmovilización de proteínas de los PHA también puede ofrecer otras aplicaciones. Estos biopolímeros microbianos biodegradables son los candidatos más prometedores para reemplazar a los plásticos sintéticos de uso común (Raza et al., 2018).

10. Objetivo general

- Establecer el potencial de las cepas nativas de bacterias de suelos agrícolas de Tecpán-Guatemala, Chimaltenango para la producción de bioplásticos microbianos a base de polihidroxiclcanoatos.

11. Objetivos específicos

- Determinar los géneros de bacterias del suelo capaces de producir gránulos de polihidroxiclcanoatos en medio mínimo mineral.
- Determinar el rendimiento de producción de polihidroxi butirato, a través del cultivo de las cepas microbianas en caldo mínimo de Davis.
- Establecer la capacidad de los microorganismos del suelo para degradar el polihidroxi butirato producido por las cepas microbianas.

12. Hipótesis

- Al menos una cepa bacteriana del suelo es capaz de producir gránulos de polihidroxi butirato en medio mínimo mineral.
- Al menos una cepa bacteriana es capaz de producir polihidroxi butirato en caldo mínimo de Davis.
- El polihidroxi butirato producido por al menos una cepa microbiana puede ser degradado por los microorganismos del suelo.

13. Materiales y métodos

13.1 Enfoque y tipo de investigación

13.1.1 Enfoque de la investigación: Este estudio posee un enfoque cuantitativo.

13.1.2 Tipo de la investigación: Descriptiva y explicativa.

13.2 Método: experimental

Se tomaron muestras de 500 g de suelo de 4 zonas agrícolas de Tecpán en bolsas plásticas estériles. Las muestras fueron transportadas al laboratorio del Departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia para buscar bacterias productoras de polihidroxibutirato (PHB). Las cepas que mostraron mayor capacidad para la producción de PHB fueron cultivadas en Medio Mínimo de Davis y se extrajo el PHB por la metodología de cloroformo/hipoclorito, el contenido de PHB fue medido espectrofotométricamente a través de la formación de ácido crotónico a partir de PHB. El PHB extraído de cada cepa fue utilizado para la producción de films bioplásticos y se puso a prueba la biodegradabilidad del material. Las cepas fueron identificadas por sus características macroscópicas, microscópicas, bioquímicas y por espectrometría de masas. Todas las evaluaciones y mediciones se hicieron a través de un diseño de bloques aleatorios completos de las cepas nativas a evaluar, con cinco repeticiones sucesivas. La variable de bloqueo la constituyeron las cepas de microorganismos.

13.3 Técnicas e instrumentos

Recolección de las muestras y aislamiento de los microorganismos

Se recolectaron muestras de suelo de 10.0 g en puntos al azar en regiones agrícolas de Tecpán-Guatemala, Chimaltenango en bolsas plásticas estériles. Se tomó 1.0 g de cada muestra y se disolvió en 10 ml de agua destilada estéril para preparar una dilución 10^{-1} (solución madre). De la solución madre se prepararon diluciones seriadas en solución salina al 0.9% hasta 10^{-8} . 0.1 ml de las diluciones 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} fueron esparcidas en cajas de Petri con agar nutritivo e incubadas a 37 °C por 24 horas. Las colonias aisladas fueron trasladadas a cajas de Petri con agar nutritivo e incubadas por 24 horas para purificarlas. Las cepas purificadas fueron sembradas en tubos con tapa de rosca con agar nutritivo, incubadas durante 24 horas a 37°C y luego se almacenaron a 4°C. Se realizaron resiembras de las cepas cada 4–6 semanas (Ali et al., 2017).

Tamizaje de cepas productoras de polihidroxibutirato

Las cepas microbianas aisladas y purificadas fueron trasladadas a Medio Mínimo de Davis por 2–3 días a 37 °C. Una vez desarrolladas, se realizaron preparaciones microscópicas con Negro de Sudán y con agua desmineralizada, dichas preparaciones se observaron con microscopía de luz y de contraste de fases. La cantidad de gránulos de PHB fue anotada cualitativamente en cruces. Las cepas que produjeron la mayor cantidad de gránulos de PHB fueron utilizadas en los pasos posteriores (Koller et al., 2017).

Producción y extracción de polihidroxibutirato en Caldo Mínimo de Davis

Las cepas microbianas fueron inoculadas en matraces de 500 ml con 200 ml de caldo mínimo de Davis, luego se incubaron a 32 °C durante 48 horas, con una agitación de 115 rpm. Para la extracción del PHB se utilizó la metodología de cloroformo-hipoclorito, después de la incubación, 25 ml de los caldos fueron trasladados a tubos cónicos y centrifugados a 6000 rpm durante 10 minutos, los sobrenadantes fueron descartados. Los precipitados fueron resuspendidos en 5 ml de hipoclorito de sodio al 4 % y 5 ml de cloroformo concentrado caliente (55 °C), luego fueron incubados a 37 °C durante una hora. Luego de la incubación, las suspensiones fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y al precipitado se le agregó 5 ml de cloroformo concentrado caliente y 5 ml de alcohol/acetona 1:1 para precipitar los gránulos. Las soluciones se dejaron a 30 °C para evaporar el sobrenadante y secar los gránulos. Finalmente se tomó el peso seco de cada muestra (Koller et al., 2017).

Análisis cuantitativo del PHB

Para la cuantificación del PHB se tomó 1 mg de cada muestra y se le agregó 10 ml de ácido sulfúrico concentrado, se dejó reaccionar durante 30 minutos a 95 °C en baño maría para la conversión del PHB a ácido crotónico. Posteriormente se dejó enfriar la solución y se transfirió 1 ml a una celda de cuarzo para la cuantificación espectrofotométrica a 235 nm. Se realizó una curva de calibración con PHB al 98% como estándar (Muhammadi et al., 2015).

Identificación de las cepas microbianas

La identificación se realizó de acuerdo al microorganismo por microscopia, características macroscópicas, pruebas bioquímicas y por proteómica a través de espectrometría de masas mediante la determinación de las proteínas ribosomales (MALDI-TOF). Para la microscopia se utilizaron tinciones de Gram, azul de lactofenol y verde de malaquita. Para las características macroscópicas, dependiendo del microorganismo se utilizó agar nutritivo, agar sangre, manitol sal, MacConkey, agar papa dextrosa. 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 (Muhammadi et al., 2015).

Degradación del PHB extraído por microorganismos del suelo

Para las pruebas de degradación, se utilizó medio libre de nitrógeno MLN (0.8 g K_2HPO_4 , 0.2g KH_2PO_4 , 0.05 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.025 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.05 g $CaCl_2$ y 15 g de agar por litro de agua) y MLN con 2.5 % p/v del PHB extraído. En cajas de Petri se colocó una capa de MLN y se dejó solidificar, luego se añadió otra capa delgada de MLN con PHB al 2.5%. Los microorganismos del suelo fueron inoculados en la superficie de los medios de cultivo por esparcido, posteriormente fueron incubados por 3–5 días a 37 °C para buscar halos de degradación (Akaraonye, Keshavarz, & Roy, 2010).

Instrumentos: aparatos y procedimientos técnicos.

Tabla 1

Operacionalización de las variables o unidades de análisis

Objetivos específicos	Variables o unidades de análisis que fueron consideradas	Forma en que se midieron y clasificaron
Determinar los géneros de bacterias del suelo capaces de producir gránulos de polihidroxialcanoatos en medio mínimo mineral.	Producción de gránulos de polihidroxialcanoatos	Cualitativa (categórica), cantidad de gránulos de polihidroxialcanoatos intracelulares
Determinar el rendimiento de producción de polihidroxibutirato, a través del cultivo de las cepas microbianas en caldo mínimo de Davis.	Producción de polihidroxibutirato	Cuantitativa, concentración de polihidroxibutirato.
Establecer la capacidad de los microorganismos del suelo para degradar el polihidroxibutirato producido por las cepas microbianas.	Capacidad degradadora de polihidroxibutirato	Cuantitativa, diámetros del halo de degradación (mm)

13.5 Procesamiento y análisis de la información

El estudio de la producción de PHA por cepas bacterianas y el de capacidad de degradación se hizo con cinco repeticiones sucesivas. Se realizó un análisis exploratorio de los datos obtenidos. Para los datos obtenidos en la producción de polihidroxibutirato y para la producción de enzimas degradadoras de polihidroxibutirato se hizo una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para evidenciar si existía o no diferencia entre el rendimiento de producción y la biodegradabilidad del

polímero, se realizó un análisis de varianza (anova) y una posterior prueba de comparación de medias de Duncan, con el 0.05 de significancia. Los resultados fueron procesados en Excel 2013 y el programa de uso libre R® (Zaferanloo, Bhattacharjee, Ghorbani, Mahon, & Palombo, 2014).

13.6 Coherencia de la propuesta de investigación

Tabla 2

Coherencia de la propuesta de investigación

Objetivos específicos	Métodos, técnicas, instrumentos	Alcances, hallazgos, conocimientos teóricos resultados o productos esperados (en función de cada objetivo)
Determinar los géneros de bacterias del suelo capaces de producir gránulos de polihidroxialcanoatos en medio mínimo mineral.	Cultivos bacterianos, purificación de cepas, microscopía óptica y de contraste de fases.	Identificación de cepas bacterianas capaces de producir gránulos de polihidroxibutirato intracelularmente.
Determinar el rendimiento de producción de polihidroxibutirato, a través del cultivo de las cepas microbianas en caldo mínimo de Davis.	Fermentación en caldo mínimo de Davis, extracción de polihidroxibutirato por la técnica hipoclorito-cloroformo, cuantificación espectrofotométrica.	Polihidroxibutirato purificado, porcentajes de peso seco del polímero por cepa bacteriana.
Establecer la capacidad de los microorganismos del suelo para degradar el polihidroxibutirato producido por las cepas microbianas.	Degradación del polímero en medios de cultivo. Medición de diámetros de los halos de degradación.	Tiempo de degradación de los polímeros producidos.

14. Vinculación, difusión y divulgación

Entre las actividades de vinculación se logró que la empresa “LABIMED” que se dedica al suministro de reactivos y equipo de laboratorio, a través de la Lcda. Otilia Vásquez, asesora científica, financiara la identificación de bacterias productoras de bioplásticos mediante técnicas de biología molecular (proteómica) por espectrometría de masas (MALDI-TOF).

Además entre las actividades de vinculación se participó en la capacitación ¿Cómo medir los datos de humedad relativa y presión de vapor? Impartido por Morpho New y además Biology Meets Programming: Bioinformatics for Beginners, las cuales han servido para mejorar las condiciones de laboratorio respecto a la incubación de las cepas bacterianas, además para conocer herramientas sobre la identificación de las cepas.

Por otro lado se participó en capacitaciones relacionadas con Propiedad Industrial, El impacto socio económico de las revoluciones científico tecnológicas”, “Ventajas del E-Commerce en el emprendimiento”, “Aprendiendo sobre la Titularidad de los Derechos de la Propiedad Intelectual” y “Capacitación sobre Herramientas de Adobe Reader para trabajar con archivos PDF” que apoyaron la ejecución del proyecto así también, cuando se realice en un futuro, a nivel de planta piloto en tanques de fermentación, la producción de bioplásticos bacterianos.

Como apoyo a la investigación, se participó en el Curso-Taller: “Herramientas para elaborar, revisar y gestionar manuscritos científicos en revistas de impacto – Nivel Avanzado” el cual sirvió para iniciar la elaboración del manuscrito científico, además para conocer herramientas estadísticas para el análisis de datos.

Se organizó y se implementó el taller virtual “Producción de polímeros biodegradables: Polihidroxialcanoatos”, con fecha 29 de abril de 2020 como parte de las actividades de difusión y divulgación, así como apoyo a la docencia de los cursos del área aplicada que se sirven a los estudiantes del 7º Ciclo de la carrera de Químico Biólogo en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (USAC). El número de asistentes a dicho taller fue de 50 estudiantes, en el se ayudó a concientizar sobre la responsabilidad en la utilización de plásticos biodegradables que impidan el deterioro y contaminación del medio ambiente.

15. Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:

Se logró aislar 30 cepas de bacterias a partir de las muestras de suelo recolectadas en sectores agrícolas de Tecpán Guatemala, Chimaltenango en medio mínimo mineral. Los gránulos de polihidroxialcanoatos fueron observados con microscopia de luz y de contraste de fases previo a la purificación de los mismos (Figura 2). De las 30 cepas aisladas se determinó que 18 resultaron

positivas para la producción de polihidroxialcanoatos, entre ellas se encontraron los siguientes géneros: *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Proteus* y *Staphylococcus* de los cuales los más prometedores fueron *Staphylococcus* y *Bacillus* (Tabla 1).

Se observó que las mayores concentraciones del polímero fueron producidas por la cepa DES304 (*Staphylococcus* sp.), DES309 (*Bacillus subtilis*) y DES301 (*Staphylococcus pasteurii*) (Figura 1). De las cepas que mostraron mayor rendimiento en la producción de polihidroxialcanoatos no se encontró diferencia entre la DES301 y la DES309 que produjeron en promedio 1.33 g/L del polímero. Además las cepas DES312, DES317, DES319 y DES320 tampoco mostraron diferencia estadística y produjeron en promedio 0.27 g/L del polímero (Tabla 1).

Respecto a la degradación de los polihidroxialcanoatos producidos por las cepas microbianas, se encontró a nivel de laboratorio, que los microorganismos del suelo son capaces de utilizar todos los polímeros evaluados en medio mínimo de Davis, suplementado con dichos polihidroxialcanoatos.

Tabla 1
Géneros del suelo aislados

Código	Cepa	Cantidad de polihidroxialcanoatos producido (g/L) ¹
DES301	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1.29 (0.17) ^a
DES302	Bacilos gram negativo	0.00
DES303	Bacilos gram negativo	0.00
DES304	<i>Staphylococcus</i> sp.	1.60 (0.03) ^b
DES305	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.00
DES306	<i>Bacillus</i> sp.	0.00
DES307	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	0.96 (0.26) ^c
DES308	<i>Achromobacter</i> sp.	0.00
DES309	<i>Bacillus subtilis</i>	1.37 (0.04) ^a
DES310	Bacilos gram negativo	0.44 (0.09) ^d
DES311	<i>Bacillus</i> sp.	0.45 (0.02) ^d
DES312	<i>Micrococcus luteus</i>	0.26 (0.06) ^e
DES313	<i>Bacillus</i> sp.	0.00
DES314	<i>Bacillus simplex</i>	0.09 (0.02) ^{gh}
DES315	<i>Staphylococcus</i> sp.	0.00
DES316	<i>Pantoea agglomerans</i>	0.16 (0.01) ^{gf}
DES317	Bacilos gram negativo	0.31 (0.02) ^e
DES318	<i>Micrococcus luteus</i>	0.00
DES319	<i>Proteus mirabilis</i>	0.22 (0.02) ^{ef}
DES320	<i>Achromobacter</i> sp.	0.32 (0.02) ^e
DES321	Bacilos gram negativo	0.11 (0.02) ^{gh}
DES322	<i>Bacillus</i> sp.	0.00
DES323	<i>Bacillus</i> sp.	0.06 (0.02) ^{gh}
DES324	<i>Bacillus subtilis</i>	0.00
DES325	<i>Bacillus cereus</i>	0.05 (0.02) ^{gh}
DES326	Bacilos gram negativo	0.00
DES327	Bacilos gram negativo	0.04 (0.02) ^h
DES328	<i>Bacillus</i> sp.	0.06 (0.02) ^{gh}
DES329	<i>Bacillus</i> sp.	0.00
DES330	<i>Bacillus subtilis</i>	0.06 (0.02) ^{gh}

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

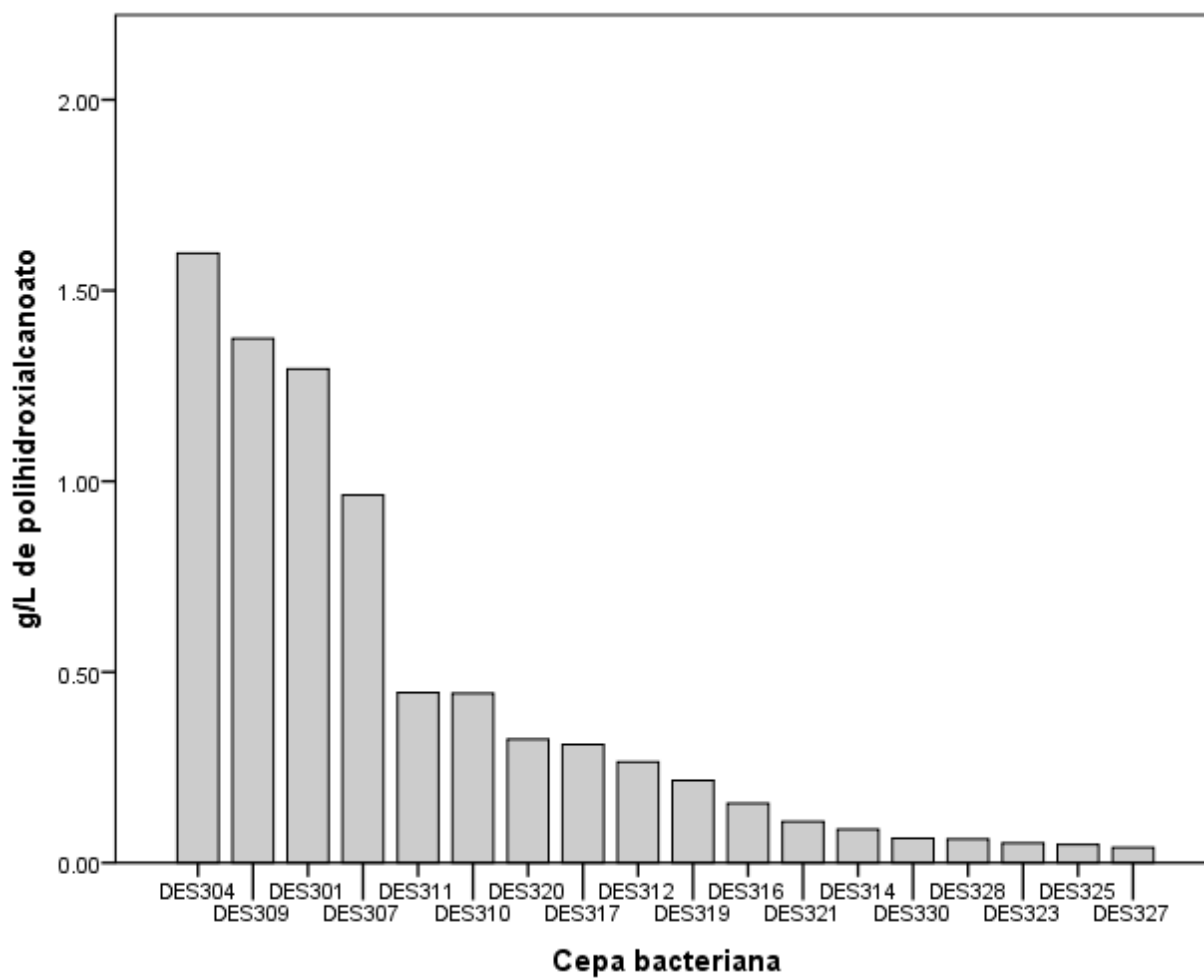


Figura 1. Producción de polihidroxicanoatos, valores medios por cepa bacteriana. Los resultados se muestran en gramos por litro.

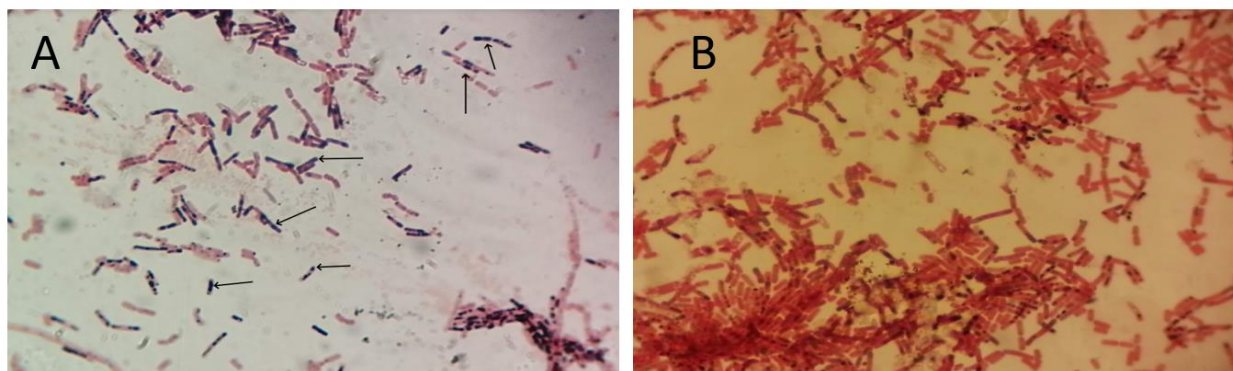


Figura 2. Microscopias realizadas para la detección de PHAs. Tinciones con Negro Sudán de la cepa DES310 (A) y DES311 (B) cultivadas en Medio Mínimo Mineral. Las áreas de color oscuro corresponden a los gránulos de PHA.

16. Análisis y discusión de resultados

Se aislaron 30 cepas microbianas de los suelos agrícolas de Tecpán Guatemala, Chimaltenango de las cuales 18 resultaron positivas para la producción de polihidroxicanoatos al desarrollarse en Medio Mínimo de Davis. Entre los géneros encontrados esta *Achromobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Proteus* y *Staphylococcus*. Asimismo se encontró que las cepas DES301 (*Staphylococcus pasteurii*), DES304 (*Staphylococcus* sp.) y DES309 (*Bacillus subtilis*) produjeron las mayores concentraciones del polímero, con una media de 1.29 (0.17) g/L, 1.60 (0.03) g/L y 1.37 (0.04) g/L respectivamente. Además los polímeros producidos por todas las cepas microbianas mostraron ser degradables al ser utilizados como sustrato por los microorganismos del suelo.

Se sabe que los polihidroxicanoatos son producidos por muchas bacterias gram positivas y gram negativas así como también por arqueas cuando estos microorganismos son expuestos a condiciones de estrés con nutrientes limitados. En este sentido en algunos estudios donde se han utilizado medios minerales como sustrato se han reportado rendimientos promedio de 1.5 g/L de polihidroxicanoatos con *Cupriavidus necator* (Al Battashi, Al-Kindi, Gupta, & Sivakumar, 2020) estos resultados son similares a los producidos por la cepa DES304 correspondiente a *Staphylococcus* sp. que al desarrollarse en Medio Mínimo de Davis, el cual está constituido principalmente por sales que favorecen las condiciones de estrés (Dextrosa 1.0 g/L, sulfato de amonio 1.0 g/L, fosfato dipotásico 7 g/L, fosfato de potasio 2 g/L, citrato de sodio 0.5 g/L, sulfato de magnesio 0.1 g/L) mostró una producción de 1.60 g/L en promedio. Múltiples especies de *Staphylococcus* han sido reportadas como productoras de PHA principalmente P(3HB), su capacidad de crecimiento en condiciones anóxicas, producción de distintas enzimas como lipasas, la formación de biofilms y la formación de pigmentos le permiten adaptarse a múltiples sustratos y la convierten en un microorganismo de interés para la producción de PHA (Valappil, Boccaccini, Bucke, & Roy, 2007). Durante este estudio se encontraron tres cepas del género *Staphylococcus* (DES301, DES304, DES307) las cuales evidenciaron los mayores valores medios de producción por litro de sustrato.

En otros estudios se ha reportado al género *Bacillus* como productor de múltiples compuestos benéficos para el ser humano, es considerado una fábrica de enzimas y de sustancias de interés industrial (Westers et al., 2003). El género *Bacillus* ha sido utilizado también para la producción de PHA principalmente a partir de residuos agrícolas tales como almidón, aguas servidas, desechos de frutas y melazas de caña donde se han reportado rendimientos de hasta 3 g/L del polímero. En este estudio se encontró que la cepa DES309 correspondiente a *Bacillus subtilis* presentó un rendimiento promedio de 1.37 g/L al utilizar Medio Mínimo de Davis como sustrato, lo cual es similar al rendimiento que presentan otras cepas de *Bacillus* en sustratos como pectinas o almidón (Santimano, Prabhu, & Garg, 2009). Asimismo *Bacillus subtilis* es un microorganismo de interés para la producción de PHA ya que es considerado seguro (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos y también es importante por su uso a gran escala de proteínas recombinantes, aminoácidos y compuestos químicos. Otras cepas de *Bacillus*, DES311, DES314, DES323, DES325, DES328 y DES330 fueron encontradas como productoras de PHA, estas podrían ser de interés industrial debido a que este género produce un amplio espectro de PHA como P(3HB-co-3HV), P(3HB-co-3HHx), P(3HB-co-4HB-co-3HHx) y P(3HB-co-6HHx-co-3HHx) dependiendo tanto de la cepa como del sustrato por lo que se recomendaría realizar más estudios sobre sustratos y estructuras de los polímeros producidos (Tsuge, Hyakutake, & Mizuno, 2015).

Aunque las cepas de *Bacillus* reportadas mostraron bajos rendimientos de producción de PHA esto pudo ser debido al sustrato empleado, sin embargo el género *Bacillus* ha sido puesto en el foco de atención por su capacidad para producir PHA con propiedades únicas, por ejemplo en un estudio se reportó que la cepa UW85 de *B. cereus* pudo producir copolímeros al utilizar sustratos combinados donde se evidenció la producción de terpolímeros de 3HB, 3HV y 6HHx al adicionar caprolactona como única fuente de carbono a medios minerales (Labuzek & Radecka, 2001). En contraste el Medio Mínimo de Davis que fue utilizado en este trabajo tiene en su composición glucosa como fuente de carbono lo que podría limitar la síntesis de PHA. Estudios han reportado la producción de polihidroxibutirato (PHB) cuando se utiliza glucosa como única fuente de carbono y a concentraciones bajas se ha evidenciado la producción de copolímeros de 3HB y 3HHx (Katircioglu, Aslim, Yüksesdao, Mercan, & Beyatli, 2003). Estudios recientes también han

mostrado información relevante sobre *B. cereus*, del que se ha reportado que al cultivarlo en sustratos con fuentes de carbono estructuralmente no relacionadas tales como la fructosa, sacarosa y el gluconato, da como resultado la incorporación de 4HB con los dos primeros sustratos y 4HB y 3HV al incorporar gluconato en el medio. Así, aunque se sabe que la limitación de nitrógeno (N), fósforo (P) y oxígeno en las condiciones de cultivo influye en la producción de PHA, los medios limitadores de potasio e incluso glucosa llevan a la producción de copolímeros que contienen monómeros de 3HB y 3HV en contraste con solo PHB (Valappil, Rai, Bucke, & Roy, 2008).

Respecto al género *Achromobacter* pocos estudios la han reportado como productora de PHA, Dionisi, Majone, Vallini, Di Gregorio y Beccari (2006) lo aislaron de aguas residuales junto con otras bacterias productoras de PHA, sin embargo no encontraron ninguna actividad en este género al utilizar ácidos orgánicos y acetato como fuente de carbono. Asimismo Dias y colaboradores (2006) al utilizar almidón de yuca, suero de queso, xilosa, melazas y malta tampoco encontraron actividad en *Achromobacter*. Sin embargo Clifton-García, González-Reynoso, Robledo-Ortiz, Villafañá-Rojas y González-García (2020) encontraron que *Achromobacter mucicolens* produce PHB a partir de suero de queso, melazas, bagazo de agave, pulpa de mango y otros sustratos ricos en glucosa. Asimismo la cepa DES320 correspondiente a *Achromobacter* produjo 0.36 g/L de PHA en Medio Mínimo de Davis el cual utiliza glucosa en su composición.

Otros géneros que fueron encontrados como productores de PHA fueron *Micrococcus* (DES312), *Proteus* (DES319) y *Pantoea* (DES316), aunque la producción media de polímero que sintetizaron fue baja (0.26 g/L, 0.22 g/L y 0.16 g/L respectivamente) pueden ser de interés industrial y podrían mejorar su eficiencia al probarlos en otros sustratos. El género *Micrococcus* ha sido considerado de importancia para la producción de PHA principalmente cuando se utilizan condiciones aeróbicas de producción, además porque los polímeros que producen son mayoritariamente P(3HB-co-3HV) que poseen propiedades físicas parecidas a las de la mayoría de plásticos de uso convencional (Ghosh & Chakraborty, 2020). Respecto a *Proteus* no se han encontrado cepas que produzcan cantidades considerables de PHA bajo ningún sustrato, Sangkharak y Prasertsan (2012) lograron producir 0.22 g/L de PHA utilizando melazas lo cual es equivalente a lo que produjo la cepa DES319 en Medio Mínimo de Davis. Asimismo no se han reportado especies de *Pantoea* productoras de PHA por lo que aunque la cepa DES316 resultó positiva se recomendaría realizar

más estudios para determinar si la eficacia puede aumentarse con otros sustratos y para determinar la estructura de los PHA que produce (Nitschke, Costa, & Contiero, 2011).

Finalmente se logró observar que al utilizar los PHA producidos como sustrato para microorganismos del suelo estos fueron degradados parcialmente, lo cual se evidenció cualitativamente con halos translucidos alrededor de las colonias microbianas. De esta forma se pone en evidencia que los polímeros pueden ser utilizados como sustratos por otros microorganismos por lo que se recomendaría hacer evaluaciones cuantitativas respecto a pérdida de masa y de propiedades físicas de los PHA luego de enfrentarlos a microorganismos de los sistemas naturales. En este sentido Mergaert, Webb, Anderson, Wouters y Swings (1993) encontraron que al enterrar materiales elaborados a partir de PHA estos perdían sus propiedades físicas y reducían su masa a diferentes temperaturas (15°, 28° y 40°) y además lograban degradarse totalmente luego de 200 días, es por ello que en las pruebas llevadas a cabo en esta investigación solo se observó una hidrólisis parcial.

La mayoría de cepas microbianas aisladas en esta investigación tienen potencial como productoras de PHA para uso industrial y para ser utilizados como una alternativa a los plásticos convencionales. Los valores medios producidos son prometedores y comparables a otros reportados en la literatura, sin embargo aún hacen falta estudios para determinar los mejores sustratos que permitan mejorar las eficiencias así como determinar el tipo de PHA que produce cada microorganismo.

17. Conclusiones

- Las cepas bacterianas aisladas de suelos agrícolas de Tecpán-Guatemala, Chimaltenango productoras de gránulos de PHA pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Pantoea* y *Proteus*.
- Se encontró que la cepa DES301 produjo en promedio 1.29 (0.17) g/L de PHA, la DES304 1.60 (0.03) g/L, la DES307 0.96 (0.26) g/L, la DES309 1.37 (0.04) g/L, la DES310 0.44 (0.09) g/L, la DES311 0.45 (0.02) g/L, la DES312 0.26 (0.06) g/L, la DES314 0.09 (0.02) g/L, la DES316 0.16 (0.01) g/L, la DES317 0.31 (0.02) g/L, la DES319 0.22 (0.02) g/L, la DES320

0.32 (0.02) g/L, la DES321 0.11 (0.02) g/L, la DES323 0.06 (0.02) g/L, la DES325 0.05 (0.02) g/L, la DES327 0.04 (0.02) g/L, la DES328 0.06 (0.02) g/L y la DES330 0.06 (0.02) g/L.

- Los microorganismos del suelo lograron degradar parcialmente los polímeros de PHA producidos por las cepas aisladas.

18. Impacto esperado

Este estudio no solo demuestra y propone el potencial de las cepas microbianas nativas como productoras de bioplásticos, sino también expone una alternativa biodegradable a los plásticos petroquímicos que se utilizan en Guatemala, principalmente como materiales de empaque. Además genera soluciones a la contaminación del agua, disminución de emisiones tóxicas al ambiente y preservación de la vida submarina. También aporta soluciones que encaminan al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible y a la campaña Mares Limpios de la ONU.

19. Referencias

- Agus, J., Kahar, P., Abe, H., Doi, Y., & Tsuge, T. (2006). Molecular weight characterization of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. *Polymer Degradation and Stability*, 91(5), 1138–1146. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.07.006
- Akaraonye, E., Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85, 732–743. doi: 10.1002/jctb.2392
- Akiyama, M., Tsuge, T., & Doi, Y. (2003). Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. *Polymer Degradation and Stability*, 80, 183–194. doi: 10.1016/S0141-3910(02)00400-7
- Al-Battashi, H., Al-Kindi, S., Gupta, V. K., & Sivakumar, N. (2020). Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production Using Volatile Fatty Acids Derived from the Anaerobic Digestion of Waste Paper. *Journal of Polymers and the Environment*, 1-10. doi: 10.1007/s00253-013-5323-x
- Albuquerque, P., & Malafaia, C. (2018). Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(A), 615–625. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026

- Ali, W., Zaki, N., & Obiad, S. (2017). Production of bioplastic by bacteria isolated from local soil and organic wastes. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 1012–1017.
- Antipov, E., Dubinsky, V., Rebrov, A., Nekrasov, Y., Gordeev, S., & Ungar, G. (2006). Strain-induced mesophase and hard-elastic behaviour of biodegradable polyhydroxyalkanoates fibers. *Polymer*, 47(15), 5678–5690. doi: 10.1016/j.polymer.2005.04.111
- Azurdia, C., García, F. y Ríos, M. (2008). Guatemala y su biodiversidad. Un enfoque histórico, cultural, biológico y económico. Guatemala: Consejo Nacional de Áreas Protegidas
- Barnes, D. K. A., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364, 1985–1998. doi: 10.1098/rstb.2008.0205
- Blessing, G. (2018). Guatemala se une a la campaña Mares Limpios. Noticias ONU. Recuperado de <https://news.un.org/es/story/2018/10/1443532>
- Bohmert, K., Balbo, I., Steinbüchel, A., Tischendorf, G., & Willmitzer, L. (2002). Constitutive Expression of the β -Ketothiolase Gene in Transgenic Plants. A Major Obstacle for Obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants. *Plant Physiology*, 128(4), 1282–1290. doi: 10.1104/pp.010615
- Braunegg, G., Bona, R., Schellauf, F., & Wallner, E. (2002). Polyhydroxyalkanoates (PHAs): Sustainable biopolyester production. *Polimery*, 47(7–8), 479–484.
- Calabrò, P. S., & Grosso, M. (2018). Bioplastics and waste management. *Waste Management*, 78, 800–801. doi: 10.1016/j.wasman.2018.06.054
- Carrasco, F., Dionisi, D., Martinelli, A., & Majone, M. (2006). Thermal stability of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Polymer Science*, 100(3), 2111–2121. doi: 10.1002/app.23586
- Chen, G., & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565–6578. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.036
- Clifton-García, B., González-Reynoso, O., Robledo-Ortiz, J. R., Villafañá-Rojas, J., & González-García, Y. (2020). Forest soil bacteria able to produce homo and copolymers of polyhydroxyalkanoates from several pure and waste carbon sources. *Letters in Applied Microbiology*, 70(4), 300–309. doi: 10.1111/lam.13272
- Contreras, L. (2018). Guatemala se compromete a frenar contaminación en océanos causada por desecho de material plástico. The World News. Recuperado de <https://theworldnews.net/gt-news/guatemala-se-compromete-a-frenar-contaminacion-en-oceanos-causada-por-desecho-de-material-plastico>

- Cox, K., Covernton, G., Davies, H., Dower, J., Juanes, F., & Dudas, S. (2019). Human Consumption of Microplastics. *Environmental Science and Technology*, 53, 7068–7074. research-article. doi: 10.1021/acs.est.9b01517
- Deepa, R., & Vidhya, A. (2018). Production and characterization of Polyhydroxybutyrate by *Nocardia* sp. RD13 isolated from agriculture rhizosphere soil. *International Journal of Research in BioSciences*, 7(1), 45–51.
- Dias, J. M. L., Lemos, P. C., Serafim, L. S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M. G. E., ... Reis, M. A. M. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product. *Macromolecular Bioscience*, 6(11), 885–906. doi: 10.1002/mabi.200600112
- Dias, J. M., Lemos, P. C., Serafim, L. S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque, M. G., ... & Reis, M. A. (2006). Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromolecular bioscience*, 6(11), 885-906. doi: 10.1002/mabi.200600112
- Dionisi, D., Majone, M., Vallini, G., Di Gregorio, S., & Beccari, M. (2006). Effect of the applied organic load rate on biodegradable polymer production by mixed microbial cultures in a sequencing batch reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 93(1), 76-88. doi: 10.1002/bit.20683
- Emadian, S., Onay, T., & Demirel, B. (2017). Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management*, 59, 526–536. doi: 10.1016/j.wasman.2016.10.006
- Filatov, V., Zaitseva, N., & Larionova, A. (2018). State Management of Plastic Production Based on the Implementation of UN Decisions on Environmental Protection. *Ekoloji*, 27(106), 635–642.
- Getachew, A., & Woldesenbet, F. (2016). Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Research Notes*, 9(1), 1–9. doi: 10.1186/s13104-016-2321-y
- Geyer, R., Jambeck, J., & Law, K. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7), 25–29. doi: 10.1126/sciadv.1700782
- Ghosh, S., & Chakraborty, S. (2020). Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) from aerobic granules of refinery sludge and *Micrococcus aloeverae* strain SG002 cultivated in oily wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 155, 105091. doi: 10.1016/j.ibiod.2020.105091
- Gross, R. A., & Kalra, B. (2002). Biodegradable Polymers for the Environment. *Science*, 297(5582), 803–808. doi: 10.1126/science.297.5582.803

- Gunaratne, L., & Shanks, R. (2005). Melting and thermal history of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) using step-scan DSC. *Thermochimica Acta*, 430(1–2), 183–190. doi: 10.1016/j.tca.2005.01.060
- Hahladakis, J., Velis, C., Weber, R., Iacovidou, E., & Purnell, P. (2018). An overview of chemical additives present in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179–199. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.10.014
- Haider, T. P., Völker, C., Kramm, J., Landfester, K., & Wurm, F. R. (2019). Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie - International Edition*, 58(1), 50–62. doi: 10.1002/anie.201805766
- Hoornweg, D., Bhada-Tata, P., & Kennedy, C. (2013). Waste production must peak this century. *Nature*, 502, 615–617. doi: 10.1038/502615a
- Jiang, X., Ramsay, J., & Ramsay, B. (2006). Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), 212–219. doi: 10.1016/j.mimet.2006.03.015
- Kalia, V. (2019). *Biotechnological Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Singapore: Springer Nature Singapore. doi: 10.1007/978-981-13-3759-8
- Katircioglu, H., Aslim, B., Yüksekdao, 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.
- Keshavarz, T., & Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 321–326. doi: 10.1016/j.mib.2010.02.006
- Koller, M. (2019). Switching from petro-plastics to microbial polyhydroxyalkanoates (PHA): the biotechnological escape route of choice out of the plastic predicament?. *The EuroBiotech Journal*, 3(1), 32–44. doi: 10.2478/ebtj-2019-0004
- Koller, M., Marsalek, L., Dias, M., & Braunegg, G. (2017). Producing Microbial Polyhydroxyalkanoate (PHA) Biopolyesters in a Sustainable Manner. *New Biotechnology*, 37(A), 24–38. doi: 10.1016/j.nbt.2016.05.001
- Kovalcik, A., Meixner, K., Mihalic, M., Zeilinger, W., Fritz, I., Fuchs, W., ... Drosig, B. (2017). Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 497–504. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.04.054
- Kovalcik, A., Obruca, S., Fritz, I., & Marova, I. (2019). Polyhydroxyalkanoates: Their Importance and Future. *BioResources*, 14(2), 2468–2471.

- Kumar, P., & Kim, B. S. (2018). Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products. *Bioresource Technology*, 269, 544–556. doi: 10.1016/j.biortech.2018.08.120
- Łabuzek, S., & Radecka, I. (2001). Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *Journal of Applied Microbiology*, 90(3), 353–357. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01253.x
- Labuzek, S., & Redecka, I. (2001). Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85. *Journal of Applied Microbiology*, 90(3), 353–357. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01253.x
- Lemoigne, M. (1926). Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid. *Bulletin de La Société Chimique de France*, 8, 770–782.
- Leong, Y., Show, P., Lan, J., Loh, H., Lam, H., & Ling, T. (2017). Economic and environmental analysis of PHAs production process. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 19(7), 1941–1953. doi: 10.1007/s10098-017-1377-2
- Li, R., Gu, P., Fan, X., Shen, J., Wu, Y., Huang, L., & Li, Q. (2018). Isolation and Characterization of PHA-Producing Bacteria from Propylene Oxide Saponification Wastewater Residual Sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(1), 233–244. doi: 10.1007/s12010-018-2731-5
- Li, Y., Wang, X., Fu, W., Xia, X., Liu, C., Min, J., ... Crittenden, J. C. (2019). Interactions between nano/micro plastics and suspended sediment in water: Implications on aggregation and settling. *Water Research*, 161, 486–495. doi: 10.1016/j.watres.2019.06.018
- Luckachan, G., & Pillai, C. (2011). Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. *Journal of Polymers and the Environment*, 19, 637–676. doi: 10.1007/s10924-011-0317-1
- Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G., & Olivera, E. R. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 251–260. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00040-7
- Madison, L., & Huisman, G. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21–53.
- Masood, F., Yasin, T., & Hameed, A. (2015). Polyhydroxyalkanoates – What are the uses? Current challenges and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 514–521. doi: 10.3109/07388551.2014.913548
- 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. doi: 10.1039/c3ta12555f

- 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. doi: 10.1080/17518253.2015.1109715
- Nigmatullin, R., Thomas, P., Lukasiewicz, B., Puthussery, H., & Roy, I. (2015). Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(7), 1209–1221. doi: 10.1002/jctb.4685
- Nitschke, M., Costa, S. G., & Contiero, J. (2011). Rhamnolipids and PHAs: Recent reports on Pseudomonas-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochemistry*, 46(3), 621–630. doi: 10.1016/j.procbio.2010.12.012
- Noda, I., Lindsey, B., & Caraway, D. (2010). *Nodax™ Class PHA Copolymers: Their Properties and Applications*. In G. G.-Q. Chen (Ed.), *Plastics from Bacteria* (1st ed., pp. 237–255). New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-03287-5
- Padermshok, A., Sato, H., Katsumoto, Y., Ekgasit, S., Noda, I., & Ozaki, Y. (2004). Thermally induced phase transition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) investigated by two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 36, 241–249. doi: 10.1016/j.vibspec.2003.11.016
- Park, S., Choi, J., & Lee, S. (2005). Short-chain-length polyhydroxyalkanoates: Synthesis in metabolically engineered Escherichia coli and medical applications. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(1), 206–215.
- Peters, V., & Rehm, B. (2005). In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthases. *FEMS Microbiology Letters*, 248(1), 93–100. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.027
- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. R., & Nicolaus, B. (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by *Archaea*. *Archaea*, 2011, 1–13. doi: 10.1155/2011/693253
- Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. (2018). Objetivos de Desarrollo Sostenible. Recuperado de <http://www.gt.undp.org/content/guatemala/es/home/sustainable-development-goals.html>
- Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 126, 45–56. doi: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001

- Sangkharak, K., & Prasertsan, P. (2012). Screening and identification of polyhydroxyalkanoates producing bacteria and biochemical characterization of their possible application. *The Journal of general and applied microbiology*, 58(3), 173-182. doi: 10.2323/jgam.58.173
- Santimano, M. C., Prabhu, N. N., & Garg, S. (2009). PHA production using low-cost agro-industrial wastes by *Bacillus* sp. strain COL1/A6. *Research Journal of Microbiology*, 4, 89-96. doi: 10.3923/jm.2009.89.96
- Shang, L., Jiang, M., & Chang, H. (2003). Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnology Letters*, 25(17), 1415–1419. doi: 10.1023/A:1025047410699
- Steinbüchel, A., & Lütke-Eversloh, T. (2003). Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16(2), 81–96. doi: 10.1016/S1369-703X(03)00036-6
- Strungaru, S., Jijie, R., Nicoara, M., Plavan, G., & Faggio, C. (2019). Micro- (nano) plastics in freshwater ecosystems: abundance, toxicological impact and quantification methodology. *Trends in Analytical Chemistry*, 110, 116–128. doi: 10.1016/j.trac.2018.10.025
- Tsuge, T., Hyakutake, M., & Mizuno, K. (2015). Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(15), 6231-6240. doi: 10.1007/s00253-015-6777-9
- Tsuge, T., Yano, K., Imazu, S., Numata, K., Kikkawa, Y., Abe, H., ... Doi, Y. (2005). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases. *Macromolecular Bioscience*, 5(2), 112–117. doi: 10.1002/mabi.200400152
- Valappil, S. P., Boccaccini, A. R., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. *Antonie van leeuwenhoek*, 91(1), 1-17. doi: 10.1007/s10482-006-9095-5
- Valappil, S. P., Rai, R., Bucke, C., & Roy, I. (2008). Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Bacillus cereus* SPV under varied limiting conditions and an insight into the biosynthetic genes involved. *Journal of applied microbiology*, 104(6), 1624-1635. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03678.x
- Verma, R., Vinoda, K. S., Papireddy, M., & Gowda, A. N. S. (2016). Toxic Pollutants from Plastic Waste- A Review. *Procedia Environmental Sciences*, 35, 701–708. doi: 10.1016/j.proenv.2016.07.069
- Wagener, M., Scherer, C., Alvarez-Muñoz, D., Brennholt, N., Bourrain, X., Buchinger, S., ... Reifferscheid, G. (2014). Microplastics in freshwater ecosystems: what we know and what

we need to know. *Environmental Sciences Europe*, 26(12), 29–38. doi: 10.1016/0163-8343(83)90040-3

Westers, H., Dorenbos, R., Van Dijk, J. M., Kabel, J., Flanagan, T., Devine, K. M., ... & Quax, W. J. (2003). Genome engineering reveals large dispensable regions in *Bacillus subtilis*. *Molecular Biology and Evolution*, 20(12), 2076-2090. doi: 10.1093/molbev/msg219

Zaferanloo, B., Bhattacharjee, S., Ghorbani, M., Mahon, P., & Palombo, E. (2014). Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. *BMC Microbiology*, 14(55), 1–12. doi: 10.1186/1471-2180-14-55.

Zhu, Y., Romain, C., & Williams, C. K. (2016). Sustainable polymers from renewable resources. *Nature*, 540, 354–362. doi: 10.1038/nature21001

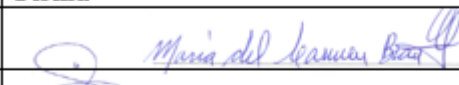
Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(1), 5–21. doi: 10.1016/S0169-409X(01)00218-6

Zubris, K., & Richards, B. (2005). Synthetic fibers as an indicator of land application of sludge. *Environmental Pollution*, 138(2), 201–211. doi: 10.1016/j.envpol.2005.04.013

20. Apéndice

Listado de los integrantes del equipo de investigación

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Lcda. María del Carmen Bran González	
Lic. Osberth Morales Esquivel	
Ing. Agr. Gustavo Álvarez	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Ricardo Andres Figueroa Ceballos	Investigador	20151723	X		

Guatemala, 08 de enero de 2021.



María del Carmen Bran González

Coordinadora

Proyecto de Investigación

Ing. Agr. Augusto Saúl Guerra Gutiérrez
Coordinador
Programa Universitario de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas