

INFORME FINAL

Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente –PUIRNA–.
Programa universitario de investigación de la Digi

Producción de plásticos biodegradables en Guatemala (fase II): bioplásticos de bacterias
halófilas nativas a partir de residuos agrícolas.
Nombre del proyecto de investigación

AP21-2021

Código del proyecto de investigación

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas –IIQB–
Unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

Lcda. María del Carmen Bran González – coordinadora
M.A. Ricardo Andrés Figueroa Ceballos
Lic. Osberth Morales Esquivel
Ing. Agr. Gustavo Álvarez

Nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala, 10 de enero de 2022

Lugar y fecha

Contraportada

Autoridades

Dr. Hugo Rene Pérez Noriega
Director General de Investigación

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

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

Autores

Lcda. María del Carmen Bran González – coordinadora

M.A. Ricardo Andrés Figueroa Ceballos

Colaboradores:

Lic. Osberth Morales Esquivel – Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

Ing. Agr. Gustavo Álvarez – Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2021. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través del código AP21-2021 en el Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.



INFORME FINAL

1 Índice general

2	Resumen y palabras claves	4
3	Introducción.....	5
4	Planteamiento del problema	8
5	Delimitación en tiempo y espacio	10
6	Marco teórico.....	10
7	Estado del arte	17
8	Objetivos.....	20
9	Hipótesis	20
10	Materiales y métodos	20
11	Resultados y discusión.....	25
11.1	Resultados:.....	25
12	Referencias.....	34
13	Apéndice	43
14	Aspectos éticos y legales	43
15	Vinculación	43
16	Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual	43
17	Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:.....	46
18	Orden de pago final.....	46
19	Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación:	47
20	Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario	47
21	Visado de la Dirección General de Investigación	47

Índice de tablas

Tabla 1	26
Tabla 2	27

Índice de figuras

Figura 1	28
Figura 2	29
Figura 3	30
Figura 4	31

2 Resumen y palabras claves

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

Palabras clave: Biopolímeros, biprocesamiento, desechos plásticos, extremófilos, polihidroxibutirato.

Abstract and keyword

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

Keywords: Biopolymers, biprocessing, plastic waste, Extremophiles, Polyhydroxybutyrate.

3 Introducción

Los productos plásticos son ampliamente utilizados en nuestra vida diaria, su uso en textiles, electrodomésticos, productos para el cuidado de la salud, juguetes y en materiales de empaque es inevitable (Thakur et al., 2018; Wang et al., 2016). Desde el año 1940, los plásticos sintéticos o petroquímicos han revolucionado a la sociedad, debido a sus propiedades como la fuerza mecánica,

su ligereza, flexibilidad y durabilidad, además de ser un material de bajo costo y con la capacidad de reemplazar productos hechos de otros materiales como el papel, el vidrio y los metales (Hottle, Bilec, & Landis 2013). En el año 2015 a nivel mundial la producción de plástico se incrementó a 300 millones de toneladas (Mellinas et al., 2016) y de acuerdo a Mekonnen, Mussone, Khalil y Bressler (2013) al menos 34 millones de toneladas de desechos plásticos son generados por año, de los cuales el 93% llega a los océanos y vertederos.

La acumulación de los plásticos en los ecosistemas se debe a que su proceso de degradación es difícil, además durante dicho proceso se emiten grandes cantidades de CO₂ y otros compuestos tóxicos (Emadian, Onay, & Demirel, 2017). Se estima que aproximadamente 2.8 kg de CO₂ se producen al quemar 1 kg de plástico (Burgos, Valdés, & Jiménez, 2016). En este sentido los biopolímeros han surgido a partir del impacto ambiental que generan los plásticos petroquímicos no biodegradables. Los bioplásticos son un tipo de biopolímero que se compone principalmente de celulosa, almidones o azúcares los cuales son compuestos renovables en la naturaleza ya que son descompuestos por microorganismos como bacterias, algas y hongos (Meeks, Hottle, Bilec, & Landis, 2015; Kale et al., 2007). El proceso de degradación de los bioplásticos también depende de las condiciones ambientales como la temperatura, el agua, el oxígeno y de la composición química del polímero. Asimismo, en la degradación de los bioplásticos, la emisión de CO₂ es muy baja lo que es favorable para un compuesto con propiedades similares a los plásticos petroquímicos (Scaffaro, Botta, Maio, Mistretta, & La Mantia, 2016).

Se espera que los biopolímeros complementen y reemplacen gradualmente algunos de los materiales basados en aceites fósiles (Elsawy, Kim, Park, & Deep, 2017). Los esfuerzos de investigación en los últimos años han generado un nivel significativo de éxito técnico y comercial hacia estos materiales de base biológica. Sin embargo, la aplicación extensiva de los bioplásticos aún se ve desafiada por una o más de sus posibles limitaciones inherentes, como la pobre procesabilidad, fragilidad, hidrofobicidad, pobre barrera contra la humedad y los gases, baja compatibilidad, pobres propiedades eléctricas, térmicas y físicas y principalmente por los elevados costos de producción (Mekonnen et al., 2013).

Una clase especial de bioplásticos llamados polihidroxicanoatos (PHA) han sido unos de los más prometedores y podrían ser un candidato potencial para reemplazar algunos plásticos petroquímicos debido a su naturaleza biodegradable y propiedades físicas (Tortajada, Ferreira, & Prieto, 2013). Los PHA muestran algunas similitudes con los conocidos polímeros basados en aceites fósiles como el polietileno de baja densidad y el polipropileno, además la eliminación de sus residuos los hace atractivos en la búsqueda de un sustituto que cumpla las características de los plásticos petroquímicos y no sea nocivo con al medio ambiente (Du, Sabirova, Soetaert, & Ki Carol Lin, 2012).

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

A pesar de sus ventajas los PHA producidos a partir de fuentes de carbono estándar tienen ciertas limitaciones como el alto costo de producción. En este sentido los residuos agrícolas representan una fuente de carbono renovable y poco utilizada que debería considerarse como materia prima para otros procesos industriales en lugar de ser desechos (Sadh, Duhan, & Duhan, 2018). Según Choi y Lee (1999) el uso de fuentes de carbono baratas y renovables, como los desechos y subproductos agroindustriales pueden contribuir a una reducción de hasta un 40-50% en el costo total de producción de PHA. Otros parámetros que también influyen en el costo total de producción son cepas bacterianas, estrategias de fermentación, procesos de recuperación y falta de plantas productoras locales en cada país (Santimano, Prabhu & Garg, 2009; Kovalcik et al., 2017).

Los halófilos han sido estudiados en los últimos años para la producción de PHA. Estos representan un grupo de microorganismos distintivo y diverso que tiene la habilidad de sobrevivir en hábitats hipersalinos como lagos, salinas, marismas y suelos salinos. Las bacterias halófilas son una

potencial fuente de biosurfactantes, carotenoides, bacteriodopsinas y la mayoría tiene la capacidad de acumular gránulos de PHA intracelulares (Edbeib, Wahab, & Huyop, 2016). Su capacidad para desarrollarse en condiciones con alta salinidad disminuye los requerimientos de esterilidad y problemas de contaminación durante la fermentación y por lo tanto aumenta los costos de producción, por lo que han sido consideradas como prometedoras y rentables para la producción de PHA (Mitra, Xu, Xiang, & Han, 2020).

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

4 Planteamiento del problema

Los plásticos petroquímicos son fundamentales en casi todas las actividades del ser humano, algunas incluso dependen completamente de estos materiales, debido a su versatilidad, durabilidad y bajo costo (Arutchelvi et al., 2008). Sin embargo, es precisamente esta durabilidad la que ha resultado en la persistencia de residuos plásticos que han llevado a un impacto ambiental negativo. Como están compuestos de polímeros inertes, hidrófobos, de cadena larga y de alto peso molecular, los plásticos son altamente resistentes a la degradación en condiciones ambientales naturales, lo que resulta en la acumulación de grandes cantidades de plásticos no degradables en el medio ambiente cada año (Lee & Liew, 2020).

Los plásticos no degradables se descomponen en microplásticos que pueden tardar miles de años en descomponerse. Al menos 8 millones de toneladas de desechos plásticos terminan en ambientes marinos, matando a la vida silvestre por enredos o ingestión, contaminando las reservas de peces y mariscos y sitios de interés turístico y económico (Beaumont et al., 2019). Para 2050, se pronostica que el océano contendrá más plástico que peces y habrá 12 mil millones de toneladas de basura plástica en los vertederos y el medio ambiente (Lee & Liew, 2020).

A raíz de la contaminación por plásticos petroquímicos, en los últimos años se han realizado esfuerzos legislativos a nivel global con el objetivo de limitar el uso de plásticos convencionales y potenciar la producción de nuevos materiales no contaminantes del medio ambiente a partir de fuentes renovables de energía (Bello, Zinn, Brandl, & Otero, 2008). En Guatemala, el 19 de septiembre del año 2019 se publicó el Acuerdo Gubernativo 189-2019 que busca prohibir el uso y distribución de diferentes insumos plásticos a fin de proteger, conservar y mejorar los recursos naturales del país (Acuerdo Gubernativo del Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales, 2019). Una posible solución para estos problemas puede ser el uso de plásticos biodegradables como alternativa a los petroquímicos.

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son un tipo de material biodegradable compuesto por poliésteres lineales y que es sintetizado por una variedad de microorganismos. Los PHA tienen un enorme potencial de mercado, pero el alto costo de producción ha limitado sus aplicaciones comerciales. Aunque en los últimos años se han realizado muchos estudios sobre producción de PHA pocos de ellos se han enfocado en los microorganismos halófilos, los cuales debido a sus varias características únicas que incluyen un alto requisito de salinidad que previene la contaminación microbiana, una alta presión osmótica intracelular que permite una lisis celular fácil para la recuperación de los PHA y la capacidad de utilizar un amplio espectro de sustratos de bajo costo como los residuos agrícolas (Mitra et al., 2020).

5 Delimitación en tiempo y espacio

5.1 Delimitación en tiempo

El estudio se realizó en el periodo comprendido entre febrero a diciembre de 2021. Se inició con la elaboración de medios de cultivo en el mes de febrero y recolección de las muestras de agua del lago salado Laguna de Ayarza en el mes de marzo, luego en el mes de abril se realizó un tamizaje para la búsqueda de bacterias halófilas capaces de desarrollarse en residuos agrícolas y de producir PHA, posteriormente entre mayo y agosto, se pasó a la fase de fermentación para la producción de polihidroxialcanoatos utilizando como sustrato pulpa de café, cascaras de plátanos y salvado de trigo, asimismo, se realizó la extracción y la cuantificación del rendimiento para cada cepa. Luego en los meses de septiembre y octubre se evaluó la degradabilidad del PHA producido y la identificación de los microorganismos aislados. Finalmente, en el mes de noviembre y diciembre se realizó el análisis de los datos.

5.2 Delimitación espacial

Se realizó un muestreo en el mes de marzo en el lago salado Laguna de Ayarza situada en el Departamento de Santa Rosa, Guatemala para la recuperación de bacterias halófilas.

6 Marco teórico

Los plásticos son moléculas poliméricas sintéticas que exhiben características deseables como suavidad, capacidad de sellado térmico, buena relación resistencia/peso y transparencia. Los plásticos petroquímicos como el polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), poliuretano (PUR), tereftalato de polietileno (PET), tereftalato de polibutileno (PBT) y los nylon son los polímeros más utilizados en la vida diaria debido a su versatilidad, peso ligero y excelentes propiedades térmicas, además son de bajo costo, fáciles de manipular y moldear en diversos productos (Kumar, Shukla, Singh, Prabhakaran, & Tanwar, 2014).

A lo largo de los años el uso excesivo de plásticos petroquímicos ha tenido un impacto negativo en el medio ambiente, se estima que se producen 34 millones de toneladas de residuos plásticos por año, de los cuales solo el 7% se recicla y el 93% restante se vierte en los océanos y vertederos. Los materiales poliméricos sintéticos no son biodegradables y han causado serios problemas ambientales a los hábitats de agua dulce, terrestres y marinos. Además, tardan décadas en degradarse en la naturaleza o el medio ambiente y también se producen a partir de fuentes no renovables como el petróleo, carbón y gas natural (Sushmitha, Vanitha, & Rangaswamy, 2016; Emadian et al., 2017).

Los bioplásticos suponen una alternativa prometedora a los plásticos petroquímicos, son uno de los materiales más innovadores de base biológica y biodegradables que se pueden elaborar a partir de desechos y fuentes renovables como las cáscaras de plátano, los desechos orgánicos, los desechos agrícolas, desperdicios de papel, restos de fruta de palma aceitera, caña de azúcar, almidón de maíz, almidón de papa, paja de arroz, aceite vegetal, celulosa de plantas, algodón y, a veces, de varias partículas de tamaño nanométrico como cadenas de carbohidratos (Goswami, Goswami, & Purohit, 2015). Los bioplásticos pueden ser degradados por los microorganismos como las bacterias, algas y hongos y poseen propiedades similares a las de los plásticos petroquímicos (Ali, Zaki, Yassen, & Obiad, 2017).

Polihidroxicanoatos (PHA)

Los polihidroxicanoatos (PHA) son un tipo de bioplástico con propiedades similares a varios plásticos petroquímicos como el PE, PP y PET. Numerosos microorganismos han sido identificados como productores de PHA, estos los almacenan como inclusiones celulares para usar como reserva de energía. Los PHA se pueden producir en matraces de agitación y en biorreactores con condiciones definidas de fermentación utilizando nutrientes adecuados. Su producción a gran escala depende de varios factores, como la fuente de carbono, el suministro de nutrientes, la temperatura, el nivel de oxígeno disuelto, el pH y el proceso de producción. Una vez producidos, los PHA tienen diversas

aplicaciones en múltiples campos de la ciencia, tecnología y particularmente en el sector médico debido a su biocompatibilidad (Raza, Tariq, Majeed, & Banat, 2019).

Clasificación de los PHA

Los PHA se clasifican según su composición de monómeros, existen los de cadena corta (SCL-PHA), de cadena media (MCL-PHA) y de cadena larga (LML-PHA). Los SCL-PHA están formados por subunidades de 3-hidroxi ácido graso que contienen de cuatro a cinco carbonos, los MCL-PHA de 6 a 16 carbonos y los LML-PHA más de 16 carbonos. Se han identificado más de 100 tipos diferentes de unidades de monómero en polímeros de PHA (Hazer & Steinbüchel, 2007).

Los polímeros de PHA son termoplásticos y las diferencias en sus propiedades físicas y térmicas dependen de su composición de subunidades. Los polímeros de PHA pueden ser homopolímeros que contienen solo un tipo de monómero de 3-hidroxi ácido graso, pueden ser copolímeros con dos tipos de monómeros de 3-hidroxi ácido graso o pueden ser heteropolímeros con diferentes 3-hidroxi ácidos grasos de varias longitudes de cadena. Se pueden producir homopolímeros y copolímeros aleatorios de PHA dependiendo de las especies bacterianas y las condiciones de crecimiento (Anjum et al., 2016).

El poli-(3-hidroxi-butarato) (PHB), es un homopolímero que contiene cuatro subunidades de carbono del 3-hidroxi-butarato (3HB), y el miembro más extendido y mejor caracterizado de la familia de los polihidroxicanoatos (Koller, Salerno, Dias, Reiterer, & Braunegg, 2010). El PHB es altamente cristalino y, en consecuencia, es relativamente frágil y rígido, con una baja relación de alargamiento/rotura. Por estas razones, los esfuerzos en el mejoramiento de la composición del PHB se centran principalmente en la búsqueda de plastificantes y agentes nucleantes capaces de reducir el proceso de cristalización y mejorar la flexibilidad. Los copolímeros que contienen una mezcla de subunidades de cuatro y cinco carbonos pueden producirse cultivando bacterias con ácido valérico, lo que da como resultado la formación de PHA que contienen 3 monómeros de hidroxivalerato (3HV) o

4-hidroxibutirato (4HB) (Amache, Sukan, Safari, Roy, & Keshvarz, 2013). Los MCL-PHA y LCL-PHA son flexibles y elásticos, tienen baja cristalinidad, baja resistencia a la tracción y altas relaciones de alargamiento/rotura. En comparación con los SCL-PHA, los polímeros MCL-PHA tienen bajas temperaturas de fusión, bajas temperaturas de transición vítrea y mayores relaciones de alargamiento/rotura (Noda, Green, Satkowski, & Schechtman, 2009).

Microorganismos halófilos como productores de PHA

Entre los microorganismos halófilos, *Haloferax mediterranei* y la mayoría de especies de *Halomonas* spp., han sido estudiadas ampliamente para la producción eficiente de PHA. Hasta ahora se ha reportado que *H. mediterranei* sintetiza PHBV y poli-(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato-co-4-hidroxibutirato) (PHBV4HB); mientras que en las especies de *Halomonas* se ha encontrado PHB, PHBV, y poli-(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) (P3HB4HB). Actualmente, más y más candidatos para cada género han sido resaltados por su eficiencia como productores de PHA (Ye et al., 2020).

Dentro del dominio bacteriano, la mayoría de los halófilos productores de PHA pertenecen a la familia *Halomonadaceae*. De los casi 12 géneros de *Halomonadaceae*, se sabe que el género *Halomonas* produce SCL-PHA. Además, la mayoría de *Halomonas* spp tienen un requerimiento de NaCl de entre 3 a 15% para que se desarrollen de forma óptima, dicha concentración es suficiente para prevenir la contaminación microbiana. *Halomonas boliviensis*, una bacteria tolerante a los álcalis y moderadamente halófila, ha mostrado la capacidad de sintetizar PHB de manera eficiente con rendimientos del 50% al utilizar glucosa, sacarosa, maltosa, xilosa y salvado de trigo (Quillaguaman, Delgado, Mattiasson, & Hatti-Kaul, 2006). En 2010, se informó que una cepa de *Halomonas* sp. KM-1 produce PHB utilizando residuos de glicerol como única fuente de carbono (Kawata & Aiba, 2010). Otra cepa halófila *Halomonas bluephagenesis* se ha cultivado en procesos de fermentación continuos, estériles, abiertos y de dos etapas y se ha logrado producir PHB con rendimientos del 65-70%, utilizando glucosa como sustrato. Se ha descubierto que cada vez más especies de *Halomonas*

sintetizan PHB mediante el uso de glucosa u otras fuentes de carbono de bajo costo (Tan, Xue, Aibaidula, & Chen, 2011).

Obstáculos financieros para la comercialización de PHA

La comercialización de un producto depende principalmente de su costo de producción, aplicaciones potenciales y requisitos del mercado. En las últimas décadas, se han realizado grandes esfuerzos para mejorar el rendimiento en la producción de los PHA tanto a escala de laboratorio como de planta piloto (Albuquerque & Malafaia, 2018). Los principales desafíos en la comercialización de los PHA han sido su alto costo de producción y los bajos rendimientos del producto. La producción de PHA requiere diferentes herramientas como fermentadores, autoclaves, cabinas de bioseguridad y refrigeradoras, esto aumenta el costo de producción y, en última instancia, limita su comercialización. La incapacidad para lograr condiciones óptimas de crecimiento bacteriano y bajos rendimientos de producción de PHA han sido una desventaja importante en este contexto (Huang et al., 2018). Además, los PHA tienen algunas desventajas en sus propiedades mecánicas que incluyen; incompatibilidad con el procesamiento térmico convencional, funcionalidades limitadas, susceptibilidad a la degradación térmica y costos de producción que limitan su competitividad y aplicación como un biomaterial factible en comparación con los plásticos petroquímicos. La posibilidad de comercialización de los PHA podría mejorarse utilizando cultivos bacterianos adecuados con fuentes de carbono baratas, como desechos de producción agrícola o materiales orgánicos compostables (Albuquerque & Malafaia, 2018).

Reducción de costos de producción de PHA a través de microorganismos halófilos

En los últimos años, ha sido posible emplear microorganismos no halófilos tales como *Alcaligenes latus*, *Burkholderia* sp., *Ralstonia eutropha* y *Escherichia coli* recombinante para la producción industrial de PHA (Schmidt et al., 2016). Sin embargo, la utilización de microorganismos

halófilos tiene beneficios adicionales, principalmente por la fermentación rentable y libre de contaminación en comparación con los microorganismos no halófilos. Debido a que son tres los factores más importantes a tomar en cuenta para mejorar el costo de producción de los PHA (el sustrato, el proceso de fermentación y la purificación), la recuperación de PHA producidos a partir de halófilos resultaría adecuada debido a que se puede realizar la lisis celular utilizando agua con baja salinidad en lugar de solventes como el cloro/cloroformo y a que la fermentación es menos propensa a la contaminación debido al alto contenido de sal de los medios de propagación. Por estas características, los microorganismos halófilos tienen mayor potencial para la producción de PHA a gran escala y a costos competitivos (Bhattacharyya et al., 2012).

Materiales de desecho como fuentes de carbono

La fuente de carbono es el principal nutriente para la síntesis de PHA y el crecimiento de las bacterias, el uso de desechos orgánicos representa una alternativa prometedora para la reducción de los costos de producción de PHA. Se han descrito tres vías principales para la síntesis de PHA, dos de ellas utilizan azúcares como fuente de carbono (La ruta I o del Acetil-CoA a 3-Hidroxi-butiril-CoA y la ruta III, de biosíntesis de ácidos grasos) y la tercera ruta utiliza ácidos grasos como fuente de carbono (La ruta II de degradación de ácidos grasos). Por lo tanto, los desechos que contienen azúcar o ácidos grasos son los mejores candidatos para la producción de PHA (Anjum et al., 2016). Gomez-Cardozo, Mora-Martínez, Yepes-Pérez y Correa-Londoño (2016) definen los términos: desechos ricos en azúcar (es decir, desperdicios ricos en carbohidratos simples como glucosa, sacarosa, fructosa o sacarosa) y desechos ricos en grasas (desperdicios con alto contenido en ácidos grasos tales como el ácido mirítico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico butírico, acético o propiónico) para clasificar los desechos de acuerdo con la composición de la fuente de carbono. Además, otros desechos con materia orgánica altamente biodegradable podrían ser utilizados debido a que pueden transformarse fácilmente en carbohidratos simples para la producción de PHA a través de pretratamientos fisicoquímicos o biológicos, es decir, carbohidratos simples o ácidos grasos volátiles (VFA) como acetato, propionato, butirato o lactato.

Se han reportado diferentes tipos de desechos como fuente de carbono para la producción de PHA, dependiendo de su origen se han clasificado como agroalimentarios, industriales, no agroalimentarios y alimentarios. Los desechos agroalimentarios incluyen: desechos sólidos vegetales, como salvado de arroz, cáscaras de guisantes, raíces, cáscaras de papa, manzana, cebolla, uvas, desechos de granjas animales y corrientes de aguas residuales industriales, como las aguas residuales del proceso de extracción de aceite de oliva, aguas de procesamiento de leguminosas y de frutas. Los desechos alimentarios comprenden: desechos sólidos, como café molido, arroz, vegetales, aceite de cocina, cáscaras de verduras y carne cocida. Los desechos no agroalimentarios son los generados por la fabricación de biodiesel: glicerol crudo, hidrolizado de tortas de aceite y ácidos grasos del biodiésel producto de la purificación de glicerol. Los industriales comprenden efluentes de la digestión anaeróbica los cuales consisten en 1,3-propanodiol y ácidos carboxílicos (Pan, Tan, Ge, Chen, & Wang, 2016).

Utilización subproductos agrícolas por microorganismos halófilos

Existen bacterias halófilas que pueden utilizar eficientemente sustratos de bajo costo para la producción de PHA. Por ejemplo *Halomonas halophila* ha mostrado su capacidad de utilizar hidrolizados de café molido con rendimientos de hasta 62% de PHB (Kucera et al., 2018). Además, *H. halphila* también se ha utilizado con melaza, hidrolizados de suero de queso, aserrín y bagazo de maíz, en los cuales ha mostrado rendimientos de hasta 64% de PHB. Otro ejemplo es *H. boliviensis* que ha mostrado su capacidad para utilizar ácidos grasos volátiles (ACV) los cuales son compuestos orgánicos que se producen en grandes cantidades durante la fermentación acidogénica de los desechos de alimentos o desechos sólidos municipales. En dichas condiciones *H. boliviensis* ha mostrado ser capaz de producir PHB y en presencia de una mezcla de ACV que con altos contenidos de ácido racético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico, puede generar PHBV (García-Torreiro, Lu-Chau, Steinbuchel, & Lema, 2016). También, el salvado de trigo es un residuo agrícola barato y fácilmente disponible que brinda un alto potencial para la producción comercial de PHB. Asimismo, se ha reportado que los desechos de papa proveen de una fuente de ácido acético y butírico y han

mostrado que se puede producir PHB a partir de microorganismos como *H. boliviensis* (Kucera et al., 2018).

Área de estudio

Laguna de Ayarza

La Laguna de Ayarza es un lago de doble cráter de origen volcánico, ubicado al noreste del departamento de Santa Rosa, Guatemala, a 1410 metros sobre el nivel del mar, tiene una superficie de 14 km² y una profundidad máxima de 240 m (Poppe, Paull, Newhall, Bradbury, & Ziagos, 1985). Las aguas son cristalinas, templadas, poseen una dureza de 154 mg/L y un pH de 8.7. Tienen una alta salinidad, la concentración de sodio es de 492 mg/L y de cloro de 241 mg/L, además posee otros minerales en cantidades considerables como el bicarbonato 106 g/L, calcio 39.28 mg/L, carbonato 36 mg/L, potasio 25 mg/l y magnesio 13.22 mg/l. La flora que lo rodea se compone principalmente por pinos, encinos y eucaliptos (Mayorga et al., 1979).

7 Estado del arte

Aunque los polihidroxicanoatos (PHA) están siendo producidos a escala industrial a partir de diversas bacterias y se han utilizado para la elaboración de bioplásticos, la comercialización todavía tiene varios desafíos como los costos asociados al proceso de síntesis y la inestabilidad en las propiedades térmicas, mecánicas y estructurales de los polímeros. La producción de los PHA también está relacionada con las dificultades en el bioprocesamiento principalmente por las condiciones de esterilidad, la baja conversión de sustratos de carbono en productos de PHA, el mal desarrollo de los microorganismos, y la purificación del producto final. Para reducir la complejidad y los costos en la producción de los PHA se han buscado microorganismos más prometedores como bacterias resistentes a la contaminación, por ello en los últimos años la atención se ha dirigido a los extremófilos, especialmente a las bacterias y arqueas halófilas como *Halomonas* spp. y *Haloferax mediterranei* con el objetivo de mejorar la producción de PHA para alcanzar un proceso más sencillo y económico (Chen, Chen, Wu, Chen, 2020).

Biotecnología industrial de próxima generación basada en halófilos

Actualmente los microorganismos extremófilos se están aprovechando debido a que existe la posibilidad de cultivarlos en condiciones donde no pueden desarrollarse otras formas de vida, lo que ha facilitado evitar la contaminación durante el proceso de fermentación. Entre este tipo de microorganismos, los científicos han prestado especial atención a las bacterias halófilas que pueden crecer rápidamente en medios con altas concentraciones de sal y pH elevado (Yue et al., 2014), lo que resulta en un excelente mecanismo de resistencia a la contaminación que pocos microorganismos poseen. Se ha reportado que las bacterias halófilas pueden crecer en procesos de fermentación abiertos y continuos en medios con agua de mar no estéril sin presentar contaminación durante al menos dos meses. Sus potenciales podrían desarrollarse aún más con modificaciones genéticas introduciendo nuevas vías o genes (Shen et al., 2014). Recientemente, la tecnología también se ha centrado la manipulación genética de bacterias halófilas. Se han desarrollado herramientas de ingeniería molecular para construir *Halomonas* recombinantes para aumentar su porcentaje de eficiencia para la producción de PHBV. En el futuro más estudios sobre ingeniería genética conducirán a la generación de nuevos polímeros producidos por halófilos recombinantes (Zhao et al., 2017).

Cultivos microbianos mixtos (CMM)

Los CMM se han propuesto como un método rentable para producir biopolímeros a partir de recursos renovables, en donde a través de bioprocesos cuidadosamente diseñados, el fenotipo de los microorganismos productores de PHA se enriquece naturalmente, haciendo que el proceso sea más eficiente y económico (Carvalho, Oehmen, Albuquerque, & Reis, 2014). Como alternativa, el uso de CMM es prometedor, ya que no requieren condiciones estériles y tienen un potencial metabólico más amplio que al utilizar cepas individuales, lo que ayudaría a reducir el costo de producción de los PHA. El uso de CMM además permite utilizar sustratos más baratos, como los desechos agrícolas, que a su vez evita el uso de costosas fuentes de carbono. El proceso de producción de PHA con CMM requiere la selección individual de los microorganismos que acumulen la mayor cantidad de PHA. Esta selección se realiza a escala laboratorio que posteriormente se lleva a una escala mayor en procesos continuos. Recientemente, se han propuesto nuevos sistema de producción de PHA con microorganismos fotosintéticos o fijadores de nitrógeno (Chen et al., 2020).

Aplicaciones más relevantes de los PHA

La producción industrial de PHA se desarrolla según las necesidades del mercado y por las nuevas legislaciones y penalizaciones a los plásticos petroquímicos. En este sentido, se espera que dos líneas principales de productos de PHA sean las más demandas: Productos de alta gama de los que se requiere que sean biodegradables y biocompatibles, por ejemplos, los materiales de suministro de medicamentos, de ingeniería de tejidos y para nanobiotecnología. Los polímeros de PHA también tienen potencial para reemplazar a los plásticos petroquímicos en aplicaciones como aditivos y rellenos de cosméticos. En algunas situaciones el precio más alto de los PHA puede ser aceptable, ya sea por las prohibiciones o por su compatibilidad con organismos vivos. Para los productos de gama baja los beneficios pueden provenir de la biodegradabilidad, la actividad óptica, la piezoelectricidad y las propiedades de barrera. Las aplicaciones cubren principalmente bolsas para recolección de desechos orgánicos, empaques de un solo uso, textiles, juguetes, recuerdos, materiales para decoración y utilizados para diversos productos de entretenimiento deportivo, por ejemplo, pelotas para bádminton. En tales casos, la capacidad de producción de PHA se encuentra en una fase temprana, de modo que los precios de producción aún son altos, pero se espera que el desarrollo en investigaciones genere plataformas que permitan la reducción de los costos a través de microorganismos más eficientes y de fuentes de carbono más accesibles como los materiales de desecho agrícolas (Chen et al., 2020).

Perspectivas

Con la creciente diversidad de moléculas de PHA que se han ido descubriendo, sus aplicaciones serán cada vez más extensas. Sin embargo, la industrialización y comercialización a gran escala ha sido restringida por los costos de producción, especialmente el de los nuevos monómeros que se han caracterizado de forma reciente. No obstante, mediante la búsqueda de nuevas cepas productoras, la biología sintética, de sistemas, la ingeniería de morfología y la biotecnología industrial de próxima generación, la síntesis de todo tipo de PHA se irá integrando para generar plataformas de producción de bajo costo, que se basen en bacterias capaces de utilizar múltiples rutas metabólicas y puedan sintetizar PHA específicos para cada industria. Eventualmente será posible reducir el costo de producción de todo tipo de PHA y se promoverá así la aplicación en diferentes campos lo que resultaría en alternativas para resolver los problemas de contaminación ambiental (Mitra et al., 2020).

8 Objetivos

General

Establecer el potencial de las cepas nativas de bacterias halófilas de la Laguna de Ayarza para la producción de bioplásticos microbianos a partir de residuos agrícolas.

Específicos

- Determinar los géneros de bacterias halófilas capaces de producir gránulos de polihidroxicanoatos en el medio EGM.
- Establecer la capacidad de las bacterias halófilas de producir gránulos de polihidroxicanoatos a partir de pulpa de café, cascaras de plátanos y salvado de trigo.
- Determinar el rendimiento de producción de polihidroxicanoatos de las bacterias halófilas, a través de la fermentación en medios suplementados con residuos agrícolas.

9 Hipótesis

- Al menos una cepa de bacterias halófilas es capaz de producir polihidroxicanoatos en medio EGM.
- Al menos una cepa de bacterias halófilas es capaz de producir gránulos de polihidroxibutirato a partir de residuos agrícolas.
- Al menos una cepa de bacterias halófilas es capaz de producir polihidroxicanoatos a partir de la fermentación de medios suplementados con residuos agrícolas.

10 Materiales y métodos

10.1 Enfoque de la investigación

Este estudio posee un enfoque cuantitativo.

10.2 Método

Se utilizó el método experimental. Las actividades se llevaron a cabo en los laboratorios del Departamento de Microbiología, de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

10.3 Recolección de información

Se tomaron 35 muestras de 200 ml en puntos al azar de la Laguna de Ayarza en frascos de vidrio estériles. Las muestras fueron transportadas al laboratorio del Departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala para aislar bacterias productoras de PHA. Las cepas que mostraron mayor capacidad para la producción de PHA fueron cultivadas en medios con desechos de producción agrícola como fuente de carbono y se extrajeron los PHA. Se determinó el coeficiente de rendimiento para establecer la capacidad de las cepas bacterianas halófilas de producir PHA a partir de los residuos agrícolas. Todas las evaluaciones y mediciones se llevaron a cabo 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.

10.4 Técnicas e instrumentos

Muestreo, aislamiento y mantenimiento de las cepas

Para el aislamiento de las bacterias halófilas productoras de PHA se recolectaron aleatoriamente 30 muestras de agua en la Laguna de Ayarza, Departamento de Santa Rosa, Guatemala ubicada a 14°24'23.0" Norte y 90°07'01.6" Oeste. Las muestras de agua fueron de 200 ml y se recolectaron en frascos de vidrio estériles de boca ancha a una profundidad de aproximadamente 20 cm de la superficie. Después de tomar las muestras, estas fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio de Microbiología del Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Posteriormente 1 ml de cada muestra fue enriquecido

agregándolo a 10 ml de medio EGM (1% p/v de glucosa, 0.5% p/v de extracto de levadura y 25% v/v de agua del lago) e incubado a 30 °C por 48 horas. Se seleccionaron las muestras que evidenciaron desarrollo microbiano, a partir de las cuales se prepararon diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y se inocularon 100 μ L de cada dilución en cajas de Petri con agar EGM (1% p/v de glucosa, 0.5% p/v de extracto de levadura y 25% v/v de agua del lago). Las cajas de Petri fueron incubadas a 25 °C por 72 horas y se analizaron para determinar el total de colonias. Posteriormente las colonias fueron sembradas hasta lograr su purificación, luego se almacenaron en tubos con agar EGM a 4°C (Fuentes, Carreño, & Llanos, 2013).

Tamizaje de las cepas productoras de PHA

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

Tinción de Negro de Sudan

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

Determinación de la capacidad de producir polihidroxialcanoatos en medio EGM

Las cepas de bacterias halófilas seleccionadas se cultivaron en 10 ml de medio EGM modificado a 30°C hasta que alcanzaron una concentración de 0.5 del estándar de McFarland. Posteriormente 5 ml del cultivo anterior se inoculó en 45 ml de caldo EGM y se incubó a 30°C con

agitación constante a 150 rpm hasta que se alcanzó una concentración de 9 del estándar de McFarland. Una vez alcanzada dicha concentración, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se lavó dos veces con agua desmineralizada y se deshidrató en horno a 45°C hasta alcanzar peso constante. Para la cuantificación de los PHA, se agregó 1 ml de hipoclorito de sodio al 5% por 2 horas a los tubos con la biomasa deshidratada, posteriormente se agregó 1 ml de cloroformo por 20 minutos para separar la biomasa del polímero. Luego los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos y se obtuvieron dos fases, la superior corresponde al hipoclorito de sodio con restos celulares y la inferior a la de cloroformo con los PHA. Con una pipeta Pasteur se extrajo la fase inferior de cloroformo y se depositó en otro tubo de ensayo el cual se colocó en un horno a 40 °C por 24 horas para la evaporación del cloroformo (Guzmán, Hurtado, Carreño, & Casos, 2017).

Verificación del polímero y rendimiento a través del coeficiente de rendimiento

Una vez evaporado el cloroformo de los tubos, el polímero obtenido se pesó y se verificó su naturaleza, para ello se digirió el sedimento con H₂SO₄ concentrado durante 30 minutos a 90°C en baño maría. Luego se dejó enfriar y se realizó un barrido con espectrofotómetro en un rango de 220 a 250 nm, el polímero se identificó como PHA cuando se observó un pico máximo de absorbancia a 235 nm. Finalmente, con los pesos de la biomasa celular y de los PHA se calculó el coeficiente de rendimiento del producto con relación a la biomasa o cantidad de PHA obtenido por biomasa formada, con la siguiente ecuación *Coeficiente* (Y) = $\frac{\text{Masa de los PHA}}{\text{Biomasa celular}}$ (Guzman et al., 2017).

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

Para la preparación del medio de fermentación, los residuos agrícolas pulpa de café, cáscaras de plátano y salvado de trigo se deshidrataron por 72 horas a temperatura ambiente y se molieron en fracciones de entre 0.5 a 2 mm. A partir de los residuos agrícolas molidos se prepararon 3 medios de fermentación EGM modificados, cada uno 6 g l⁻¹ de un residuo agrícola distinto, 0.25% p/v de extracto

de levadura y 25% v/v de agua del lago. Una vez preparados los medios de fermentación, las cepas de bacterias halófilas seleccionadas se cultivaron en 10 ml de cada uno de los medios EGM modificados a 30°C hasta que alcanzaron una concentración de 0.5 del estándar de McFarland. Posteriormente 5 ml del cultivo se inoculó en 45 ml de cada uno de los medios EGM modificados y se incubó a 30°C con agitación constante a 150 rpm hasta alcanzar una concentración de 9 del estándar de McFarland. Una vez alcanzada dicha concentración, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se lavó dos veces con agua desmineralizada y se deshidrató en horno a 45°C hasta alcanzar peso constante. Para la purificación de los PHA, se agregó 1 ml de hipoclorito de sodio al 5% por 2 horas a los tubos con la biomasa deshidratada, luego se agregó 1 ml de cloroformo por 20 minutos para separar la biomasa del polímero. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos y se obtuvieron dos fases, la inferior corresponde a la de cloroformo con los PHA. Finalmente, con una pipeta Pasteur se extrajo el cloroformo de la fase inferior y se depositó en otro tubo de ensayo el cual se colocó en un horno a 40°C por 24 horas para la evaporación del cloroformo. Posteriormente se verificó el polímero y se obtuvo el coeficiente de rendimiento para cada cepa bacteriana (Du et al., 2012).

Identificación de las cepas

La identificación se realizó de acuerdo al microorganismo a través de características macroscópicas, pruebas bioquímicas y microscopía, además de hicieron pruebas complementarias con espectroscopia de masas. Para las características macroscópicas, dependiendo del microorganismo se utilizó agar nutritivo, agar sangre, manitol sal y agar MacConkey. Para las pruebas bioquímicas se utilizó catalasa, oxidasa, ureasa, producción de indol, prueba de rojo de metilo, reacción de Voges-Proskauer, utilización del citrato e hidrólisis del almidón (Muhammadi, Afzal, & Hamed, 2015).

10.5 Procesamiento y análisis de la información

Se realizó un análisis exploratorio de los resultados obtenidos. Para los datos obtenidos en la producción de PHA a partir de glucosa y a partir de los residuos agrícolas se llevó a cabo una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para evidenciar diferencias entre los coeficientes de rendimiento se realizó un análisis de varianza (anova) y una posterior prueba de comparación de medias de Tukey, con el 0.05 de significancia. Los resultados fueron procesados en Excel 2013 y el programa R® (Guzmán et al., 2017).

11 Resultados y discusión

11.1 Resultados:

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

Se observó que las mayores concentraciones del polímero en medio EGM fueron producidas por la cepa AP21-14 (*Alcaligenes faecalis*), AP21-10 (*Alcaligenes faecalis*) y AP21-03 (*Staphylococcus capitis*). De las cepas que mostraron mayor rendimiento en la producción de polihidroxicanoatos no se encontró diferencia entre la AP21-14 y la AP21-10 que produjeron en promedio 1.21 g/L del polímero (Figura 1). Asimismo, al evaluar las cepas en medio enriquecido con pulpa de café, se encontró que las mayores concentraciones fueron producidas por las cepas AP21-03 (*Staphylococcus capitis*), AP21-10 (*Alcaligenes faecalis*) y AP21-16 (*Pseudomonas cuatrocieneegasensis*), de estas la cepa AP21-03 y AP21-10 no mostraron diferencia significativa y reportaron un promedio de 0.88 g/L de PHA (Figura 2).

Al evaluar las cepas en medio enriquecido con cascara de plátano se observó que las que produjeron mayor concentración del polímero fueron la AP21-03 (*Staphylococcus capitis*), AP21-14 (*Alcaligenes faecalis*) y AP21-10 (*Alcaligenes faecalis*). No se encontró diferencia entre las cepas AP21-10 y AP21-14 que produjeron 0.85 g/L del polímero (Figura 3). Además, al desarrollar las cepas en medio enriquecido con salvado de trigo, se encontró que las cepas que produjeron mayor concentración del PHA fueron la AP21-10 (*Alcaligenes faecalis*), AP21-03 (*Staphylococcus capitis*) y AP21-16 (*Pseudomonas cuatrocieneegasensis*), de estas no se encontró diferencia significativa entre la AP21-10 y AP21-03 que produjeron 1.03 g/L del polímero (Figura 4).

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

Tabla 1

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

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

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 Duncan (p = .05).

Tabla 2

Identificación de cepas por espectrometría de masas

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

¹Aunque las cepas correspondan a la misma especie, estas provienen de distintas muestras por lo que podrían mostrar diferencias fenotípicas y genotípicas que afecten la producción del biopolímero.

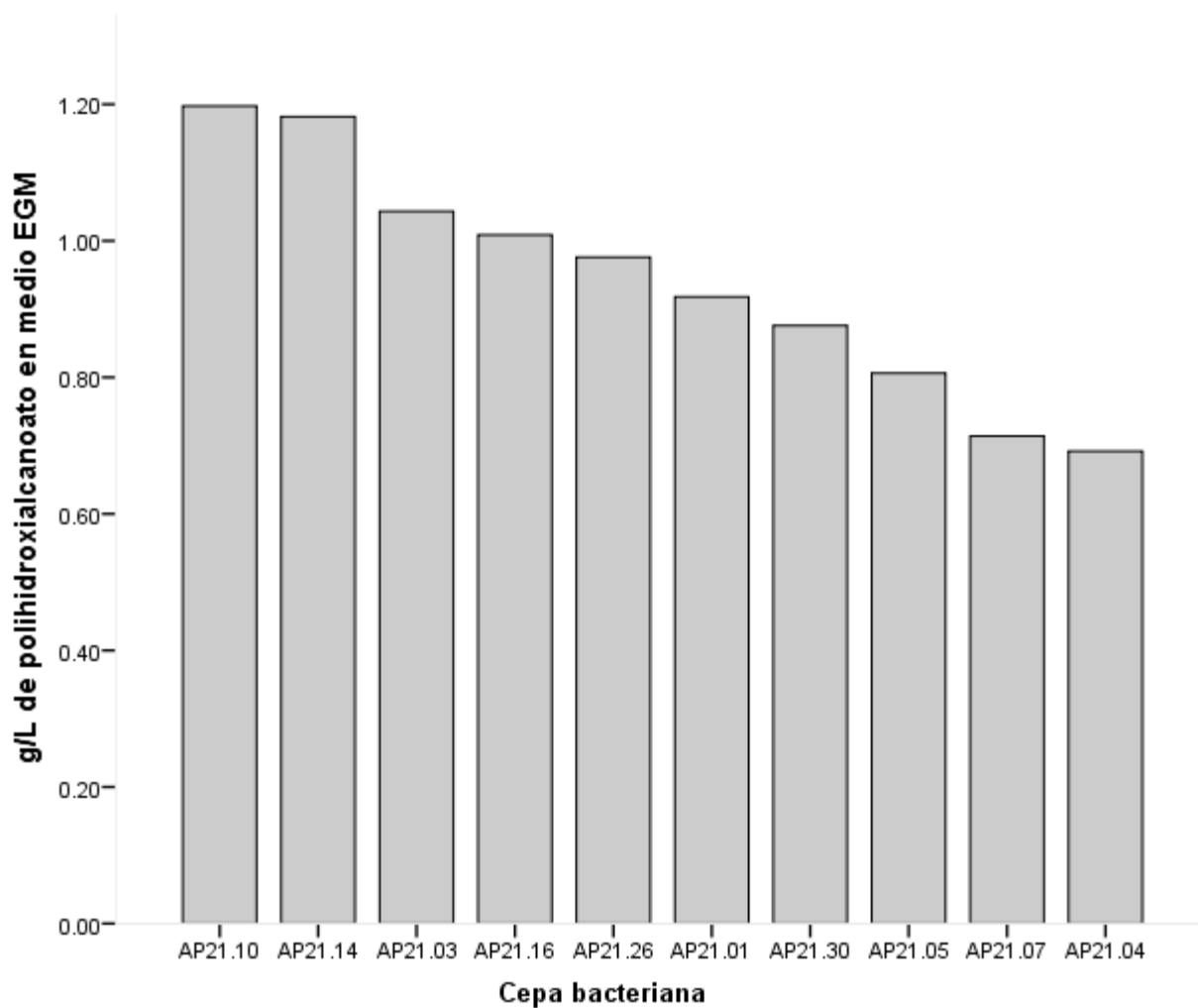


Figura 1. Producción de polihidroxicanoatos en medio EGM, valores medios por cepa bacteriana. Los resultados se muestran en gramos por litro.

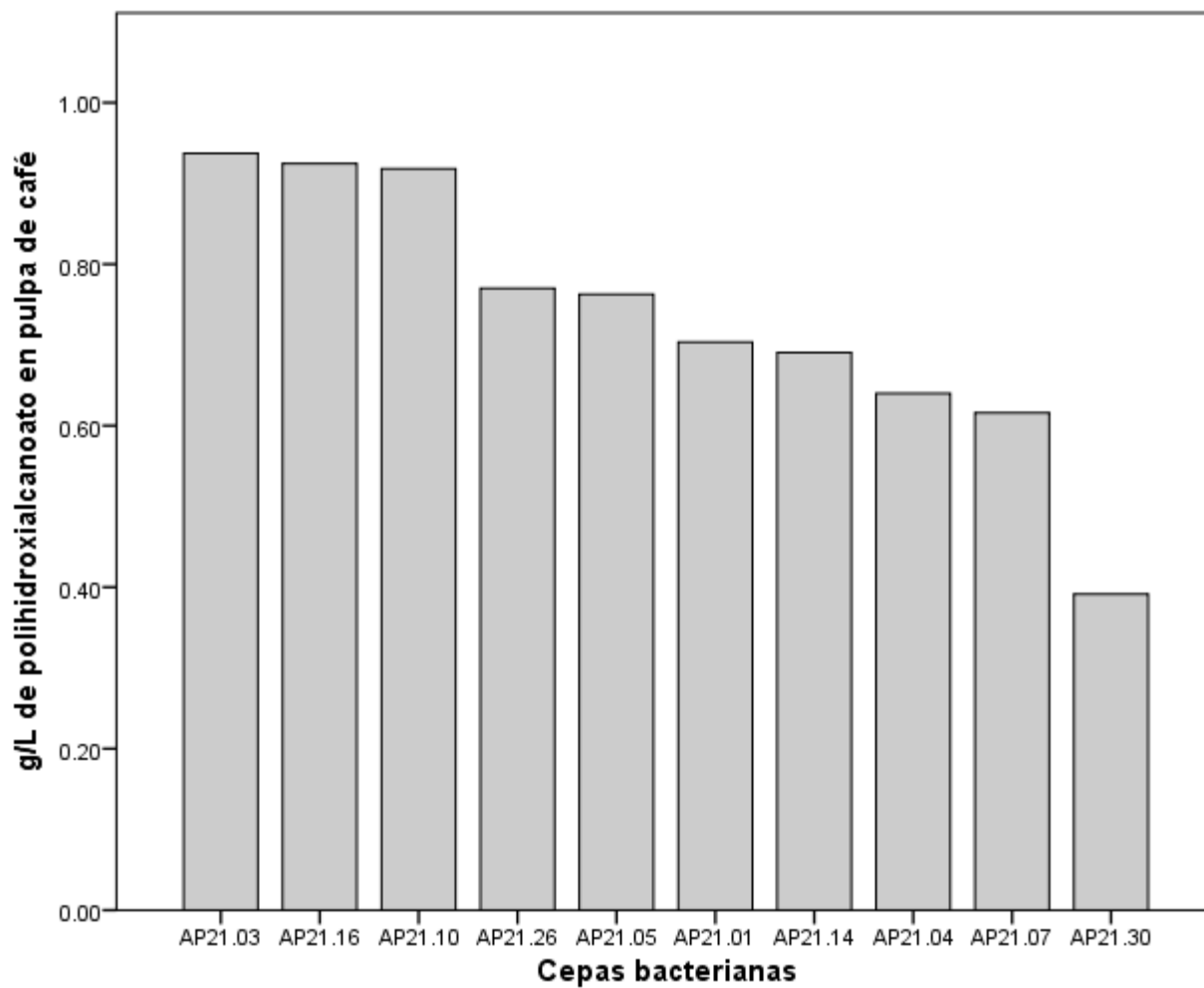


Figura 2. Producción de polihidroxicanoatos en medio enriquecido con pulpa de café, valores medios por cepa bacteriana. Los resultados se muestran en gramos por litro.

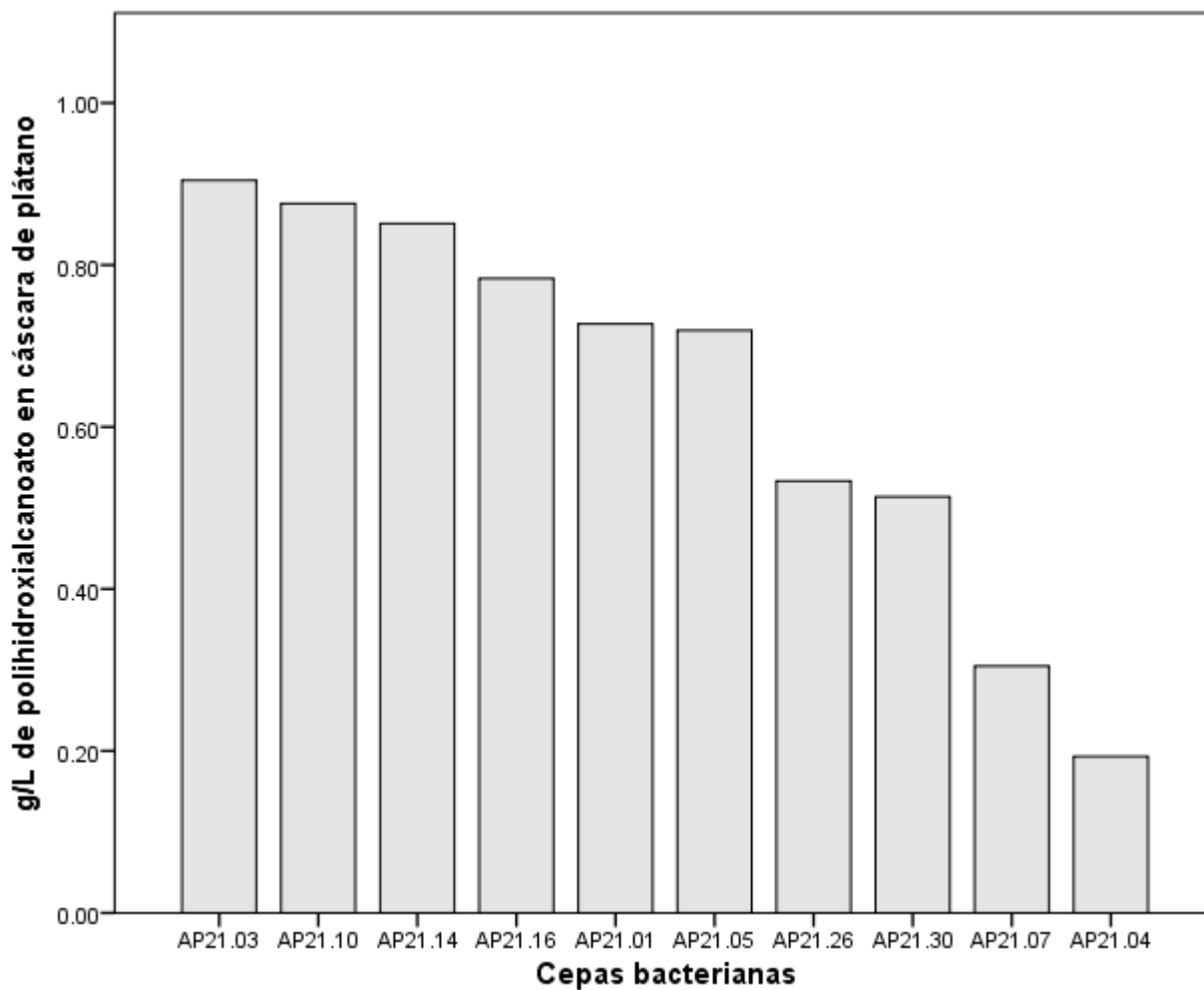


Figura 3. Producción de polihidroxicanoatos en medio enriquecido con cáscara de plátano, valores medios por cepa bacteriana. Los resultados se muestran en gramos por litro.

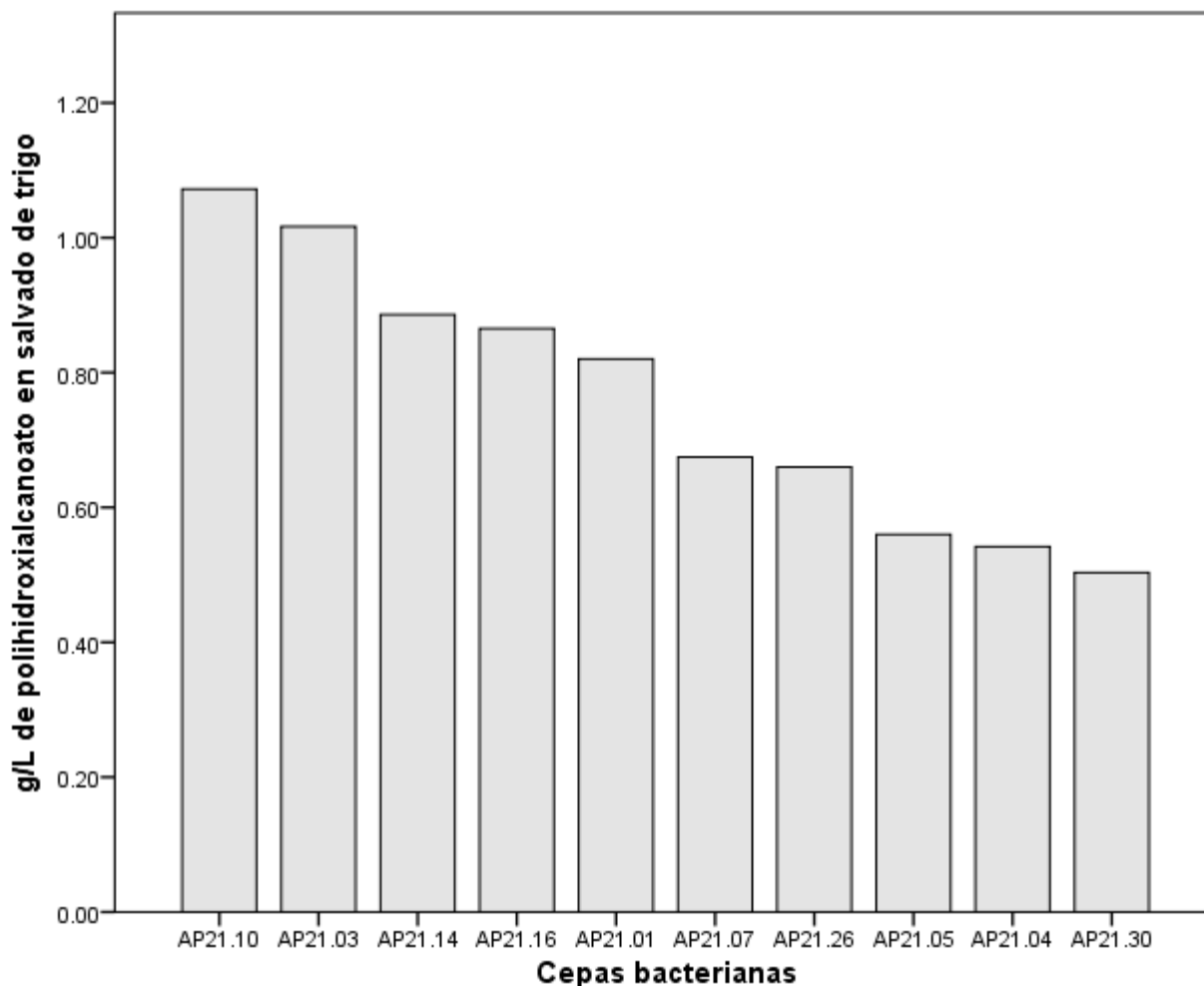


Figura 4. Producción de polihidroxicanoatos en medio enriquecido con salvado de trigo, valores medios por cepa bacteriana. Los resultados se muestran en gramos por litro.

11.2 Discusión de resultados

Se aislaron 35 cepas microbianas en la Laguna de Ayarza, de las cuales 10 resultaron positivas para la producción de polihidroxicanoatos al desarrollarse en Medio EGM, pulpa de café, cáscara de plátano y salvado de trigo. Entre las especies encontradas está *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus idriensis*, *Bacillus megaterium*, *Exiguobacterium acetylicum*, *E. aurantiacum*, *Pseudomonas cuatrocieneegasensis* y *Staphylococcus capitis*. Además, se encontró que las cepas AP21-10 (*Alcaligenes faecalis*), AP21-14 (*Alcaligenes faecalis*) y AP21-03 (*Staphylococcus capitis*) produjeron

las mayores concentraciones del polímero, en los cuatro medios probados (EGM y enriquecidos con pulpa de café, cáscara de plátano y salvado de trigo) con una media de 1.00 (0.16) g/L, 0.88 (0.41) g/L y 0.98 (0.12) g/L respectivamente.

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

En otras investigaciones también se ha reportado a *Staphylococcus* como un género capaz de adaptarse a distintas condiciones ambientales por su amplio potencial para producir diversas enzimas para aprovechar los nutrientes del medio y competir con otros microorganismos e incluso evadir las defensas naturales de animales y seres humanos (Seo & Bohach, 2014). El género *Staphylococcus* ha sido utilizado también para la producción de PHA a partir de medios sintéticos y también de productos agrícolas y residuos industriales como las semillas de sésamo, melaza, cáscaras de plátano, papa, mango, efluentes textiles, aceites residuales y polvo de proteína y se han reportado producciones promedio de hasta 1.71 g/L de distintos PHA (Joyline & Aruna, 2019). En este estudio se encontró que la cepa AP21-03 correspondiente a *Staphylococcus capitis* presentó un rendimiento promedio de 1.12 g/L en medio EGM, 0.84 g/L en medio enriquecido con pulpa de café, 0.93 g/L en medio con

cáscara de plátano y 1.02 g/L en medio con salvado de trigo, lo cual es similar al rendimiento que presentan otras cepas de *Staphylococcus* en otros desechos agroindustriales (Joyline & Aruna, 2019). Asimismo, *Staphylococcus* ha sido considerado un microorganismo de interés para la producción de PHA ya que tiene un amplio potencial de adaptación a distintos sustratos y también por su tolerancia a elevadas concentraciones de sal lo que lo hacen apto para reducir los costos de producción de polímeros biodegradables. Aunque *S. capitis* no había sido reportado para la producción de polihidroxialcanoatos, se ha encontrado que *S. epidermidis*, *S. aureus* y otras especies han logrado producir PHB, PHBV y P4HB (Venkateswar & Venkata, 2012).

Por otra parte, aunque la cepas de *Bacillus megaterium* y *B. idriensis* encontradas mostraron los menores rendimientos de producción de PHA en medio EGM y enriquecidos con pulpa de café, cáscara de plátano y salvado de trigo (0.54 g/L y 0.53 g/L respectivamente), esto puede ser el resultado de los sustratos utilizados, no obstante, algunas especies de *Bacillus* han sido ampliamente aplicadas por su potencial para producir polímeros de PHA con propiedades específicas, por ejemplo: en un estudio se reportó que la cepa BPPI-14 y BPPI-19 de *Bacillus* sp. produjeron ácido hidroxibutírico (4HB) y poli-(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato), los cuales presentan propiedades fisicoquímicas similares a las del polipropileno (Mohammed, Panda, & Ray, 2019). En esta investigación se utilizó medio EGM y medios enriquecidos con pulpa de café, cáscara de plátano y salvado de trigo como fuente de carbono lo que pudo limitar la síntesis de PHA. Además, otras investigaciones han reportado la producción de PHB cuando se ha utilizado glucosa como única fuente de carbono y también se ha evidenciado la producción de otros PHA como el PHVB y P4HV (Katircioglu, Aslim, Yüksekdao, Mercan, & Beyatli, 2003). Otras investigaciones también han reportado que se pueden obtener diversos tipos de polihidroxialcanoatos dependiendo la fuente de carbono en la que es cultivado *B. cereus*, entre estos se ha reportado el PHV, PHBHV. Por lo tanto, aunque las condiciones limitantes de nitrógeno y el exceso de carbono son las principales variables a considerar para la producción de PHA, las condiciones de cultivo y los sustratos también tienen un efecto directo con relación al tipo de polímero producido (Rathika, Janaki, Shanthi, & Kamala-Kannan, 2018).

Respecto al género *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomonas cuatrocienegasensis* pocos estudios los han reportado para la síntesis de polihidroxicanoatos, Kanekar, Joshi, Kelkar, & Borgave (2008) aislaron a *Exiguobacterium aurantiacum* del lago salado Lonar de la India y la reportaron como productora de PHA, sin embargo, no indicaron el rendimiento de producción el cual para la presente investigación fue de 0.70 g/L (Tabla 1) en promedio en los sustratos utilizados reportados anteriormente. Asimismo, Dong-Heon y colaboradores (2010) lograron aislar a *Pseudomonas cuatrocienegasensis* a partir de aguas contaminadas con un derrame de petróleo en Taean, Corea. Dichos autores encontraron que *P. cuatrocienegasensis* es capaz de producir PHA al utilizar medios sintéticos con glucosa como fuente de carbono con rendimientos de hasta 1.10 g/L los cuales son similares a los encontrados en la presente investigación.

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

12 Referencias

- Acuerdo Gubernativo del Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales, 189-2019. Diario de Centroamérica, No. 8 (20 septiembre de 2019)
- Albuquerque, P. B. & Malafaia, C. B. (2018). Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 615-625. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.026
- Ali, S., Zaki, N. H., Yassen, N., & Obiad, S. (2017). Production of bioplastic by bacteria isolated from local soil and organic wastes. *Current Resources in Microbiology and Biotechnology*, 5(2), 1012–1017.

- Amache, R., Sukan, A., Safari, M., Roy, I., & Keshavarz, T. (2013). Advances in PHAs production. *Chemical Engineering Transactions*, 32, 931-936. doi: 10.3303/CET1332156
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N., & Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: a review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 161-174. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- Arutchelvi, J., Sudhakar, M., Arkatkar, A., Doble, M., Bhaduri, S., & Uppara, P. V. (2008). Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 9-22.
- Beaumont, N. J., Aanesen, M., Austen, M. C., Börger, T., Clark, J. R., Cole, M., ... & Wyles, K. J. (2019). Global ecological, social and economic impacts of marine plastic. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 189-195. doi: 10.1016/j.marpolbul.2019.03.022
- Bello, D., Zinn, M., Brandl, H., & Otero, M. A. (2008). Aislamiento y caracterización de Poli-B-hidroxitirato obtenido por vía fermentativa a partir de *Bacillus megaterium*. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*, 42(1-3), 101-105.
- Bhattacharyya, A., Pramanik, A., Maji, S. K., Haldar, S., Mukhopadhyay, U. K., & Mukherjee, J. (2012). Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. *AMB Express*, 2(1), 34. doi: 10.1186/2191-0855-2-34
- Blessing, G. (2018). Guatemala se une a la campaña Mares Limpios. Noticias ONU. Recuperado de <https://news.un.org/es/story/2018/10/1443532>
- Burgos, N., Valdés, A., & Jiménez, A. (2016). Valorization of agricultural wastes for the production of protein-based biopolymers. *Journal of Renewable Materials*, 4(3), 165-177. doi: 10.7569/JRM.2016.634108
- Carvalho, G., Oehmen, A., Albuquerque, M. G., & Reis, M. A. (2014). The relationship between mixed microbial culture composition and PHA production performance from fermented molasses. *New Biotechnology*, 31(4), 257-263. doi: 10.1016/j.nbt.2013.08.010
- Cervantes-Uc, J. M., Catzin, J., Vargas, I., Herrera-Kao, W., Moguel, F., Ramirez, E., Rincón-Arriaga, S., & Lizama-Uc, G. (2014). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, *Halomonas nitroreducens*, isolated from

- hypersaline ponds. *Journal of Applied Microbiology*, 117(4), 1056–1065. doi: 10.1111/jam.12605
- Chen, G. Q., Chen, X. Y., Wu, F. Q., & Chen, J. C. (2020). Polyhydroxyalkanoates (PHA) toward cost competitiveness and functionality. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(1), 1-7. doi: 10.1016/j.aiepr.2019.11.001
- Choi, J., & Lee, S. Y. (1999). Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(1), 13-21. doi: 10.1007/s002530051357
- 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>
- Dong-Heon, L., Suan-Ran, M., Young-Hyun, P., Jung-H, K., Hoon, K., Parales, R., & Hyung-Yeel, K. (2010). *Pseudomonas taeanensis* sp. nov., isolated from a crude oil-contaminated seashore. *Internation Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(12), 175-182. doi:10.1099/ijs.0.018093-0
- Du, C., Sabirova, J., Soetaert, W., & Ki Carol Lin, S. (2012). Polyhydroxyalkanoates production from low-cost sustainable raw materials. *Current Chemical Biology*, 6(1), 14-25. doi: 10.2174/187231312799984394
- Edbeib, M. F., Wahab, R. A., & Huyop, F. (2016). Halophiles: biology, adaptation, and their role in decontamination of hypersaline environments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(8), 135. doi: 10.1007/s11274-016-2081-9
- Elsawy, M. A., Kim, K. H., Park, J. W., & Deep, A. (2017). Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1346-1352. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.143
- Emadian, S., Onay, T., & Demirel, B. (2017). Demirel, Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management*, 59, 526-536. doi: 10.1016/j.wasman.2016.10.006
- Fuentes, Á., Carreño, C., & Llanos, C. (2013). Rendimiento de exopolisacáridos emulgentes producidos por bacterias halófilas nativas en tres concentraciones de melaza de *Saccharum*

- officinarum* L. “caña de azúcar”. *Scientia Agropecuaria*, 4(2), 111-120. doi: 10.17268/sci.agropecu.2013.02.04
- García-Torreiro, M., Lu-Chau, T., Steinbuchel, A., & Lema, J. (2016). Waste to bioplastic conversion by the moderate halophilic bacterium *Halomonas boliviensis*. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 163-168. doi: 10.3303/CET1649028
- Gómez-Cardozo, J. R., Mora-Martínez, A. L., Yepes-Pérez, M., & Correa-Londoño, G. A. (2016). Production and characterization of polyhydroxyalkanoates and native microorganisms synthesized from fatty waste. *International Journal of Polymer Science*, 6541718, 1-12. doi: 10.1155/2016/6541718
- Goswami, G., Goswami, M. G., & Purohit, P. (2015). Bioplastics from Organic Waste. *International Journal of Engineering Research and Technology*, 3(23), 1-3.
- 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. doi: 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. doi: 10.17268/sci.agropecu.2017.02.03
- Hazer, B., & Steinbüchel, A. (2007). Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 1-12. doi: 10.1007/s00253-006-0732-8
- Hottle, T., Bilec, M., & Landis, A. (2013). Sustainability assessments of bio-based polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 98(9), 1898-1907. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2013.06.016
- Huang, Z., Wang, Y., Jiang, L., Xu, B., Wang, Y., Zhao, H., & Zhou, W. (2018). Mechanism and performance of a self-flocculating marine bacterium in saline wastewater treatment. *Chemical Engineering Journal*, 334, 732-740. doi: 10.1016/j.cej.2017.10.076

- Jain, R., & Tiwari, A. (2014). Homology modelling of PHA synthases in *Cupriavidus necator*. *IJUPBS*, 3(3), 214-23.
- Joyline, M. & Aruna, K. (2019). Production and characterization of polyhydroxyalkanoates (pha) by *Bacillus megaterium* strain jha using inexpensive agro-industrial wastes. *International Journal of Recent Scientific Research*, 10(7), 33359-33374.
- Kale, G., Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Selke, S. E., & Singh, S. P. (2007). Compostability of bioplastic packaging materials: an overview. *Macromolecular Bioscience*, 7(3), 255-277. doi: doi.org/10.1002/mabi.200600168
- Kanekar, P.P., Joshi, A.A., Kelkar, A.S., Borgave, S.B., & Sarnaik, S.S. (2008). Alkaline Lonar lake, India - a treasure of alkaliphilic and halophilic bacteria. *The 12th World Lake Conference*, 1, 1765-1774.
- 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.
- Kawata, Y. & Aiba, S. I. (2010). Poly (3-hydroxybutyrate) production by isolated *Halomonas* sp. KM-1 using waste glycerol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 74(1), 1-3.
- Khanna, S. & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry*, 40(2), 607-619. doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.053
- 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
- Koller, M., Salerno, A., Dias, M., Reiterer, A., & Braunegg, G. (2010). Modern biotechnological polymer synthesis: a review. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 255-269.
- Kovalcik, A., Meixner, K., Mihalic, M., Zeilinger, W., Fritz, I., Fuchs, W., ... & Drogg, 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

- Kucera, D., Pernicová, I., Kovalcik, A., Koller, M., Mullerova, L., Sedlacek, P., ... & Krzyzanek, V. (2018). Characterization of the promising poly (3-hydroxybutyrate) producing halophilic bacterium *Halomonas halophila*. *Bioresource Technology*, 256, 552-556. doi: 10.1016/j.biortech.2018.02.062
- Kumar, Y., Shukla, P., Singh, P., Prabhakaran, P. P., & Tanwar, V. K. (2014). Bio-plastics. A perfect tool for eco-friendly food packaging: A Review. *Journal of Food Product Development and Packaging*, 1, 1-6.
- Lee, A. & Liew, M. S. (2020). Ecologically derived waste management of conventional plastics. *Journal of Material Cycles and Waste Management*, 22, 1-10. doi: 10.1007/s10163-019-00931-4
- Lee, S. Y., Choi, J. I., Han, K., & Song, J. Y. (1999). Removal of endotoxin during purification of poly (3-hydroxybutyrate) from gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2762-2764. doi: 10.1128/AEM.65.6.2762-2764
- Mayorga, R., Cáceres, A., Toriello, C., Gutiérrez, G., Alvarez, O., Ramírez, M. E., & Mariat, F. (1979). Investigación de una zona endémica de esporotricosis en la región de la Laguna de Ayarza, Guatemala. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, 87(1), 20-34.
- Meeks, D., Hottle, T., Bilec, M. M., & Landis, A. E. (2015). Compostable biopolymer use in the real world: Stakeholder interviews to better understand the motivations and realities of use and disposal in the US. *Resources, Conservation and Recycling*, 105, 134-142. doi: 10.1016/j.resconrec.2015.10.022
- 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
- Mellinas, C., Valdés, A., Ramos, M., Burgos, N., Garrigos, M. D. C., & Jiménez, A. (2016). Active edible films: Current state and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(2). doi: 10.1002/app.42631

- Mitra, R., Xu, T., Xiang, H., & Han, J. (2020). Current developments on polyhydroxyalkanoates synthesis by using halophiles as a promising cell factory. *Microbial Cell Factories*, *19*, 1-30. doi: 10.1186/s12934-020-01342-z
- Mohammed, S., Panda, A. N., & Ray, L. (2019). An investigation for recovery of polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Bacillus* sp. BPPI-14 and *Bacillus* sp. BPPI-19 isolated from plastic waste landfill. *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 1085–1096. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.155
- Muhammadi, S., Afzal, M., & Hameed, S. (2015). Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, *8*(3–4), 56–77. doi: 10.1080/17518253.2015.1109715
- Noda, I., Green, P. R., Satkowski, M. M., & Schechtman, L. A. (2005). Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. *Biomacromolecules*, *6*(2), 580-586. doi: 10.1021/bm049472m
- Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., ... Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(11), 4795–4810. doi: 10.1007/s00253-020-10568-1
- Pan, C., Tan, G. Y. A., Ge, L., Chen, C. L., & Wang, J. Y. (2016). Microbial removal of carboxylic acids from 1, 3-propanediol in glycerol anaerobic digestion effluent by PHAs-producing consortium. *Biochemical Engineering Journal*, *112*, 269-276. doi: 10.1016/j.bej.2016.04.031
- Poppe, L. J., Paull, C. K., Newhall, C. G., Bradbury, J. P., & Ziagos, J. (1985). A geophysical and geological study of Laguna de Ayarza, a Guatemalan caldera lake. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, *25*(1-2), 125-144.
- 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>

- Quillaguaman, J., Delgado, O., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2006). Poly (β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1-2), 148-154. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.05.013
- Rathika, R., Janaki, V., Shanthi, K., & Kamala-Kannan, S. (2018). Bioconversion of agro-industrial effluents for polyhydroxyalkanoates production using *Bacillus subtilis* RS1. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(10), 5725–5734. Doi:10.1007/s13762-018-2155-3
- Raza, Z. A., Tariq, M. R., Majeed, M. I., & Banat, I. M. (2019). Recent developments in bioreactor scale production of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 42(6), 901-919. doi: 10.1007/s00449-019-02093-x
- Sadh, P., Duhan, S., & Duhan, J. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1–15. doi: 10.1186/s40643-017-0187-z
- 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(3), 89-96. doi: 10.3923/jm.2009.89.96
- Scaffaro, R., Botta, L., Maio, A., Mistretta, M. C., & La Mantia, F. P. (2016). Effect of graphene nanoplatelets on the physical and antimicrobial properties of biopolymer-based nanocomposites. *Materials*, 9(5), 351. doi: 10.3390/ma9050351
- Schmidt, M., Ienczak, J. L., Quines, L. K., Zanfonato, K., Schmidell, W., & de Aragão, G. M. F. (2016). Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production in a system with external cell recycle and limited nitrogen feeding during the production phase. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 130-135. doi: 10.1016/j.bej.2016.04.013
- Seo, K. S., & Bohach, G. A. (2014). *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 1, 547–573. doi:10.1128/9781555818463.ch21

- Shen, R., Cai, L., Meng, D., Wu, L., Guo, K., Dong, G., ... & Chen, G. (2014). Benzene containing polyhydroxyalkanoates homo-and copolymers synthesized by genome edited *Pseudomonas entomophila*. *Science China Life Sciences*, 57(1), 4-10. doi: 10.1007/s11427-013-4596-8
- Sushmitha, B. S., Vanitha, K. P., & Rangaswamy, B. E. (2016). Bioplastics-A Review. *International Journal of Modern Trends in Engineering and Research*, 3(4), 411-413.
- Tan, D., Xue, Y. S., Aibaidula, G., & Chen, G. Q. (2011). Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresource Technology*, 102(17), 8130-8136. doi: 10.1016/j.biortech.2011.05.068
- Thakur, S., Chaudhary, J., Sharma, B., Verma, A., Tamulevicius, S., & Thakur, V. (2018). Sustainability of Bioplastics: Opportunities and Challenges Sourbh. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 13, 68-75. doi: 10.1016/j.cogsc.2018.04.013
- Tortajada, M., Ferreira, L., & Prieto, M. A. (2013). Second-generation functionalized mediumchain-length polyhydroxyalkanoates: the gateway to high-value bioplastic applications. *International Microbiology*, 16(1), 1-15. doi: 10.2436/20.1501.01.175
- Venkateswar R.M., & Venkata M. S. (2012). Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 114, 573–582. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.127
- Wang, Y., Sun, Z., Tian, J., Wang, H., Wang, H., & Ji, Y. (2016). Influence of Environment on Ageing Behaviour of the Polyurethane Film. *Materials Science*, 22(2), 1392-1320. doi: 10.5755/j01.ms.22.2.12935
- Yajima, T., Nagatomo, M., Wakabayashi, A., Sato, M., Taguchi, S., & Maeda, M. (2020). Bioconversion of biphenyl to a polyhydroxyalkanoate copolymer by *Alcaligenes denitrificans* A41. *AMB Express*, 10(1), 69-78. doi: 10.1186/s13568-020-01093-5
- Ye, J., Hu, D., Yin, J., Huang, W., Xiang, R., Zhang, L., ... & Chen, G. Q. (2020). Stimulus response-based fine-tuning of polyhydroxyalkanoate pathway in *Halomonas*. *Metabolic engineering*, 57, 85-95. doi: 10.1016/j.ymben.2019.10.007

Yue, H., Ling, C., Yang, T., Chen, X., Chen, Y., Deng, H., ... & Chen, G. Q. (2014). A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 108. doi: 10.1186/1754-6834-7-108

Zhao, H., Zhang, H. M., Chen, X., Li, T., Wu, Q., Ouyang, Q., & Chen, G. Q. (2017). Novel T7-like expression systems used for *Halomonas*. *Metabolic Engineering*, 39, 128-140. doi: 10.1016/j.ymben.2016.11.007

13 Apéndice

No aplica

14 Aspectos éticos y legales

No aplica

15 Vinculación

Entre las actividades de vinculación se logró la asistencia técnica y de reactivos de la empresa “LABIMED”, a través de la especialista microbióloga Lcda. Otilia Vásquez, asesora científica, para financiar e identificar las bacterias productoras de bioplásticos mediante técnicas de biología molecular (proteómica) por espectrometría de masas.

Además, se tramitó a nivel de la Jefatura del Laboratorio Clínico del Hospital General San Juan de Dios con la Lcda. Miriam Alcazar, el préstamo del espectrómetro de masas (MALDI-TOF) para la identificación de las bacterias.

16 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Se organizó y se implementó el taller virtual Bioprospección de la diversidad en Guatemala del 27 de Abril al 5 de Mayo de 2021, presentándose los temas: “Potencial biotecnológico de la diversidad nativa”, “Polímeros microbianos y plásticos biodegradables”, “Producción de polímeros

biodegradables: Polihidroxialcanoatos”, como parte de las actividades de difusión y divulgación, así como apoyo a la docencia de los cursos del área aplicada que se sirvió a 56 estudiantes del 7mo. ciclo de la carrera de Químico Biólogo en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia (USAC). El taller además concientizó a los asistentes de su responsabilidad en la utilización de plásticos biodegradables que impidan el deterioro y contaminación del medio ambiente. Así como se les motivó a participar en futuros proyectos de investigación al respecto a través de los programas de evaluación terminal aprobados por la facultad para la carrera de Químico Biólogo.

Se participó en varios talleres organizados por la Digi para el fortalecimiento de la divulgación de resultados de investigación a través de capacitaciones para publicación de artículos científicos en revistas indexadas a nivel nacional e internacional, conocimientos que se utilizaron para la elaboración del artículo científico.

Con el fin de dar a conocer los resultados de la investigación DES3-2020, a la comunidad científica internacional se sometió a revisión a la Revista Colombiana de Biotecnología el artículo científico: “Aislamiento e identificación de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos (PHA) en suelos agrícolas de Guatemala. Ricardo Figueroa¹, María del Carmen Bran¹, Osberth Morales¹, Gustavo Álvarez², (¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, ²Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala).

Se participó en la jornada de presentación de investigaciones cofinanciadas por la Dirección General de Investigación del 7 de mayo de 2021: “Producción de plásticos biodegradables en Guatemala (Fase I): Aislamiento e identificación de bacterias productoras de bioplásticos, extracción y purificación”.

Por otro lado se participó en el “Foro interuniversitario de ambiente”, llevado a cabo el 25 de agosto de 2021 en la que participaron además de la universidad de San Carlos de Guatemala –USAC, otras como Rafael Landivar, Mariano Gálvez, Del Istmo y Galileo, organizado por el comité académico de producción más limpia. El tema presentado fue ” Producción de plásticos

biodegradables” en la que se expusieron los resultados obtenidos en los proyectos DES3-2020 y AP.2021.

Se participó en el encuentro de investigadores del plástico en un conversatorio para compartir resultados de investigación científica relacionados a plásticos, microplásticos, bioplásticos, compostabilidad y biodegradabilidad con fecha 15 de octubre 2021. Esta participación fue muy importante para la difusión de los resultados de los proyectos 2020-2021, tomando en cuenta que el acceso a la información es muy importante para poder plantear soluciones prácticas y que no dañan el medio ambiente. Este conversatorio fue organizado por el Programa PUIRNA de la Digi y Comisión Ambiental, Cambio Climático, Seguridad y Resiliencia del Consejo Superior Universitario y Comisión Universitaria para la Atención a la Población con Discapacidad.

Se participó en el “III Encuentro Científico de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia” con la ponencia “Aislamiento e identificación de bacterias productoras de bioplásticos en Guatemala, extracción y purificación, realizado del 16 al 19 de noviembre en Guatemala. Este encuentro fue organizado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la unidad académica indicada y que permitió la difusión de los resultados a la comunidad científica facultativa.

Además se participó en el “VII Congreso de Química Biológica” con el tema “Polihidroxicanoatos, una alternativa a los plásticos derivados del petróleo” donde se dio a conocer a la comunidad científica nacional de Químicos Biólogos, estudiantes, docentes y profesionales, la importancia de su uso así como las alternativas de producción por microorganismos y los trabajos efectuados y que se efectúan actualmente cofinanciados por la Digi y avalados por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. La ponencia se presentó el jueves 18 de noviembre de 2021.

Se colaboró con el periodista de la unidad de divulgación de la universidad edición noviembre Edson Sebastian Losano en la publicación a nivel del diario universitario: “Periódico de la Usac”, Universidad de San Carlos de Guatemala No.309. Noviembre de 2021, sobre la importancia de los trabajos cofinanciados por la Digi: “Producción de plásticos biodegradables en Guatemala (Fase I): aislamiento e identificación de bacterias productoras de bioplásticos, extracción y purificación”, así

también la importancia del trabajo “Producción de plásticos biodegradables en Guatemala (fase II): bioplásticos de bacterias halófilas nativas a partir de residuos agrícolas”. cuyas muestras se tomaron en suelos de Tecpán-Guatemala, Chimaltenango y en la laguna de Ayarza, respectivamente, en la búsqueda de bacterias productoras de polihidroxialcanoatos como una alternativa para contrarrestar la contaminación generada por los plásticos a base de petroquímicos y su substitución por plásticos de origen biológico biodegradables. El artículo se llama “En Búsqueda de plástico biodegradable”(Losano, E.S. (2021). En búsqueda de plástico biodegradable. *Periódico de la Usac*, (309), 21.)

17 Aporte de la propuesta de investigación a los ODS:

Se obtuvo un cepario de las cepas locales bacterianas halófilas de la Laguna de Ayarza capaces de producir polihidroxialcanoatos utilizando desechos agrícolas a base de pulpa de café, cascara de plátanos y salvado de trigo. También se determinó el coeficiente de rendimiento para determinar las cepas con mayor potencial en la producción de PHA. La importancia de esta investigación radicó en encontrar cepas de bacterias halófilas productoras de bioplásticos que harán más efectiva la producción de PHA y que son de interés para la producción industrial a gran escala, como una alternativa en la elaboración de productos que actualmente son a base de plásticos petroquímicos. Además, también para dar un valor agregado a la preservación de la Laguna de Ayarza como fuente de cepas con potencial biotecnológico, dar cumplimiento a los ODS “vida submarina, acción por el clima, agua limpia y saneamiento, así como también a la campaña Mares Limpios de la ONU de la cual forma parte Guatemala”.

18 Orden de pago final

Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Investigador pagado en DIGI	Firma
Ricardo Andrés Figueroa Ceballos	Investigador	20151723	Si	

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

19 Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación:

La coordinadora del proyecto de investigación Licda. Maria del Carmen Bran González, con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación cofinanciados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales.

María del Carmen Bran González Coordinador del proyecto de investigación	Firma
Fecha: 10/enero/2022	

20 Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

Vo.Bo. Dra. María Eunice Enríquez Cotton Aval: Directora Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas	Firma
Fecha: 10/enero/2022	

21 Visado de la Dirección General de Investigación

Vo.Bo. Saúl Guerra Gutiérrez Coordinador(a) del Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente	Firma
Fecha: 10/enero/2022	

Informe final proyecto de investigación 2021

Dirección General de Investigación –DIGI-

<p>Vo.Bo. Ing. Rufino Salazar Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación</p>	<p>Firma</p>
<p>Fecha: 10/enero/2022</p>	