

## ESTUDIO DE BACTERIAS HALÓFILAS PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMATERIALES TIPO POLIHIDROXIALCANOATOS

## STUDY OF HALOPHILIC BACTERIA FOR THE PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATE TYPE BIOMATERIALS

San Miguel-González G.<sup>1</sup>, Alemán-Huerta M.E.<sup>1\*</sup>, Silva-Ortiz T. C. <sup>1</sup>, De La Torre-Zavala S.<sup>1</sup>,  
Quintero- Zapata I.<sup>1</sup>, Martínez-Herrera R.E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, México

<sup>2</sup>Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, México

\*maria.alemanhr@uanl.edu.mx

### Artículo Científico

Publicado: 30 abril 2024

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue encontrar una cepa halófila productora de PHA por métodos cualitativos y evaluar su rendimiento con distintos parámetros de fermentación a nivel matraz (pH 8, 9, 10 y a 30, 37 y 42 °C). La determinación cualitativa fue llevada a cabo mediante tinción Azul de Nilo y microscopía de fluorescencia, se evaluó la producción de PHA en un medio de cultivo con exceso de sales y el extracto obtenido fue analizado por espectroscopia de infrarrojo (FT-IR). Después de ser evaluada en medio líquido, la producción de biomasa seca resultó en 4.81g/L a 30 °C, pH10 y 150 rpm. Así como 0.17g/L de PHA a pH 9, 37 °C y 150 rpm. El análisis FT-IR mostró un pico característico de los PHA cerca de 1700cm<sup>-1</sup>. La cepa en estudio aislada en el desierto de Cuatrociénegas, Coahuila fue positiva a la tinción específica para producción de PHA. La temperatura de 42 °C,

pH10 resultó ser la condición para el rendimiento mayor del biopolímero. Los hábitats desérticos son fuente de microorganismos de importancia industrial.

**Palabras clave:** Bacteria halófila, Fermentación, Polihidroxicanoatos.

### ABSTRACT

The objective of the present work was to find a halophilic strain that produces PHA by qualitative methods to evaluate its performance with different fermentation parameters at the flask level (pH 8, 9, 10 and at 30, 37 and 42°C). The qualitative determination was carried out using Nile Blue staining and fluorescence microscopy, the production of PHA was evaluated in a culture medium with excess salts and the extract obtained was analyzed by infrared spectroscopy (FT-IR). After being evaluated in liquid medium, dry biomass production resulted in 4.8g/L at 30°C, pH10 and 150rpm. As well as

0.17g/L of PHA at pH9, 37 °C and 150 rpm. FT-IR. Analysis showed a characteristic peak of PHAs near  $1700\text{cm}^{-1}$ . The strain under study isolated in the desert of Cuatrociénegas, Coahuila was positive for specific staining for PHA production. The temperature of 42 °C, pH10 turned out to be the condition for the highest yield of the biopolymer. Desert habitats are a source of microorganisms of industrial importance.

**Keywords.** Halophilic bacteria, Fermentation, polyhydroxyalkanoates.

## INTRODUCCIÓN

La producción mundial de plástico derivado del petróleo en 2019 fue de 370 millones de toneladas, lo que representa un 300% más que la demanda y producción de plástico de hace 20 años [1]. Con el efecto que dejó la pandemia de COVID-19, estas cifras siguen en aumento, y según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sólo el 9% de los plásticos producidos se reciclan, mientras que el resto se elimina en vertederos, ríos, lagos y océanos, por tal motivo, la OMS indujo a los científicos a encontrar rutas y materiales alternativos para reducir las cargas ambientales.

Los Polihidroxicanoatos (PHA) son un grupo de polímeros biodegradables, con propiedades similares a las de los plásticos sintéticos que se acumulan a manera

de "carbonosomas" en el citoplasma, pueden ser producidos por distintos microorganismos, principalmente por bacterias mediante condiciones excesivas de fuente de carbono y condiciones limitantes de nitrógeno [2-3].

La producción de PHA por microorganismos extremófilos puede resultar con ventajas competitivas en la producción a gran escala de este tipo de biopolímeros, tales como el empleo de cepas halófilas, las cuales toleran altas concentraciones de NaCl impidiendo así la proliferación de microorganismos contaminantes y disminuyendo los costos de operación por esterilización del reactor [4].

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Productos químicos y sustratos.

Todos los sustratos y productos químicos de calidad analítica utilizados en este proyecto se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EE. UU.).

### Análisis cualitativo de producción de PHA.

Se estudiaron 20 cepas bacterianas halófilas y se seleccionó de manera cualitativa la producción de PHA. Se preparó un medio de cultivo sólido LB (Lennox) que contenía cloruro de sodio (NaCl), triptona y extracto de levadura, adicionalmente se añadió azul de Nilo ( $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{ClN}_3\text{O}$ ) y glucosa  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ , finalmente fue ajustado a pH8. Se observaron en un transiluminador (Fisher Scientific) y se

seleccionó la cepa bacteriana que mostró mayor fluorescencia bajo luz UV [5].

**Evaluación de la producción de PHA bajo diferentes parámetros de fermentación.** Se prepararon medios de cultivo líquidos LB modificado (añadiendo glucosa) para la biosíntesis de PHA, se probaron tres temperaturas (30, 37 y 42 °C) y tres pHs (8, 9 y 10).

Se procedió a cuantificar suspensión de esporas de la cepa seleccionada, mediante la técnica de cuenta viable [6]; dicha suspensión fue conservada a -4 °C en microtubos para su uso posterior.

**Preparación de pre-inóculos.** El caldo LB modificado (NaCl 1%, extracto de levadura 0.5%, triptona 1%, glucosa 1.5%) fue preparado en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con un volumen de 100 mL. Dichos caldos, se inocularon con 100 µL de la solución de esporas de la cepa en estudio. Se llevaron a la incubadora con agitación (Lab-Line) por 24 h, a 150 rpm, y a las diferentes temperaturas y los distintos pH en estudio.

Los matraces conteniendo el medio de cultivo, fueron inoculados con 2% v/v del pre-inóculo. Una vez inoculados, se llevaron a las condiciones en estudio por 48 h.

**Biomasa seca.** Se pasaron 2 mL en 5 microtubos (previamente pesados) de

cada matraz, posteriormente fueron llevados a la centrifuga (Beckman Coulter) a 5000 rpm, por 15 min. El sobrenadante fue descartado y se procedió a dejar los microtubos a una temperatura de 55 °C [7] en una estufa de calentamiento (Riossa) por 24 h. Una vez secos, se registró el peso final de biomasa seca. La producción de biomasa seca se calculó en gramos por litro (g/L) conforme a la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} & \text{Biomasa seca} \frac{g}{L} \\ & = (\text{Peso final microtubo}) - \\ & (\text{Peso inicial microtubo}) * 500 \end{aligned}$$

**Extracción y purificación del biopolímero.** Los caldos de cultivo se centrifugaron a 8000 rpm a 4 °C por 15 min. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 15 mL de Hipoclorito de Sodio (NaClO) y se colocaron en baño de ultrasonido (Branson) por 30 min y posterior a un lavado con agua destilada, se lavaron con cloroformo (CHCl<sub>3</sub>). Posteriormente se colocaron en ebullición por un minuto y se vaciaron en cajas Petri de vidrio, previamente pesadas. (Figura 4b). Se dejaron secar para registrar su peso final [8]. La producción del biopolímero se calculó en gramos por litro (g/L) conforme a la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} & \text{PHA} \frac{g}{L} \\ & = (\text{Peso final placa}) - (\text{Peso inicial placa}) \\ & * 5 \end{aligned}$$

El rendimiento del biopolímero (% de biomasa seca) se calculó en porcentaje conforme a la siguiente ecuación:

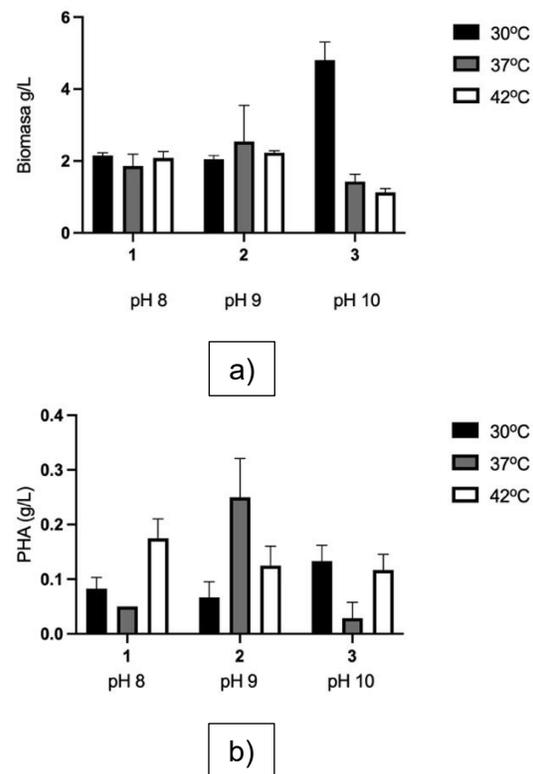
$$\% \text{ PHA de biomasa seca} = \frac{\left(\text{PHA} \frac{\text{g}}{\text{L}}\right)}{\left(\text{Biomasa seca} \frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} * 100$$

**Caracterización química.** Se realizó un análisis FT-IR a través de un Espectrómetro de espectro (PerkinElmer) para conocer la estructura química del biopolímero producido. Para cada espectro, se realizaron dieciséis escaneos entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  que fueron promediados, con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

**Análisis cualitativo de producción de PHA y estudio morfológico.** Se seleccionó la cepa bacteriana halófila que presentó mayor fluorescencia. Posteriormente se sometió a la reactivación en agar LB y presentó morfología macroscópica: colonias de 2 a 4 mm de diámetro, colonias circulares, borde liso, elevación convexa, consistencia mucoide. La cepa en estudio fue capaz de crecer en un medio excesivo de NaCl, lo cual indica que la cepa, al ser aislada de un ambiente salino, puede crecer a concentraciones de 1 a 5% de NaCl [9].

**Evaluación de la producción de PHA bajo diferentes parámetros de fermentación.** Los resultados de biomasa fluctuaron entre 1.13 y 4.81g/L, donde la mayor producción se observó a 30 °C, pH10 y 150 rpm (Figura 1a).



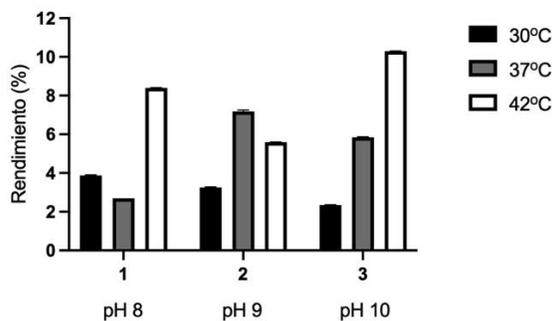
**Figura 1.** Efecto de las condiciones de incubación en el rendimiento de la cepa en estudio, a) biomasa y b) Producción de PHA.

Otros estudios reportan valores de producción de biomasa menores con cepas halófilas y utilizando NaCl 1% en sus fermentaciones *In vitro*, por su parte, la temperatura es un factor importante en la alta producción de biomasa debido al ecosistema extremo del hábitat de procedencia de las cepas bacterianas [10]. La

producción de PHA en g/L, resultó entre 0.02 y 0.17g/L, mostrando a los parámetros pH9, y 37 °C de mayor producción (**Figura. 1b**). Se han reportado distintas bacterias halófilas aisladas de suelo y agua, con valores alrededor de 0.4g/L [11-12].

Además, se han evaluado las temperaturas empleadas en este estudio con distintas cepas halófilas, sin embargo, la temperatura de 37 °C, ha demostrado ser sobresaliente en la producción de PHA g/L [13].

El mayor porcentaje de PHA en biomasa seca fue de 10.3%, el cual se logró bajo los parámetros de pH10 y temperatura de 42 °C (**Figura 2**).

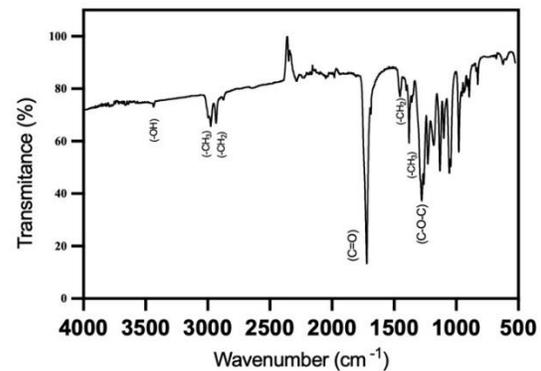


**Figura 2.** Rendimiento del biopolímero bajo distintos parámetros de fermentación

Rivera-Terceros y colaboradores [14] reportan altos rendimientos de PHA utilizando temperaturas elevadas en sus fermentaciones. Las cepas bacterianas halófilas destacan cualidades únicas debido a que, su crecimiento óptimo es con altas concentraciones de sal, se inhiben el

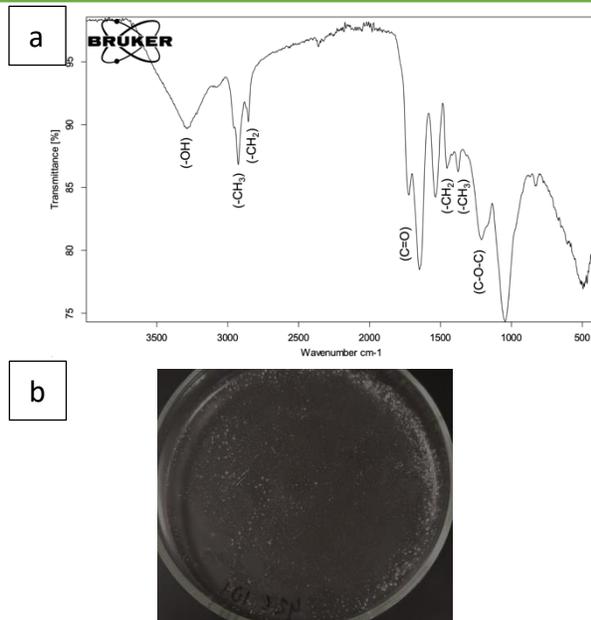
crecimiento de bacterias no halófilas [15].

**Caracterización química.** El análisis FT-IR realizado a través del extracto polimérico obtenido, se comparó con un Polihidroxialcanoato de cadena corta (PHB) comercial (**Figura 3**) para observar la similitud en sus bandas con el polímero producido.



**Figura 3.** Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) de PHB comercial (Sigma-Aldrich)

El espectro presenta una banda características en 1722  $\text{cm}^{-1}$  y 1648  $\text{cm}^{-1}$  que están relacionadas con el grupo carbonilo C=O del biopolímero [16,18]. Además, mostró un pico en 3292 $\text{cm}^{-1}$ , que podría indicar la presencia de enlaces intensos del grupo -OH, (**Figura 4a**) [17]. Así como se revela una banda distintiva que aparece en 1455  $\text{cm}^{-1}$ , asociada con la deformación asimétrica de los enlaces (C-H) dentro de los grupos (-CH<sub>2</sub>) y (-CH<sub>3</sub>), con otra aparición notable en 1375  $\text{cm}^{-1}$ [18]. Esto demuestra que el espectro obtenido fue similar al PHB control (Sigma-Aldrich).



**Figura 4.** a) Análisis FT-IR del extracto polimérico obtenido b) Apariencia del biomaterial

## CONCLUSIONES

La cepa en estudio aislada en el desierto de Cuatrociénegas, Coahuila fue positiva a la tinción específica para producción de PHA. La temperatura de 37 °C resultó ser la condición para la producción mayor del biopolímero en g/L. Los hábitats desérticos son fuente de microorganismos de importancia industrial.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se logró gracias a las instalaciones del Laboratorio 3 en colaboración con el Laboratorio 9 del Instituto de Biotecnología UANL y al CONAHCYT por la beca otorgada. CVU: 1152042.

## REFERENCIAS

- [1] Obulisamy, P. K., & Mehariya, S. (2021). Polyhydroxyalkanoates from extremophiles: A review. *Bioresource technology*, 325, 124653. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124653>
- [2] Koller M., Maršálek L., de Sousa-Dias, M.M., & Braunegg, G. (2017). Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New biotechnology*, 37(Pt A), 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.05.001>
- [3] Rajesh-Banu, J., Ginni, G., Kavitha, S., Yukesh-Kannah, R., Adish-Kumar, S., Bhatia, S. K., & Kumar, G. (2021). Integrated biorefinery routes of biohydrogen: Possible utilization of acidogenic fermentative effluent. *Bioresource technology*, 319, 124241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124241>
- [4] Stanley, Angelina & Mutturi, Sarma & Vijayendra, S.V.N.. (2021). Halophilic Microorganisms as Potential Producers of Polyhydroxyalkanoates. Authors: Angelina S, Sarma Mutturi and SVN Vijayendra. [https://doi.org/10.1007/978-981-16-1823-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-16-1823-9_10)

- [5] Bhuwal, A. K., Singh, G., Aggarwal, N. K., Goyal, V., & Yadav, A. (2013). Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. *International journal of biomaterials*, 2013, 752821. <https://doi.org/10.1155/2013/752821>
- [6] Thapa, Christina & Shakya, Pallavi & Shrestha, Rabina & Pal, Sushovita & Manandhar, Prakash. (2019). Isolation of Polyhydroxybutyrate (PHB) Producing Bacteria, Optimization of Culture Conditions for PHB production, Extraction and Characterization of PHB. *Nepal Journal of Biotechnology*. 6. 62-68. <https://doi.org/10.3126/njb.v6i1.22339>
- [7] Getachew, A., Woldesenbet, F. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. *BMC Res Notes* 9, 509 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2321-y>
- [8] Martínez-Herrera, R. E., Alemán-Huerta, M. E., Almaguer-Cantú, V., Rosas-Flores, W., Martínez-Gómez, V. J., Quintero-Zapata, I., Rivera, G., & Rutiaga-Quiñones, O. M. (2020). Efficient recovery of thermostable polyhydroxybutyrate (PHB) by a rapid and solvent-free extraction protocol assisted by ultrasound. *International journal of biological macromolecules*, 164, 771–782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.101>
- [9] Mendoza-Jiménez, L., Patiño-Hernández, V. M., Martínez-García, M., Garduño-Solórzano, G., Monsalvo-Reyes, A. C., & Campos-Contreras, J. E. (2015). Caracterización de bacterias halófilas aisladas de un cultivo a cielo abierto tipo raceway de espirulina.
- [10] Hong, J. W., Song, H. S., Moon, Y. M., Hong, Y. G., Bhatia, S. K., Jung, H. R., Choi, T. R., Yang, S. Y., Park, H. Y., Choi, Y. K., & Yang, Y. H. (2019). Polyhydroxybutyrate production in halophilic marine bacteria *Vibrio proteolyticus* isolated from the Korean peninsula. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42(4), 603–610. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-02066-6>.
- [11] Flores, V., A. D. P., & Idrogo, B. E. (2015). Rendimiento de polihidroxialcanoatos, PHA, de bacterias halófilas aisladas de suelo y agua de salinas en Mórrope, Lambayeque, 2014.
- [12] Guzmán, C., Hurtado, A., Carreño, C., & Casos, I. (2017). Producción de polihidroxialcanoatos por bacterias halófilas nativas

- utilizando almidón de cáscaras de *Solanum tuberosum* L. *Scientia Agropecuaria*, 8(2), 109-118.  
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2017.02.03>
- [13] Li, H. F., Wang, M. R., Tian, L. Y., & Li, Z. J. (2021). Production of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Vibrio alginolyticus* Strains Isolated from Salt Fields. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(20), 6283.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26206283>
- [14] Rivera-Terceros, P., Tito-Claros, E., Torrico, S., Carballo, S., Van-Thuoc, D., & Quillaguamán, J. (2015). Production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Halomonas boliviensis* in an air-lift reactor. *Journal of biological research (Thessalonike, Greece)*, 22(1), 8.  
<https://doi.org/10.1186/s40709-015-0031-6>
- [15] 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.068>
- [16] Cervantes-Uc, J. M., Catzin, J., Vargas, I., Herrera-Kao, W., Moguel, F., Ramirez, E., Rincón-Arriaga, S., & Lizama-Uc, G. (2014). Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoates produced by an extreme halophilic bacterium, *Halomonas nitroreducens*, isolated from hypersaline ponds. *Journal of applied microbiology*, 117(4), 1056–1065.  
<https://doi.org/10.1111/jam.12605>
- [17] Hagagy, N., Saddiq, A. A., Tag, H. M., Selim, S., AbdElgawad, H., & Martínez-Espinosa, R. M. (2022). Characterization of Polyhydroxybutyrate, PHB, Synthesized by Newly Isolated Haloarchaea *Halolamina* spp. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(21), 7366.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27217366>
- [18] Mohandas, S. P., Balan, L., Lekshmi, N., Cubelio, S. S., Philip, R., & Bright Singh, I. S. (2017). Production and characterization of polyhydroxybutyrate from *Vibrio harveyi* MCCB 284 utilizing glycerol as carbon source. *Journal of applied microbiology*, 122(3), 698–707.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13359>