

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.¹, Alemán-Huerta M.E.^{1*}, Silva-Ortiz T. C. ¹, De La Torre-Zavala S.¹,
Quintero- Zapata I.¹, Martínez-Herrera R.E.²

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto de Biotecnología, México

²Tecnológico 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 150rpm. Así como 0.17g/L de PHA a pH 9, 37°C y 150rpm. El análisis FT-IR mostró un pico característico de los PHA cerca de 1700cm⁻¹. 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 150rpm. FT-IR. Analysis showed a characteristic peak of PHAs near 1700cm⁻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.

INTRODUCCION

La producción mundial de plástico derivado del petróleo es de 370 millones de toneladas en 2019, 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 Polihidroxialcanoatos (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

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 con exceso de sales, azul de Nilo, y fue ajustado a pH8. Se observaron en un transiluminador y se seleccionó la cepa con mayor intensidad de fluorescencia.

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 pH (8, 9 y 10).

De las cepas seleccionadas, se procedió a cuantificar suspensión de esporas mediante la técnica de cuenta viable; dicha suspensión fue conservada a -4°C en microtubos para su uso posterior.

Preparación de pre-inóculos . El medio de cultivo LB modificado fue preparado en matraces Erlenmeyer de 250mL de capacidad con un volumen de 100mL.

Dichos caldos, se inocularon con 100 μ L de la solución de esporas de la cepa en estudio. Se llevaron a la incubadora de agitación por 24h, a 150rpm, y a los diferentes tratamientos.

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 48h.

Biomasa seca. Se pasaron 2mL en 5 microtubos (previamente pesados) de cada matraz, posteriormente fueron centrifugados a 5000 rpm, por 15 min. El sobrenadante fue descartado y se procedió a dejar los microtubos a una temperatura de 50°C por 24h. Una vez secos, se registró el peso final de biomasa seca. La producción de biomasa seca se calculó 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 8000rpm a 4°C por 15min. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 15mL de NaClO y se colocaron en baño de ultrasonido por 30min y posterior a un lavado con agua destilada, se les aplicó cloroformo. Posteriormente se colocaron en ebullición por un minuto y se vaciaron en cajas Petri de vidrio, previamente pesadas. (**Figura 4 b**). Se dejaron secar

2h para registrar su peso final (Martínez *et al.*, 2020). La producción del biopolímero se calculó 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 conforme a la siguiente ecuación:

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

Caracterización química. Se realizó un análisis FT-IR para conocer la estructura química del biopolímero producido. Para cada espectro, se realizaron dieciséis escaneos entre 4000 y 400cm⁻¹ que fueron promediados, con una resolución de 4cm⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

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

Evaluación de la producción de PHA bajo diferentes parámetros de fermentación. Los resultados de biomasa fluctuaron entre 1.13 y 4.81g/L, resultando las condiciones de mayor producción a 30°C, pH10 y 150rpm (**Figura 1a**). 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 [6].

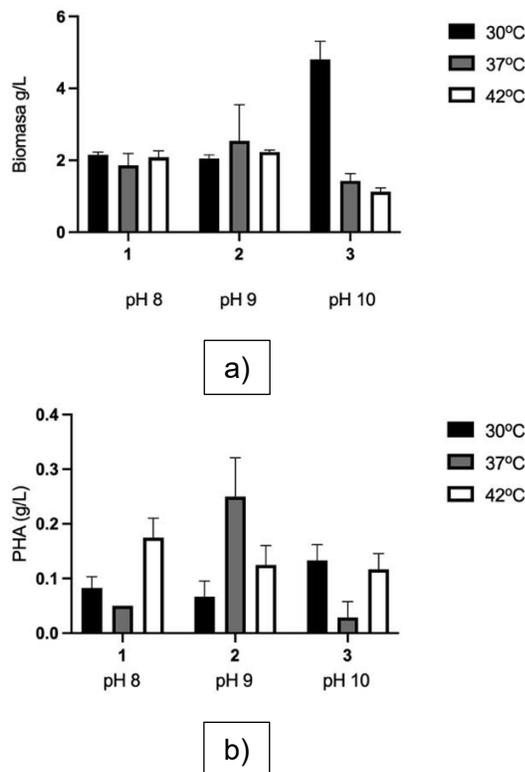


Figura 1. Efecto de las condiciones de incubación en el rendimiento de la cepa en estudio, a) biomasa y b) Producción de PHA.

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 3**).

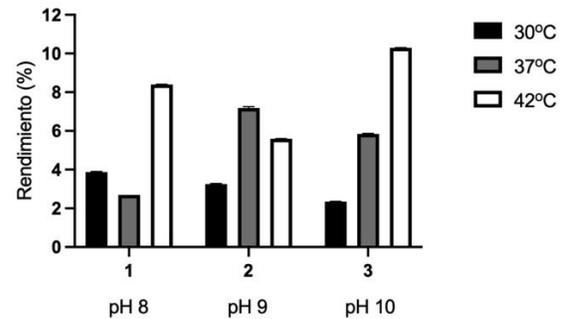


Figura 3. Rendimiento del biopolímero bajo distintos parámetros de fermentación

Caracterización química. El análisis FT-IR logró presentar picos alrededor de los 1700cm⁻¹, relacionados con el grupo carbonilo C=O característico de los Polihidroxicanoatos además, mostró picos característicos alrededor de 3400cm⁻¹, que indican la presencia de enlaces intensos del grupo -OH, (**Figura 4**) [7].

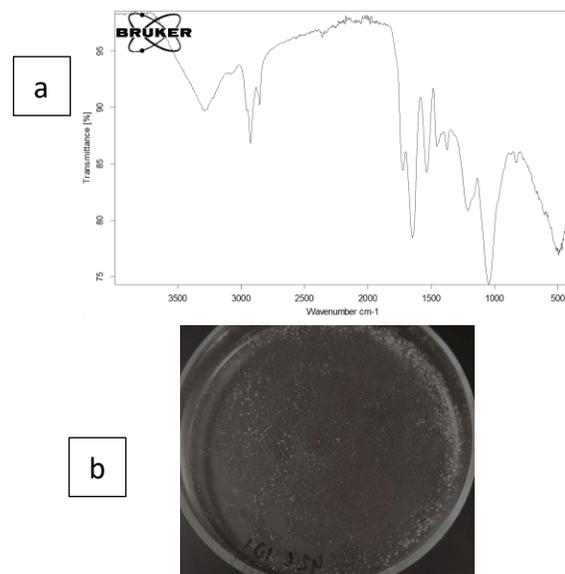


Figura 4. a) Análisis FT-IR del extracto polimérico obtenido b) Apariencia del biomaterial

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 42°C, pH10 resultó ser la condición para el rendimiento mayor del biopolímero. 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., Yakesh-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
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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>

