

Guanajuato Rumbo al Desarrollo Sustentable, Etapa 2.0: Análisis de bacterias productoras de polihidroxitirato (PHB) dentro del rol de bioplásticos

Laura Vanessa Facundo Martínez¹, Ulises Emiliano Rodríguez Castrejón¹, Aurelio Álvarez Vargas², Carmen Cano Canchola², Alma Hortensia Serafin Muñoz^{1*}

¹Universidad de Guanajuato, División de Ingenierías, Campus Guanajuato.

²Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Exactas y Naturales, Campus Guanajuato.
sermuah@ugto.mx^{1*}

Abstract

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are a class of biodegradable thermoplastic polymers that can be produced from microorganisms. In the PHA family, polyhydroxybutyrate (PHB) is the most studied polymer due to its physical and chemical properties, which are competent against many conventional polymers such as polypropylene (PP). In the present work, the ability of the bacteria *Rhodococcus gordonae*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Exiguobacterium indicum* and *Jeotgalibacillus Soli* to produce polyhydroxybutyrate (PHB) from different culture media was studied. Through the Sudan Black staining methodology it was observed that *R. gordonae*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans* and *Jeotgalibacillus Soli* showed a positive production for PHB. These results contribute to biotechnological research into sustainable development for the use of biodegradable plastics from microorganisms.

Keywords: *Rhodococcus gordonae*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Exiguobacterium indicum*, *Jeotgalibacillus soli*; biopolymer, bioplastics, biodegradable plastics, sustainability.

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHA), es una clase de polímeros termoplásticos biodegradables que pueden producirse a partir de microorganismos, dentro de la familia de los PHA se encuentra el Polihidroxitirato (PHB), siendo el más estudiado debido a sus propiedades físicas y químicas competentes frente a muchos polímeros convencionales como el polipropileno (PP). En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la capacidad de las bacterias *Rhodococcus gordonae*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Exiguobacterium indicum* y *Jeotgalibacillus Soli* para producir polihidroxitirato (PHB) a partir de diferentes medios de cultivo. A través de la metodología con la tinción Negro Sudán se observaron que *R. gordonae*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans* y *Jeotgalibacillus Soli* presentaron una producción positiva para PHB. Estos resultados contribuyen en la investigación biotecnológica dentro del desarrollo sustentable para el uso de plásticos biodegradables a partir de microorganismos.

Palabras clave: *Rhodococcus gordonae*, *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Exiguobacterium indicum*, *Jeotgalibacillus soli*; biopolímero, bioplásticos, plásticos biodegradables, sustentabilidad.

Introducción

En la actualidad parece inevitable el uso de los polímeros sintéticos, debido a su gran número de aplicaciones, sin embargo, este uso desmedido ha traído consigo consecuencias medioambientales que continúan incrementando. La problemática principal que concierne al uso de estos plásticos, generalmente de un solo uso, radica en su procedencia de una manufactura dependiente de fuentes no renovables como petróleo y gas, además de un complejo y lento proceso de degradación. Es por ello por lo que se han hecho esfuerzos en la búsqueda de nuevas propuestas de materiales, tal es el caso de los bioplásticos. (Marcelo Muller-Santos, 2020). La familia de los polihidroxialcanoatos (PHA), es una clase de polímeros termoplásticos biodegradables que pueden producirse a partir de muchos microorganismos, dentro de la familia de los PHA se encuentra el Polihidroxibutirato (PHB), siendo el más estudiado debido a sus propiedades físicas y químicas competentes frente a muchos polímeros convencionales, por ejemplo, el polipropileno (PP), (Campuzano, 2015).

Tabla 1. Cepas reportadas en la producción de PHB

Cepa	Sustrato o condición de estrés	Medio de Cultivo	Aplicación del PHB	Referencia
Cyanobacteria	No se menciona	Ácido cítrico: 0,006 g, citrato férrico: 0,006 g, EDTA: 0,001 g, Na CO : 0,02 g, MgSO .7H O: 0,075 g, CaCl .2H O: 0,036 234222 g, K ₂ HPO ₄ : 0,04 g, MnCl ₂ .4H ₂ O: 1,81 mg, Na ₂ MoO ₄ : 0,039 mg, H ₃ BO ₃ : 2,86 mg, CuSO ₄ .5H ₂ O: 0,079 mg, Co (SO ₄) .7H ₂ O: 0,04 mg y ZnSO ₄ .7H ₂ O: 0,222 mg/L.	En la producción de plásticos biodegradables.	(K. Gopi, 2014)
<i>Bacillus</i> BBST4	Glucosa y glicerol como medio de carbono	(NH ₄) ₂ SO ₄ : 1g/l, K ₂ HPO ₄ : 1.5g/l, MgSO ₄ ·7H ₂ O: 0.2g/l, Na ₂ HPO ₄ : 9g/l, y 1 ml de solución de oligoelementos que contiene FeSO ₄ ·7H ₂ O: 10 g/l, MnSO ₄ ·4H ₂ O: 0.5g/l, ZnSO ₄ ·7H ₂ O: 2.25g/l, CuSO ₄ ·5H ₂ O: 1g/l, CaCl ₂ ·2H ₂ O: 2g/l, H ₃ BO ₄ : 0.23g/l (NH ₄) ₂ Mo ₇ O ₂₄ : 0.2g/l, y 10 ml de HCl.	Aplicaciones comerciales.	(Jimmy A. López, 2011)
<i>Microbacterium</i> sp. WA81	Fructosa como medio de carbono	medio de sal mineral que constaba de 2,0 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2,0 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,6 g/L Na ₂ HPO ₄ , 0,2 g/L MgSO ₄ ·7H ₂ O, 20 mg/L CaCl ₂ , 10 mL/L de solución de metales traza y 0,1 g/L de extracto de levadura. La solución de trazas de metal consta de 1,3 mg/L ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0,2 mg/L FeSO ₄ ·7H ₂ O, 0,6 mg/L (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O y 0,6 mg/L H ₃ BO ₃ .	No se menciona.	(Yehia Osman, 2016)
<i>Burkholderia cepacia</i> BPT1213	Glicerol como fuente de carbono	Medio mínimo de sal que contiene (por litro) 4,5 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ y 0,5 g (NH ₄) ₂ SO ₄ . Separado soluciones estériles de 0,1 M MgSO ₄ ·7H ₂ O (10,0 mL/L) y oligoelementos (1,0 mL/L) que contienen (por litro) 13,9 g FeSO ₄ ·7H ₂ O, 1,98 g MnCl ₂ ·H ₂ O, 0,56 g CoSO ₄ ·7H ₂ O, 2,94 g CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0,34 g CuCl ₂ ·2H ₂ O y 2,88 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O.	No se menciona.	(Y.B. Drusilla Wendy, 2022)
<i>Bacillus cereus</i> NDRMN001	Melaza de azúcar, salvado de arroz y melaza de sagú como fuente de carbono.	Medio selectivo que contiene que contiene 2,5 g de H ₂ KO ₄ P, 25 g de HNa ₂ O ₄ P, 100 g de Manitol, 20 g de NaCl, 1 g de MgSO ₄ , 100 g de C ₃ H ₃ NaO ₃ , 10 g de Peptona, , 1,2 g de azul de bromotimol y 20 g L de agar.	No se menciona.	(Mathiyazhagan Narayanan, 2020)

El PHB es un poliéster alifático producido por muchas procariotas como almacenamiento de carbono y energía. Normalmente las bacterias producen PHB al encontrarse con un exceso de carbono o limitaciones nutricionales como son nitrógeno, fósforo y oxígeno. Más allá del notable potencial que el PHB tiene como bioplástico ya que presenta características similares a las de los materiales petroquímicos, se ha demostrado que el PHB es un biopolímero fundamental para la fisiología microbiana (Marcelo Muller-Santos, 2020). Una de las desventajas de este biopolímero es su alto costo de producción, el cual se relaciona de manera directa con la consecución

de las fuentes de carbono o materia prima, y la energía requerida. Es por ello por lo que surge la necesidad de evaluar la capacidad de producción de distintas cepas en diversos medios de cultivo, con distintas fuentes de carbono como glucosa y sacarosa, con la finalidad de optimizar su producción a escala laboratorio (Campuzano, 2015). Existen diversos reportes de cepas bacterianas capaces de producir PHB (Tabla 1) con diferentes medios de cultivo, fuentes de carbono, así como con distintas condiciones de incubación, evidenciando la amplia diversidad de obtención del biopolímero. El presente trabajo está enfocado en la verificación de la producción de PHB a través del estrés bacteriano de las cepas E.i, R.g, M.h y J.s, mediante la implementación de distintos medios mínimos de cultivo y la aplicación de la tinción Negro Sudan.

Metodología

La metodología fue llevada a cabo en 2 etapas. En la Figura 1, se presenta el esquema metodológico general llevado a cabo.

Etapas 1: Activación de cepas bacterianas y selección de medio de cultivo para la producción de PHB.

Las cepas fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Biología Molecular de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato. (U. E. Rodríguez Castrejón, 2022). Las bacterias son pertenecientes a las familias de las Actinobacterias, Firmicutes, Bacillaceae, Planococcaceae; *R. gordionae* (R.g), *M. h hydrocarbonoxydans* (M.h), *E. indicum* (E.i) y *J. soli* (J.s) respectivamente. Los medios utilizados fueron los siguientes: Medio LB; Bactotripton 10g L⁻¹, Extracto de levadura 5g L⁻¹, NaCl 10g L⁻¹ y Agar bacteriológico 10g L⁻¹, pH 7.0 ± 0.1. Caldo nutritivo; Caldo nutritivo 8g L⁻¹, Agar bacteriológico 20g L⁻¹, pH 8.0 ± 0.1. Las condiciones de incubación se presentaron en placas a 30°C por 24 h y conservadas a 4°C, posteriormente se transfirieron a medios líquidos. Se utilizaron tubos falcon (15 mL) estériles con un volumen de trabajo de 8 mL.

Los medios utilizados para promover la producción de PHB en cultivos líquidos fueron medio mínimo activado (MMA), M1 y M6: La fuente de carbono fueron glucosa y sacarosa dependiendo el medio de cultivo. Glucosa 2g/L, MgSO₄ 0.2g/L, NaCl 0.1g/L, KH₂PO₄ 0.5g/L, Ácido cítrico 0.5g/L, Extracto de levadura 2.5g/L, pH 8.0 ± 0.1. Medio1(M1); Sacarosa 20g/L, (NH₄)₂SO₄ 2g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2g/L, CaCl₂·2H₂O 0.02g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01g/L, pH 7.0 ± 0.1, a 37°C Y 120 rpm. (Daniel Bello Gil, 2007). Medio 6 (M6) Glucosa-Caldo nutritivo; Glucosa 10g/L, Peptona de carne 3g/L, Extracto de levadura 1g/L, NaCl 2.5g/L; pH 7.0 ± 0.1, a 30°C. (Daniel Bello Gil, 2007). Se tomó una alícuota por cepa: E.i, M.h, R.g y J.s, para su inoculación se utilizó el equipo MAXQ 4000 de la marca Thermo Scientific, en medio MMA a 37°C por 24 horas a 120 rpm, en M6 se incubaron a 30°C por 72 horas a 400 rpm y en M1 se incubaron a 37°C por 96 horas a 120 rpm.

Etapas 2: Tinción para la observación de PHB.

Tinción en medios líquidos.

Negro Sudán. Para la tinción con Negro Sudán se preparan dos soluciones, solución I: negro Sudán B (IV) al 0.33% (p/v) en etanol 60% y solución II: safranina al 0.5% (p/v) en solución acuosa. Se tiñe el frotis con solución I durante 10 minutos. Si se evapora, se añade más colorante, posteriormente se vierte el exceso de colorante y se lava con agua destilada, a continuación, se seca con papel secante o filtro, se tiñe con solución II durante 15 segundos y se aclara con agua destilada, después se seca con papel filtro o secante y, finalmente, se observa en el microscopio óptico Primo Star de la marca Zeiss con objetivo de inmersión (100X).



Figura 1. Diagrama de la metodología experimental

Resultados y Discusión

La comparación cualitativa del crecimiento bacteriano indicó que el mayor crecimiento de las cuatro cepas R. g, E. i, M. h y J. s. ocurrió con la presencia de glucosa, la cual se encontraba en el MMA y en el M6, así mismo el menor crecimiento de las bacterias antes mencionadas se obtuvo con el medio rico en sacarosa M1. Así mismo, se observó que el mayor crecimiento de las bacterias se presentó con la concentración más baja de glucosa 2g/l en MMA en comparación con la concentración de 10g/l de glucosa en M6.

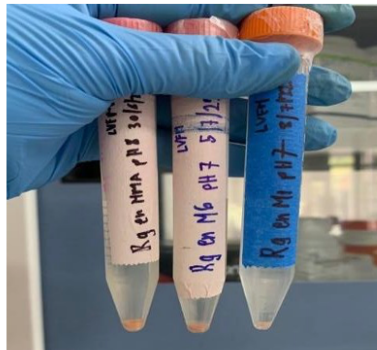


Figura 2. Comparación del crecimiento bacteriano de la cepa R.g en MMA, M6 y M1.

Las cepas R. g, y J. s resultaron positivas en la síntesis de PHB en los tres medios, MMA, M6 y M1, se observó que la producción fue mayor en MMA (Figura 2 y 3) y menor en M1 (material complementario figuras S1-S10). La cepa M. h resultó positiva en la producción de PHB en el medio MMA y M1, obteniendo una mayor productividad del biopolímero en el medio M1(material complementario figura 12) con respecto al M6. En el medio MMA no se observó producción de PHB. La cepa E. i fue negativa para la síntesis de PHB.

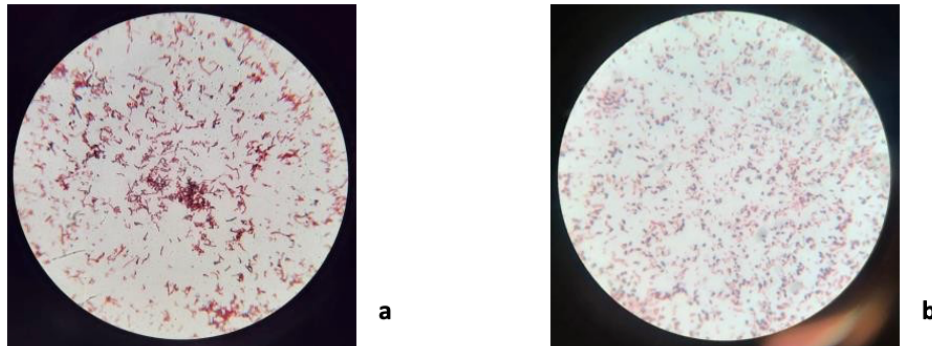


Figura 3. a) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa *R.g* en MMA observada en el microscopio óptico con un aumento de 100X. b) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa *J.s* en MMA observadas en el microscopio óptico con un aumento de 100X.

En la tabla 2 se observan los resultados de la producción de PHB por cepa y en diferentes medios de cultivo.

Tabla 2. Producción de PHB en diferentes medios de cultivo.

Producción de PHB en los distintos medios			
Cepas	MMA	M1	M6
<i>R. g</i>	Positiva	Positiva	Positiva
<i>M.h</i>	Negativa	Positiva	Positiva
<i>E.i</i>	Negativa	Negativa	Negativa
<i>J. s</i>	Positiva	Positiva	Positiva

La comparación del crecimiento bacteriano en los medios MMA y M6, a diferentes concentraciones de glucosa, 2g/l y 10g/l ,respectivamente, implica que, probablemente se produce un efecto inhibitorio en M6 ocasionado por la acumulación en el medio de cultivo de sub-productos de reacción, el peróxido de hidrógeno y el ácido glucónico, los cuales son los responsables de la toxicidad para las células bacterianas ya que específicamente el peróxido de hidrógeno ocasiona daños a nivel de los grupos sulfidrilos de la membrana celular, afectando el sistema de transporte de la glucosa, por inactivación de las enzimas hexoquinasa y la gliceraldeido 3-fosfato deshidrogenasa. (Nirza C. Noguera-Machado1 Luis E. Ojeda Ojeda, 2018).

Normalmente las bacterias producen PHB en medios con exceso de carbono o limitaciones nutricionales como son nitrógeno, fósforo y oxígeno (Marcelo Muller-Santos, 2020). La mayor producción de PHB fue en *R.g* y *J. s* en MMA, el cual no cuenta con exceso en la fuente de carbono (glucosa), como sí lo fue en el medio M6. Para el caso de estudio, el exceso en la fuente de carbono disminuye la producción de PHB en las bacterias mencionadas.

Por otro lado, la observación de los gránulos de PHB de la cepa *M. h* a través de microscopía óptica se dificultó con la tinción negro sudán debido a que el tamaño de los bacilos era muy pequeño, por lo que no se recomienda esta tinción para esta cepa. *M. h* resultó positiva en la síntesis de PHB en medio M6, indicando que a esta cepa le favorece el exceso de la fuente de carbono que fue glucosa, así mismo la mayor producción del biopolímero se presentó en medio M1, por lo que la cepa antes mencionada prefiere la sacarosa frente a la glucosa como fuente de carbono.

Las cuatro cepas seleccionadas son gram positivas, lo cual tiene una gran relevancia pues esto las dota de las características necesarias para ser utilizadas en aplicaciones biomédicas, ya que no contienen endotoxinas en la membrana conocidas como lipopolisacáridos (LPS) las cuales en cambio sí se encuentran en las bacterias gram negativas (GONZALEZ, 2018). Entre las aplicaciones biomédicas que se le puede dar al PHB se encuentra la obtención de materiales como hilo para suturar, sustitutos pericárdicos (Echavarrá, 2016). Por mencionar alguna aplicación.

Conclusiones

De las cuatro cepas estudiadas, tres cepas fueron productoras de PHB presentando comportamientos diferentes. Para el caso de J. s y R. g presentan una acumulación significativa bajo los medios probados con una mayor producción de PHB utilizando glucosa en comparación con sacarosa como fuente de carbono. Sin embargo, para estas mismas bacterias disminuyen la producción de PHB con un exceso de esta misma fuente de carbono. Mientras, M.h produce PHB en condiciones de exceso de fuente de carbono tanto con glucosa como con sacarosa en medio M6 y M1, respectivamente. Este estudio contribuye en el rol de las bacterias como productoras de PHB que podrían ser la base para el desarrollo de innovación tecnológica sustentable en la producción de bioplásticos, sustituyendo de esta manera a los plásticos convencionales altamente contaminantes para la salud ambiental.

Agradecimientos

Los autores agradecen al comité de Veranos UG 2022 y a la DAIP-UG por el apoyo otorgado, así como a la Secretaría del Edo de Guanajuato IdeaGTO, ya que este producto forma parte del proyecto Guanajuato Rumbo al Desarrollo Sustentable: Caso de Estudio Comunidades Sostenibles Etapa 2.0, (070/2021); 2021- 2022.

Referencias bibliográficas

- Campuzano, C. A. (2015). Análisis de la producción de polihidroxitirato usando lactosuero como materia prima. análisis de la producción de polihidroxitirato usando lactosuero como materia prima. Manizales, Colombia.
- Daniel Bello Gil, H. B. (2007). Selección de bacterias productoras de poli-hidroxitirato. ICIDCA, 10-18.
- Echavarrá, D. C. (Octubre de 2016). Polihidroxitirato (PHB) microbiano con potencial para aplicaciones médicas: Obtención y Caracterización. Polihidroxitirato (PHB) microbiano con potencial para aplicaciones médicas: Obtención y Caracterización. Medellín, Colombia.
- González, J. M. (2018). Generalidades del lipopolisacárido como inductor de lesión en la enfermedad causada por bacterias gram negativas. generalidades del lipopolisacárido como inductor de lesión en la enfermedad causada por bacterias gram negativas. Bogotá, Colombia.
- Marcelo Muller-Santos, J. J. (2020). FEMS Microbiology Reviews, fuaa058, 44, 2020, 1doi: 10.1093/femsre/fuua058 Advance Access Publication Date: 0 2020 Review article Review Article The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 1-13.
- Nirza C. Noguera-Machado¹ Luis E. Ojeda Ojeda, L. P. (2018). Efecto de la combinación de glucosa oxidasa/ glucosa sobre el crecimiento de bacterias del género salmonella aisladas de aves de corral. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 127-136.
- U. E. Rodríguez Castrejón, A. H. (2022). Isolation and molecular identification of native As-resistant bacteria: As(III) and As(V) removal capacity and possible mechanism of detoxification. Archives of Microbiology, 191.

Material Complementario

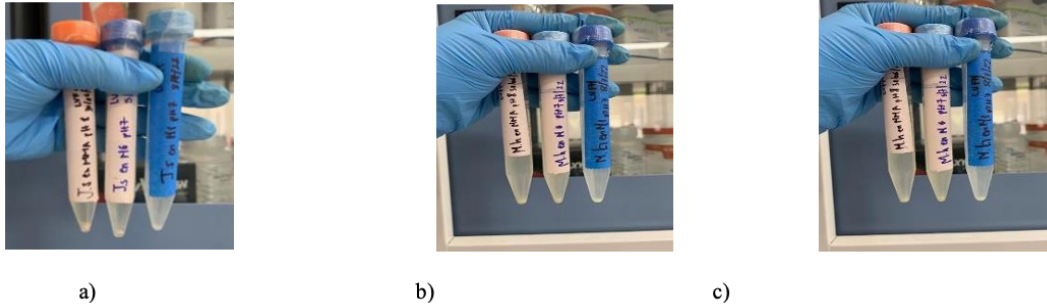


Figura S1. a) Comparación del crecimiento bacteriano de la cepa R.g en MMA, M6 y M1. b) Comparación del crecimiento bacteriano de la cepa J.s en MMA, M6 y M1. c) Comparación del crecimiento bacteriano de la cepa M.h en MMA, M6 y M1

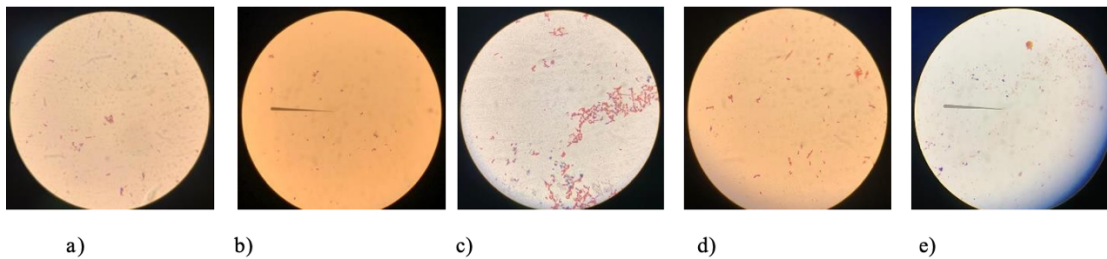


Figura S2. a) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa R.g en M6 observada en el microscopio óptico con un aumento de 100X. b) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa R.g en M1 observada en el microscopio óptico con un aumento de 100X. c) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa J.s en M6 observada en el microscopio óptico con un aumento de 100X. d) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa J.s en M1 observada en el microscopio óptico con un aumento de 100X. e) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa M.h en M6 observada en el microscopio óptico con un aumento de 100X.

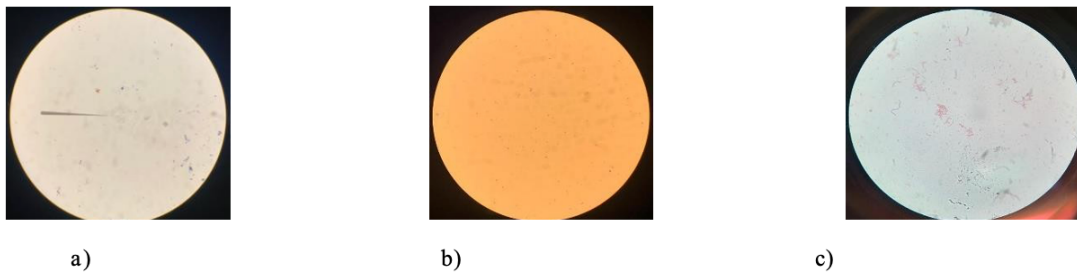


Figura S3. a) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa M.h en M1 observada en el microscopio óptico con un aumento de 100X. b) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa E.i en M6 observada en el microscopio óptico con un aumento de 100X. c) Gránulos intracelulares negro-azulados de PHB en la cepa E.i en M1 observada en el microscopio óptico con un aumento de 100X.