

## PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS TIPO POLIHIDROXIBUTIRATO A PARTIR DE CEPAS BACTERIANA AISLADAS DE LA HEMOLINFA DE LARVAS DE *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758. Diptera: Stratiomyidae)

Raúl Enrique Martínez-Herrera<sup>1</sup> ✉, Brenda Castro-Cantú<sup>1</sup>, Erick de Luna-Santillana<sup>2</sup>, Isela Quintero-Zapata<sup>1</sup>, Fátima Gandarilla-Pacheco<sup>1</sup>, Verónica Almaguer-Cantú<sup>1</sup>, María Elizabeth Alemán-Huerta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Av. Pedro de Alba y Manuel L. Barragán s/n. Ciudad Universitaria. C. P. 66455. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

<sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Laboratorio de Medicina de Conservación. Blvd. del Maestro s/n esq. Elías Piña, Col. Narciso Mendoza, C. P. 88710, Reynosa, Tamaulipas, México.

✉ Autor de correspondencia: [maria.alemanhr@uanl.edu.mx](mailto:maria.alemanhr@uanl.edu.mx)

**RESUMEN.** Los Polihidroxiálcanoatos (PHAs) son biopolímeros bacterianos que han llamado la atención en años recientes debido a sus cualidades físicas muy parecidas a la de los plásticos de origen petroquímico. Dentro de esta amplia familia de biopolímeros se encuentra el Polihidroxi-butilato (PHB), el cual es utilizado en diversas áreas industriales. La problemática entorno a estos biomateriales son sus altos costos de producción, por lo que la búsqueda de nuevas cepas bacterianas con la capacidad de producir PHB ha sido de interés en este ámbito. Las larvas de la mosca negra (*Hermetia illucens*. Linnaeus, 1758) parecen ser una alternativa para este objetivo, puesto que este insecto presenta una microbiota interesante con potencial biotecnológico. El presente trabajo tuvo como objetivo aislar cepas bacterianas de la hemolinfa de esta larva, lográndose aislar 25 cepas bacterianas, de las cuales 10 son productoras de PHB y de estas, la cepa bacteriana denominada como Hi12 es la que presentó una mayor capacidad productiva. Se considera una posterior identificación y evaluación de esta cepa bacteriana debido a su potencial productivo.

**Palabras clave:** *Bacillus*; bioplásticos; mosca negra; Polihidroxiálcanoatos

### Production of biopolymers type Polyhydroxybutyrate from bacterial strains isolated from the hemolymph of *Hermetia illucens* larvae (Linnaeus, 1758. Diptera: Stratiomyidae)

**ABSTRACT.** Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are bacterial biopolymers that have attracted attention in recent years due to their physical qualities very similar to the petrochemical plastics. Within this wide family of biopolymers, Polyhydroxybutyrate (PHB) is found, which is employed in diverse industrial areas. The problem around these biomaterials is their high production costs, therefore the search for new bacterial strains with the capacity to produce PHB has been an interest in this scope. The black fly larvae (*Hermetia illucens*. Linnaeus, 1758) seems to be an alternative for this aim since this insect presents an interesting microbiota with biotechnological potential. The present work focused on isolating bacterial strains from the hemolymph of this insect. 25 bacterial strains were isolated, 10 are cataloged as PHB producers, and the bacterial strain denominated as Hi12 is the one with the highest production capacity. A subsequent identification and evaluation of this bacterial strain are considered due to its productive potential.

**Keywords:** *Bacillus*; bioplastics; black fly; Polyhydroxyalkanoates

## INTRODUCCIÓN

Los plásticos biodegradables emergieron como una alternativa a los plásticos de origen petroquímico debido a la creciente contaminación ambiental producida por los desechos de este tipo de materiales (Ojha y Kapoor, 2019). Este tipo de bio-plásticos se caracteriza por presentar cualidades como biodegradabilidad (principalmente), no toxicidad, hidrofobicidad, resistencia térmica y biocompatibilidad. Entre estos biopolímeros, los que más han dado de que hablar son los polihidroxiálcanoatos o PHAs (Prados y Maicas, 2016).

Los PHAs, son biopolímeros de origen bacteriano sintetizados a manera de gránulos citoplasmáticos cuando la célula bacteriana está bajo un estrés de nutrientes (deficiencia o desbalance

de algún sustrato esencial), dicho biopolímero es empleado como un depósito de carbono y/o energía que le permite sobrevivir ante estas condiciones ambientales (Możejko-Ciesielska y Kiewisz, 2016). Estos biopolímeros comprenden una amplia familia, cuya clasificación va de acuerdo con los monómeros que componen la cadena y el tamaño de esta, entre esta amplia familia el que más destaca por sus propiedades similares al polipropileno y polietileno es el Polihidroxibutirato o PHB (Lee y Na, 2013).

El PHB es un biopolímero que presenta distintas aplicaciones a nivel industrial, médico y agrícola. Sin embargo, presenta un alto costo de producción, por lo que una de las alternativas que influyen en el abaratamiento de costos, es el aislamiento de nuevas cepas bacterianas a partir de distintos ecosistemas con un intercambio de nutrientes variable, las cuales posean una versatilidad metabólica para la toma de distintos sustratos como fuente de carbono/nitrógeno (Możejko-Ciesielska y Kiewisz, 2016). Estas nuevas cepas bacterianas han sido aisladas de aguas residuales, efluentes industriales, sedimentos marinos, suelos contaminados, incluso la microbiota presente en la linfa de diversos insectos ha llamado la atención para estos procesos biotecnológicos (Ponnusamy *et al.*, 2019).

Entre los insectos que han llamado la atención para el aislamiento de cepas bacterianas con el potencial para producir PHB son las larvas de *Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758. *Diptera: Stratiomyidae*) o mosca "soldado negra" (MSN); una larva nativa de las regiones subtropicales y templadas de América con la capacidad de consumir una amplia variedad de sustratos orgánicos (Wu y Wang, 2018). Por estas razones, el objetivo del presente trabajo se enfocó en aislar cepas bacterianas a partir de la hemolinfa de la MSN, las cuales posean el potencial de producir biomateriales tipo PHB en cantidades considerables.

## MATERIALES Y MÉTODO

**Material biológico.** Para este estudio se emplearon larvas de *H. illucens* recolectadas a partir de composta orgánica en un jardín del municipio de San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. Dichas larvas se almacenaron en viales de plástico a condiciones de 25 °C.

**Aislamiento de cepas bacterianas.** Para el aislamiento de las cepas bacterianas se lavaron las larvas con agua destilada estéril y se remojaron en etanol (70 %) durante 1 minuto. Posteriormente, 1 g de larva fue macerada y se diluyó en solución salina (0.85 %) estéril. Después, se realizó dilución en serie y 0.1 mL de cada dilución fueron inoculados en placas con agar nutritivo las cuales se incubaron a condiciones de 30 °C durante 24 horas. Las cepas obtenidas fueron resembradas mediante estría simple hasta obtener cultivos puros.

**Selección cualitativa y cuantitativa.** La selección de colonias productoras de PHB se realizó primero mediante la técnica del colorante Negro Sudán (NS), la cual se realizó sembrando las cepas bacterianas aisladas en agar nutritivo suplementado con glucosa al 1 % e incubadas a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente las colonias fueron teñidas con NS y se enjuagaron con etanol (70 %), siendo las colonias positivas aquellas que se tiñeron de negro. Después de realizar esta selección previa, se sometió a las cepas bacterianas a una evaluación de la producción de biomasa celular (g/L), biopolímero (g/L) y porcentaje de acumulación (% PHB), en un medio de cultivo semidefinido suplementado con glucosa al 1 % (Masood *et al.*, 2017) a condiciones de 30 °C, 150 rpm, durante 48 horas.

**Cuantificación de biomasa celular y porcentaje de acumulación (% PHB).** De los caldos de fermentación de 48 horas se tomaron 10 mL del medio de cultivo y se distribuyeron en microtubos de un volumen de 2 mL previamente secos en horno a 50 °C y pesados. Posteriormente se centrifugaron a condiciones de 5,000 rpm durante 15 minutos, luego se almacenó la biomasa a

50 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se cuantificó su peso y relacionado a esto, se obtuvo el porcentaje de acumulación de PHB mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ PHB} = [\text{PHB (g/L)} / \text{Biomasa celular (g/L)}] * 100$$

El PHB fue extraído mediante la técnica de digestión con hipoclorito de sodio y suspensión en cloroformo reportada por Hahn *et al.* (1994).

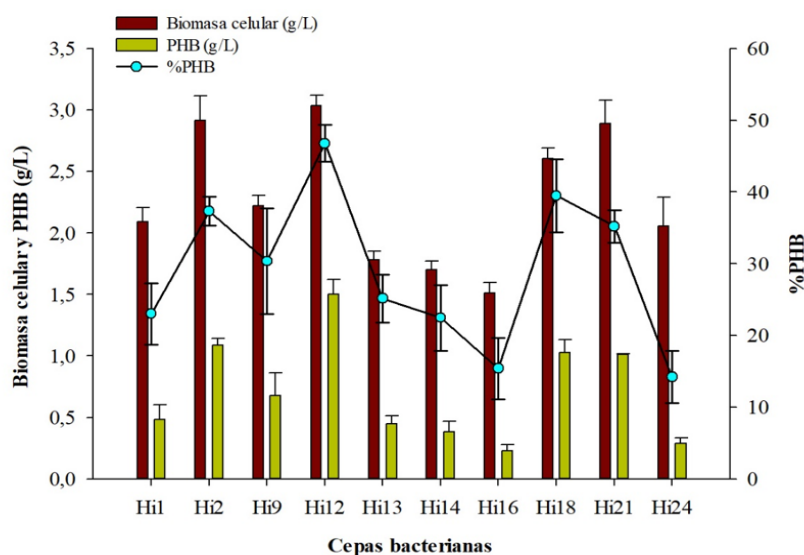
**Tinciones Gram.** Las cepas seleccionadas como productoras de PHB fueron caracterizadas parcialmente mediante tinciones Gram (Rehman *et al.*, 2007; Desouky *et al.*, 2017).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 25 cepas bacterianas se aislaron de la hemolinfa de las larvas recolectadas; de las cuales 10 dieron positivo para la acumulación de PHB. Cabe destacar que de estas cepas siete son bacilos Gram positivos, el resto son cepas Gram negativas. Lo cual está de acuerdo con el reporte de De Smet *et al.* (2018), quien informa que la mayoría de las bacterias presentes en la hemolinfa de la larva de la MSN son cepas bacterianas Gram positivas, las cuales están implicadas en el metabolismo de la materia orgánica ingerida por la larva.

Cabe señalar la importancia del género *Bacillus*, el cual es un género bacteriano que ha presentado una gran relevancia en la producción de PHB, ya que las especies de este género bacteriano pueden metabolizar una amplia variedad de sustratos residuales, tales como: melazas y mieles, material lignocelulósico, cáscaras de frutas y/o verduras, aceites y mantecas residuales, sueros lácteos, harinas e hidrolizados, etc. (Mohapatra *et al.*, 2017). Asimismo, este género bacteriano presenta ventajas como altas tasas de duplicación y crecimiento, generación de enzimas de interés biotecnológico, carencia de endotoxinas y lipopolisacáridos que puedan influir en la biosíntesis del PHB y una alta generación de biopolímero bajo óptimas condiciones controladas (Kumar *et al.*, 2013).

Las 10 cepas bacterianas catalogadas como productoras de PHB produjeron biomasa celular en cantidades de 1.51 a 3.03 g/L, biopolímero desde 0.29 a 1.50 g/L y % PHB de 14.22 a 46.79 % (Figura 1).



**Figura 1.** Evaluación de la producción de biomasa celular (g/L), PHB (g/L) y %PHB por las cepas bacterianas aisladas de la hemolinfa de las larvas de *H. illucens*.

La cepa bacteriana denominada como Hi12 es un bacilo Gram positivo que presentó la mayor biosíntesis de biomasa celular, PHB y % PHB. Sin embargo, son necesarios más estudios para caracterizar bioquímicamente y molecularmente esta cepa bacteriana, así como realizar evaluaciones de los parámetros de incubación que permitan explotar sus propiedades biotecnológicas.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron 10 cepas bacterianas a partir de la hemolinfa de *H. illucens*, las cuales presentan la capacidad de producir biopolímeros tipo PHB de manera considerable. Cabe destacar que la cepa denominada como Hi12 fue aquella que presentó la mejor producción de biomasa celular, PHB y porcentaje de acumulación. Sin embargo, es necesario realizar la identificación y caracterización metabólica para contribuir a la explotación biotecnológica del PHB.

## LITERATURA CITADA

- De Smet, J., Wynants, E., Cos, P. and Van Campenhout, L. 2018. Microbial Community Dynamics during Rearing of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens*) and impact on Exploitation Potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(9): 1–17. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02722-17>.
- Desouky, S. E., Abdel-rahman, M. A., Azab, M. S. and Esmael, M. E. 2017. Batch and fed-batch production of polyhydroxyalkanoates from sugarcane molasses by *Bacillus flexus* Azu-A 2. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*, 4(3): 55–66. ISSN: 2349-2759
- Hahn, S. K., Chang, Y. K., Kim, B. S. and Chang, H. N. 1994. Optimization of microbial poly (3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(2): 256–261. <https://doi.org/10.1002/bit.260440215>
- Kumar, P., Patel, S. K. S., Lee, J. K. and Kalia, V. C. 2013. Extending the limits of *Bacillus* for novel biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 31: 1543–1561. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.007>
- Lee, G. and Na, J. 2013. Future of microbial polyesters. *Microbial Cell Factories*, 12(1): 1–4. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-54>
- Masood, F., Abdul-Salam, M., Yasin, T. and Hameed, A. 2017. Effect of glucose and olive oil as potential carbon sources on production of PHAs copolymer and tercopolymer by *Bacillus cereus* FA11. *3 Biotech*, 7(87): 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0712-y>
- Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C. and Samantaray, D. 2017. *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12: 206–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.10.001>
- Możejko-Ciesielska, J. and Kiewisz, R. 2016. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192: 271–282. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.07.010>
- Ojha, S. and Kapoor, S. 2019. Bio-Plastics: The Suitable and Sustainable Alternative to Polyethylene based Plastics. *Acta Scientific Microbiology*, 2(6): 145–148. <https://doi.org/10.31080/ASMI.2019.02.0254>
- Ponnusamy, S., Viswanathan, S., Periyasamy, A. and Rajaiah, S. 2019. Production and characterization of PHB-HV copolymer by *Bacillus thuringiensis* isolated from *Eisenia foetida*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(3): 340–352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bab.1730>
- Prados, E. and Maicas, S. 2016. Bacterial Production of Hydroxyalkanoates (PHA). *Universal Journal of Microbiology Research*, 4(1): 23–30. <https://doi.org/10.13189/ujmr.2016.040104>

- Rehman, S. U., Jamil, N. and Husnain, S. 2007. Screening of different contaminated environments for polyhydroxyalkanoates- producing bacterial strains. *Biologia*. 62(6): 650–656. <https://doi.org/10.2478/s11756-007-0144-y>
- Wu, C. S. and Wang, S. S. 2018. Bio-Based Electrospun Nanofiber of Polyhydroxyalkanoate Modified with Black Soldier Fly's Pupa Shell with Antibacterial and Cytocompatibility Properties. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(49): 42127–42135. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b16606>