

Tesis de grado de la Licenciatura en Bioquímica

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
ENZIMAS BACTERIANAS DE ORIGEN
ANTÁRTICO, CON POTENCIAL APLICACIÓN
BIOTECNOLÓGICA**

Bach.: Evelyn Falero Bilbao
Orientadora: Elena Fabiano
Co-orientadora: Vanesa Amarelle
Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Abril de 2013

Imágenes de la portada

Fila 1, de izquierda a derecha: foto del microscopio invertido de la muestra M8, foto de ensayo para lacasas de la muestra M6, foto del microscopio invertido de la muestra M8, foto del lugar de toma de la muestra M5

Fila 2, de izquierda a derecha: colonias obtenidas de la muestra M6, foto del lugar de toma de la muestra M5, foto del microscopio invertido de la muestra M8, foto del lugar de toma de la muestra M9.

Fila 3, de izquierda a derecha: foto del lugar de toma de la muestra M8, foto del lugar de la toma de la muestra M11, foto del lugar de toma de la muestra M11, foto del ensayo para sideróforos de la muestra M11.

Fila 4, de izquierda a derecha: foto del microscopio invertido de la muestra M6, foto de aislamientos obtenidos para la muestra M12, foto del ensayo para lacasas de la muestra M6, foto para el ensayo de esterasas/lipasas para la muestra M11.

Agradecimientos

Agradezco a todos los integrantes del laboratorio y todas aquellas personas que me han ayudado y aconsejado durante mi pasantía.

Quiero agradecer especialmente a mi familia por su apoyo durante todos estos años y por siempre escucharme y alentarme a seguir adelante en este largo camino. En especial a mi madre, mi hermana, mi esposo y mi hija del corazón. Los quiero!

A Nicolás y a Diana quiero decirles simplemente gracias por aguantarme, escucharme, ayudarme, tranquilizarme, soportar mis malos ratos y sobretodo quererme todo este tiempo. A pesar de todo el tiempo que no pude dedicarles o que tuve que estar lejos, ustedes siempre estuvieron ahí para mí. Saben que los adoro y sin ustedes no hubiese podido al fin lograr esto. Este logro es tan mío como de ustedes. No me alcanzan las palabras para decirles cuanto los quiero!

Gracias a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE	3
ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1. Origen de las muestras	
2. Tratamiento de las muestras	
2.1. Observación microscópica de las muestras	
2.2. Aislamiento de bacterias cultivables	
2.3. Generación de una colección de bacterias cultivables	
2.4. Mantenimiento de la colección	
2.5. Caracterización funcional de la colección	
2.6. Caracterización de las actividades enzimáticas halladas	
2.7. Caracterización genotípica de los clones de interés	
RESULTADOS	27
1. Tratamiento de las muestras	
1.1. Observación microscópica de las muestras	
1.2. Aislamiento de bacterias cultivables	
1.3. Caracterización funcional de la colección	
1.4. Caracterización de las actividades enzimáticas halladas	
1.5. Caracterización genotípica de los clones de interés	
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	51
ANEXO I: MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS UTILIZADOS	53
ANEXO II: PCR	58

ABREVIATURAS

- ABTS: 2,2' azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- BLAST: basic local alignment search tool
- CMC: carboximetilcelulosa
- dNTPS: desoxinucleótidos trifosfato
- PBS: phosphate saline buffer
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- U.F.C.: unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Se estima que un 75% de la biosfera de la Tierra se encuentra en entornos perennemente fríos siendo estos ambientes un recurso atractivo para la identificación de nuevas enzimas con potencial aplicación industrial. Las enzimas con actividad a bajas temperaturas tienen un gran valor biotecnológico ya que son capaces de catalizar eficientemente reacciones a temperaturas moderadas o bajas, disminuyendo de esta manera los costos asociados a las etapas de calentamiento.

En este trabajo nos propusimos la búsqueda, identificación y caracterización de enzimas bacterianas con potencial aplicación biotecnológica a partir de muestras obtenidas en la isla Rey Jorge perteneciente a las islas Shetland del Sur de la Antártida.

A partir de seis muestras tomadas en diferentes sitios, se generó una colección de bacterias psicrófilas/psicrotolerantes capaces de ser cultivadas en el laboratorio. Estas bacterias fueron aisladas en un medio sólido recomendado para el crecimiento de microorganismos de crecimiento lento y se crecieron a 4 °C. Se trabajó con un total de 336 aislamientos, seleccionados en base al fenotipo presentado. Estos aislamientos fueron utilizados para realizar ensayos que permitieran la identificación de actividades enzimáticas de interés biotecnológico. En particular, se evaluó la actividad lignocelulolítica, lipolítica, proteolítica, antimicrobiana o secuestradora de hierro de los aislamientos mediante la utilización de indicadores específicos de dichas actividades. Se obtuvieron 33 aislamientos con actividad ligninolítica, 78 con actividad lipolítica, 52 con actividad proteolítica y 21 con actividad secuestradora de hierro. No se obtuvieron aislamientos con actividad celulolítica, antimicrobiana o peroxidasa/manganeso peroxidasa. Se evaluó el efecto de diferentes temperaturas (4 °C, 25 °C, 30 °C y 37 °C) sobre algunas de las actividades enzimáticas encontradas, concluyendo que la temperatura óptima en todos los casos fue de 25 °C. En el caso de los clones con actividad lipolítica se determinó la capacidad de utilizar sustratos alternativos de manera de seleccionar aquellos clones más promisorios para continuar trabajando. De los 78 clones con actividad lipolítica encontrados, solo 12 presentaron actividad lipasa.

Con la finalidad de identificar el género al que pertenecen algunos de los aislamientos seleccionados, se analizó la secuencia correspondiente al gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal. Se determinó que de los 25 aislamientos seleccionados un 68 % pertenecían al género *Pseudomonas*. Interesantemente un 83,3 % de los aislamientos

presentaron homología con secuencias de otras bacterias previamente detectadas en ambientes fríos.

Palabras clave: celulasas, lipasas, esterasas, lacasas, peroxidasas, sideróforos, enzimas psicrófilas, Antártida.

INTRODUCCIÓN

Dado el creciente interés en el desarrollo de políticas ambientales que permitan un desarrollo sustentable con el menor impacto ambiental posible, existe una fuerte tendencia a la sustitución de procesos industriales altamente contaminantes por alternativas biológicas menos nocivas para el medioambiente. Esto ha llevado a que en los últimos años se haya producido un auge en el desarrollo e innovación de nuevas tecnologías capaces de sustituir parcial o completamente dichos procesos.

Los procesos industriales que implican catálisis química han requerido tradicionalmente altas temperaturas, alta presión o el agregado de aditivos químicos para llevar a cabo dichas reacciones. Estas prácticas implican un alto consumo energético, así como la generación de subproductos nocivos con efectos perjudiciales para el medioambiente. Las enzimas ofrecen numerosas ventajas sobre los procesos químicos dado que presentan mayor especificidad, tasas de reacción rápida, funcionan a temperaturas y pH moderados, se derivan de recursos renovables y son biodegradables (43).

Los procariotas exhiben una vasta biodiversidad y versatilidad metabólica. Estas ventajas hacen posible que éstos habiten y prosperen incluso en las condiciones ambientales más extremas. La magnitud de biodiversidad observada entre los procariota supera ampliamente la mostrada por los eucariotas. Estas características convierten a los procariotas en una inagotable y beneficiosa fuente para la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas.

El término bioprospección ha sido acuñado por quienes se han dedicado a la búsqueda en la naturaleza de nuevos compuestos bioactivos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos obtenidos de éstos, con potencial aplicación comercial y por tanto beneficiosos para el ser humano (2).

Las muestras ambientales son habitualmente las elegidas para realizar bioprospección debido principalmente a la diversidad de organismos presentes dentro de un mismo ecosistema.

Se estima que un 75 % de la biosfera de la Tierra se encuentra en entornos perennemente fríos (<5 °C) poco explorados (45). Es así que estos ambientes representan un recurso atractivo para la identificación de nuevas especies, nuevos procesos y nuevos genes con potencial aplicación industrial. En especial, las enzimas que presentan actividad a bajas temperaturas tienen un gran valor biotecnológico ya que son capaces de catalizar eficientemente reacciones a temperaturas moderadas o bajas, disminuyendo de esta

manera los costos asociados a las etapas de calentamiento (46). A continuación se presenta una breve reseña de diversas actividades enzimáticas y compuestos bioactivos con potencial biotecnológico factibles de ser identificados por bioprospección.

Enzimas lignocelulolíticas

La lignocelulosa está compuesta esencialmente por celulosa, hemicelulosa y lignina formando una estructura supramolecular altamente resistente a la degradación y oxidación. La lignina es el polímero orgánico más abundante en la biosfera. Se encuentra en las paredes de plantas en íntima asociación con la celulosa y la hemicelulosa, siendo el primero y el segundo polímero de polisacáridos más abundante en la naturaleza, respectivamente. (37).

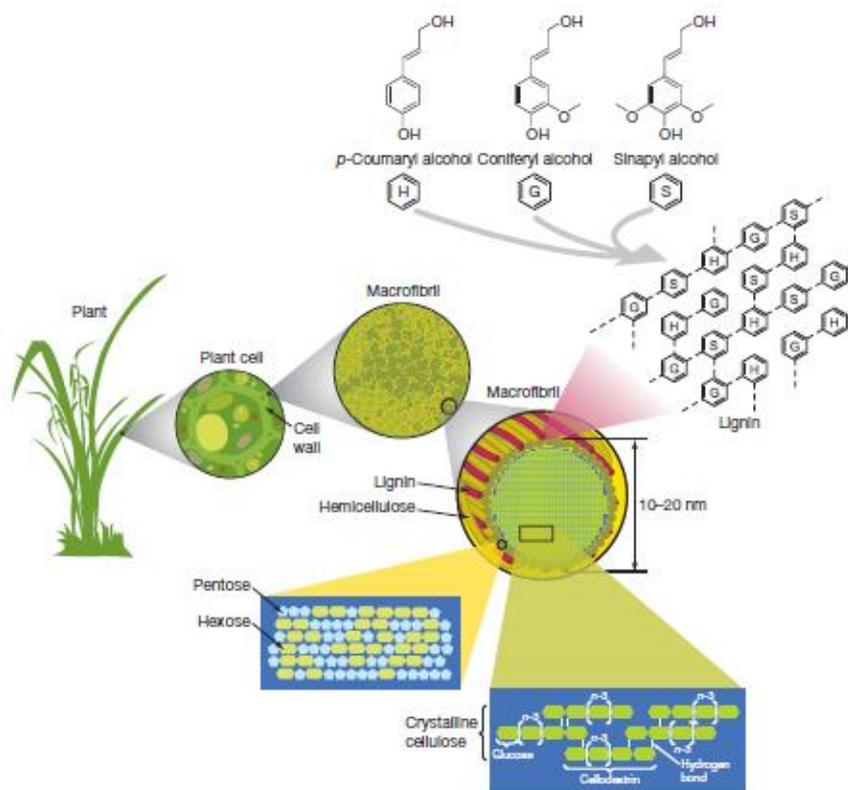


Figura 1. Representación esquemática de la pared celular vegetal y la estructura de la lignina presente en ésta (figura tomada de Rubin 2008).

La celulosa está formada por cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos β (1-4). El grado de polimerización, es decir, el número de residuos de glucosa que forman una molécula de celulosa, puede oscilar entre 50 y 15.000 (26).

Por otra parte, la hemicelulosa está constituida por varios heteropolisacáridos de composición distinta en cada planta. Los más abundantes son xilanos, mananos y galactanos.

Se trata de polímeros cortos y en general ramificados. Su función principal en la pared vegetal es la de unir la celulosa y la lignina (38).

En la degradación de la lignocelulosa intervienen distintas enzimas. Las lacasas, manganeso peroxidasas, lignina peroxidasas y oxidasas que generan peróxido, componen el sistema enzimático que degrada la lignina, mientras que las celulasas y hemicelulasas son las responsables de la degradación de la celulosa y la hemicelulosa respectivamente (37).

- Lacasas

Las lacasas (EC 1.10.3.2) son glicoproteínas que forman parte de un grupo de proteínas llamado enzimas multicobre oxidasas azules (37).

A diferencia de otras enzimas ligninolíticas, la lacasa oxida una gran variedad de sustratos sin necesidad de peróxido como es el caso de la manganeso peroxidasa y de la lignina peroxidasa que requieren de peróxido para poder actuar.

En la actualidad, el estudio de la oxidación de compuestos aromáticos recalcitrantes por tratamientos enzimáticos en medios no acuosos con lacasas ha ido en incremento, debido a que estos tratamientos serían una opción para la remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos en combustibles (32). En la figura 2 se presenta un esquema del ciclo catalítico de las lacasas.

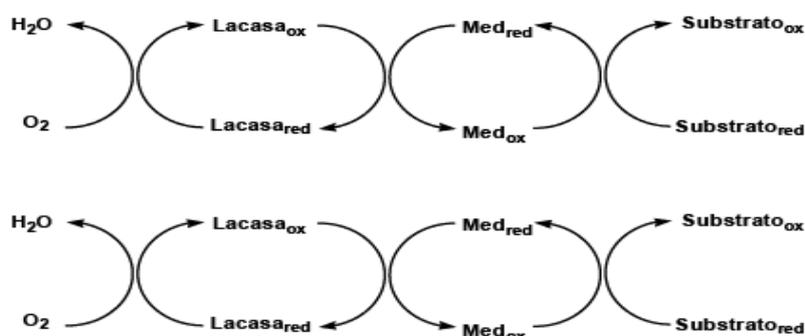


Figura 2. Esquema del ciclo catalítico de las lacasas (figura tomada de Yaropolov, *et al.* 1994).

Las lacasas son muy inespecíficas ya que catalizan la oxidación de varios compuestos aromáticos entre los que se encuentran: mono, di y polifenoles; aminofenoles y diaminas (31). También tienen la capacidad de interactuar con un mediador redox fácilmente oxidable como el ABTS para oxidar compuestos no fenólicos los cuales no son sustratos de las lacasas (30).

La reducción de oxígeno a agua catalizada por la lacasa, está acompañada de la oxidación típica de un sustrato fenólico generando un radical libre, y este producto, siendo típicamente inestable, puede experimentar una segunda oxidación por catálisis enzimática para formar quinonas. Puede también ocurrir una reacción no enzimática tal como una hidratación o desprotonación, o el sustrato fenólico podría participar en una reacción de polimerización, dando un compuesto amorfo insoluble como la melanina **(29)**. Las reacciones oxidativas que pueden llevar a cabo las lacasas para despolimerizar la lignina incluyen: ruptura entre enlaces C α -C β , hidroxilación, ruptura de estructuras aromáticas y desmetilación **(28)**.

Las lacasas pueden ser utilizadas en la industria papelera para llevar a cabo el biopulpeo que es un proceso fundamental para separar y eliminar la lignina de la celulosa. Asimismo, durante el bioblanqueo las lacasas eliminan los residuos de la lignina que causan el color amarillo del papel **(27)**.

- Peroxidasas

Las peroxidasas (EC 1.11.1.14) son glicoproteínas capaces de oxidar compuestos fenólicos y sustratos aromáticos no fenólicos incluyendo a la lignina. En su mayoría las peroxidasas son hemoproteínas, ejecutando sus funciones redox mediante el ion férrico presente en el grupo hemo **(37)**.

Las manganeso peroxidasas (EC 1.11.1.13) son producidas como parte del sistema multi-enzimático que degrada la lignina. Pertenecen a la familia de las oxidoreductasas. Catalizan reacciones de óxido-reducción, utilizando al peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones y tiene como sustrato al manganeso catalizando su oxidación de Mn²⁺ a Mn³⁺ **(37)**.

- Celulasas

Celulasas es el nombre genérico que recibe el complejo enzimático capaz de degradar celulosa. Este grupo está formado por enzimas glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.), un grupo extendido de enzimas que hidrolizan el enlace O-glicosídico formado entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un residuo no carbohidrato. En base a su actividad enzimática las celulasas se clasifican en: 1) endoglucanasas o 1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), que tienen por función hidrolizar los enlaces β -1,4 internos de la celulosa para producir gluco-oligosacáridos; 2) las exoglucanasas, que hidrolizan

enlaces 1,4 de los extremos de la celulosa e incluyen las 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.74) que liberan unidades sucesivas de glucosa y las 1,4- β -D-glucan cellobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), que liberan celobiosa y 3) las β -D-glucosidasas (EC 3.2.1.21) degrada los gluco-oligosacáridos producidos por las exoglucanasas a glucosa (39).

- Hemicelulasas

Esta familia de enzimas cataliza la ruptura de los enlaces internos presentes en el xilano, un tipo de polisacárido constituyente mayoritario de la hemicelulosa. Incluye a las endoxilanasas (EC 3.2.1.8) que rompen el esqueleto de xilano en pequeños oligosacáridos, y β -xilosidasas (EC 3.2.1.37), que a su vez degradan estos oligosacáridos a moléculas de xilosa (49).

Enzimas lipolíticas

Las enzimas lipolíticas están ampliamente distribuidas entre animales, plantas y microorganismos. Las bacterias producen diferentes clases, incluyendo carboxilesterasas o esterasas (EC 3.1.1.1), que hidrolizan ésteres de ácidos carboxílicos de cadena corta ($C \leq 12$) y lipasas (EC 3.1.1.3), que se diferencian de las anteriores ya que tienen la capacidad de hidrolizar acilglícéridos de cadena larga insolubles en agua ($C \geq 12$) (4).

Las lipasas, se caracterizan por actuar en la interfase lípido-agua, a diferencia de las esterasas. Además, catalizan la hidrólisis o síntesis enantio- y regio-selectiva de una amplia variedad de sustratos naturales (6). Asimismo pueden llevar a cabo la esterificación, interesterificación y transesterificación que consiste en intercambiar el grupo alcoxi (RO-) de un éster por otro alcohol. Este tipo de proceso es llevado a cabo para la producción de biodiesel a partir de aceite vegetal o animal (7).

También tienen importantes aplicaciones en la industria alimentaria, como la producción de grasas con propiedades físicas y químicas deseables, además de contener una baja proporción de grasas trans en el producto final, a diferencia de los procesos de hidrogenación y transesterificación química (5). Presentan también aplicaciones en la industria del aceite, la producción de farmacéuticos, agroquímicos y compuestos aromáticos (8).

Enzimas proteolíticas

Las peptidasas o más comúnmente llamadas proteasas son enzimas que hidrolizan el enlace peptídico presente en péptidos o proteínas. Debido a la amplia aplicación que estas enzimas tienen en la industria, es muy importante el hallazgo de nuevas enzimas con características útiles para los procesos industriales. Los ambientes que contienen grandes cantidades de proteína, son las mejores fuentes para la búsqueda de microorganismos productores de proteasas **(48)**.

Las proteasas se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas de acuerdo a la ubicación del enlace peptídico que son capaces de hidrolizar.

Las exopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos que se encuentran situados en los extremos terminales amino o carboxilo, liberando los aminoácidos terminales presentes en la cadena polipeptídica. Estas enzimas se pueden clasificar de la siguiente manera **(36)**:

- Dipeptidilaminopeptidasas (EC 3.4.15). Las cuales liberan dipéptidos a partir del extremo amino terminal.
- Aminopeptidasas (EC 3.4.11). Las cuales liberan secuencialmente aminoácidos desde el extremo amino terminal.
- Carboxipeptidasas (EC 3.4.12). Las cuales liberan secuencialmente aminoácidos desde el extremo carboxilo terminal.

Las endopeptidasas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos situados generalmente en el interior del polipéptido. Dentro de las endopeptidasas se encuentran **(36)**:

- Serín-proteasas (EC 3.4.21). Las cuales se caracterizan por poseer un residuo serina en su sitio activo.
- Tíol-proteasas (EC 3.4.22). Las cuales se caracterizan por poseer un grupo SH (tíol) en su sitio activo.
- Proteasas ácidas (EC 3.4.23). Las cuales se caracterizan por poseer uno o más grupos carboxilo en su sitio activo.
- Metallo-proteasas (EC 3.4.24). Las que para su actividad requieren de cationes metálicos divalentes.

Las proteasas adaptadas al frío tienen un importante valor comercial, debido a sus múltiples usos en los sectores industriales y biotecnológico, entre los que se destacan las aplicaciones en la industria de los detergentes, la industria de los alimentos, como biorremediadores, en la biotransformación y la biología molecular **(35)**.

Sideróforos

El hierro es uno de los micronutrientes más importantes requeridos para el crecimiento celular. Actúa como regulador en muchos procesos celulares, metabólicos y de biosíntesis, entre los cuales se destacan: síntesis de ADN, transporte de electrones, formación del grupo hemo, cofactor enzimático, transporte de oxígeno, síntesis de ATP y reducción de nitrógeno en el ciclo del nitrógeno (**12 al 17**).

Si bien se encuentra en cantidades abundantes en la naturaleza, no es fácil encontrarlo en una forma fácilmente accesible ya que en presencia de oxígeno y a pH neutro, el hierro experimenta una rápida oxidación desde Fe^{2+} a Fe^{3+} volviéndose muy poco soluble. Para su adquisición, algunos microorganismos producen y excretan al medio pequeñas moléculas quelantes llamadas sideróforos. Existe una amplia variedad de sideróforos producidos por bacterias, los cuales son internalizados mediante mecanismos de transporte activo. Éstos además, juegan un rol crítico en la virulencia y desarrollo de biofilms (**9**).

Los sideróforos pueden ser clasificados de acuerdo al grupo funcional capaz de unir el ion férrico como: catecolatos (o fenolatos), hidroxamatos e hidroxicarboxilatos. También se han descrito sideróforos con más de un tipo de grupo funcional, denominados sideróforos de ligando mixto (**10, 11**). En la figura 3, se muestran ejemplos de sideróforos y sus estructuras.

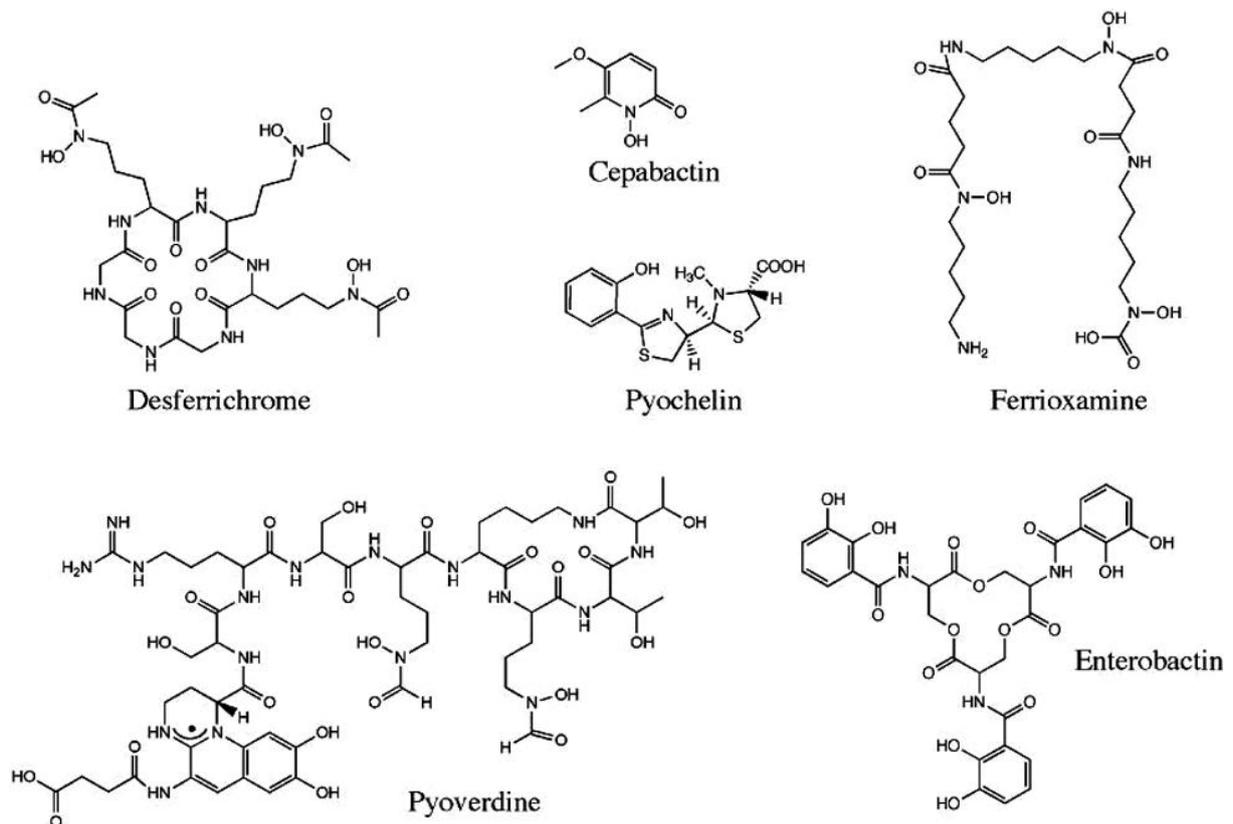


Figura 3. Diferentes estructuras de sideróforos bacterianos (figura tomada de Saha, *et al.* 2012).

Los sideróforos producidos por bacterias han sido usados en fitorremediación de ambientes contaminados con metales pesados. Hay especial interés en aquellos producidos por bacterias asociadas a la rizósfera de plantas ya que unen metales pesados y los vuelven disponibles para las raíces, asegurando la capacidad fitorremediadora de las plantas (17, 18). Se conocen como bacterias promotoras del crecimiento vegetal, a aquellas que tienen la capacidad de favorecer el crecimiento de plantas, ya sea de forma directa poniendo a disposición de la planta algún nutriente o de forma indirecta mediante la supresión de patógenos. Uno de los mecanismos mediante los cuales estas bacterias pueden suprimir el desarrollo de patógenos vegetales es la producción de sideróforos, limitando la cantidad de hierro disponible para otros microorganismos no beneficiosos. Un ejemplo de este mecanismo es la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum*, causante de enfermedades en las raíces de plantas de maíz, inducido por *Pseudomonas*. Estas bacterias producen el sideróforo pioverdina el cual al captar hierro en las proximidades de las raíces limita el crecimiento del patógeno (3, 19, 20, 21).

Los sideróforos además presentan aplicaciones médicas, como la llamada “Estrategia del caballo de Troya”. Esta estrategia utiliza las denominadas sideromicinas, que son conjugados

de sideróforos y antibióticos, en los cuales el antibiótico utiliza al sideróforo como mediador para entrar en las células mediante la maquinaria de adquisición de hierro (22, 23, 24).

Compuestos antimicrobianos

Los antibióticos son compuestos que en pequeñas dosis son capaces de inhibir los procesos vitales de ciertos microorganismos, destruyendo o impidiendo su desarrollo y reproducción. Hay bacterias que producen una variada gama de antibióticos, como ciertas cepas del género *Streptomyces* (estreptomicina, tetraciclina, eritromicina), y también hongos filamentosos, como *Penicillium*, del cual se obtiene la penicilina. En el caso de los antibióticos producidos por microorganismos, éstos son productos del metabolismo secundario.

La producción y secreción de las sustancias antibióticas le ofrecen al microorganismo productor una ventaja desde el punto de vista de la supervivencia ya que le permiten eliminar microorganismos competidores.

Los antibióticos pueden clasificarse tomando en cuenta diferentes criterios:

- Según su mecanismo de acción, ya que algunos antibióticos impiden la síntesis de la pared celular de los microorganismos, otros alteran la membrana plasmática, y la mayor parte de ellos inhiben la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas.
- Según la estructura química se diferencian las penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfamidas u otros.
- Según su espectro de acción, es posible dividirlos en agentes de amplio espectro, que actúan frente a multitud de bacterias, y agentes de espectro restringido que solo actúan frente a algunos tipos de bacterias.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Detectar, identificar y caracterizar nuevas enzimas y actividades bacterianas adaptadas al frío con potencial interés biotecnológico.

Objetivos específicos:

- a. Generar una colección de bacterias cultivables aisladas de distintas muestras provenientes de la Antártida.
- b. Identificar los clones bacterianos de la colección que expresen funciones enzimáticas de potencial interés biotecnológico: proteasas, celulasas, lipasas/esterasas, enzimas ligninolíticas, producción de sideróforos y producción de compuestos antimicrobianos.
- c. Identificar el género al que pertenecen algunos de los aislamientos seleccionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Origen de las muestras

Las muestras fueron colectadas por nuestro grupo en diferentes sitios de la isla Rey Jorge, Antártida, durante la campaña de enero de 2012 realizada con el apoyo del Instituto Antártico Uruguayo. A continuación se presenta una breve descripción de las muestras que se emplearon en este trabajo:

M5: Mata con musgos y cianobacterias. Isla/península Ardley. S 62° 12' 35.1''; W 058° 55' 30.8''

M6: Mata de coloración rojo ladrillo en Caleta Norma. S 62° 11' 26.3''; W 058° 55' 07.3''

M8: Mata rojiza cercana a lago. S 62° 10' 41.6''; W 058° 55' 22.0''

M9: Mata rojo ladrillo pasando Villa de las Estrellas. S 62° 12' 33.4''; W 058° 57' 49.5''

M11: Sedimento con líquenes cerca de la base científica antártica General Artigas (BCAA). S 62° 11' 11.7; W 058° 54' 17.9''

M12: Suelo con combustible al lado de los tanques de la BCAA. S 62° 11' 03.4; W 058° 54' 03.5''



Figura 5. Fotos tomadas en cada uno de los sitios de la toma de muestras. De izquierda a derecha, arriba M5, M6, M8 y abajo M9, M11 y M12.

Todas las muestras fueron colectadas en condiciones asépticas y conservadas a 4 °C hasta su procesamiento.

2. Tratamiento de las muestras

2.1. Observación microscópica

Como primera aproximación, las muestras fueron observadas por microscopía de campo claro de manera de analizar la composición de las mismas y comprobar la presencia de bacterias. Con esta finalidad, se prepararon frotis de cada una de las muestras. En el caso de las muestras sólidas se colocó una gota de buffer PBS estéril en un portaobjetos y se mezcló con una ansada tomada asépticamente de la muestra sólida. Para las muestras líquidas se colocó una gota de la misma sobre un portaobjetos. Luego los portaobjetos se cubrieron con los cubreobjetos y se llevaron al microscopio para su observación.

2.2. Aislamiento de bacterias cultivables

Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de manera de obtener colonias aisladas. Para ello se resuspendieron aproximadamente 0,5 g de cada muestra en 500 µL de agua destilada estéril generando la dilución de partida, denominada dilución 0. A partir de ésta se realizó una dilución 1:10 (dilución -1). Se procedió de la misma manera para la generación de la dilución 1:100 (dilución -2). Cien microlitros de cada una de estas diluciones se sembraron en medio sólido R2A (ver anexo I, tabla 1) recomendado para el crecimiento de microorganismos de crecimiento lento (1). Las placas sembradas se incubaron a 4 °C para favorecer el crecimiento de bacterias psicrotolerantes y con luz directa permanente para permitir el crecimiento de bacterias fotosintéticas. Las placas se incubaron hasta observar crecimiento de colonias.

2.3. Generación de una colección de bacterias cultivables

Se seleccionaron 48 U.F.C. de cada una de las muestras de acuerdo al fenotipo macroscópico de las colonias. Para ello se consideraron diferencias en cuanto a tamaño, forma, color, textura, brillo, borde, elevación y velocidad de crecimiento. Las colonias seleccionadas se ordenaron en placas conteniendo medio sólido R2A utilizando una distribución adecuada para su posterior manipulación con replica plater. Los moldes generados fueron incubados a 4 °C hasta observar crecimiento en todos los aislamientos.

2.4. Mantenimiento de la colección

Para el mantenimiento de la colección se utilizaron los moldes detallados en el punto anterior a partir de los cuales se inocularon placas estériles de 96 pocillos conteniendo 100 μL de medio R2A líquido y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cicloheximida por pocillo. La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas y fue utilizada con el fin de eliminar posibles contaminaciones con hongos los cuales no fueron el objeto de estudio en el presente trabajo. Las placas así obtenidas fueron incubadas a 4 °C y agitación hasta observar crecimiento bacteriano evidenciado por la presencia de turbidez en el medio. Luego de verificar la presencia de turbidez en todos los pocillos se agregaron 100 μL de glicerol estéril 50 % (v/v) por pocillo y la colección generada fue almacenada a - 80 °C.

2.5. Caracterización funcional de la colección

Para detectar los clones portadores de las funciones de interés se realizaron ensayos cualitativos donde las bacterias fueron crecidas en medios sólidos que contenían indicadores específicos. Esta poderosa herramienta puede ser utilizada en la búsqueda de clones con actividades enzimáticas de interés, obteniéndose un resultado positivo o negativo que indica la presencia o ausencia de dicha actividad. Estos ensayos tienen la ventaja de permitir trabajar con un gran número de clones, ensayar diferentes actividades enzimáticas y utilizar reactivos fácilmente accesibles y en general poco costosos.

Para la realización de los ensayos cualitativos, la colección fue crecida en placas de 96 pocillos conteniendo 100 μl de medio R2A líquido. Se incubaron las placas durante seis días a 4 °C. Transcurrido este tiempo, los clones se traspasaron mediante replica plater a cada uno de los medios sólidos conteniendo los indicadores específicos. Los clones se incubaron en los medios sólidos específicos a 4 °C y luz directa, y se observaron diariamente en busca de resultados y cambios producidos.

En las tablas 2 a 10 del anexo I se indica la composición de cada uno de los medios finales utilizados.

2.5.1. Actividad esterasa/lipasa

El ensayo llevado a cabo para evaluar la presencia de enzimas esterasas/lipasas consiste en la incorporación al medio R2A de tributirina en una concentración final de 1 % (v/v) (43). La tributirina es un triacilglicerol simple formado por glicerol y un ácido graso de cadena corta,

el ácido butírico o butanoico de 4 carbonos de longitud. Por su largo de cadena la hidrólisis de la tributirina no permite diferenciar entre enzimas esterases o lipasas, ya que ambas pueden hidrolizar los enlaces ésteres presentes en ésta. Como resultado de la incorporación de la tributirina el medio se vuelve opaco, por lo que luego de crecidos los aislamientos es posible detectar un resultado positivo al observar un halo traslúcido alrededor de la colonia que posea actividad esterasa/lipasa. Este halo traslúcido es debido a la hidrólisis de los enlaces éster formados entre los ácidos grasos y el glicerol.

2.5.2. Actividad proteolítica

Se evaluó la actividad proteolítica en la colección mediante el agregado de leche en polvo descremada de concentración final de 10 % (p/v) en medio R2A sólido. La leche en polvo bovina está compuesta por aproximadamente un 80 % de proteínas caseínas (fosfoproteínas) las cuales son susceptibles de ser hidrolizadas por proteasas. Un resultado positivo podrá ser visualizado por la formación de un halo traslucido alrededor de la colonia debido a la hidrólisis de las caseínas, destacándose sobre el medio opaco.

2.5.3. Actividad celulolítica

Para la detección de actividad celulolítica se ensayaron diferentes tipos de celulosa o hemicelulosa incorporados al medio R2A sólido en una concentración final de 0,5 % (p/v). En particular para evaluar la presencia de endoglucanasas se empleó un derivado de la celulosa, la carboximetilcelulosa (CMC). Se utilizaron tres tipos de CMC distintas, que difieren en su solubilidad y presentación: CMC fibrosa y CMC microgranulada, ambas insolubles en agua y la sal disódica de CMC la cual es soluble en agua.

Para evaluar la presencia de exoglucanasas se utilizó celulosa microcristalina (avicel) y para evaluar la presencia de endoxilanasas se utilizó xilano de avena, polisacárido compuesto mayormente por xilosa y arabinosa.

Los clones se crecieron en los cinco medios antes mencionados y para visualizar la presencia o ausencia de actividad celulolítica se utilizó el colorante Rojo Congo en una concentración de 0,05 % (p/v). Este colorante permite diferenciar entre celulosa intacta o degradada, ya que forma complejos con polímeros de polisacáridos. Interacciona con los enlaces (1→4)-β-D-glucanos, (1→3)-β-D-glucanos y con los (1→4)-β-D-xilanos permitiendo monitorear la hidrólisis de los mismos provocada por enzimas celulolíticas (47). Mediante el uso de un algodón embebido en agua destilada estéril se retiraron las colonias y sobre el

agar se vertieron 10 mL del colorante dejándolo actuar durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de exposición se enjuagaron las placas de Petri con agua destilada y se observaron. Un resultado positivo es evidenciado por la presencia de un halo anaranjado en el lugar donde se hallaba la colonia con actividad celulolítica. Un resultado negativo presentará la misma coloración roja que el medio en el lugar donde se hallaba la colonia.

2.5.4. Utilización de celulosa microcristalina como única fuente de carbono

Por último se determinó la capacidad de los clones para desarrollarse en el medio mínimo M9-Avicel. El Avicel es una forma de celulosa microcristalina. Se presume que los clones capaces de crecer en avicel tendrán, además de hidrolasas, los sistemas de transporte necesarios para secretar estas enzimas y para internalizar los glúcidos liberados de forma de utilizarlos como fuente de carbono. Para ello se preparó el medio M9 y se suplementó con 5 g de Avicel por litro de medio. Un resultado positivo se evidencia simplemente por el crecimiento del aislamiento en este medio.

2.5.5. Producción de compuestos antimicrobianos

La producción de compuestos antimicrobianos en la colección fue evaluada en base a la capacidad que presentaran los clones de inhibir el crecimiento de cultivos bacterianos específicos denominados cultivos blanco. Se utilizó *E. coli* y *Bacillus* sp. como cultivos blanco, de manera de evaluar el posible efecto antimicrobiano tanto en bacterias gram negativas como gram positivas. Para realizar estos ensayos, se utilizó la superposición de dos medios de cultivo uno de ellos sólido (R2A) y el otro semisólido (LB). En una primera etapa se incuban los clones de la colección en medio sólido R2A durante seis días a 4 °C. Por otro lado, se coloca de manera aséptica una ansada del cultivo blanco en un tubo conteniendo 5 mL de caldo LB estéril y se incuba durante 24 horas a 37 °C y con agitación. Una vez transcurrido el tiempo de incubación en medio líquido se observa el tubo para verificar la presencia de crecimiento evidenciado por la turbidez del medio y se inoculan 25 mL de medio semisólido LB fundido con 100 µL de cultivo bacteriano. Este medio semisólido inoculado se coloca sobre los clones de la colección, de forma de obtener un tapiz celular capaz de cubrir dichos clones (aproximadamente 4 mL por placa). La placa de Petri se incuba durante 24 horas a 37 °C para posibilitar el crecimiento de las bacterias blanco. Un resultado positivo se evidencia por la inhibición del crecimiento en tapiz del cultivo blanco alrededor de la colonia productora de compuestos antimicrobianos.

2.5.6. Actividad ligninolítica

Para evaluar la presencia de clones productores de peroxidasas o manganeso peroxidasas, se incorporó al medio R2A el sustrato ABTS en una concentración final de 250 mg/L (44). En el caso de las manganeso peroxidasas, se agregó al medio manganeso en una concentración de 0,1 g/L ya que es el sustrato de estas enzimas. El medio de cultivo obtenido es incoloro y para detectar la presencia de las actividades enzimáticas se utilizó peróxido de hidrógeno a una concentración de 5 volúmenes. Aquellas colonias que presenten actividad peroxidasa o manganeso peroxidasa se tornan azuladas debido a la coloración del producto oxidado del ABTS.

El ensayo para la búsqueda de bacterias productoras de enzimas lacasas consistió en el agregado de 0,3 g/L de Guaiacol (2-metoxifenol) y 40 mg/L de sulfato cúprico al medio R2A sólido (41). El sulfato cúprico se agrega con la finalidad de suplementar al medio con cobre, el cual es necesario para la función de la lacasa ya que es su cofactor. El Guaiacol es el sustrato que será oxidado por la enzima y en caso de tener un resultado positivo la colonia adquirirá coloración marrón, debido a que este sustrato fenólico puede participar en una reacción de polimerización, dando un compuesto amorfo insoluble, la melanina.

2.5.7. Producción de sideróforos

Se utilizó el ensayo de cromo azurol-S (CAS) para evaluar la presencia de clones productores de sideróforos, dado que esta técnica permite detectar la presencia de compuestos quelantes de hierro (40). El cromo azurol-S se une al ión férrico formando un complejo cromogénico que otorga al medio de cultivo una coloración azul intensa. Aquellos compuestos quelantes que presenten mayor afinidad por el hierro que el CAS, podrán capturar el hierro y dejar al complejo cromogénico sin los iones férricos, provocando que el medio vire de azul a anaranjado en torno a la colonia que haya producido estos compuestos quelantes. Cabe destacar que este medio de cultivo no se prepara en base al medio R2A, como es el caso de los ensayos anteriores, ya que las cantidades de hierro presentes en el mismo deben de estar en una relación estequiométrica con el CAS, de manera que todo esté formando complejo CAS-ión férrico. La composición del medio se encuentra detallada en la tabla 9 del anexo I.

2.6. Caracterización de las actividades enzimáticas halladas

Una vez identificados los clones positivos para cada una de las actividades enzimáticas ensayadas, los mismos fueron confirmados nuevamente en los medios finales correspondientes verificando la presencia de la actividad enzimática por la cual fueron previamente seleccionadas. Una vez confirmada la actividad enzimática se continuó la caracterización para algunas de ellas, determinando el efecto de la temperatura en la actividad enzimática y en algunos casos se evaluó la capacidad de utilizar sustratos alternativos.

2.6.1 Evaluación del efecto de la temperatura

Los clones que presentaron actividades proteasa fueron ensayados en paralelo a cuatro temperaturas distintas con el objetivo de determinar su temperatura óptima en cuanto a su velocidad de crecimiento y desarrollo de actividad enzimática. Las temperaturas ensayadas fueron: 4 °C, 25 °C, 30 °C y 37 °C. Los aislamientos fueron incubados a las cuatro temperaturas indicadas y se monitorearon diariamente en busca de crecimiento y desarrollo de actividad enzimática. Se compararon los resultados obtenidos en los cuatro casos de forma de determinar a cual temperatura se obtuvo un crecimiento y actividad enzimática mejor y más rápida.

2.6.2. Evaluación de la utilización de sustratos alternativos

- Esterasas/Lipasas

Una vez seleccionadas y confirmadas las colonias con actividad esterasa/lipasa, se determinó si tenían la capacidad de utilizar sustratos alternativos a la tributirina. Para ello se utilizó medio R2A con el agregado de trioleína o tricaprilinea (ver tabla 3 del anexo I). Estos sustratos son ambos triacilglicéridos simples con ácidos grasos de cadenas largas enlazados al glicerol: ácido oleico con 18 carbonos de longitud y ácido caprílico u octanoico con 8 carbonos longitud, para la trioleína y tricaprilinea respectivamente. Al igual que en la metodología utilizada en la evaluación de la presencia de esterazas/lipasas, se agrega el sustrato alternativo al medio R2A en una concentración final 1 % (v/v) y el resultado es positivo cuando se observa un halo traslúcido correspondiente a la hidrólisis del triglicérido. Las lipasas se diferencian de las esterazas en que las primeras tienen la capacidad de

hidrolizar ésteres de glicerol y ácidos grasos de cadena larga, mayor o igual a doce carbonos. Basándonos en este hecho, aquellos aislamientos que puedan hidrolizar el triglicérido trioleína serán portadores de actividad lipasa, mientras que los demás tendrán actividad esterasa. Este ensayo nos permite determinar cuál de los aislamientos seleccionados anteriormente como esterasas/lipasas son efectivamente lipasas.

Con el fin de determinar si las lipasas halladas tienen la capacidad de degradar aceites de uso doméstico o industrial, los clones con actividad lipasa fueron evaluados en medio mínimo M9 conteniendo varios sustratos alternativos. De esta manera podemos evaluar la capacidad de utilizar los sustratos alternativos como única fuente de carbono. Se utilizó aceite de girasol o aceite de oliva (formados por triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos) y Tween 20, Tween 40 o Tween 60 (ésteres de ácido láurico de 12 carbonos, de ácido palmítico de 16 carbonos y de ácido esteárico de 18 carbonos). Todos los sustratos se agregaron a una concentración final de 1 % (v/v). También se utilizaron los mismos sustratos en medio M9 con el agregado de glucosa como fuente de carbono para evaluar la capacidad de los aislamientos de degradar los distintos sustratos sin utilizarlos como fuente de carbono. Los ácidos grasos liberados a partir de Tween 20, Tween 40 y Tween 60 en presencia de lipasas forman sales con cationes divalentes como el calcio (Ca^{2+}) con el cual fue suplementado este medio. Es posible observar un resultado positivo por la aparición de pequeños cristales (formados por jabón con calcio) en torno a la colonia (**50**). En el caso de que los sustratos alternativos sean aceite de oliva o aceite de girasol, se observa un halo entorno a la colonia al enfrentarnos a un resultado positivo. La composición de los medios se encuentra detallada en la tabla 3 del anexo I.

- Proteasas

Una vez confirmados los aislamientos con actividad proteasa, se determinó si mantenían su actividad con menores concentraciones de leche descremada en polvo. Para ello se utilizó medio R2A sólido suplementado con leche descremada en polvo 1 % o 5 %, ver tabla 5 del anexo I. Se procedió de igual manera que con el medio anteriormente utilizado para proteasas.

2.7. Caracterización genotípica de los clones de interés

2.7.1. Amplificación y secuenciación del gen ADNr 16S

Con el fin de determinar el género bacteriano al que pertenecen algunos de los aislamientos de interés, se llevó a cabo la amplificación de la subunidad 16S del ADN ribosomal mediante la técnica de PCR. Se seleccionaron aquellos aislamientos que presentaron las actividades enzimáticas más eficientes y además se seleccionaron algunos aislamientos con características fenotípicas interesantes. Dentro de este último grupo seleccionamos un aislamiento con coloración rosada, uno amarillo, uno blanco y uno amarillo con crecimiento expansivo.

Para la amplificación del gen de interés se utilizó la técnica de PCR de colonia. La cual consiste en utilizar como molde el ADN genómico obtenido directamente de las colonias, sin pasos previos de extracción y purificación. Las colonias a ensayar son tocadas asepticamente con palillos estériles, los cuales son utilizados posteriormente para depositar las células adheridas al palillo en un tubo para PCR vacío. Se utilizó como control negativo un palillo estéril sin células adheridas y como control positivo una colonia de *Bacillus* sp. que fue sometida al mismo procedimiento. A cada tubo se le agregó 25 μ L de mix para PCR, el cual se detalla en la tabla 1 del anexo II. Para la amplificación se emplearon los cebadores universales Eub27f y Eub1492r, cuyas secuencia se detallan en la tabla 3 del anexo II. El programa de PCR utilizado se detalla en la tabla 2 del anexo II, presentada abajo. Cabe destacar que el programa de PCR se inicia con una primera etapa de calentamiento a 95 °C esencial para la lisis bacteriana y exposición del ADN. Luego de esta etapa los tubos se abren y en cada uno se colocan 0,2 μ L de la enzima Taq polimerasa (Fermentas) de concentración 5 U/ μ L. Luego se prosigue con la reacción de PCR con sus etapas habituales de desnaturalización, hibridación y extensión, las cuales se encuentran detalladas en la tabla 2 del anexo II. Se verificó la obtención del amplicón de tamaño esperado mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa 0,8 % en buffer TAE 1X (Tris-acético 0,04 M; EDTA 0,001 M, pH = 8,0). Para la visualización del ADN se utilizó el agente intercalante Good View® (20 μ L/L). Este producto se intercala entre bases nitrogenadas de las hebras de ADN y permite su visualización al iluminarlo con luz ultravioleta.

Los amplicones obtenidos se enviaron a secuenciar a Macrogen, Korea. Una vez obtenidas las secuencias de ADN se analizaron con el uso de la herramienta bioinformática del NCBI (National Center for Biotechnology Information), BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment

Search Tool). Dicha herramienta compara la secuencia de nucleótidos ingresada (query) contra una base de datos de secuencias nucleotídicas, permitiendo hallar similitudes entre ellas. BLASTn puede ser usado para identificar miembros de familias génicas, así como también para inferir relaciones funcionales o evolutivas entre las secuencias.

RESULTADOS

1. Tratamiento de las muestras

1.1. Observación microscópica de las muestras

Para verificar la presencia de bacterias en las muestras colectadas, se prepararon frotis para su observación en microscopio invertido campo claro. En las mismas se encontró abundante cantidad de cianobacterias filamentosas y microorganismos eucariotas como protistas y diatomeas, además de bacterias (figura 5).

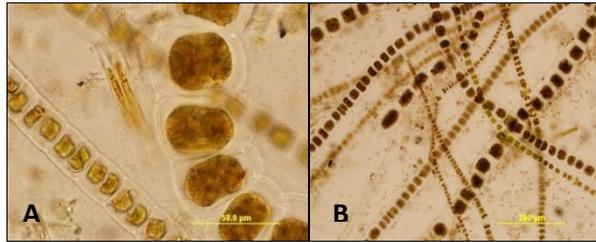


Figura 5. Imágenes obtenidas de la observación de las muestras con microscopio invertido en campo claro: A) corresponde al frotis de la muestra 6 y B) al de la muestra 8. En ambas imágenes se observan bacterias y además cianobacterias y microorganismos eucariotas.

1.2. Aislamiento de bacterias cultivables

Se obtuvieron bacterias capaces de crecer a 4 °C en medio R2A sólido a partir de todas las muestras ensayadas. En todos los casos en que se sembraron 100 μL de la dilución de partida (0,5 g de muestra resuspendidos en 500 μL de agua) se obtuvo un crecimiento confluyente. Las U.F.C. obtenidas a partir de las diluciones siguientes, donde se pudo realizar el conteo ya que se obtuvieron colonias aisladas, se muestran en la tabla 1. Como se muestra en la tabla, la muestra M5 (proveniente de una mata presente en la isla Ardley) fue la que presentó mayor cantidad de U.F.C ($4,5 \times 10^5$ U.F.C/g) mientras que la muestra M11 (proveniente de un sedimento obtenido de la superficie de rocas con crecimiento de líquenes) fue la muestra que presentó menor número de U.F.C. ($1,8 \times 10^3$ U.F.C/g)

Tabla 1. Unidades formadoras de colonias obtenidas en medio R2A a partir de las muestras ensayadas.

Muestra	U.F.C. (dilución)	U.F.C. estimadas en 1 g de la muestra original
M5	450 (1:100)	$4,5 \times 10^5$
M6	260 (1:100)	$2,6 \times 10^5$
M8	42 (1:100)	$4,2 \times 10^4$
M9	62 (1:100)	$6,2 \times 10^4$
M11	18 (1:10)	$1,8 \times 10^3$
M12	290 (1:100)	$2,9 \times 10^5$

Se seleccionaron 48 colonias de cada muestra, excepto para la muestra 6 en la cual se seleccionaron 96 colonias, obteniéndose un total de 336 aislamientos con los cuales se continuó trabajando.

1.3. Caracterización funcional de la colección

Se determinó que seis días de incubación en medio R2A líquido a 4 °C es el tiempo mínimo requerido para observar crecimiento adecuado de todas las colonias, es decir antes de los seis días de incubación en estas condiciones solo se observaba crecimiento en algunas colonias pero no en toda la colección. La incubación en medio líquido se lleva a cabo como paso previo a la realización de los ensayos del screening de actividades enzimáticas de interés, por lo cual es importante establecer correctamente el tiempo en el cual se observa crecimiento de todas las colonias de la colección en medio líquido para que el screening pueda realizarse de manera correcta.

Debido a que no se obtuvieron cultivables fotosintéticas, no se continuó con el uso de la fuente de luz directa durante la incubación de los aislamientos.

1.3.1. Actividad esterasa/lipasa

Luego de sembrar los aislamientos en R2A-tributirina e incubarlos durante 48 hs a 4 °C se observaron 39 colonias con actividad esterasa/lipasa, evidenciadas por la visualización de un halo translúcido alrededor de las colonias, correspondiente a la hidrólisis de la tributirina (figura 6) (25). Al extender el tiempo de incubación a 96 hs se detectaron 39 nuevas colonias con actividad esterasa/lipasa.

Los clones con actividad esterasa/lipasa provenían de las muestras M5, M6, M8, M9 y M11, (tablas 2 a 7). En particular se obtuvieron 6 clones en la muestra M5, 14 en la muestra M6, 21 en la muestra M8, 15 en la muestra M9 y 2 en la muestra M11. Contrariamente a lo esperado, no se detectaron clones con actividad esterasa/lipasa en la muestra M12 proveniente de suelo con derrame de combustible.



Figura 6. Clones con actividad lipasa/esterasa. Se observa el halo de hidrólisis sobre el fondo opaco del medio.

1.3.2. Actividad proteasa

Luego de sembrar los aislamientos en R2A-leche descremada e incubarlos durante 48 hs a 4 °C se observaron 38 colonias con actividad proteasa, evidenciadas por la visualización de un halo translúcido alrededor de las colonias, correspondiente a la hidrólisis de las proteínas presentes en la leche descremada (figura 7). Al prolongar el tiempo de incubación a 96 hs se hallaron 14 nuevas colonias con actividad proteasa.

Un total de 52 clones con actividad proteasa se hallaron en las muestras M5, M6, M8 y M12 (tablas 2 a 7). Doce clones provenían de la muestra M5, 19 clones de la muestra M6, 19 clones de la muestra M8 y 2 clones de la muestra M12, por lo tanto las muestras que presentaron más clones con actividad proteasa fueron M6 y M8.



Figura 7. Clones con actividad proteasa. Se observa el halo de hidrólisis sobre el fondo opaco del medio.

1.3.3. Actividad celulasa/hemicelulasa

No se detectó actividad celulasa ni hemicelulasa con los sustratos ensayados en ninguno de los clones de la colección.

1.3.4. Capacidad de crecimiento en medio mínimo M9 avicel

A los 14 días de incubación a 25 °C se obtuvieron 4 colonias con la capacidad de crecer en medio mínimo M9-avicel. Se obtuvo un total de 4 clones que pudieron crecer en medio mínimo M9-avicel derivados de las muestras: M6, M8 y M12 (tablas 2 a 7), obteniéndose un clon de cada una de las muestras.

1.3.5. Producción de compuestos antimicrobianos

No se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los dos casos.

1.3.6. Actividades peroxidasas y manganeso-peroxidasas

No se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los dos casos.

1.3.7. Producción de sideróforos

A los 14 días de incubación a 4 °C se obtuvieron 21 colonias que produjeron sideróforos, las cuales se identificaron ya que presentaron un halo naranja alrededor de la colonia sobre el fondo azul del medio (figura 8). Este método está basado en el cambio de color del compuesto cromoazurol, siendo este azul al estar unido al hierro y naranja en su forma libre (40).

Los clones que tuvieron la capacidad de producir compuestos sideróforos se obtuvieron en las muestras: M5, M11 y M12 (tablas 2 a 7). Cuatro clones provenían de la muestra M5, un clon de la muestra M12 y 16 clones de la muestra M11. Por lo tanto la muestra que presentó un mayor número de clones productores de sideróforos fue la muestra M11.



Figura 8. Clones productores de sideróforos. Se observa el halo naranja claro sobre el fondo azul del medio.

1.3.8. Actividad lacasa

A los 14 días de incubación a 4 °C se obtuvieron 33 colonias con actividad lacasa, las cuales se identificaron debido a que la colonia adquiere una coloración amarronada en presencia del compuesto fenólico guaiacol (41) (figura 9).

Interesantemente, se obtuvieron clones con actividad lacasa en todas las muestra analizadas (tablas 2 a 7). En la muestra M5 se obtuvo un clon, en la muestra M6 se obtuvieron 8 clones, en la muestra M8 se obtuvieron 8 clones, en la muestra M9 se obtuvieron 2 clones, en la muestra M11 se obtuvieron 7 clones y en la muestra M12 se obtuvieron 5 clones. Por lo tanto las muestras que presentaron un mayor número de clones con actividad lacasa fueron las muestras M6 y M8.



Figura 9. Clones con actividad lacasa, se identifican por la coloración amarronada que adquieren las colonias.

Tabla 2. Caracterización funcional de la muestra 5

MUESTRA 5: Mata de musgos y cianobacterias en Isla Ardley.						
	7	8	9	10	11	12
A		P				P
B	Lac				E/L	
C	P	E/L		P		
C			P		P	
E	E/L P S					
F	P S	E/L P S		E/L		
G		P		P	P	
H	S		E/L			

Se esquematizan los 48 clones obtenidos para la muestra 5, y se indican aquellos con actividades Esterasa/Lipasa (E/L), Proteasa (P), Lacasa (Lac), producción de sideróforos (S) o que hayan crecido en medio mínimo M9 avicel (M9).

Tabla 3. Caracterización funcional de la muestra 6

MUESTRA 6: Mata de coloración rojo ladrillo en Caleta Norma.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Lac	E/L P	E/L P		Lac	P						
B										E/L P		
C	Lac				P	P						
D	E/L P				P	P				E/L P		E/L P
E			E/L P		P	P					E/L	E/L P Lac
F					P Lac					E/L		Lac
G			E/L P								E/L	
H			Lac	Lac				M9		E/L P	E/L P	

Se esquematizan los 96 clones obtenidos para la muestra 6, y se indican aquellos con actividades Esterasa/Lipasa (E/L), Proteasa (P), Lacasa (Lac), producción de sideróforos (S) o que hayan crecido en medio mínimo M9 avicel (M9).

Tabla 4. Caracterización funcional de la muestra 8

MUESTRA 8: Mata cercana a lago 5.						
	7	8	9	10	11	12
A	E/L P Lac				P	E/L Lac
B		E/L P		E/L P	P	
C				E/L	P	
D			E/L P	E/L P Lac		E/L P
E				E/L Lac	E/L P	E/L P
F	E/L P	E/L Lac	E/L P	E/L Lac		E/L P
G			E/L P			E/L P
H	M9	E/L P Lac		E/L P	Lac	E/L P

Se esquematizan los 48 clones obtenidos para la muestra 8, y se indican aquellos con actividades Esterasa/Lipasa (E/L), Proteasa (P), Lacasa (Lac), producción de sideróforos (S) o que hayan crecido en medio mínimo M9 avicel (M9).

Tabla 5. Caracterización funcional de la muestra 9

MUESTRA 9: Mata rojo ladrillo pasando Villa de las estrellas.						
	7	8	9	10	11	12
A						
B						
C						E/L
D				E/L	E/L	E/L
E	E/L		E/L		E/L	E/L
F						E/L Lac
G			E/L	E/L	E/L	E/L Lac
H				E/L		E/L

Se esquematizan los 48 clones obtenidos para la muestra 9, y se indican aquellos con actividades Esterasa/Lipasa (E/L), Proteasa (P), Lacasa (Lac), producción de sideróforos (S) o que hayan crecido en medio mínimo M9 avicel (M9).

Tabla 6. Caracterización funcional de la muestra 11

MUESTRA 11: Tierra con líquenes en roca, base BCAA.						
	1	2	3	4	5	6
A				Lac S	E/L	E/L
B		Lac S	S	S	S	Lac S
C			S	S	S	Lac S
D			Lac S	S		
E			Lac S	Lac S		
F				S		
G						
H						S

Se esquematizan los 48 clones obtenidos para la muestra 11, y se indican aquellos con actividades Esterasa/Lipasa (E/L), Proteasa (P), Lacasa (Lac), producción de sideróforos (S) o que hayan crecido en medio mínimo M9 avicel (M9).

Tabla 7. Caracterización funcional de la muestra 12

MUESTRA 12: Tierra con combustible al lado de los tanques. BCAA.						
	1	2	3	4	5	6
A		M9				Lac
B						Lac S
C						
D						
E						
F			Lac	P		
G		P	Lac		Lac	
H						

Se esquematizan los 48 clones obtenidos para la muestra 12, y se indican aquellos con actividades Esterasa/Lipasa (E/L), Proteasa (P), Lacasa (Lac), producción de sideróforos (S) o que hayan crecido en medio mínimo M9 avicel (M9).

1.4. Caracterización de las actividades enzimáticas halladas

1.4.1. Evaluación del efecto de la temperatura y de diferentes concentraciones de leche descremada en la actividad proteasa de algunos clones

- Luego de 24 hs de incubación en medio R2A con 1 % de leche en polvo se observó crecimiento en las 4 temperaturas ensayadas, 4 °C, 25 °C, 30 °C y 37 °C. En cambio, solamente se detectó actividad proteasa en colonias de las placas incubadas durante 24 hs a 25 °C.
- Luego de 24 hs de incubación en medio R2A con 5 % de leche en polvo, se observa crecimiento a las 4 temperaturas ensayadas, 4 °C, 25 °C, 30 °C y 37 °C. En cambio, solamente se observa actividad proteasa en colonias de las placas incubadas durante 24 hs a 25 °C.

Esto es muy importante ya que nos indica que 25 °C es la temperatura a la cual las colonias crecen y desarrollan su actividad enzimática en menor tiempo para las distintas concentraciones de sustrato ensayadas.

1.4.2. Evaluación de la utilización de sustratos alternativos para clones con actividad lipasa

- Sustrato alternativo: Tricaprilina

Luego de 21 días de incubación a 4 °C, se obtuvieron 22 colonias con la capacidad de utilizar el sustrato tricaprilinea. En particular se hallaron 6 clones en la muestra M5, 1 clon en la muestra M6, 9 clones en la muestra M8 y 6 clones en la muestra M9 (tablas 8 y 9). La muestra que presentó un mayor número de clones con la capacidad de utilizar el sustrato tricaprilinea fue M8.

- Sustrato alternativo: Trioleína

Luego de 21 días de incubación a 4 °C, se obtuvieron 12 colonias con la capacidad de utilizar el sustrato trioleína, es decir clones con actividad lipasa, ya que pueden hidrolizar a la trioleína que es un triacilglicérido formado por ácidos grasos de cadena larga (≥ 12 carbonos). De este total de 12 clones se hallaron 5 clones en la muestra M5, 1 clon en la muestra M6, 4 clones en la muestra M8 y un clon en la muestra M9 (tablas 8 y 9). La muestra que presentó un número mayor de clones con actividad lipasa fue M5.

Tabla 8. Clones con la capacidad de utilizar los sustratos trioleína o tricaprilinea hallados en las muestras 5 y 6

MUESTRA 5: Mata de musgos y cianobacterias en Isla Ardley.							MUESTRA 6: Mata de coloración rojo ladrillo en Caleta Norma.						
	7	8	9	10	11	12		7	8	9	10	11	12
A							A						
B							B						
C		■	■				C						
D							D						■
E	■	■					E						
F		■	■		■	■	F						
G							G						
H			■	■			H						

Se representan esquemáticamente las posiciones de los clones con la capacidad de utilizar el sustrato trioleína (■) y/o tricaprilinea (■), para las muestras M5 y M6.

Tabla 9. Clones con la capacidad de utilizar los sustratos trioleína o tricaprilina hallados en las muestras 8 y 9

MUESTRA 8: Mata cercana a lago 5.							MUESTRA 9: Mata rojo ladrillo pasando Villa de las estrellas.						
	7	8	9	10	11	12		7	8	9	10	11	12
A	■					■	A						
B		■					B						
C				■	■		C						
D				■	■		D						
E				■	■		E					■	■
F		■		■	■		F				■		■
G							G				■	■	■
H		■	■				H						

Se representan esquemáticamente las posiciones de los clones con la capacidad de utilizar el sustrato trioleína (■) y/o tricaprilina (■), para las muestras M8 y M9.

- Sustratos alternativos: Tween 20, Tween 40, Tween 60, aceite de oliva o aceite de girasol con el agregado de glucosa.

Todos los clones con actividad lipasa (12 clones), es decir aquellos que hidrolizan al sustrato trioleína, presentaron actividad lipasa en medio mínimo M9 con el agregado de cualquiera de los seis sustratos alternativos y glucosa (tablas 10 y 11). En la figura 10 se observan entorno a las colonias, los cristales formados por el calcio del medio y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis de los sustratos alternativos Tween 20, Tween 40 y Tween 60, en presencia de glucosa. En el caso de los aceites de oliva o girasol, se observaron halos de hidrólisis en torno a las colonias (50).



Figura 10. Clones con actividad lipasa en medio M9 con el agregado glucosa y Tween 20 (izquierda), Tween 40 (centro) y Tween 60 (derecha). Se observan los cristales de sales de ácidos grasos y calcio alrededor de las colonias.

- Sustratos alternativos: Tween 20, Tween 40, Tween 60, aceite de oliva o aceite de girasol sin el agregado de glucosa.

Los clones con actividad lipolítica que tuvieron la capacidad de utilizar algunos sustratos alternativos como fuente de glucosa, pertenecieron a las muestras M5, M6 y M8 (tabla 10 y 11).

En la figura 11 se observan entorno a las colonias, los cristales formados por el calcio del medio y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis de los sustratos alternativos Tween 20, Tween 40 y Tween 60.



Figura 11. Clones con actividad lipasa en medio con el agregado de Tween 20. Se observan los cristales de sales de ácidos grasos y calcio alrededor de las colonias.

Tabla 10. Clones con la capacidad de utilizar los sustratos Tween 20, Tween 40, Tween 60, aceite de oliva o aceite de girasol como fuente de carbono, hallados en las muestras 5 y 6

MUESTRA 5: Mata de musgos y cianobacterias en Isla Ardley.							MUESTRA 6: Mata de coloración rojo ladrillo en Caleta Norma.						
	7	8	9	10	11	12		7	8	9	10	11	12
A							A						
B							B						
C		T60 T40 T20 G					C						
D							D						G O T40
E	T60 T40 T20						E						
F		T60 T40 T20		T60 T40 T20 G C			F						
G							G						
H			T60 T20 G O				H						

Se representan los clones con actividad lipolítica de las muestras M5 y M6 que tuvieron la capacidad de crecer en medio M9 con los sustratos: Tween 20 (T20), Tween 40 (T40), Tween 60 (T60), aceite de oliva (O) o aceite de girasol (G), sin el agregado de glucosa.

Tabla 11. Clones con la capacidad de utilizar los sustratos Tween 20, Tween 40, Tween 60, aceite de oliva o aceite de girasol como fuente de carbono, hallados en la muestra 8

MUESTRA 8: Mata cercana a lago 5.						
	7	8	9	10	11	12
A						
B						
C				T60 T20		
D				T60 T20 G O		
E						
F				G O T60 T20		
G						
H		T60 T40 T20				

Se representan los clones con actividad lipolítica de la muestra M8 que tuvieron la capacidad de crecer en el medio M9 con los sustratos: Tween 20 (T20), Tween 40 (T40), Tween 60 (T60), aceite de oliva (O) o aceite de girasol (G), sin el agregado de glucosa.

1.5. Caracterización genotípica de los clones de interés

1.5.1. Amplificación y secuenciación del gen ADNr 16S

A partir de los resultados obtenidos en la caracterización funcional de la colección se seleccionaron algunos clones de interés para determinar el género bacteriano al que pertenecen: 7 positivos para el ensayo de lipasas (colonia D12 de la muestra M6, colonia C10 M8, colonia H11 M8 o M5, colonia F10 M5, colonia C8 M5, colonia E2 M5 y colonia D10 M8) y 10 positivos para el ensayo de lacasas (colonia A7 M8, colonia B7 M5, colonia D11 M8 o M5, colonia F9 M8 o M5, colonia A6 M12, colonia H9 M8, colonia H8 M8, colonia B7 M8, colonia D11 M8 y colonia G9 M8). Estas cepas fueron seleccionadas en base a que fueron aquellas que desarrollaron alguna actividad enzimática en menor tiempo de incubación. Además se seleccionaron 4 aislamientos con la capacidad de desarrollarse en medio mínimo M9-avicol (colonia B7 M6, colonia F7 M8 o M5, colonia H8 M6 y colonia A2 M12) y 4 colonias cada una ellas representando un tipo de característica morfológica diferente (colonia A1 M12 color rosado, colonia A3 M12 color amarilla, colonia E5 M12 blanca y H7 M6 amarilla invasora).

Se obtuvieron amplicones del tamaño deseado (1465 pb) los cuales se verificaron en geles de agarosa 0,8 % (no se muestra fotos de los geles).

Se secuenció un total de 25 aislamientos, encontrándose que un 68 % de las colonias analizadas pertenecían al género *Pseudomonas*. Un 83,3 % ya se han reportado en estudios previos de otros autores y coinciden con su presencia en ambientes fríos. A excepción de uno de los resultados obtenidos correspondiente a la colonia A2 M12 seleccionada ya que creció en medio mínimo M9-avicel, los demás presentaron un porcentaje de identidad (grado en el que dos secuencias nucleotídicas tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en el alineamiento) superior a 95 % y un e-value (expect value) de 0,0. Estos resultados indican que las coincidencias entre nuestras secuencias query y las secuencias subject no son por azar. En la tabla 12, se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 12. Resultados de los alineamientos realizados para las 25 secuencias analizadas

Query					Subject						Score			Identities
Muestra	Actividad o característica hallada	Length	Start	End	DB	Gene	Length	Start	End	EValue	Match	Total	Pct.(%)	
colonia D12 M6	Lipasa	1406	10	565	gb	Pseudomonas sp. SGb106 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1430	1430	875	0.0	542	557	97	
colonia C10 M8	Lipasa	1616	11	1373	gb	Pseudomonas sp. HAT5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1428	1426	57	0.0	1335	1378	97	
colonia H11 M8 o M5	Lipasa	1617	45	1307	gb	Pseudomonas frederiksbergensis strain KOPRI 25933 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	1405	1380	131	0.0	1229	1265	97	
colonia F10 M5	Lipasa	1644	26	1344	gb	Pseudomonas sp. MN6-30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1509	1442	122	0.0	1303	1324	98	
colonia A7 M8	Lacasa	1674	23	1310	gb	Pseudomonas frederiksbergensis strain KOPRI 25933 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	1405	1405	132	0.0	1245	1289	97	
colonia B7 M5	Lacasa	1259	11	1257	gb	Pseudomonas sp. B5.3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1421	1416	185	0.0	1209	1251	97	
colonia D11 M8 o M5	Lacasa	1288	75	1201	gb	Pseudomonas sp. HC2-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1529	1412	318	0.0	1091	1127	97	
colonia F9 M8 o M5	Lacasa	202	41	202	gb	Flavobacterium enrichment culture clone Ac-H1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	966	803	8e-69	158	164	96	
colonia A6 M12	Lacasa	1598	42	1394	gb	Pseudomonas frederiksbergensis strain KOPRI 25623 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	1405	1388	32	0.0	1329	1362	98	
colonia H9 M8	Lacasa	1617	26	1401	gb	Pseudomonas sp. INK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1416	1411	28	0.0	1351	1389	97	
colonia H8 M8	Lacasa	1610	49	1397	gb	Pseudomonas sp. INK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1416	1388	28	0.0	1329	1369	97	
colonia B7 M8	Lacasa	1636	25	1395	gb	Pseudomonas frederiksbergensis strain KOPRI 25933 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	1405	1405	32	0.0	1353	1381	98	
colonia D11 M8	Lacasa	1683	21	1397	gb	Pseudomonas sp. INK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1416	1416	40	0.0	1349	1387	97	
colonia C8 M5	Lipasa	1644	13	1376	gb	Pseudomonas sp. MN6-30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1509	1452	81	0.0	1334	1378	97	
colonia G9 M8	Lacasa	1609	46	1397	gb	Pseudomonas sp. INK1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1416	1388	28	0.0	1329	1364	97	
colonia E2 M5	Lipasa	1577	24	1317	gb	Pseudomonas frederiksbergensis strain KOPRI 25933 16S ribosomal RNA gene, partial sequer	1405	1405	125	0.0	1238	1295	96	
colonia D10 M8	Lipasa	209	23	208	gb	Pseudomonas fluorescens strain a192 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1482	1463	1282	4e-62	170	187	91	
colonia B7 M6	Desarrollarse en M9-avic	1531	53	1421	gb	Bacterium 10(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1366	1364	14	0.0	1325	1375	96	
colonia F7 M8 o M5	Desarrollarse en M9-avic	1663	43	1442	gb	Pseudomonas sp. HC3-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1528	1434	34	0.0	1362	1413	96	
colonia H8 M6	Desarrollarse en M9-avic	1245	59	1243	gb	Bacterium 10(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1366	1364	186	0.0	1165	1185	98	
colonia A2 M12	Desarrollarse en M9-avic	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
colonia A1 M12	Colonia rosada	1578	12	1416	emb	Uncultured Sphingomonas sp. partial 16S rRNA gene, clone ER-C-8	1402	1378	4	0.0	1338	1411	95	
colonia A3 M12	Colonia amarilla	1568	10	1349	emb	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone 3_H05	1371	1371	20	0.0	1315	1357	97	
colonia E5 M12	Colonia blanca	1693	1	1389	emb	Burkholderia sp. DF5EH4 partial 16S rRNA, isolate DF5EH4	1483	1458	66	0.0	1346	1402	96	
colonia H7 M6	Colonia amarilla invasora	1436	10	1365	emb	Flavobacterium sp. 412R-09 partial 16S rRNA gene, strain 412R-09	1459	1440	80	0.0	1315	1371	96	

Resultados obtenidos a partir de los alineamientos realizados mediante la herramienta BLASTn del NCBI.

DISCUSIÓN

1. Generación de una colección de bacterias cultivables

En este trabajo como primer objetivo se planteó la creación de una colección de bacterias cultivables a partir de cada una de las 6 muestras analizadas, para luego realizar un screening de biocatalizadores en la colección. Para ello se utilizaron técnicas de microbiología tradicional. Estos métodos dependen del aislamiento, cultivo y posterior búsqueda de los productos de interés. Se estima que una fracción muy pequeña (< 1 %) de los microorganismos presentes en un determinado ambiente pueden ser recuperados mediante las técnicas habituales de cultivo (51). Esto conlleva a que las colecciones de cultivos obtenidos en cada muestra sub-representan la diversidad genética y el potencial biotecnológico de estos microorganismos. Para avanzar en el conocimiento de ese 99 % restante de especies aún no cultivables se ha desarrollado una aproximación metodológica denominada metagenómica, multigenómica o genómica colectiva, la cual podría ser llevada a cabo en etapas posteriores de manera de complementar el presente trabajo.

Se escogió como medio de cultivo sólido para el crecimiento de la colección el medio R2A, ya que en estudios previos se ha reportado favorece el crecimiento de microorganismos ambientales de crecimiento lento (1).

Las condiciones de incubación de la colección obtenida fueron 4 °C para favorecer el crecimiento de bacterias psicrotolerantes y luz directa permanente para permitir el crecimiento de bacterias fotosintéticas. Como no se obtuvieron bacterias fotosintéticas en la colección, se discontinuó el uso de luz en la incubación de los clones.

Bajo las condiciones antes mencionadas se obtuvieron del orden de 10^3 - 10^5 aislamientos por gramo de muestra. Luego se seleccionaron 48 colonias de cada muestra, generando una colección de 336 colonias. El criterio utilizado para seleccionar 48 aislamientos de cada muestra fue la o las diferencias macroscópicas observadas por en cada aislamientos. Por lo tanto, es posible que se hayan seleccionados como diferentes aislamientos que corresponden a un mismo tipo de microorganismo.

Para evitar el sesgo provocado por la utilización de un solo medio de cultivo (R2A) en la generación de la colección, sería posible utilizar diferentes medios de cultivo para abarcar una mayor cantidad de microorganismos.

2. Caracterización funcional de la colección

Uno de los objetivos específicos de este trabajo consistió en identificar los clones bacterianos de la colección que expresen funciones enzimáticas de potencial interés biotecnológico. Con esta finalidad se emplearon ensayos cualitativos en medio sólido ya que tienen la ventaja de ser de fácil interpretación y usualmente proporciona resultados poco ambiguos. Este objetivo fue realizado con gran éxito ya que se halló una gran cantidad de clones que presentaron alguna actividad enzimática de interés.

Interesantemente el ensayo que arrojó un mayor número de clones positivos fue el de esterasas/lipasas. Se obtuvieron 78 clones con actividad esterasa/lipasa, de los cuales luego se confirmaron que 12 de ellos portaban lipasas. Éste además fue el ensayo más reproducible y más claro en su visualización. Además se halló un gran número de clones con actividad lacasa, 33 colonias, lo cual es poco habitual en este tipo de ambientes.

Para evaluar la presencia de endoglucanasas se empleó CMC fibrosa, CMC microgranulada y CMC sal disódica de manera de probar sustratos con diferente estructura presentes en el laboratorio. Para evaluar la presencia de exoglucanasas y endoxilanasas se utilizaron únicamente avicel y xilano, respectivamente. De todas formas no se obtuvieron hallazgos positivos para celulasas o hemicelulasas. En este ensayo se deberían de haber incluido bacterias celulasa positivas, de manera de tener un control positivo que asegure que el ensayo estuvo bien realizado. Debido a que en los ensayos para la búsqueda de peroxidasas, manganeso peroxidasas y compuestos antimicrobianos tampoco se obtuvieron resultados positivos, en ellos se debería de haber utilizado controles positivos para asegurar que los ensayos estuvieron bien realizados.

En el protocolo llevado a cabo para la búsqueda de enzimas lacasas se utilizó como sustrato fenólico al guaiacol, el cual tiene la desventaja de ser oxidado por el oxígeno presente en el aire tornándose oscuro y dando lugar a posibles falso positivos. Durante la realización del ensayo se observó que luego de cierto tiempo de incubación todas las colonias comenzaban

a adquirir una coloración amarronada, como la que se observa en presencia de clones lacasa positivos.

En el caso de la búsqueda de enzimas proteasas presentes en los clones de la colección, se utilizó leche descremada como sustrato para las proteasas. Este ensayo, debido al agregado de leche descremada en polvo, resultó difícil de poner a punto ya que en ocasiones la leche en polvo formaba grumos que dificultaban la visualización de las colonias y los halos de hidrólisis de las proteínas entorno a las clones. Por este motivo se ensayaron diferentes concentraciones de leche descremada en polvo, de forma de tratar de evitar la formación de grumos, pero no se observaron mejoras notables.

Es importante notar que las diferencias observadas al comparar las cantidades de aislamientos obtenidos en cada actividad enzimática hallada con las tablas que esquematizan los clones obtenidos en cada muestra, se debe a que durante el tratamiento de las muestras se produjo un error de manipulación. A partir de ese momento no se pudo identificar si alguno de los aislamientos pertenecen a la muestra 8 o a la muestra 5, pero en vista de que algunos de esos aislamientos presentaron actividades enzimáticas interesantes se continuó con su análisis. De todas formas esos aislamientos fueron solamente 3 y se describieron a lo largo del texto.

Con perspectivas a nivel de la caracterización funcional de la colección podrían plantearse el uso de sustratos alternativos en los ensayos o ensayos diferentes. Además se podrían realizar ensayos cuantitativos en medio líquido que permitieran caracterizar de manera más completa las actividades enzimáticas halladas.

3. Determinación del género bacteriano de algunos aislamientos

Debido a que se obtuvieron 288 aislamientos en la colección, solo se analizaron aquellos que presentaron actividades enzimáticas interesantes o características fenotípicas macroscópicas diferentes. Se analizó un total de 25 aislamientos, 21 de los cuales fueron seleccionados en base a que fueron aquellas que desarrollaron un halo de mayor diámetro y/o en menor tiempo de incubación y las 4 restantes fueron seleccionadas por sus características fenotípicas visibles. Se encontró que un 68 % de las colonias analizadas pertenecían al género *Pseudomonas*. Un 83,3 % ya se han reportado en estudios previos de otros autores y

coinciden con su presencia en ambientes fríos. A excepción de uno de los resultados obtenidos correspondiente a la colonia A2 M12 seleccionada ya que creció en medio mínimo M9-avicel, los demás presentaron un porcentaje de identidad (grado en el que dos secuencias nucleotídicas tienen los mismos residuos en las mismas posiciones en el alineamiento) superior a 95 % y un e-value (expect value) de 0,0. Estos resultados indican que las coincidencias entre nuestras secuencias query y las secuencias subject no son por azar.

Como una etapa posterior al presente análisis de las secuencias analizadas, se podrían construir árboles filogenéticos que permitan establecer relaciones evolutivas entre las cepas obtenidas.

CONCLUSIONES

A modo de resumen a continuación se presentan los resultados obtenidos.

A partir de las 6 muestras se seleccionó un total de 336 U.F.C. los cuales se analizaron durante este trabajo.

Los clones positivos hallados son los siguientes: 33 para lacasas, 78 para lipasas/esterasas, 52 para proteasas, 21 para actividad secuestradora de hierro y 4 con la capacidad de desarrollarse en medio mínimo M9-avicel. No se obtuvieron resultados positivos para celulasas, compuestos antimicrobianos, peroxidasa y manganeso peroxidasa.

De los 78 clones positivos para la actividad lipasa/esterasa solo 12 tienen actividad lipasa.

La muestra que tuvo el mayor número de hallazgos positivos fue M6, correspondiente a una mata de coloración rojo ladrillo ubicada en Caleta Norma, la cual presentó 29 clones positivos para alguno de los ensayos realizados. Los ensayos que dieron un resultado positivo en esta muestra fueron: proteasas, esterasa/lipasas, lacasas y capacidad de crecer en medio mínimo M9-avicel.

La incubación a 25 °C durante 24 hs es suficiente para observar crecimiento y actividad proteasa en los aislamientos, comparado con otras temperaturas ensayadas donde fueron necesarios tiempos de incubación mayores.

Se halló una correlación entre los clones que presentaron actividad proteasa y lipasa: 40,3 % de las colonias que presentaron proteasas, también fueron positivas en el ensayo de estererasas/lipasas.

Finalmente el análisis de la secuencia del ADNr 16S de las colonias que presentaron las mejores actividades enzimáticas y de una colonia de cada tipo morfológico diferente arrojó que de las 25 cepas elegidas un 68 % de las colonias pertenecen al género *Pseudomonas*. Y un 83,3 % ya se han reportado en estudios previos de otros autores y coinciden con su presencia en ambientes fríos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Reasoner D. J. y Geldreich E. E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environl Microbiol.* 49:1-7.
2. de Pascale D., De Santi C., Fu J. y Landfald B. 2012. The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Mar Genomics.* 8:15-22.
3. Glick B.R. 2003. Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* 21:383–393.
4. Eggert T., Pencreac’h G., Douchet I., Verger R. y Jaeger K-E. 2000. A novel extracelular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur. J. Biochem.* 267: 6459-6469.
5. Rivera-Pérez C. y García-Carreño F. 2007. Enzimas Lipolíticas y su Aplicación en la Industria del Aceite. *BioTecnología.* 11 No. 2
6. Björkling F., Godtfredsen S.E. y Kira O. 1991. The future impact of industrial lipases. *Trends Biotechnol.* 9:360-363.
7. Houde A., Kademi A. y Leblanc D. 2004. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118: 155-170.
8. Jaeger K.E. y Egger T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13:390-397.
9. Saha R., Saha N., Donofrio R. y Bestervelt L. 2012. Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* 52:1–15.
10. Miethke M. y Marahiel M. A. 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Molbiol. Rev.* 71:413-451.
11. Wencewicz T., Möllmann U., Long T. y Miller M. 2009. Is drug release necessary for antimicrobial activity of siderophore-drug conjugates? Syntheses and biological studies of the naturally occurring salmycin “Trojan Horse” antibiotics and synthetic desferridanoxamineantibiotic conjugates. *BioMetals.* 22: 633-648.
12. Neilands J.B. 1981. Iron absorption and transport in microorganisms. *Annu. Rev. Nutr.* 1:27-46.
13. Crosa J.H. 1989. Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Molbiol. Rev.* 53:517-530.
14. Skaar E.P. 2010. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog.* 6:1-4.
15. Ratledge C. y Dover L. G. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881–941.
16. Andrews S.C., Robinson A.K. y Rodríguez-Quiñones, F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:215–237.

17. Hammer N. D. y Skaar E. P. 2011. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annu. Rev. Microbiol.* 65:129–147.
18. Rajkumar M., Ae N., Prasad M. N. V. y Freitas, H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotechnol.* 28:142–149.
19. Kloepper J., Leong J., Teintze M. y Schroth, M. 1980. *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr Microbiol.* 4:317–320.
20. Weller D. M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. *Phytopathol.* 97:250–256.
21. Sahu G. y Sindhu S. 2011. Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp. *Res. J. Microbiol.* 6:735–749.
22. Ratledge C. y Dover L. G. 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881–941.
23. Miller M., Zhu H., Xu Y. y Wu C. 2009. Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. *BioMetals.* 22:61–75.
24. Möllmann U., Heinisch L., Bauernfeind A., Köhler T. y Ankel-Fuchs D. 2009. Siderophores as drug delivery agents: application of the “Trojan Horse” strategy. *BioMetals.* 22:615–624.
25. Kouker G. y Jaeger K. E. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl Environ Microbiol.* 53:211-213.
26. Gilbert I. G. y Tsao G. T. 1983. Application of cellulases. *Annu. Rep. Ferm. Process.* 6:323-358.
27. Deleé W., Oneil C., Hawkes F. R. y Pinheiro H. M. 1988. Anaerobic treatment of textil effluents: a review. *J. Chem Technol Biot.* 73:323-335.
28. Sariaslani F. S. 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Crit Rev Biotechnol.* 9:171-257.
29. Thurston C. F. 1994. The structure and function of fungal laccase. *Microbiol.* 140:1.
30. Bourbonnais R. y Paice M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett.* 267:99-102.
31. Giardina P., Cannio R., Martirani L., Marzullo L., Palmieri G. y Sannia G. 1995. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl and Environ Microbiol.* 61:2408-2413.
32. Heinzkill M., Bech L., Halkier T., Schneider P. y Anke T. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi: (family *Coprinaceae*). *Appl Environ Microbiol.* 64:1601-1606.
33. Rubin E. M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature.* 454:841-845.
34. Yaropolov A., Skorobogatko O., Vartanov S. y Varfolomeyev S. 1994. Lacasse-properties, catalytic mechanism, and applicability. *Appl Biochem.* 49:257-280.

35. Kuddus M. y Ramteke P. W. 2012. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. *Crit Rev Microbiol.* 4:330-8.
36. Suárez-Rendueles P. y Wolf D. H. 1988. Proteinase function in yeast: Biochemical and genetic approaches to a central mechanism of post-translational control in the eukaryotic cell. *FEMS. Microbiol. Lett.* 54:17-46.
37. Dosoretz C. G. y Reddy C. A. 2007. Lignin and lignin-modifying enzymes. 611-620. *Methods for general and molecular microbiology*. 3 rd ed. ASM Press.
38. Fan L. T., Gharpuray M. M. y Lee Y. H. 1987. Cellulose hydrolysis. *Biotechnology Monographs* vol. 3. Springer-Verlag, Berlín-Heidelberg.
39. Lynd L. R., Weimer P. J., Van Zyl W. H. y Pretorius I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:506-77, table of contents.
40. Schwyn B. y Neilands J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem.* 160:47-56.
41. Kiiskinen L., Ratto M. y Kruus K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. *J Appl Microbiol.* 97:640–646
42. Lynd L. R. y Zhang Y. 2002. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. *Biotechnol Bioeng.* 77:467-475.
43. Cherry J. R y Fidanstef A. L. 2003. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 14:438–443
44. Hofrichter M., Bublitz F. y Fritche W. 1997. Fungal attack on coal: Solubilization of low-rank coal by filamentous fungi. *Fuel Process Technol.* 52:55-64.
45. Margesin R. y Haggblom M. 2007. Thematic issue: Microorganisms in cold environments. *FEMS Microbiol Ecol.* 59:215–216
46. Cavicchioli R., Siddiqui K. S., Andrews D. y Sowers K. R. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol* 13:253-61.
47. Kim S. J., Lee C. M., Han B. R., Kim M. Y., Yeo Y. S., Yoon S. H., Koo B. S. y Jun H. K. 2008. Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 282:44-51.
48. Vishwanatha T., Spoorthi N. J., Reena V., Divyashree B. C., Siddalingeshwara K. G., Karthic J. y Sudipta K. M. 2010. Screening of substrates for protease production from *Bacillus Licheniformis*. *Int J Eng Sci Technol.* 2: 6550-6554.
49. Himmel M. E, Baker J. O., Adney W. S. y Decker S. R. 2007. Cellulases, hemicellulases and pectinases. 596-610. *En Methods for general and molecular microbiology*, 3 rd ed. ASM Press.

50. Tindall B. J., Sikorski J., Smibert R. A. y Kreig N. R. 2007. Phenotypic characterization and the principles of comparative systematics. 596-610. En *Methods for general and molecular microbiology*, 3 rd ed. ASM Press.
51. Giovannoni S. J., Britschgi T. B., Moyer C. L. y Field K. G. 1990. Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton. *Nature* 345:60–63

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- Tabla 1.** Unidades formadoras de colonia obtenidas en medio R2A a partir de las muestras ensayadas
- Tabla 2.** Caracterización funcional de la muestra 5
- Tabla 3.** Caracterización funcional de la muestra 6
- Tabla 4.** Caracterización funcional de la muestra 8
- Tabla 5.** Caracterización funcional de la muestra 9
- Tabla 6.** Caracterización funcional de la muestra 11
- Tabla 7.** Caracterización funcional de la muestra 12
- Tabla 8.** Clones con la capacidad de utilizar los sustratos trioleína o tricaprilina, hallados en las muestras 5 y 6
- Tabla 9.** Clones con la capacidad de utilizar los sustratos trioleína o tricaprilina, hallados en las muestras 8 y 9
- Tabla 10.** Clones con la capacidad de utilizar los sustratos Tween 20, Tween 40, Tween 60, aceite de oliva o aceite de girasol, hallados en las muestras 5 y 6
- Tabla 11.** Clones con la capacidad de utilizar los sustratos Tween 20, Tween 40, Tween 60, aceite de oliva o aceite de girasol, hallados en las muestras 8
- Tabla 12.** Alineamientos realizados para las 25 cepas analizadas
-

- Figura 1.** Representación esquemática de la pared celular vegetal y la estructura de la lignina presente en ésta.
- Figura 2.** Esquema del ciclo catalítico de las lacasas.
- Figura 3.** Diferentes estructuras de compuestos sideróforos.
- Figura 4.** Fotos tomadas en cada uno de los sitios de la toma de muestras. Las fotos se encuentran ordenadas de izquierda a derecha, arriba: M5, M6 y M8; y abajo: M9, M11 y M12.
- Figura 5.** Imágenes obtenidas de la observación de las muestras con microscopio invertido en campo claro: A) corresponde al frotis de la muestra 6 y B) al de la muestra 8. En ambas imágenes se observan bacterias y además cianobacterias y microorganismos eucariotas.

Figura 6. Clones con actividad lipasa/esterasa.

Figura 7. Clones con actividad proteasa.

Figura 8. Clones productores de sideróforos.

Figura 9. Clones con actividad lacasa, se identifican por la coloración amarronada que adquieren las colonias.

Figura 10. Clones con actividad lipasa en medio con el agregado glucosa y Tween 20 o Tween 40 o Tween 60.

Figura 11. Clones con actividad lipasa en medio con el agregado de Tween 20.

ANEXO I: Medios de cultivo

Tabla 1. Composición del medio R2A sólido (1)

R2A sólido	
Componente	Cantidad por litro
Extracto de levadura	0,5 g
Proteasa peptona N°3	0,5 g
Casaminoácidos	0,5 g
Glucosa	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Piruvato de sodio	0,3 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05 g
Agar	15 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L
Ajustar a pH = 7,2	

Tabla 2. Composición del medio LB

LB (Luria Bertani)	
Componente	Cantidad por litro
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	c.s.p. 1 L

Tabla 3. Composición de los medios para lipasas/esterasas

Medios sólidos para lipasas/esterasas	
Componente	Cantidad por litro
Trioleína o Tricaprilina o Tributirina	10 mL
medio para R2A	c.s.p. 1 L
Componente	Cantidad por litro
Aceite de oliva	10 mL
Aceite de girasol	10 mL
Tween 20	10 mL
Tween 40	10 mL
Tween 60	10 mL
medio para M9	c.s.p. 1 L

Tabla 4. Composición de los medios para celulasas

Medios sólidos para celulasas	
Componente	Cantidad por litro
CMC microgranulada o CMC sal disódica o CMC fibrosa o Xilano o Avicel	5 g
medio para R2A	c.s.p. 1 L

Tabla 5. Composición de los medios para proteasas

Medios sólidos para proteasas	
Componente	Cantidad por litro
Leche en polvo 1%	1 g
medio para R2A	c.s.p. 1 L
Componente	Cantidad por litro
Leche en polvo 5%	5 g
medio para R2A	c.s.p. 1 L
Componente	Cantidad por litro
Leche en polvo 10 %	10 g
medio para R2A	c.s.p. 1 L

Tabla 6. Composición del medio para lacasas

Medio sólido para lacasas	
Componente	Cantidad por litro
Medio para R2A c.s.p.	1 L
Guaiacol (2-metoxifenol)	0,3 g
CuSO ₄	40 mg

Tabla 7. Composición del medio para peroxidasas

Medio sólido para peroxidasas	
Componente	Cantidad por litro
Medio para R2A	c.s.p. 1 L
ABTS	250 mg

Tabla 8. Composición del medio para manganeso peroxidasas

Medio sólido para manganeso peroxidasas	
Componente	Cantidad por litro
Medio para R2A	c.s.p. 1 L
ABTS	250 mg
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g

Tabla 9. Composición del medio CAS (40).

Medio sólido CAS			
Componente		Cantidad	
Pipes		7,56 g	
CaCl ₂ 0,1M		250 µL	
MgCl ₂ 1M		250 µL	
Solución salina (KH ₂ PO ₄ 0,3 g, NaCl 0,5 g, NH ₄ Cl 1 g, agua destilada c.s.p. 100 mL)		25 mL	
Extracto de levadura desferrada 5 %		5 mL	
Agar		3,75 g	
Agua destilada		187 mL	
Llevar a pH = 6,8 con NaOH 50 %			
Finalmente autoclavar			
A parte preparar dos soluciones:			
Solución 1		Solución 2	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
CAS	15,12 mg	HDTMA	18,22 mg
Agua	12,5 mL	Agua destilada estéril	10 mL
Fe (13,5 mg/50 mL)	2,5 mL		

La solución 2 se prepara en erlenmeyer estéril y se calienta durante 4 segundos a 50 % de potencia en microondas. Una vez pronta se mezcla con la solución 1. Finalmente se autoclava la mezcla y se agrega al medio conteniendo agar.

Tabla 10. Composición del medio mínimo M9-avicel

Medio mínimo M9	
Componente	Cantidad para 250 mL
CaCl ₂ 0,1 M	250 µL
MgSO ₄ 1M	500 µL
Sales 5x	50 mL
Agar	3,2 g
Agua destilada	c.s.p. 250 mL
Sales 5 x	
Componente	Cantidad por litro
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	64 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2,5 g
NH ₄ Cl	5,0 g
Agua biodestillada	c.s.p. 1 L

En el caso del medio mínimo M9-avicel se agrega 5 g de avicel por litro de medio M9.

ANEXO II: PCR

Tabla 1. Componentes del mix 5 x utilizado para la reacción de PCR.

Mix 5 x para PCR	
Componente	Cantidad
Agua bidestilada	94 μ L
Buffer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{MgCl}_2$	12,5 μ L
dNTPs (5mM)	5 μ L
MgCl_2 (25mM)	10 μ L
Primer EUB27F (10 μ M)	2,5 μ L
Primer EUB1492R (10 μ M)	2,5 μ L

Tabla 2. Programa de PCR utilizado en la amplificación del ADNr 16S.

Programa de PCR amplificación ADNr 16S		
Temperatura	Tiempo	Repetición del ciclo
95 °C	20 min	---
Apertura de los tubos para agregar Taq polimerasa (5 U/ μ L) 0,2 μ L por tubo		
95 °C	2 min	---
95 °C	45 seg	10 veces
60 °C	45 seg	
72 °C	1 min	
95 °C	45 seg	25 veces
59 °C	45 seg	
72 °C	1 min	
72 °C	8 min	---

Tabla 3. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados

Nombre	Secuencia
Eub27f	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
Eub1492r	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'