



Tesis de Grado
Licenciatura en Ciencias Biológicas
Orientación Biotecnología

Selección de microorganismos capaces de sintetizar
Polihidroxicanoatos a partir de aislamientos de
muestras antárticas.

Maurizio Andreani
Tutora: D.Sc Ana Inés Catalán

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Unidad de Microbiología Molecular
Departamento de Bioquímica y Genómica Microbiana
2017



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

RESUMEN

Los plásticos petroquímicos se han convertido en un material importante para mejorar la calidad de vida de los humanos. Sin embargo, la acumulación de desperdicios plásticos es un problema ambiental a nivel mundial, así como el anunciado y presuntamente rápido agotamiento de los combustibles fósiles. Existen una variedad de biopolímeros que pueden ser utilizados como sustitutos de los plásticos petroquímicos. Estos materiales son derivados de fuentes renovables. En general, durante su producción se conservan los recursos fósiles y se reducen las emisiones de CO₂, lo que hace que estos productos sean considerados como una importante innovación para el desarrollo sustentable.

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son biopolímeros termoplásticos, biodegradables y biocompatibles, con un gran potencial en aplicaciones industriales y médicas. Los PHAs son producidos por numerosos microorganismos y se localizan en el citoplasma celular como gránulos, constituyendo un depósito de carbono y energía. Los microorganismos acumulan este tipo de material en respuesta a una limitación nutricional u otra condición de estrés, en presencia de exceso de fuente de carbono en el medio donde crecen. En cuanto a su estructura química, son poliésteres formados por hidroxíácidos (HA). Los PHAs constituyen una amplia familia que se pueden clasificar en PHA de cadena corta (scl-PHA), PHA de cadena media (mcl-PHA) y PHA de cadena larga (lcl-PHA), dependiendo de la longitud de la cadena carbonada del HA. Los mcl-PHA son termoelastómeros y son generalmente acumulados por bacterias del género *Pseudomonas*.

La producción de PHAs requiere el uso de grandes cantidades de fuentes de carbono, provocando un aumento del costo del proceso. El uso de residuos agroindustriales como sustratos carbonados de bajo costo es una alternativa usualmente estudiada para abaratar el proceso de fermentación. Varios sustratos de bajo costo han sido utilizados para optimizar la producción de mcl-PHAs. Entre ellos se encuentra el licor de glicerol, subproducto de la producción de biodiesel, que contiene grandes cantidades de glicerol. Por otro lado, se estudia el uso de residuos lignocelulósicos, que además de glucosa, son ricos en residuos de xilosa. Esta pentosa es el segundo azúcar más abundante en la naturaleza.

La Antártida es el continente que presenta las condiciones climáticas más severas del planeta, limitando la diversidad de los seres vivos que se pueden establecer en ese ambiente. Los microorganismos que habitan ambientes fríos están bien adaptados a condiciones de estrés fluctuantes. Se considera que la síntesis de PHA es uno de los mecanismos de supervivencia de las bacterias que habitan ambientes inestables y que están expuestas a estrés. Este trabajo se enmarca en las actividades de investigación que se desarrollan en el laboratorio en la Base Artigas, ubicada en la isla Rey Jorge Antártida. En ese contexto, se colectaron muestras de sedimento, matas briofitas, a partir de las cuales se generó una colección de aislamientos bacterianos en distintos medios incluyendo caldos nutrientes (LB, TY) y Medio mineral mínimo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de algunos aislamientos bacterianos antárticos de crecer y producir PHAs en presencia de glicerol y xilosa como únicas fuentes de carbono. En primer lugar se estudió un aislamiento de la colección, identificado como *Pseudomonas* spp. RM5. Esta bacteria fue previamente caracterizada en nuestro grupo, logrando establecer que era capaz de sintetizar mcl-PHAs al consumir glucosa como fuente de carbono. Se estudió la capacidad de síntesis de PHAs en medio mineral

mínimo (MM) con glicerol y xilosa como fuentes de carbono. Se determinó la concentración óptima de glicerol y xilosa para realizar cultivos en lote. Además se comprobó que RM5 puede crecer utilizando licor de glicerina como fuente carbonada. El análisis por GC-MS del material polimérico acumulado por RM5 al crecer en presencia de ambas fuentes de carbono en forma independiente, permitió identificar tres clases de hidroxíácidos con largos de cadena de 6 a 14 átomos de carbono, siendo el 3-hidroxidecanoato (3-HD10) el mayoritario. Al consumir glicerol, RM5 acumuló aproximadamente un 0,45% de mcl-PHA, mientras que con xilosa como fuente de carbono alcanzó un 0,08%.

En la segunda parte de este trabajo, a partir de muestras colectadas durante la campaña Antártica 2015, se obtuvieron nuevos aislamientos, en medio mineral mínimo con xilosa como fuente de carbono. Mediante la técnica de tinción con Rojo Nilo y visualización macroscópica, se identificaron 6 aislamientos que presentaban fluorescencia, lo que indicaría la acumulación de PHAs. Se evaluó el crecimiento de dichos aislamientos en medio MM con 10g/l de xilosa como única fuente de carbono. Mediante el análisis de secuencia de parte del gen 16S ARNr, los aislamientos fueron identificados como *Pseudomonas* spp.,

Finalmente, se intentó amplificar mediante PCR parte de los genes codificantes para las PHA sintasas de Clase I (*phbC*) y Clase II, (*phaC1/phaC2*). A partir de *Pseudomonas* spp. RM5 logramos amplificar los fragmentos *phaC1/phaC2*, lo cual estaría de acuerdo con los resultados obtenidos mediante GC-MS, indicando la presencia de mcl-PHAs, dada la especificidad de la enzima PhaC clase II. A partir de ninguno de los aislamientos pudimos amplificar el fragmento de *phbC*, que corresponde a la enzima que reconoce monómeros de cadena corta.

A partir de los resultados obtenidos se plantean nuevos trabajos orientados a estudiar el crecimiento de RM5 en cultivos en lote, empleando licor de glicerina como fuente de carbono. Bajo dichas condiciones, se analizará y cuantificará el biopolímero acumulado. En lo que refiere a los aislamientos antárticos obtenidos en este trabajo, se plantea determinarlos perfiles de crecimiento a distintas concentraciones de xilosa para poder realizar ensayos de cultivos en lote, identificar el material polimérico acumulado, así como su cuantificación.

CONTENIDO

RESUMEN	2
CONTENIDO.....	4
Indice de Figuras	6
Indice de Tablas.....	7
INTRODUCCION.....	8
Bioplásticos	8
Polihidroxialcanoatos (PHAs)	9
Estructura química	10
Biosíntesis.....	11
PHA sintasas	12
Propiedades físicas.....	13
Biodegradabilidad	14
Biocompatibilidad	14
Naturaleza Renovable	14
Aplicaciones.....	15
Desechos industriales como fuentes de carbono para la síntesis de PHAs	16
Licor de glicerina: residuo en la elaboración del biodiesel	16
Lignocelulosa: Residuo de la industria forestal.....	16
PHAs producidos por bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	17
Antártida	17
Antecedentes	19
OBJETIVOS.....	19
Objetivo General	19
Objetivos específicos 1.....	19
Objetivos específicos 2.....	20
MATERIALES Y METODOS.....	20
Microorganismos y Medios de cultivo	20
Medios de Cultivo.....	20
Microorganismos.....	20
Detección de producción de PHAs	21
Determinación de los Perfiles de Crecimiento.....	21

Cultivos en lote.....	22
Condiciones de Cultivo	22
Determinación de PHA.....	23
<i>Extracción de PHA y cuantificación por peso seco</i>	25
Procedimientos de biología molecular.....	25
Preparación de lisado de células.....	25
Extracción de ADN Genómico	25
Amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr por PCR	26
Amplificación de los fragmentos de genes <i>phaC</i> de los aislamientos productores de PHA26	
Electroforesis en gel de agarosa	28
Análisis de las secuencias del gen de 16S ARNr	28
RESULTADOS	29
Estudio de crecimiento y síntesis de PHA de <i>Pseudomonas</i> spp. RM5al crecer en presencia de glicerol y xilosa como fuentes de carbono.....	29
Detección de producción de PHA de la cepa RM5 <i>Pseudomonas</i> spp.....	29
Perfiles de crecimiento de la cepa RM5.....	31
Cultivos en lote.....	34
Determinación de Biomasa	34
Acumulación de PHA.....	36
<i>Extracción de PHA de Pseudomonas</i> spp. RM5 por método de Soxhlet.....	39
Obtención de aislamientos antárticos capaces de crecer y acumular PHA en presencia de Xilosa	40
Detección de producción de PHA.....	40
Perfiles de Crecimiento	43
Identificación de aislamientos antárticos	44
Identificación del tipo de PhaC en la cepa RM5 y demás aislamientos obtenidos.....	44
DISCUSION.....	46
Detección de la producción de PHA de <i>Pseudomonas</i> spp.RM5	46
Perfiles de crecimiento de RM5	47
Determinación de Biomasa y acumulación de PHA en cultivos en lote de RM5	47
Cuantificación de PHAs	48
Aislamientos antárticos.....	50
Amplificación de los fragmentos de genes <i>phaC</i>	50
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
Bibliografía	53

ANEXO I	56
Composición de Medios de Cultivo.....	56
Obtención y tratamiento de Licor de Glicerina.....	57
Composición buffer de corrida.....	57
Taq DNA Polimerasa.....	58
ANEXO II	58
Secuencias utilizadas para la identificación de los aislamientos	58

Índice de Figuras

<i>Ilustración 1- Clases diferentes de polímeros de origen biológico y biodegradables(Bugnicourt et al. 2014).</i>	8
<i>Ilustración 2 - Fotografía de microscopía electrónica de gránulos de poliéster en PseudomonasAureginosa(Rehm 2003).</i>	9
<i>Ilustración 3 - Estructura química de los polihidroxialcanoatos (PHA). La nomenclatura y número de carbonos para los compuestos de PHA son determinados por el grupo funcional alquilo R. El asterisco denota el centro quiral del bloque estructural de PHA.</i>	10
<i>Ilustración 4 - rutas metabólicas de PHAs(Mozejko-Ciesielska & Kiewisz 2016)</i>	12
<i>Ilustración 5- Organización de los genes de biosíntesis de PHA en diferentes organismos productores de PHAs. phbC, phaC1, phaC2 y phaC corresponden a PHA sintasas; phaE y phaR son las segundas subunidades de las PHA sintasas clase III y IV respectivamente (Solaiman et al. 2006).</i>	13
<i>Ilustración 6 - Ciclo de vida de PHAs(Verlinden et al. 2007)</i>	15
<i>Ilustración 7 - Diagrama bidimensional de la estructura típica de un tapete microbiano (Camacho & Fernández-Valiente 2005)</i>	18
<i>Ilustración 8 – Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (ThermoScientific, USA)</i>	28
<i>Ilustración 9–Tinción con rojo Nilo, desarrollo de fluorescencia en cultivos crecidos en presencia de glicerol a los 2, 4 y 7 días. A) Placas con MM, B) Placas con medio R2A.Pseudomonasspp. RM5 (V), H. seropedicae Z69 (Z69) como control positivo y E.coli como control negativo en R2A.</i>	30
<i>Ilustración 10 - Tinción con rojo Nilo, desarrollo de fluorescencia en cultivos crecidos en presencia de xilosa a los 2, 4 y 7 días. A) Placas con MM, B) Placas con medio R2A.Pseudomonas spp. RM5 (V), H. seropedicae Z69 (Z69) como control positivo y E.coli como control negativo en R2A.</i>	31
<i>Ilustración 11 – PHA obtenido a partir de la muestra a tiempo final del cultivo en lote utilizando glicerol como fuente de carbono. La imagen demuestra lo obtenido luego de la extracción por Soxhlet y una vez que la acetona se evaporó por completo.</i>	39
<i>Ilustración 12 - Placas con medio R2A Xilosa 10g/l de los aislamientos antárticos, incubadas por 2, 4 y 7 días. Las temperaturas de incubación están indicadas en la Tabla 13. Se utilizó como control positivo a H. Seropedicae Z69 (Z69) y como control negativo E. coli Top10 (E.coli), ambas cultivadas en R2A Xilosa 10g/l a 25°C.</i>	42
<i>Ilustración 13 - Placas con medio MM Xilosa 10g/l de los aislamientos antárticos, incubadas por 72hs. Las temperaturas de incubación están indicadas en la Tabla 13. Se utilizó como control positivo a H. seropedicae Z69 (Z69) incubada en el mismo medio a 30°C.</i>	42
<i>Ilustración 14 - Electroforesis de Gel de agarosa 1%. PCR del fragmento del gen phbC, correspondiente a la PHAsintasa clase I. El Marcador de peso molecular (MPM) es GeneRuler DNA Ladder 1kb.</i>	45
<i>Ilustración 15 - Electroforesis de Gel de agarosa 1%. PCR de los fragmentos de los genes phaC1/phaC2, correspondientes a la PHAsintasa clase II. El Marcador de peso molecular (MPM) es GeneRuler DNA Ladder 1kb.</i>	46

Indice de Tablas

<i>Tabla 1 - comparación descl-PHAs, mcl-PHAs y sus copolímeros con polipropileno (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz 2016).....</i>	<i>14</i>
<i>Tabla 2 – Concentraciones de fuente de carbono utilizadas en los perfiles de crecimiento.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 3 – Volúmenes tomados de cultivo para determinar la biomasa por peso seco. En la tabla aparecen los tiempos (horas) en las que fueron extraídas las respectivas muestras para los cultivos utilizando glicerol o xilosa como fuente de carbono.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabla 4 - Concentraciones de la suspensiones celulares utilizadas en la cuantificación de PHA mediante fluorescencia de Rojo Nilo</i>	<i>25</i>
<i>Tabla 5 -Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 6 – Mezcla de reacción de PCR en un volumen final de 50ul</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 7 - Cebadores utilizados para la amplificación de las regiones de los genes phaC de clase I y II</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 8 - Mezcla de reacciones de PCR de phaC I y phaC II en un volumen final de 25ul</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 9 – Programas utilizados en el termociclador para PCR de phaC I y phaC II</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 10 - Velocidad de crecimiento y D.O máxima obtenidas en los perfiles de crecimiento. Se indica la fuente de carbono utilizada y su concentración. La velocidad de crecimiento máxima fue calculada como la pendiente de la región lineal de la regresión del Logaritmo neperiano de DO vs tiempo</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 11 – Biomasa máxima obtenida y velocidad de crecimiento máxima de los cultivos en lote con xilosa o glicerol como únicas fuentes de carbono.</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 12 – Biomasa de las muestras obtenida en los distintos tiempo durante los cultivos en lote con glicerol y xilosa como únicas fuentes de carbono. Total de polímero calculado según lo descrito por (Tan, Chen, Ge, et al. 2014). Porcentaje de polímero calculado sobre la concentración de biomasa.</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 13 – Concentraciones de biomasa liofilizada en cada punto de la curva de calibración.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabla 14 – Resultados obtenidos a partir de la cuantificación por fluorescencia con Rojo Nilo. Las muestras utilizadas provienen de los cultivos en lote utilizando glicerol o xilosa como fuente de carbono, extraídas a distintos tiempos de los cultivos.</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 15 – Resultados de la extracción de PHA por método de Soxhlet, a partir de biomasa obtenida a tiempo final para los cultivos en lote de RM5 utilizandoglicerol oxilosa como fuente de carbono.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 16 - Tabla comparativa de los resultados de cuantificación a partir de las distintas técnicas.</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 17 – Aislamientos antárticos con sus respectivos orígenes de muestreo, pruebas de Rojo Nilo en medio R2A y MM y temperaturas de incubación.</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 18 - Densidad óptica máxima y velocidad máxima alcanzadas por aislamientos antárticos en las curvas de crecimiento.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 19 – Resultados del análisis de las secuencias de los aislamientos al compararlas con la base de datos genbank. Los resultados de los aislamientos 1 y 4 son a partir de las secuencias obtenidas utilizando el cebador 27F.....</i>	<i>44</i>
<i>Tabla 20 – Resultados de los ensayos de PCR de los fragmentos de los genes phbC y phaC1/phaC2 para cada aislamiento.</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 21 – Comparación de los porcentajes de PHA obtenidos a partir de la cuantificación por GC-MS y fluorescencia por tinción con Rojo Nilo</i>	<i>50</i>

INTRODUCCION

Bioplásticos

Los plásticos sintéticos presentan características de resistencia, ligereza y durabilidad. Se han convertido en un material importante para mejorar la calidad de vida humana, reemplazando *commodities* como el vidrio o papel en el empaquetamiento. En 2013, la producción global de plásticos derivados del petróleo fue cerca de 299 millones de toneladas. Esto se asocia a la acumulación de desperdicios plásticos como problema ambiental a nivel mundial, así como el presuntamente rápido agotamiento de los combustibles fósiles (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz 2016). Existen una variedad de biopolímeros con diversas propiedades que pueden utilizarse como sustitutos de los plásticos petroquímicos. Los biopolímeros derivan de fuentes renovables como pueden ser aceites vegetales, almidón, proteínas. De esta forma se conservan los recursos fósiles y se reducen las emisiones de CO₂, lo que hace que sean considerados una importante innovación para el desarrollo sustentable (Bugnicourt et al. 2014).

Dentro de los biopolímeros con propiedades plásticas se incluyen proteínas (a partir de fuentes animales o vegetales), lípidos y polisacáridos (Ilustración 1). Los poliésteres de ácido láctico (poli-láctico), obtenido a partir de monómeros de origen biológico, es uno de los biopolímeros principales disponibles en el mercado (Bugnicourt et al. 2014). Por otro lado, se destacan los polihidroxialcanoatos (PHAs), un poliéster biogénico sintetizado naturalmente por bacterias. Estos son polímeros termoplásticos, biodegradables con un gran potencial en aplicaciones industriales y médicas (Solaiman et al. 2005).

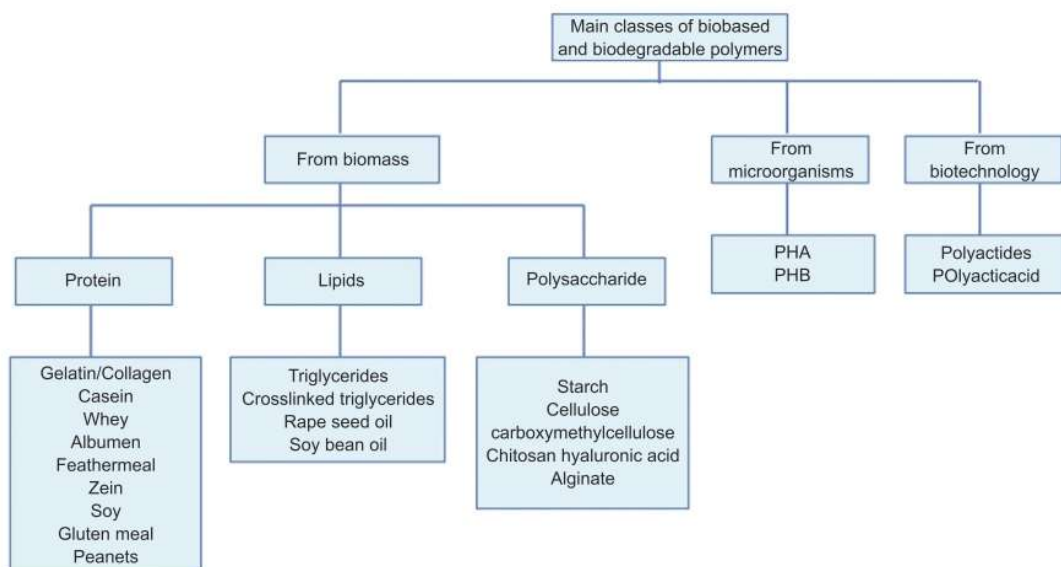


Ilustración 1- Clases diferentes de polímeros de origen biológico y biodegradables (Bugnicourt et al. 2014).

Polihidroxialcanoatos (PHAs)

Los PHAs son un grupo de biopolímeros producido por numerosos microorganismos. Son sintetizados en respuesta a una limitación nutricional, como limitación de nitrógeno, fósforo, oxígeno (Anjum et al. 2016), o en condiciones de estrés y siempre en presencia de exceso de fuente de carbono (Sathiyarayanan et al. 2017). Estos polímeros se acumulan en el citoplasma bacteriano constituyendo un depósito de fuente de carbono y energía. Además de esta función principal, los PHAs tienen otros roles fisiológicos:

- Protector de factores de estrés exógenos
- Mantener la fotosíntesis anóxica y el ciclo del sulfuro en matas microbianas dependientes de la fijación fotosintética de carbono
- Desencadenar la esporulación en *Bacillus*
- Mantenimiento del potencial redox en bacterias fijadoras de nitrógeno mediante la producción de energía y oxidación del NADH (Encarnación et al. 2002).

Los PHAs se acumulan en forma de gránulos hidrofóbicos en el citoplasma celular (Ilustración 2) (Pappalardo et al. 2014). El tamaño y cantidad de gránulos varía entre las especies (Rai et al. 2011). Estas inclusiones más o menos esféricas consisten de un núcleo de PHA, rodeado por proteínas involucradas en el metabolismo de PHA (Rehm 2010).

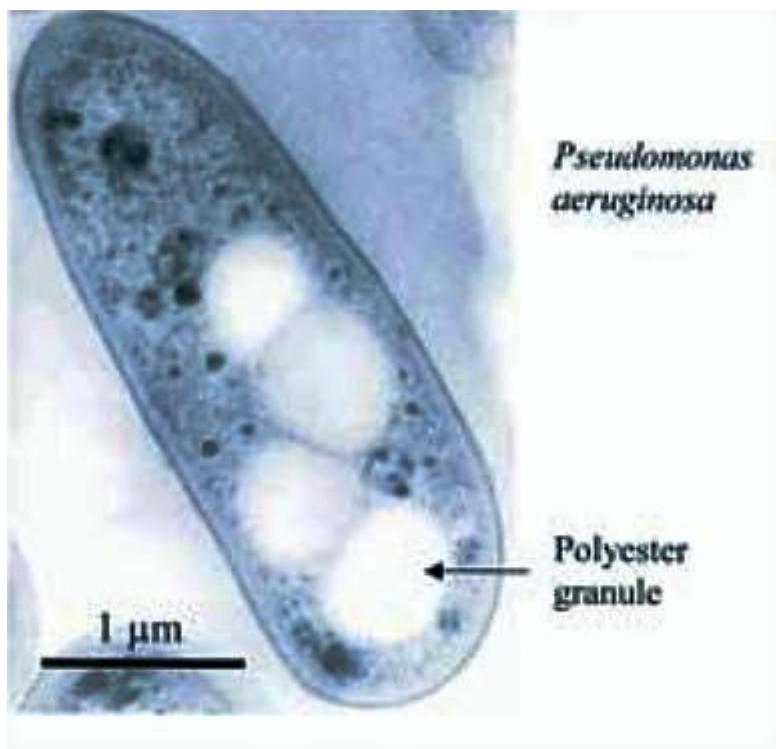
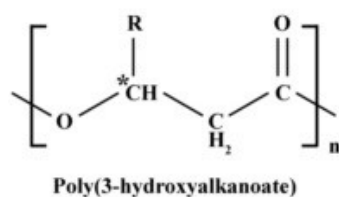


Ilustración 2 - Fotografía de microscopía electrónica de gránulos de poliéster en *Pseudomonas Aureginosa* (Rehm 2003).

Estructura química

Los polihidroxiálcanoatos son una clase linear de poliésteres que consiste en monómeros de (*R*)-hidroxiácidos (HA) conectados por un enlace éster entre el grupo carboxilo de un monómero y el grupo hidroxilo de un monómero vecino (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz 2016). Por otro lado, el grupo hidroxilo es variable, pudiendo estar ubicado en la posición 3, 4, 5 y 6 (Madison & Huisman 1999). La molécula de PHA está formada típicamente por 600 a 35000 unidades monoméricas de HA. Cada monómero presenta una cadena lateral R que generalmente está conformada por un grupo alquilo saturado (Ilustración 3), aunque también puede ser un grupo alquilo insaturado, ramificado o este grupo puede estar sustituido (Tan, Chen, Li, et al. 2014). La composición estructural de los PHA depende de la cepa bacteriana utilizada, del sustrato carbonado suministrado y de la especificidad de la enzima (PHA sintasa) que reconoce cada monómero y cataliza la formación del enlace éster (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz 2016). Se han identificado más de 150 monómeros de PHA diferentes y este número continua en aumento, tanto por modificaciones químicas de los PHA naturalmente sintetizados, o mediante la construcción de organismos genéticamente modificados dirigidos a producir PHA con grupos funcionales especializados (Tan, Chen, Li, et al. 2014).



R group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C ₄	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C ₅	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C ₆	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C ₇	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C ₈	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C ₉	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C ₁₀	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C ₁₁	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C ₁₂	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C ₁₃	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C ₁₄	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C ₁₅	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C ₁₆	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

Ilustración 3 - Estructura química de los polihidroxiálcanoatos (PHA). La nomenclatura y número de carbonos para los compuestos de PHA son determinados por el grupo funcional alquilo R. El asterisco denota el centro quiral del bloque estructural de PHA.

Los PHAs se clasifican en PHA de longitud de cadena corta (*short chain long*) (scl-PHA), compuestos por HA de 3 a 5 átomos de carbono, PHA de longitud de cadena media (*medium chain long*), mcl-PHA, con HA de 6 a 14 átomos de carbono, y cuando el largo

de cadena del HA es mayor a 15 átomos de carbono los PHA se denominan de longitud de cadena larga (*large chain long*), (lcl-PHA)(Tan, Chen, Ge, et al. 2014). También pueden ser clasificados dependiendo del tipo de monómero presente, siendo homopolímeros cuando contienen solo un tipo de HA como unidad monomérica, o un heteropolímero cuando presenta más de un tipo de HA como unidad monomérica (Rai et al. 2011). Los scl-PHA son producidos por un amplio rango de géneros bacterianos, mientras que los mcl-PHA son generalmente acumulados por bacterias del género *Pseudomonas*, como *Pseudomonas putida* (Fontaine et al. 2017).

Biosíntesis

Existen varias rutas metabólicas que aportan los monómeros para la síntesis de PHAs (Ilustración 4). Las tres vías más estudiadas y distribuidas entre los géneros bacterianos son la ruta clásica de síntesis de poli(3-hidroxi butirato) (PHB), la β -oxidación y la síntesis de *nov*o de ácidos grasos (Ilustración 4).

En la ruta clásica de síntesis de PHB (vía I), los monómeros 3HB son generados por condensación de dos moléculas de acetyl-CoA, para formar acetoacetyl-CoA, reacción catalizada por la enzima β -cetotiolasa. En el siguiente paso, la enzima acetoacetyl-CoA reductasa reduce el acetoacetyl-CoA para formar 3-hidroxi butiril-CoA. Finalmente, la enzima PHA sintasa cataliza la polimerización a partir de la esterificación del 3-hidroxi butiril-CoA a PHB (Anjum et al. 2016).

La vía II es la β -oxidación de ácidos grasos. Los intermediarios de esta ruta pueden ser derivados hacia la síntesis de HA y polimerizados por la PHA sintasa (Ilustración 4). Esta ruta ha sido descrita en *Pseudomonas* pertenecientes al grupo I de homología de ARNr (Anjum et al. 2016). Esta ruta es utilizada cuando las bacterias crecen con ácidos grasos como fuente de carbono, siendo la longitud de cadena carbonada de los HA igual o menor al del ácido graso utilizado como fuente de carbono (Le Meur et al. 2012).

La vía III es la de síntesis de *nov*o de ácidos grasos. La síntesis de PHAs es generada a partir de fuentes de carbono no relacionadas y simples, como pueden ser glucosa, sacarosa o fructosa, entre otras. Los intermediarios (*R*)-3-hidroxi acil provenientes de la vía biosintética de ácidos grasos son convertidos desde su forma proteica portadora de acilo (ACP) a su forma CoA por acción de la enzima acil-ACP-CoA transacilasa (Anjum et al. 2016). En este caso, los PHAs resultantes están compuestos por HA con igual o mayor número de átomos de carbono que el sustrato carbonado utilizado (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz 2016).

Varias bacterias del género *Pseudomonas* producen mcl-PHAs. De acuerdo a la naturaleza de la fuente de carbono, estas especies sintetizan mcl-PHAs por dos vías metabólicas centrales: la vía de síntesis de *nov*o de ácidos grasos (vía III), por ejemplo a partir de carbohidratos, y la β -oxidación (vía II) cuando la fuente de carbono es un ácido graso (Fontaine et al. 2017). La cepa de *P. putida* KT2440 cuando crece en ácido octanoico acumula mcl-PHAs compuesto en su mayoría de monómeros de 8 átomos de carbono. Por otro lado *Pseudomonas* fluorescentes, del grupo I de homología ARNr, crecen con carbohidratos como fuente de carbono y los PHA sintetizados consisten principalmente en monómeros de C₁₀ y C₈ (Madison & Huisman 1999).

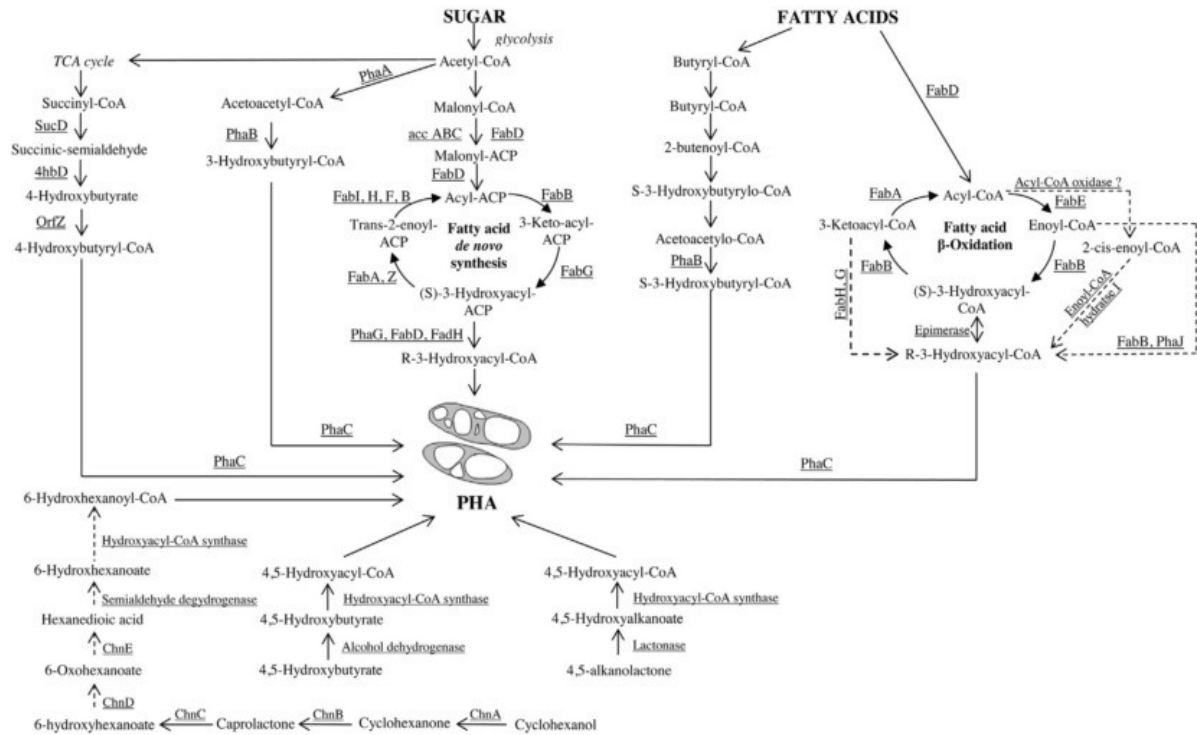


Ilustración 4 - rutas metabólicas de PHAs (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz 2016)

PHA sintasas

Las PHA sintasas son las enzimas clave en la producción de gránulos de PHA. Estas enzimas son clasificadas en cuatro clases según su estructura primaria deducida a partir de su secuencia nucleotídica, especificidad de sustrato y composición de subunidades. Las enzimas de clase I y II consisten en un solo tipo de subunidad (PhaC). Las PHA sintasas clase I reconocen HA de entre 3 a 5 átomos de carbono, mientras que las de clase II, reconocen HA comprendidos entre 6 a 14 átomos de carbono.

Las PHA sintasas de clase III, presentan dos tipos de subunidades: una subunidad PhaC, que exhibe una similitud de secuencia aminoacídica de entre 21-28% con las PHA sintasas de clase I y II; y una subunidad PhaE, sin ninguna similitud. Estas PHA sintasas utilizan HA de entre 3 a 5 carbonos.

Por último, PHA de clase IV, es muy similar a la de clase III, pero la subunidad PhaE es reemplazada por una PhaR (Rehm 2003). En la Ilustración 5 se observan las distintas subunidades de las distintas clases de PHA sintasas.

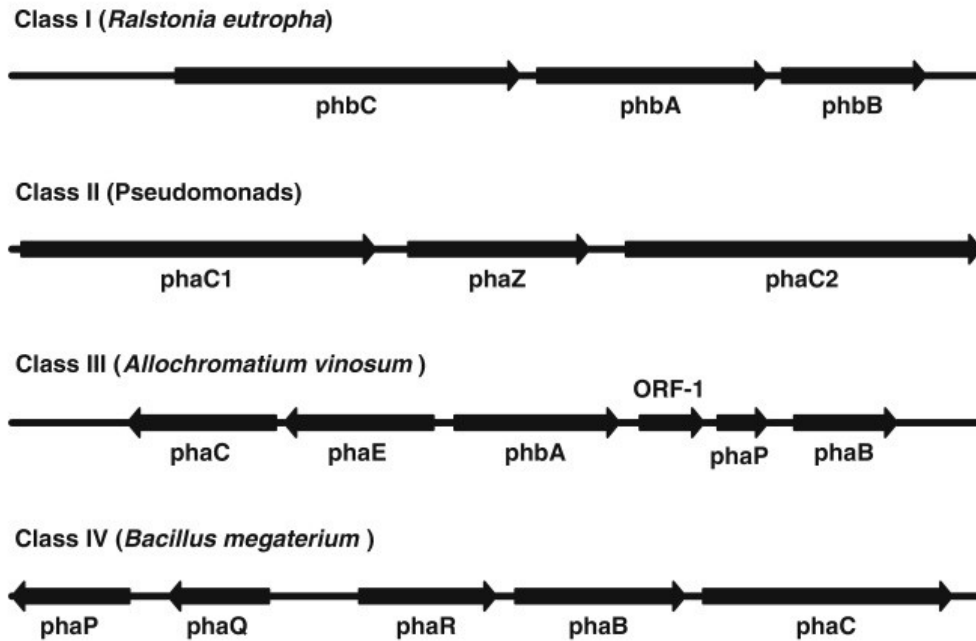


Ilustración 5- Organización de los genes de biosíntesis de PHA en diferentes organismos productores de PHAs. *phbC*, *phaC1*, *phaC2* corresponden a los genes que codifican para PHA sintasas clase I y II, respectivamente; *phaC*, *phaE* y *phaP* corresponden a los genes que codifican para las subunidades de las PHA sintasas clase III y IV (Solaiman et al. 2006).

En el caso de *Pseudomonas* productoras de mcl-PHA, la enzima presente es la PHA sintasa clase II; la organización genética en estas bacterias consiste en dos genes sintasa (*phaC1* y *phaC2*) separados por un gen que codifica para la enzima PHA depolimerasa (*phaZ*) (Ilustración 5) (Solaiman et al. 2005).

Propiedades físicas

El peso molecular de los PHAs se encuentra entre 50.000 y 1.000.000 Da, brindándole características plásticas. Algunas propiedades de los PHAs que despiertan interés es su insolubilidad en agua y resistencia relativa a degradación hidrolítica, como también a rayos ultra violeta, aunque poca a ácidos y bases; son solubles en cloroformo y otros hidrocarburos clorados, son biocompatibles, se hunden en agua, facilitando la biodegradación anaerobia en sedimentos, no son tóxicos, y son menos “pegajosos” que los polímeros tradicionales al ser derretido (Bugnicourt et al. 2014).

Las propiedades de los PHA varían considerablemente dependiendo del tipo de monómero que los componen (Tabla 1). Los mcl-PHAs presentan una temperatura de fusión (T_m) entre 40 y 60°C y una temperatura de transición de vidrio (T_g) entre -50 y -25°C. Estos polímeros son termoelastómeros, tienen una baja cristalinidad, baja resistencia a la tracción y una alta resistencia al alargamiento (Rai et al. 2011). Estas características atraen la atención para aplicaciones industriales y biomédicas donde se requieren biomateriales biocompatibles y flexibles (Pappalardo et al. 2014).

Tabla 1 - Comparación de scl-PHAs, mcl-PHAs y sus copolímeros con polipropileno (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz 2016)

Comparison of properties of scl-PHAs, mcl-PHAs and their copolymers with polypropylene.

	Homopolymer scl-PHAs	Homopolymer mcl-PHAs	copolymer P(3HB-co-3HV)	Copolymer P(3HB-co-6%3HD)	Polypropylene
Melting temperature (°C)	179	80	137–170	130	176
Glass transition temperature (°C)	4	–40	10 to –6	–8	–10
Young's modulus (GPa)	3.5	–	0.7–2.9	–	1.7
Elongation to break (%)	40	300	30–38	680	38
Tensile strength (Mpa)	5	20	up to 690	17	400

Scl-PHAs – short-chain-length polyhydroxyalkanoates; mcl-PHAs – medium-chain-length polyhydroxyalkanoates; P(3HB-co-6%3HD) – poly(3-hydroxybutyrate-co-6% 3-hydroxydecanoate).

Biodegradabilidad

Una importante característica de los PHAs es su biodegradabilidad. En la naturaleza, los PHAs pueden ser degradados por la acción de diversos microorganismos a partir de las enzimas PHA hidrolasas y PHA depolimerasas extracelulares. La actividad de estas enzimas puede variar y depender en la composición del polímero y de las condiciones ambientales. Como ejemplo el PHB puede degradarse generalmente en cuestión de unos meses (en anaerobiosis en aguas residuales) a años (en aguas marinas) (Verlinden et al. 2007).

Biocompatibilidad

Esta propiedad que genera mucho interés a nivel médico y farmacéutico, implica que no tiene ningún efecto tóxico en organismos vivos. Dentro de mamíferos, el polímero se hidroliza lentamente. Por ejemplo, se realizaron estudios donde se implantaron tabletas de PHB en ratones, demostrando que luego de un período de 6 meses la pérdida de masa de la tableta fue menor a 1,6% (w/w), lo que denota una baja degradación del biopolímero (Verlinden et al. 2007; Pouton & Akhtar 1996).

Naturaleza Renovable

La producción de PHAs es biológica y basada en recursos renovables. Durante la producción fermentativa de PHAs se utiliza fuente de carbono y energía agrícola como son los azúcares o ácidos grasos. Es así que la síntesis y biodegradación de PHA son compatibles con el ciclo de carbono (Ilustración 6).

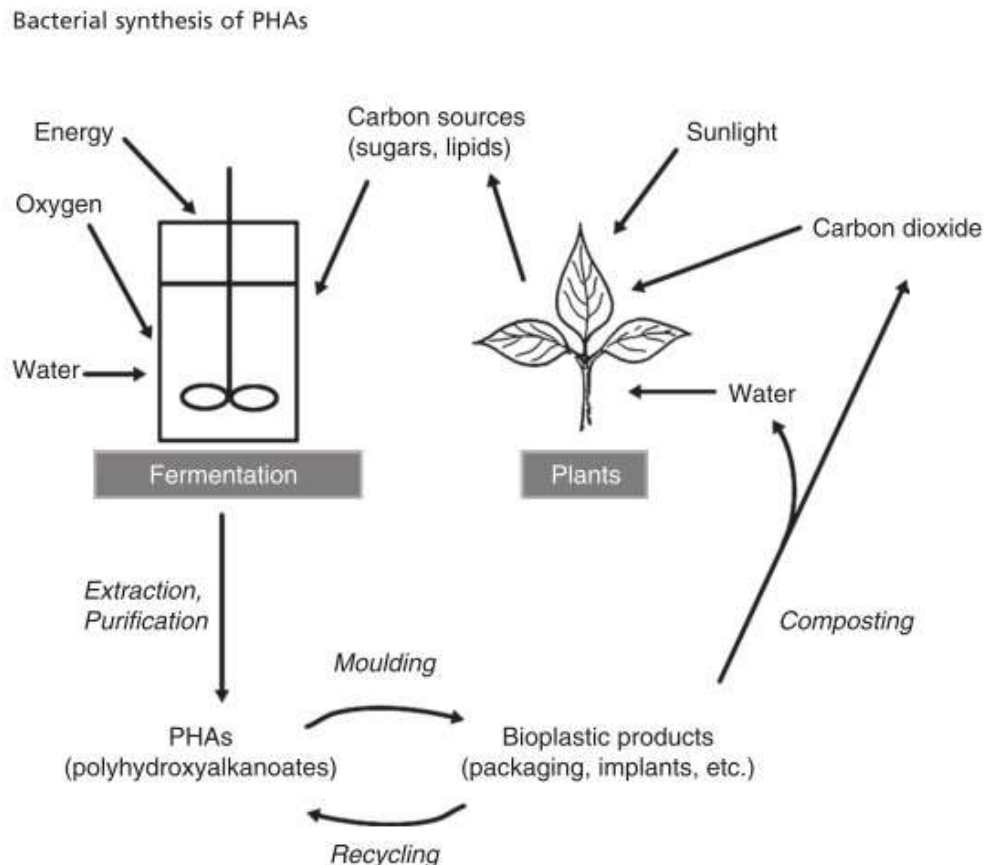


Ilustración 6 - Ciclo de vida de PHAs (Verlinden et al. 2007)

Aplicaciones

La principal aplicación de los PHAs es el remplazo de los polímeros petroquímicos (Verlinden et al. 2007). En este sentido, son varios los ejemplos de aplicaciones en la industria de empaquetamiento, medicina, farmacia, agricultura, industria alimentaria, etc. Por otro lado, los PHAs pueden ser utilizados en la industria química como materia prima para la síntesis de productos químicos enantioméricamente puros y en la producción de pinturas (Rehm 2003)

En el área biomédica, se requiere que los materiales que estén en contacto con tejidos blandos sean elastómeros y flexibles. Los mcl-PHA son interesantes en esta área ya que poseen dichas características, pudiendo ser aplicados para la elaboración de válvulas cardíacas, parches cardíacos y otras aplicaciones vasculares; ingeniería de tejidos cutáneos, cicatrización de heridas y administración controlada de fármacos (Rai et al. 2011).

El área agronómica es otro campo para el empleo de los PHAs. Los mismos pueden ser utilizados por ejemplo para la elaboración de tutores y soportes para plantines, tubos de riego que se utilizan en una sola estación, etc. Después de su uso los materiales recuperados pueden ser utilizados nuevamente por la agricultura como compost con certificado de calidad con ventajas económicas y ecológicas (Bugnicourt et al. 2014)

La industria de empaquetamiento es la mayor procesadora de polímeros, con el sector gastronómico como su mayor cliente, siendo la contaminación del plástico en ésta industria una significativa carga económica y ambiental (Bugnicourt et al. 2014).

En el campo farmacéutico, el PHAs es un biomaterial prometedor. Faveau y colaboradores (2006) demostraron que el ácido 3-hidroxihexanoico (3HHx), un mcl-HA, puede ser usado como intermediario para la síntesis de análogos de laulimalida, un compuesto con propiedades anticancerígenas. Por otro lado, los PHAs pueden ser usados como una plataforma multifuncional para la liberación sostenida de drogas basadas en la tecnología de microencapsulación. Se ha demostrado que pueden utilizarse en la liberación controlada de varios fármacos previa preparación de nanopartículas (Mozejko-Ciesielska & Kiewisz 2016).

Desafortunadamente, el desarrollo de mcl-PHA en la industria continúa siendo limitado, debido a que la producción a gran escala de este compuesto aún no puede competir con los plásticos sintéticos, debido a su alto costo durante la fermentación y extracción (Fontaine et al. 2017).

Desechos industriales como fuentes de carbono para la síntesis de PHAs

La producción comercial de PHAs basada en la fermentación de cultivos puros tiene un alto costo de operación asociado principalmente a los sustratos carbonados utilizados, lo que dificulta su producción industrial (Huang et al. 2016).

Tradicionalmente, los ácidos grasos han sido usados como sustrato principal para la síntesis bacteriana de mcl-PHAs. Sin embargo, el uso de ésta fuente de carbono es costosa cuando la producción de mcl-PHA se realiza a escalas mayores. Varios sustratos de bajo costo han sido investigados para optimizar la producción industrial de mcl-PHAs a partir de sistemas bacterianos salvajes o modificados metabólicamente (Sathiyarayanan et al. 2017).

Licor de glicerina: residuo en la elaboración del biodiesel

El alto crecimiento en la producción de biodiesel a nivel mundial, ha generado la acumulación de sub-productos, entre ellos el licor de glicerina rico en glicerol. El biodiesel es producido a partir de aceites vegetales y grasas animales a través de una transesterificación con etanol o metanol (alcoholisis), generalmente catalizada por NaOH o KOH. El glicerol generado representa un 10% (v/v) de los ésteres usados como materia prima (da Silva et al. 2009). Este sub-producto se ha convertido en un material interesante para ser empleado como fuente de carbono para la síntesis de mcl-PHA, al ser más barato que los ácidos grasos (Sathiyarayanan et al. 2017). Por cada 10 toneladas de biodiesel producido, se genera una tonelada de licor de glicerina (Poblete-Castro et al. 2014). Dependiendo del proceso aplicado, el licor de glicerina difiere en su porcentaje de glicerol, sales (NaCl o K₂SO₄), metanol y ácidos grasos, así como el pH. En algunos estudios previos se usó licor de glicerina con 20% de metanol y glicerol comercial, como sustratos para la producción de PHB y mcl-PHA (Pappalardo et al. 2014).

Lignocelulosa: Residuo de la industria forestal

Varias fuentes de carbono han sido utilizadas para la producción de PHAs, como la sacarosa o el almidón, tanto en laboratorio como a escala industrial. Pero como estos azúcares son generalmente usados para la alimentación humana, los investigadores han

buscado fuentes carbonadas alternativas, que formen parte de subproductos industriales y no compitan con los alimentos (Davis et al. 2013).

La xilosa es el segundo azúcar más abundante en la naturaleza, estando presente en grandes cantidades en la materia lignocelulósica (Huang et al. 2016). D-Xilosa es la unidad dominante en la hemicelulosa de las plantas de todas las especies de *Gramineae*. Anualmente, más de 60 mil millones de toneladas de hemicelulosa son producidas y permanecen prácticamente en completo desuso (Le Meur et al. 2012). Dicho residuo rico en xilosa puede usarse como sustrato alternativo para la síntesis de PHAs, permitiendo disminuir los costos de producción de estos bioplásticos. Algunos autores han descrito varias cepas bacterianas que crecen y acumulan PHAs utilizando xilosa como fuente de carbono, entre ellas una cepa de *Pseudomonas cepacia* (Huang et al. 2016) y *Pseudomonas putida* (Davis et al. 2013).

PHAs producidos por bacterias del género *Pseudomonas*

Los mcl-PHAs fueron descubiertos por primera vez en 1983 cuando se estudió la composición de los polímeros acumulados por una cepa de *P.oleovorans* cultivada en octano. Desde entonces, muchas especies de *Pseudomonas* han sido utilizadas para su producción. El Género *Pseudomonas* tiene una versatilidad metabólica que le permite colonizar diferentes ambientes y utilizar una variedad de sustratos carbonados (Poblete-Castro et al. 2014). Esta capacidad les permite a estos organismos generar PHA compuestos con diversos tipos de monómeros.

Las especies de este género pueden producir mcl-PHAs a partir de ácidos grasos (Rai et al. 2011). Generalmente, el contenido de mcl-PHAs obtenido es bajo, entre 1-30% CDM (*cell dry mass*). Por ejemplo, Davis y colaboradores(2013) determinaron la acumulación de un 22% CDM de mcl-PHA en la cepa W619 de *P. putida* al crecer en xilosa como fuente de carbono. Sin embargo, *P. putidamt-2* crecida en medio mínimo con octanoico como fuente de carbono fue capaz de acumular un 77% CDM de mcl-PHAs (Tan, Chen, Li, et al. 2014).

Además, se han descrito algunas *Pseudomonas* capaces de sintetizar co-poliésteres de scl-mcl-PHA al utilizar n-alcanoatos y 1,3-butanediol como fuentes de carbono. Estas bacterias pertenecen a las especies *P. marginalis*, *P. mendocina*, *P. putida* y *P. oleovorans*.

Por otro lado, las bacterias del género *Pseudomonas* son también conocidas por sus propiedades de bioremediación, incluyendo biodegradación recalcitrante y/o sustratos de carbono aromáticos tóxicos, y han sido exitosamente aplicadas en el tratamiento de efluentes contaminados, gases de escape y suelos (Tan, Chen, Li, et al. 2014).

Diferentes materiales residuales fueron probados como materia prima para producir PHA a partir de cepas de *Pseudomonas* de manera de reducir el costo de producción. Algunas cepas de *Pseudomonas* acumularon mcl-PHAs al crecer en tereftalato sódico, producido a partir de la pirolisis de PET, glicerol crudo, aceite de pirolisis de poliestireno y desechos lipídicos animales (Borrero-de Acuña et al. 2014).

Antártida

La Antártida es el continente que presenta las condiciones climáticas más severas del planeta, limitando la diversidad de seres vivos que se pueden encontrar, en comparación con otros ecosistemas de latitudes más bajas. La primavera y el verano austral permiten reducir la dureza de las condiciones de los ambientes antárticos.

Las islas Shetland del Sur se encuentran ubicadas al norte de la Península Antártica y poseen la mayor riqueza biológica y paisajística de su entorno (Serrano Cañadas 2001). La Isla Rey Jorge (61° 54' - 62° 16'S y 57° 35' - 59° 02'W) es la mayor de las Islas Shetland del Sur. Este archipiélago se encuentra ubicado al norte de la Península Antártica, dentro de la región biogeográfica denominada como Antártida marítima. El 90% de su superficie se encuentra cubierto por una gran capa de hielo permanente que puede llegar hasta 700 m de altitud (Vogt & Braun 2004). El 10% de la superficie restante no posee cobertura permanente de hielo, formando estrechos pasajes costeros que separan los glaciares del mar (Vogt & Braun 2004). Durante la estación estival, dado el deshielo del glaciar y la nieve fundida, el paisaje rocoso se cubre de pequeños arroyos y cañadas. Los tapetes microbianos que se desarrollan a medida que avanza el verano, están constituidos por diferentes comunidades de microorganismos que se disponen según un patrón de estratificación vertical. Este tipo de tapetes microbianos se encuentran distribuidos en lagos salinos e hipersalinos, fuentes termales, desiertos y zonas polares, considerados ambientes extremos (Camacho & Fernández-Valiente 2005) (Ilustración 7).

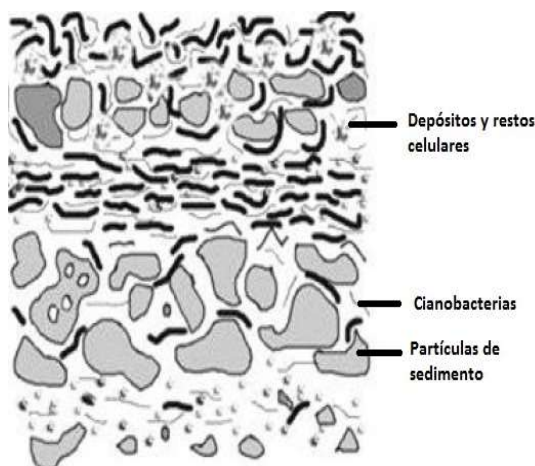


Ilustración 7 - Diagrama bidimensional de la estructura típica de un tapete microbiano (Camacho & Fernández-Valiente 2005)

Los microorganismos que habitan ambientes fríos están bien adaptados a condiciones de estrés fluctuantes. Por ejemplo las bacterias que viven en ambientes polares deben tolerar condiciones extremas como bajas temperaturas, baja disponibilidad de nutrientes y una radiación UV alta. Se cree fuertemente que la síntesis de PHA es uno de los mecanismos de supervivencia de bacterias que habitan ambientes inestables y de mucho estrés. Es más, las rutas metabólicas y catabólicas de PHA posiblemente puedan incrementar el *fitness* bacteriano en ambientes fluctuantes (Sathiyarayanan et al. 2017). En estudios previos, se logró aislar una cepa bacteriana antártica identificada como *Pseudomonas extremaustralis*, altamente resistente al estrés, capaz de sintetizar PHAs (Tribelli & López 2011).

Antecedentes

Desde hace años en el IIBCE se trabaja en el estudio de síntesis de PHAs en la bacteria *Herbaspirillum seropedicae*. El trabajo realizado en estos años ha implicado la determinación de la composición de los polímeros sintetizados a partir de diferentes fuentes de carbono. Mediante determinación de actividades enzimáticas se identificó la ruta clásica de síntesis de PHB (Anderson & Dawes 1990). Desde un punto de vista biotecnológico se realizaron trabajos para optimizar la producción de PHB mediante cambios en las condiciones y composición del medio de cultivo así como el estudio de sustratos de bajo costo, para la producción de este polímero (lactosa y xilosa), presentes en residuos agroindustriales como son la industria láctea y forestal (Catalán et al. 2016). Recientemente, en un trabajo de tesis de grado se seleccionaron e identificaron microorganismos capaces de sintetizar PHAs a partir de una colección de aislamientos provenientes de la Antártida marítima (Península Fildes, Isla Rey Jorge). Se caracterizó la composición monomérica de estos polímeros acumulados. Se identificaron nuevos aislamientos que producen mcl-PHA, utilizando como fuente de carbono glucosa y glicerol. Estos aislamientos identificados como pertenecientes al género *Pseudomonas*, constituyen nuestro punto de partida para continuar estudiando la síntesis de PHAs por estos microorganismos productores.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad de aislamientos bacterianos antárticos de crecer y producir PHAs en presencia de glicerol o xilosa como únicas fuentes de carbono.

Objetivos específicos 1

Evaluar el potencial de la bacteria antártica *Pseudomonas* spp. RM5 de crecer y sintetizar mcl-PHAs al ser cultivada en presencia de glicerol o xilosa como fuentes de carbono.

Estrategia experimental

- a) Corroborar la producción de PHAs mediante tinción con Rojo Nilo de la cepa RM5 cultivada en medio con glicerol o xilosa como únicas fuentes de carbono.
- b) Al cultivar el aislamiento RM5 en medio mínimo mineral, determinar las concentraciones de glicerol y xilosa que optimicen el crecimiento.
- c) Determinar los parámetros de crecimiento de *Pseudomonas* spp RM5 cultivada en lote, utilizando glicerol y xilosa como fuentes carbonadas.
- d) Cuantificar el material polimérico acumulado por RM5 crecida en presencia de glicerol y xilosa, mediante diferentes metodologías: cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS), detección de fluorescencia con tinción de Rojo Nilo y gravimetría, previa extracción de los PHAs utilizando el método de Soxhlet.

Objetivos específicos 2

Seleccionar e identificar nuevos microorganismos a partir de muestras provenientes de la Península Fildes (Isla Rey Jorge, Antártida), capaces de sintetizar PHAs a partir de xilosa como única fuente de carbono.

Estrategia experimental:

- a) A partir de muestras antárticas, recuperar aislamientos bacterianos capaces de crecer en medio mineral mínimo con xilosa como fuente de carbono.
- b) Identificar mediante la técnica de tinción con Rojo Nilo, bacterias candidatas a producir PHAs, al utilizar xilosa como fuente de carbono.
- c) Determinar los perfiles de crecimiento de estos aislamientos al ser cultivados en presencia de xilosa como fuente de carbono.
- d) Identificar los aislamientos positivos para la tinción con Rojo Nilo mediante el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr.
- e) Analizar mediante PCR, en los nuevos aislamientos y la cepa RM5, la presencia de los genes *phaC*, utilizando sondas específicas para cada una de las clases de PHA sintasas.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos y Medios de cultivo

Medios de Cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron: el medio nutriente TY, el medio R2A y el medio mineral definido MM (Ver composición en ANEXO I). En los casos que fueron utilizados en estado sólido, se agregó agar a una concentración final de 18 g/l.

Los medios R2A y MM, fueron suplementados con una de las siguientes fuentes de carbono: glicerol, xilosa o licor de glicerina (Ver ANEXO I), a la concentración final indicada en cada caso. Las soluciones stock fueron esterilizadas por autoclave previamente a su adición a los medios de cultivo.

Microorganismos

La cepa RM5 de *Pseudomonas* spp. fue aislada e identificada a partir de una muestra de tapetes microbianos colectados durante la campaña del Instituto Antártico Uruguayo (IAU) en el año 2008.

Las muestras antárticas utilizadas en este trabajo fueron colectadas durante la campaña del Instituto Antártico Uruguayo (IAU) en el año 2015. Se usaron dos tipos de muestras: pasto antártico con sedimento colectado en Punta Nebles (coordenadas S62°11'3'', W58°51'30'') y "claveles" y musgos colectados en Isla Ardley (coordenadas 62°12'36.8'', W 58° 56'27.5''). Se ensayaron dos estrategias para obtener aislamientos capaces de crecer en xilosa como única fuente de carbono:

- 1) Una muestra de 80mg de pasto antártico con sedimento colectado en de Punta Nebles y por otro lado una muestra de 160mg de "claveles" y musgos de Isla Ardley, fueron

suspendidas en 1ml de PBS estéril. Estas suspensiones fueron diluidas de forma serial y luego se sembraron en placas con medio MM con 10g/l de xilosa como única fuente de carbono. Las mismas se incubaron a dos temperaturas: 5° y, 25°C hasta la visualización de crecimiento. Cada colonia se repicó a placas con medio rico TY. Este paso se repitió hasta obtener colonias de apariencia homogénea, lo que sugiere la presencia de cultivos puros.

- 2) 1,21g de muestra de pasto antártico con sedimento (Punta Nebles) y 1,09g de muestra de “claveles” y musgos de la Isla Ardley fueron directamente suspendidas en 20ml de MM con 10g/l de xilosa, e incubaron a 30°C con agitación a 190rpm (Innova 43 incubator shaker series, Eppendorf). Por otro lado, 0,56g de muestra de Punta Nebles y 1,27g de Isla Ardley fueron agregadas directamente a 20ml de medio MM con 10g/l de xilosa e incubadas a 12°C con agitación a 190rpm (Innova 42 incubator shaker series, Eppendorf). Una vez crecidos los cultivos líquidos se sembraron en medio rico TY sólido y se incubaron a las respectivas temperaturas. Se procedió al aislamiento de colonias aisladas hasta obtener cultivos puros.

Los aislamientos fueron conservados a -80°C en una suspensión con glicerol al 50%. Se utilizó la cepa Z69 *Herbaspirillum seropedicae* como control positivo de síntesis de PHA (Catalán et al. 2007) y como control negativo se utilizó la cepa TOP10 de *Escherichiacoli* (Invitrogen, EE.UU).

Detección de producción de PHAs

Se analizó la capacidad de RM5 y de los aislamientos obtenidos en este trabajo de acumular PHA.

Para ello *Pseudomonas* spp. RM5 fue sembrada en medio sólido MM con 20g/l de xilosa o glicerol como únicas fuentes de carbono y en medio sólido R2A con 10 g/l de dichas fuentes de carbono. Las placas se incubaron a 30°C durante 2, 4 y 7 días.

Los distintos aislamientos antárticos se sembraron en medio R2A y MM con 10g/l de xilosa. Las placas con medio R2A se incubaron durante 2, 4 y 7 días, mientras que las placas de medio MM se incubaron por 3 días. En ambos casos la temperatura de incubación fueron 12°C, 25°C y 30°C. Para todos los casos se partió de colonias aisladas crecidas en sus respectivas temperaturas en medio rico TY.

Luego de los tiempos de incubación indicados en cada caso, las placas fueron teñidas con una solución de Rojo Nilo 0,1% (m/v en acetona), según lo descrito por Kranz et al. (1997). La fluorescencia se observó bajo luz UV (300nm) en un transiluminador (UVIS-20, Hofer).

H. seropedicae Z69 fue sembrada en medio sólido MM y R2A, mientras que *E. coli* TOP10 fue sembrada únicamente en R2A.

Determinación de los Perfiles de Crecimiento

Se determinaron los perfiles de crecimiento de los distintos aislamientos cultivados en medio MM con xilosa, glicerol y licor de glicerina, a diferentes concentraciones (Tabla 2).

Tabla 2 – Concentraciones de fuente de carbono utilizadas en los perfiles de crecimiento

Fuente de carbono	Concentraciones				
Glicerol	10g/l	15g/l	20g/l	30g/l	
Xilosa	10g/l	15g/l	20g/l	30g/l	
Licor de Glicerina	5%	10%	20%	30%	50%

Los perfiles de crecimiento se determinaron en placas de microtitulación con 96 pocillos con 200µl de medio MM suplementado con la correspondiente fuente de carbono a las concentraciones indicadas en la Tabla 2. El crecimiento celular se monitoreó cada 2 horas en un equipo Varioskan™ Flash Multimode, versión 4.00.51 (ThermoScientific, USA). Todos los ensayos se realizaron a 30°C, se hicieron por cuadruplicado y se incluyeron los controles correspondientes. Se utilizó una D.O. de 620nm para todos los ensayos.

El inóculo se preparó a partir de una colonia aislada en placa de medio TY, cultivada en 20ml de medio TY a 30°C y 190 rpm. Luego de 24 horas las células se colectaron por centrifugación (10 min a 6000g). El pellet celular se resuspendió en 1ml de MM y 20µl de dicha suspensión fue utilizada para inocular cada pocillo. Para todos los perfiles se calculó la velocidad máxima de crecimiento como la pendiente calculada a partir del cálculo de regresión, determinada en la región lineal de la gráfica de Ln de la densidad óptica en función del tiempo (ver ANEXO I).

Cultivos en lote

Condiciones de Cultivo

Se cultivó el aislamiento RM5 en matraces Erlenmeyer de 1l conteniendo 150ml de MM con xilosa (15g/l) o glicerol (20g/l) de la cepa RM5.

El inóculo fue preparado a partir de una colonia de RM5 crecida en medio TY sólido cultivada en 30ml de caldo TY a 30°C y con agitación en un agitador orbital (INNOVA, USA) a 190 rpm. Luego de 24 horas de incubación las células fueron colectadas por centrifugación (3-30K, Sigma) (10 min a 6000g) y el pellet celular así obtenido se resuspendió en 2ml de agua estéril.

1ml de las células resuspendidas fueron utilizadas para inocular los matraces con 150 ml de medio MM. Los mismos se incubaron a 30°C y con agitación 190rpm. El crecimiento se monitoreo por medidas de D.O. (620nm) y determinación de biomasa a lo largo del tiempo.

A diferentes tiempos (indicados más adelante) se tomaron 15ml de cultivo para analizar y cuantificar el polímero acumulado.

El ensayo se realizó por duplicado biológico. Se realizaron controles de contaminación en placa TY al principio y final del ensayo.

La biomasa definida como peso seco celular (CDM), se determinó a partir de un volumen conocido de cultivo (Tabla 3). Las células se colectaron por centrifugación (5 min a 12000rpm) en centrifuga Spectrafuge 24D (Labnet). El *pellet* celular se lavó, dos veces con agua desionizada y se colocó en estufa a 60°C por 72 horas o hasta peso constante. La biomasa se expresa en g/l.

Tabla 3 – Volúmenes tomados de cultivo para determinar la biomasa por peso seco. En la tabla aparecen los tiempos (horas) en las que fueron extraídas las respectivas muestras para los cultivos utilizando glicerol o xilosa como fuente de carbono.

Glicerol		Xilosa	
T(hs)	Vol. Biomasa (ml)	T(hs)	Vol. Biomasa (ml)
0	4,5	0	4,5
15	1,5	15	1,5
19	1,0	20	1,5
21,5	1,0	24	1,5
24	1,0	40	1,5
39,5	1,0	48,5	1,0
43	1,0	64	1,0
47,5	1,0	-	-
63,5	1,0	-	-

Determinación de PHA

Análisis y cuantificación por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS)

A partir de los 15ml de cultivo en lote se colectaron las células por centrifugación a 6000g por 10 min. El *pellet* se guardó a -20°C y fue posteriormente liofilizado (BW-18B Freeze Dryer, Bluewave Industries Co. China). 15mg de células liofilizadas, fueron sometidas a metanólisis bajo condiciones de catálisis ácida con el fin de obtener los metil-ésteres derivados de los hidroxiácidos según lo descrito previamente (Brandl et al. 1988). Como estándar interno se utilizó ácido benzoico (B-9300 Sigma), en una concentración de 20,6mg/ml.

1 μl de los metil-ésteres así obtenidos se inyectó con un Split 50:1 en un GC-MS-QP2010 Ultra Shimadzu equipado con una columna HP-5MS ([5% fenil]-metilpolisiloxano). Las corridas se realizaron en modo TIC (Total Ion Chromatogram). La identificación de los monómeros fue realizada por comparación con bibliotecas de espectros de masas comerciales (NIST, Wiley) y su confirmación fue realizada mediante el cálculo de los índices de Kovats (Kováts 1958).

La cuantificación se realizó en modo SIM (Selective Ion Monitoring), monitoreando los siguientes iones m/z : 43, 71, 74, 103 según lo descrito por Tan, Chen, Ge, et al. (2014). El área de cada monómero se calculó mediante la suma de las áreas de los cuatro iones característicos mencionados (Tan, Chen, Ge, et al. 2014).

Programa de separación y análisis

La temperatura del puerto de inyección, la interfase y la fuente de iones fueron 280°C , 300°C y 300°C , respectivamente. El programa de separación se inició con el horno a 80°C durante 2 min, seguido de una rampa de $8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 220°C y mantenido por 2 min. Finalmente, se continuó con una segunda rampa de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los 310°C . La ionización se efectuó por impacto electrónico (EI) a 70eV.

Para calcular la proporción de cada monómero en las muestras se utilizó la siguiente fórmula:

Ecuación 1

$$\% \text{ monómero} = \left(\frac{\text{área monómero}}{\text{área ác. Benzoico}} \right) \div \left(\frac{\sum \text{áreas monómeros}}{\text{área ác. Benzoico}} \right) \times 100$$

Para cuantificar los PHA acumulados se utilizaron las fórmulas descritas por Tan, Chen, Ge, y colaboradores (2014):

Ecuación 2

RF: Factor de respuesta

$$RF = 0.235 \times (\text{N}^\circ \text{ carbonos monómero}) - 0.646$$

Ecuación 3

$$C_A = \frac{A_A \times C_i}{A_i \times RF}$$

Donde RF es el factor de respuesta, C_A son los mg del monómero obtenido, A_A es la suma de las áreas de los picos de los cuatro iones característicos del monómero, C_i la cantidad en mg del estándar interno utilizado, A_i es el área del pico característico del estándar interno.

Para determinar el % de PHA sobre la cantidad de biomasa de la muestra se utiliza la siguiente fórmula:

Ecuación 4

$$\% \text{ PHA} = \frac{\sum C_A (\text{mg})}{\text{biomasa (mg)}} \times 100$$

Cuantificación de PHA por método de fluorescencia de Rojo Nilo

El método se basa en el uso de la tinción con Rojo Nilo para cuantificar el contenido de PHAs en función de la intensidad de fluorescencia, debido a que el Rojo Nilo actúa como una sonda hidrofóbica fluorescente.

Se prepararon las muestras a partir de células liofilizadas según lo descrito previamente (Zuriani et al. 2013).

Se realizaron suspensiones celulares a distintas concentraciones en agua destilada (Tabla 4). Las concentraciones se calcularon teniendo en cuenta cuanto estimamos como mínimo y máximo de cantidad de PHAs que podría tener RM5, tratando de asegurar la mayor cantidad de puntos dentro de la curva de calibración. 1ml de las mismas fueron centrifugadas a 12000g por 5 min. Cada pellet se resuspendió en 1ml de agua destilada y se agregó 40µl de Rojo Nilo (80µg/ml en DMSO). La mezcla se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 30 min. Pasado dicho tiempo, se centrifugó por 5 min a 12000g y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1ml de agua destilada y se agitó vigorosamente con vortex. Se colocó 200µl de la suspensión en la placa de microtitulación de 96 pocillos. En un equipo Varioskan se determinó la fluorescencia a 605nm, previa excitación a 535nm.

Se realizó una curva de calibración a partir de 12mg de células liofilizadas *H.seropedicae* Z69, con un contenido de 40% de PHB, suspendidos en 4ml de agua destilada (3mg/ml). El experimento se realizó por duplicado biológico y triplicado de ensayo.

Tabla 4 - Concentraciones de la suspensiones celulares utilizadas en la cuantificación de PHA mediante fluorescencia de Rojo Nilo

Tiempo	F. carbono	Concentración (mg/ml)
T6	GLICEROL	1,7
T8	GLICEROL	1,3
T4	XILOSA	8,5
T6	XILOSA	3,8
T8	XILOSA	3,8

Extracción de PHA y cuantificación por peso seco

La extracción por método de Soxhlet se basó en lo descrito por Jiang y colaboradores (2006), con algunas modificaciones. La extracción de PHAs utilizando solventes es la más utilizada para obtener polímeros de alta pureza. Este método se basa en la circulación del solvente por el dispositivo, extrayendo el polímero y concentrándolo.

Para la extracción por el método de Soxhlet se utilizó 0,3162g y 0,1879g de biomasa liofilizada correspondiente al tiempo final de los cultivos con glicerol y xilosa respectivamente. La extracción se realizó en un Soxhlet con 10ml de acetona durante 5hs a una temperatura de 56°C. Luego la muestra se concentró en un rotavaporador y se colocó en una placa de vidrio previamente pesada hasta evaporar completamente el remanente de acetona. Posteriormente se pesó la placa de vidrio con el polímero extraído.

Procedimientos de biología molecular

Preparación de lisado de células

Se transfirió con ansa una pequeña cantidad de células de *Pseudomonas* spp. RM5 crecidas en medio sólido TY a un microtubo de 1,5ml con 500µl de agua miliQ estéril. La suspensión se incubó a 100°C durante 15 min. Posteriormente se incubó a -20°C durante 20 min y finalmente, se centrifugó a 12000 rpm por 5 min en una microcentrifuga Spectrafuge 24D (Labnet, Corning). El sobrenadante así obtenido se utilizó como molde para la amplificación del fragmento del gen 16S ARNr.

Extracción de ADN Genómico

Para la extracción de ADN Genómico de *Pseudomonas* spp. RM5 se utilizó el kit comercial Fungal/Bacterial DNA miniprep (ZymoResearch), de acuerdo con el protocolo recomendado por los fabricantes.

El ADN de los aislamientos 1, 4, 5, 9, E fue extraído utilizando el kit comercial GeneJetGenomic DNA Kit (ThermoScientific), de acuerdo con el protocolo recomendado por los fabricantes.

Amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr por PCR

Se realizó la amplificación por PCR de una región del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S ARNr, utilizando los cebadores universales 27F y 1492R (Lane 1991) (PCR GenePro, Bioer). La secuencia de dichos cebadores se lista en la Tabla 5

Tabla 5 -Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR

Cebadores	Secuencia
27F	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'
1492R	5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

La mezcla de la reacción con un volumen final de 50µl se detalla en la **Error! Reference source not found.** Se incluyó un control negativo sin templado.

Todas las reacciones de PCR se realizaron con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 3 min a 95°C, luego 35 ciclos de 45s a 94°C, 45s a 58°C y 1min a 72°C, y un paso de extensión final de 7 min a 72°C.

Tabla 6 – Mezcla de reacción de PCR en un volumen final de 50ul

Reactivos	Volumen a agregar (µl)
10X Buffer	5
5X Q Solution	10
dNTPsMix	1
Primer 27F (10µM)	2
Primer 1492R (10µM)	2
TopTaq (Qiagen)**	0,25
Agua	27,75
ADN Molde*	2

** Ver ANEXO I

* Lisado celular o ADN genómico (dilución 1/10)

Amplificación de los fragmentos de genes *phaC* de los aislamientos productores de PHA

Se amplificaron regiones específicas de los genes de *phbC* y *phaC1/phaC2* que codifican para las PHA sintasas de clase I y II, respectivamente. Para amplificar la región del gen *phbC* se empleó un par de oligonucleótidos degenerados diseñados previamente por Kadouri y colaboradores(2003). Para amplificar parte de los genes que *phaC1/phaC2*, se empleó uno de los pares de nucleótidos descritos y diseñados por Solaiman y colaboradores(2000). En la Tabla 7 se detallan las secuencias de los cebadores utilizados.

Tabla 7 - Cebadores utilizados para la amplificación de las regiones de los genes *phaC* de clase I y II

Nombre	Secuencia 5' → 3'	nucleótidos	Referencia
<i>phbC</i>For	ATCAACAAGTTCTAYATC	18	Kadouri et al. (2003)
<i>phbC</i>Rev	GTTCCAGTASAGSAGGTCGAA	21	Kadouri et al. (2003)
I-179L	ACAGATCAACAAGTTCTACATCTTCGA C	28	Solaiman et al. (2000)
I-179R	GGTGTGTCGTTGTTCCAGTA GAGGATGTC	30	Solaiman et al. (2000)

Las mezclas de las reacciones con un volumen final de 25ul, se detallan en la Tabla 8. Se realizó un control negativo sin templado para ambos casos, y un control positivo a partir de ADN extraído de *H. seropedicae* Z69 para el gen *phbC*.

Tabla 8 - Mezcla de reacciones de PCR de *phbC* y *phaC1/phaC2* en un volumen final de 25ul

Reactivos	Volumen a agregar (μl)	
	<i>phbC</i>	<i>phaC1/phaC2</i>
10X Buffer	2,5	2,5
5X Q Solution	5,0	5,0
dNTPsMix (10mM c/u)	0,5	0,5
Primer (10μM)	5	0,5
Primer (10μM)	5	0,5
TopTaq (Qiagen)	0,125	0,125
Agua	5,875	14,875
ADN Molde*	1	1

*Para *phbC* se utilizó ADN genómico diluido en 1/10.

Las reacciones de PCR se realizaron según los programas descritos en la Tabla 9.

Tabla 9 – Programas utilizados en el termociclador para PCR de *phbC* y *phaC1/phaC2*

Programa PCR	<i>phbC</i>	<i>phaC1/phaC2</i>
Desnaturalización	5 min a 94°C	3 min a 94°C
30 Ciclos	30s a 94°C	30s a 94°C
	30s a 55.2°C	30s a 60°C
	1 min a 72°C	1 min a 72°C
Ciclo de extensión final	10 min a 72°C	10 min a 72°C

Electroforesis en gel de agarosa

El tamaño, concentración e integridad del ADN genómico purificado y todos los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (Ver ANEXO I). Las corridas electroforéticas se realizaron a 90V durante 60min y se utilizó el colorante Good View II (2ul en 50ml de gel) (SBS) para la visualización del ADN. Se utilizó 1 µl de Buffer de carga 10X Loading DYE (ThermoScientific). Se sembraron 5µl tanto de ADN genómico como de producto de PCR. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 1kb DNA Ladder (ThermoScientific) Ilustración 8.

GeneRuler 1 kb DNA Ladder

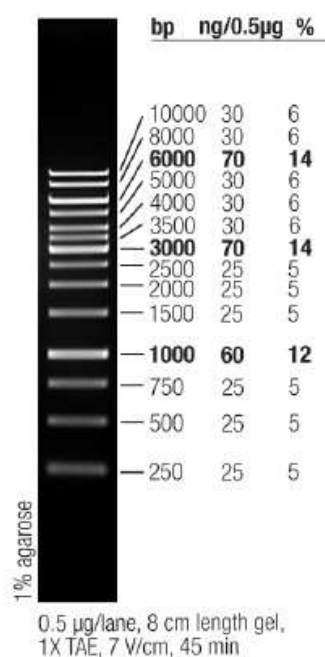


Ilustración 8 – Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder (ThermoScientific)

Análisis de las secuencias del gen de 16S ARNr

Los productos de PCR amplificados con el tamaño esperado, de acuerdo a lo visualizado en el perfil electroforético (1500pb), fueron enviados a secuenciar a MACROGEN (Corea

del Sur), utilizando los cebadores 27F y 1492R para su secuenciación. El programa informático utilizado para el análisis de las secuencias fue MEGA7. Se eliminaron las regiones de baja calidad y editaron manualmente las secuencias, luego se alinearon y ensamblaron las secuencias directa y complementaria. Las secuencias del gen de 16S ARNr se compararon contra la base de datos 16 S ARNr de Genbank, usando el programa BLASTn 16S ARNr (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RESULTADOS

Estudio de crecimiento y síntesis de PHA de *Pseudomonas* spp. RM5 al crecer en presencia de glicerol y xilosa como fuentes de carbono

Detección de producción de PHA de la cepa RM5 *Pseudomonas* spp.

En trabajos previos realizados en el laboratorio se identificó el aislamiento *Pseudomonas* spp. RM5 como productora de PHA al consumir glucosa como fuente de carbono. RM5 es capaz de crecer en presencia de xilosa y glicerol como fuente de carbono, presentando fluorescencia cuando se tiñe con Rojo Nilo.

En este trabajo se buscó corroborar dichos resultados y comparar el desarrollo de fluorescencia a lo largo del tiempo. RM5 fue sembrada en placas de MM y R2A, con glicerol o xilosa como fuente de carbono e incubada durante 2, 4 y 7 días. Se utilizó R2A ya que el control negativo de *E. coli* no crece en MM y como control positivo se incluyó a *H. seropedicae* Z69. Tanto RM5 como Z69 crecen en ambos medios de cultivo.

Los resultados de desarrollo de fluorescencia obtenidos en las placas crecidas con glicerol como fuente de carbono se muestra en la Ilustración 9. En las placas incubadas por 2 días se observa fluorescencia solamente en el medio R2A, tanto para RM5 como para el control positivo. En las placas incubadas por 4 días, la cepa RM5 presenta una intensidad de fluorescencia similar a Z69, tanto en MM como en R2A. A los 7 días de incubación, RM5 muestra una menor intensidad en comparación a Z69.

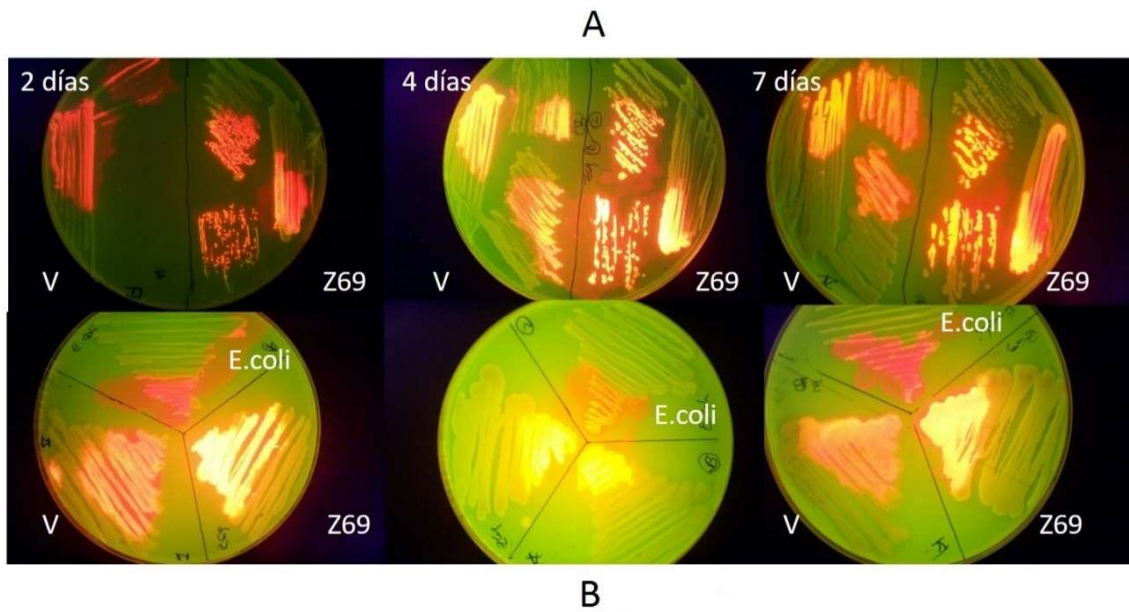


Ilustración 9—Tinción con Rojo Nilo, desarrollo de fluorescencia en cultivos crecidos en presencia de glicerol a los 2, 4 y 7 días. A) Placas con MM, B) Placas con medio R2A. *Pseudomonas* spp. RM5 (V), *H. seropedicae* Z69 (Z69) como control positivo y *E.coli* como control negativo en R2A.

Al utilizar xilosa como fuente de carbono, las intensidades de fluorescencia disminuyeron considerablemente en MM, tanto para RM5 como para Z69 (ver Ilustración 10). En MM la mayor intensidad de RM5 se observa a los 4 días de incubación, siendo considerablemente menor al control positivo. A los 2 días de incubación se observa fluorescencia en RM5 pero mucho menor que el control positivo. En R2A la intensidad de fluorescencia de RM5 es similar a la observada en *E. coli* (control negativo) que a la cepa Z69, para todos los tiempos de incubación.

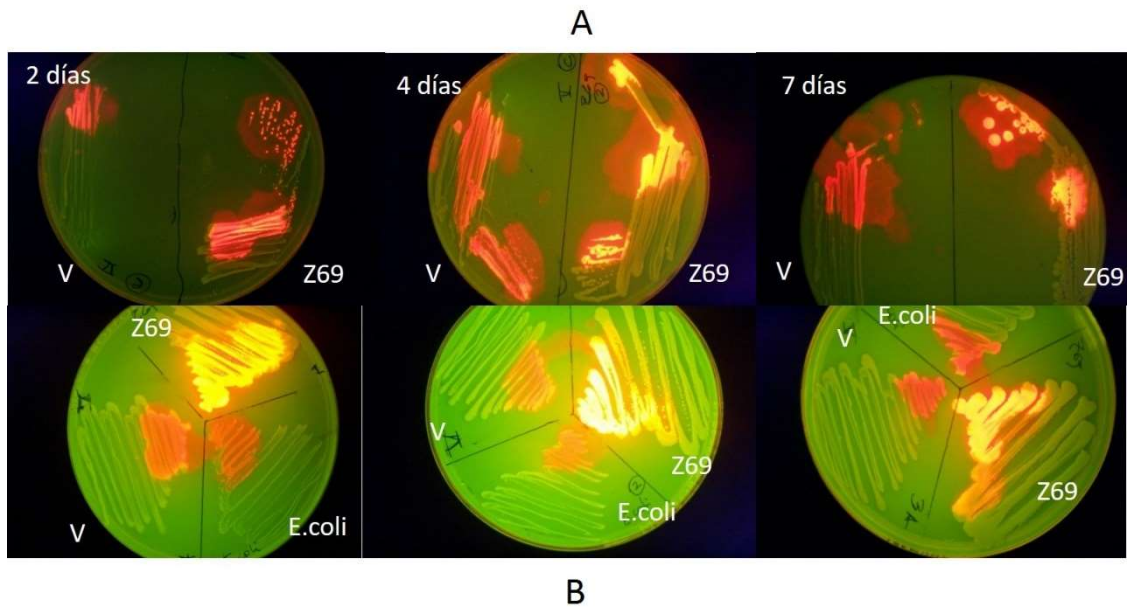


Ilustración 10 - Tinción con Rojo Nilo, desarrollo de fluorescencia en cultivos crecidos en presencia de xilosa a los 2, 4 y 7 días. A) Placas con MM, B) Placas con medio R2A. *Pseudomonas* spp. RM5 (V), *H. seropedicae* Z69 (Z69) como control positivo y *E.coli* TOP10 como control negativo en R2A.

Perfiles de crecimiento de la cepa RM5

Se estudió el crecimiento de RM5 en presencia de diferentes concentraciones de glicerol, xilosa y licor de glicerina (Tabla 2) como se indica en materiales y métodos.

En el Grafico 1, se muestran los perfiles de crecimiento de RM5 en presencia de glicerol. En general los perfiles son similares para todas las concentraciones ensayadas, alcanzando una densidad óptica (DO) mayor en concentraciones de glicerol más altas. La mayor DO obtenida fue de 0,76 en el cultivo con 20g/l de glicerol. No se observa diferencia en el crecimiento en presencia de 20 y 30g/l de glicerol. Estos perfiles de crecimiento no poseen una fase de latencia marcada, se observa la fase exponencial prácticamente durante las 64 horas de incubación, alcanzando la fase estacionaria recién hacia el final del tiempo de incubación. Sin embargo, en los crecimientos en presencia de 10g/l de glicerol, el cultivo alcanzó la fase estacionaria a las 24 horas (Grafico 1). Posiblemente, a las 24 horas se agotó la fuente de carbono, comparado con los perfiles a 15, 20 y 30 g/l de glicerol.

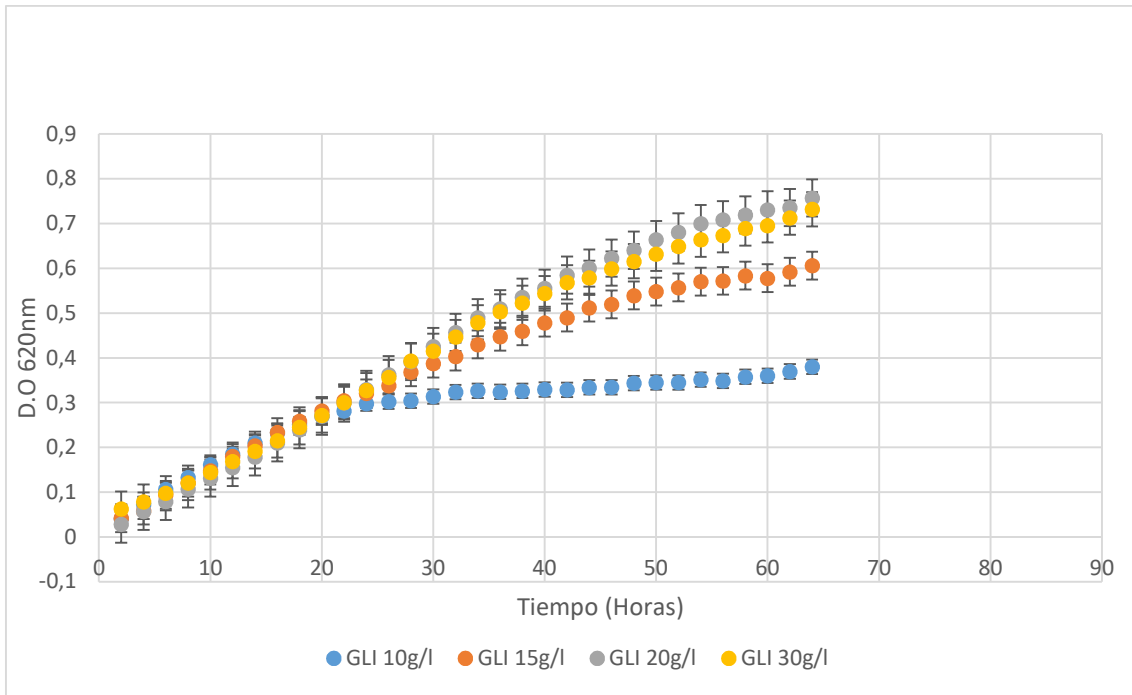


Grafico 1 - Curva de crecimiento de RM5 en MM con distintas concentraciones de glicerol como fuente de carbono, incubados por 64hs a 30°C en placas de cultivo de 96 pocillos.

Se determinó la velocidad de crecimiento para cada concentración. El mayor valor obtenido fue de 0,078, correspondiente al cultivo con 10g/l de glicerol. En la Tabla 10 se listan las velocidades de crecimiento máxima y la D.O. máxima obtenida para cada concentración de glicerol ensayada.

Tabla 10 - Velocidad de crecimiento y D.O máxima obtenidas en los perfiles de crecimiento. Se indica la fuente de carbono utilizada y su concentración, glicerol (gli), xilosa (xil) y licor de glicerina (gln). La velocidad de crecimiento máxima fue calculada como la pendiente de la región lineal del Logaritmo neperiano de DO vs tiempo.

Perfil	Velocidad máx. de crecimiento	D.O. máx
gli 10 g/l	0,078	0,38 ± 0,06
gli 15 g/l	0,040	0,61 ± 0,36
gli 20 g/l	0,057	0,76 ± 0,03
gli30 g/l	0,049	0,73 ± 0,01
xil 10g/l	0,024	0,51 ± 0,06
xil 15g/l	0,023	0,47 ± 0,03
xil 20g/l	0,027	0,45 ± 0,03
xil 30g/l	0,036	0,43 ± 0,04
gln 5%	0,059	0,50 ± 0,04
gln 10%	0,022	0,73 ± 0,07
gln 20%	0,031	0,66 ± 0,03
gln 30%	0,065	0,42 ± 0,04
gln 50%	N/A	0,08 ± 0,04

De acuerdo con los resultados de los perfiles de crecimiento en presencia de glicerol, seleccionamos la concentración de 20g/l para continuar en el cultivo en lote, debido a que es una de las concentraciones donde se obtuvo mayor D.O. y el cultivo no estará limitado en su crecimiento por el sustrato.

Los perfiles de crecimiento de RM5 con xilosa como fuente de carbono, se muestran en el Grafico 2. Como se puede observar no hay grandes diferencias al variar la concentración de xilosa. Estos perfiles no permiten observar las diferentes fases del crecimiento celular, se observa una fase exponencial hasta el final del crecimiento. A partir de éstos resultados, se seleccionó la concentración de 15g/l para continuar con los cultivos en lote, siendo la concentración media de las ensayadas.

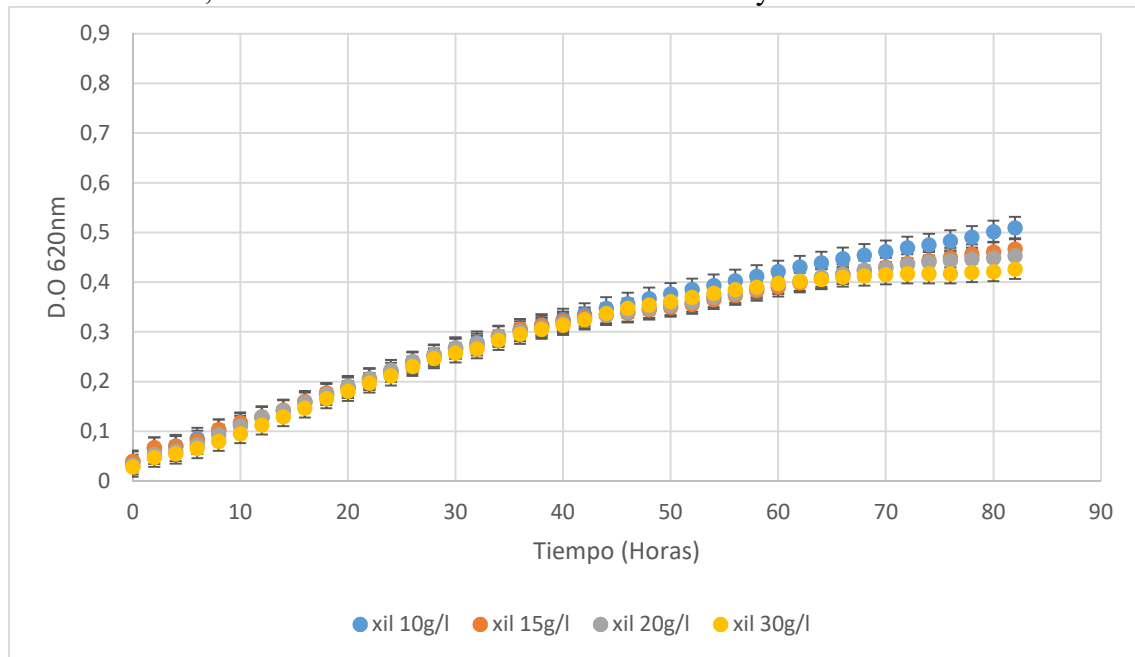


Grafico 2 - Curva de crecimiento de RM5 en MM con distintas concentraciones de xilosa como fuente de carbono, incubados por 82hs a 30°C en placas de cultivo de 96 pocillos.

Los perfiles de crecimiento en presencia de licor de glicerina como fuente de carbono se muestran en el Grafico 3. La cepa RM5 es capaz de crecer con este sustrato, excepto en la concentración al 50% donde el crecimiento está totalmente inhibido. El perfil de crecimiento obtenido con 30% de licor de glicerina posee una mayor fase de latencia, comparado con los perfiles con 5, 10 y 20% de dicho sustrato, y alcanza la fase estacionaria a las 30 horas de incubación aproximadamente. En el crecimiento con 10% de licor de glicerina se alcanzó la mayor DO de 0,73. Por otro lado, el crecimiento con 5% de licor de glicerina alcanzó una DO menor que con 10 y 20% de la fuente de carbono, alcanzando la fase estacionaria a las 35 horas de incubación aproximadamente. En la Tabla 10 se listan las velocidades de crecimientos calculadas para todos los perfiles obtenidos, siendo la velocidad máxima obtenida de 0,065 para la concentración de 30%.

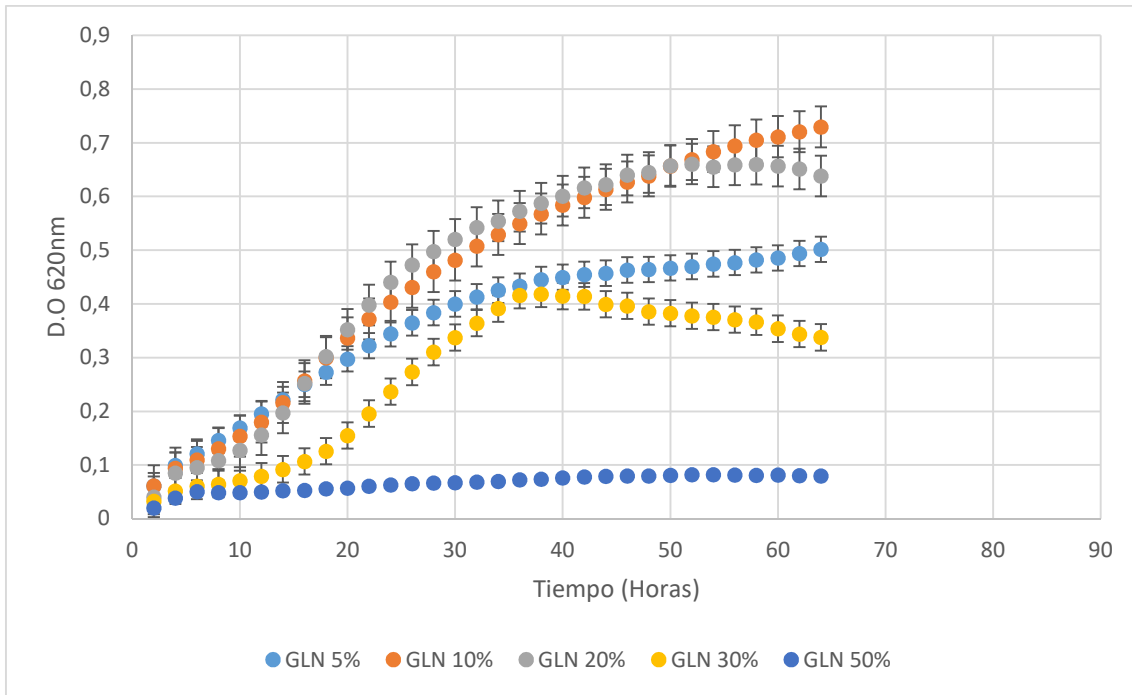


Gráfico 3 - Curva de crecimiento de RM5 en MM con distintas concentraciones de licor de glicerina como fuente de carbono, incubados por 64hs a 30°C en placas de cultivo de 96 pocillos.

Cultivos en lote

Determinación de Biomasa

Los ensayos de determinación de perfiles de crecimiento nos permitieron seleccionarlas concentraciones de glicerol y xilosa a emplear en los ensayos de producción en lote. Se realizaron cultivos en matraces Erlenmeyer para evaluar la biomasa final alcanzada, y la velocidad de crecimiento. Los perfiles de crecimiento se muestran en el Gráfico 4 y Gráfico 5. RM5 alcanzó una biomasa máxima de 3,4 g/l y 1,7g/l al crecer en presencia de glicerol y xilosa, respectivamente. Asimismo, la velocidad máxima de crecimiento de los cultivos con glicerol fue de 0,208 aproximadamente el doble que en los cultivos con xilosa. Ambos cultivos alcanzaron la fase estacionaria a las 40 horas de incubación. En la Tabla 11 se muestran los valores de biomasa final y velocidad de crecimiento obtenidos para RM5 cultivada en glicerol y xilosa.

Tabla 11 – Biomasa máxima obtenida y velocidad de crecimiento máxima de los cultivos en lote con xilosa o glicerol como únicas fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Biomasa Máxima (g/l)	Vel. de crecimiento
Xilosa	1,70 ± 0,98	0,114
Glicerol	3,40 ± 0,00	0,208

La velocidad de crecimiento máxima fue calculada como la pendiente de la región lineal de la regresión del Ln de la densidad óptica en función del tiempo.

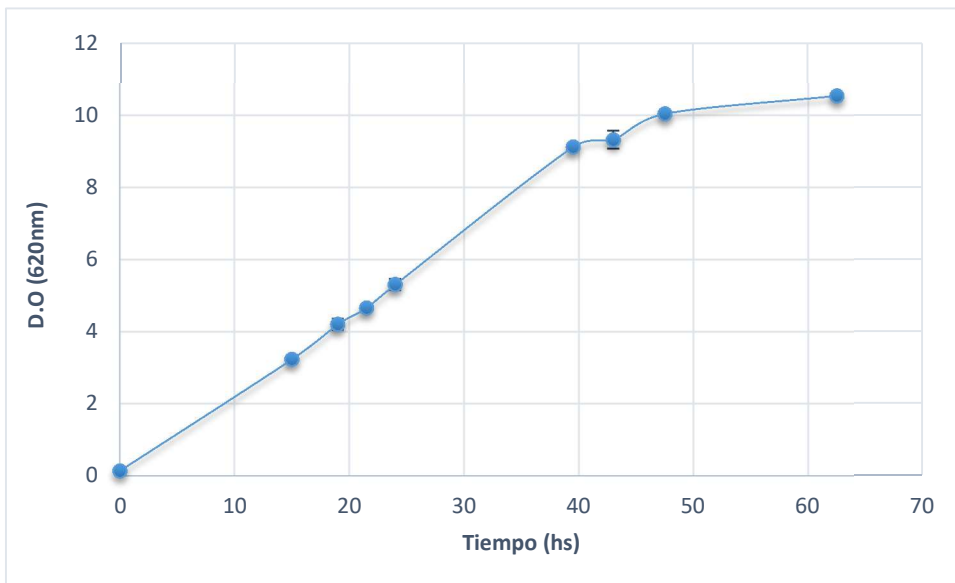


Gráfico 4 – Cultivo en lote de RM5 en MM con glicerol 20g/l como fuente de carbono

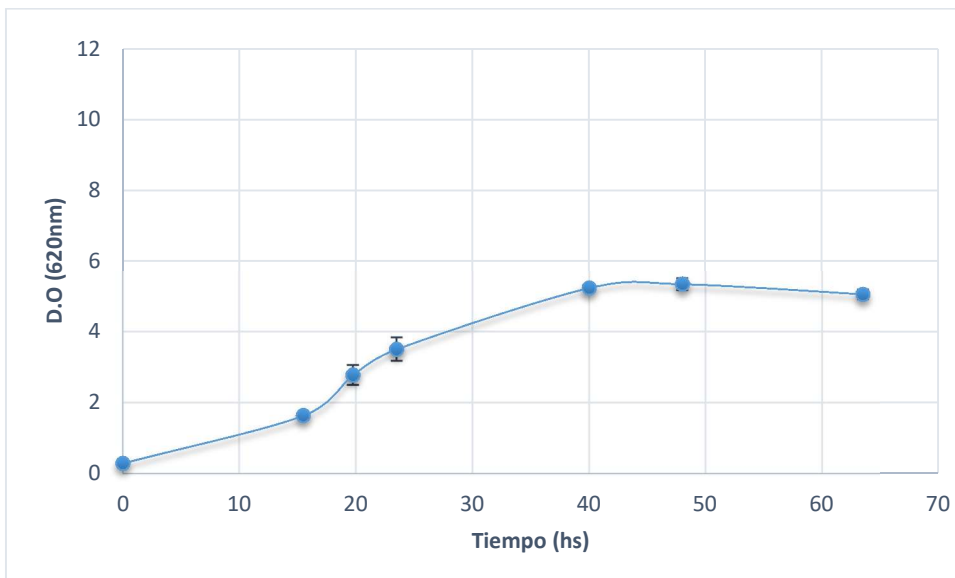


Gráfico 5 - Cultivo en lote de RM5 en MM con xilosa 15g/l como fuente de carbono

Acumulación de PHA

Determinación de la composición monomérica de los Biopolímeros

Se analizó y cuantificó el polímero acumulado por RM5 durante su crecimiento en lote en MM con glicerol o xilosa como únicas fuentes de carbono. Se tomaron muestras a las 24 (T4), 39,5 (T6) y 62,5 (T8) horas de crecimiento para el cultivo con glicerol y a 23,5h (T3), 48h (T5) y 63,5h (T6) para los cultivos con xilosa. De acuerdo con el perfil de crecimiento (Grafico 4 y Grafico 5) estos tiempos de muestreo corresponden a la fase exponencial, comienzo de la fase estacionaria y a la fase estacionaria avanzada. La identificación de los 3-hidroxiácidos y la proporción de cada uno de ellos, presentes en las muestras analizadas se muestran en el Grafico 6, obtenidos según Ecuación 1 (materiales y métodos). Los 3-hidroxiácidos identificados fueron el 3-hidroxihexanoato (3-HD6), 3-hidroxi octanoato (3-HD8), 3-hidroxi decanoato (3-HD10) y 3-hidroxi dodecanoato (3-HD12), siendo el 3-HD10 el más abundante para ambos cultivos (Grafico 6). Además, en el cultivo con glicerol se obtuvo mcl-HA de 14 carbonos.

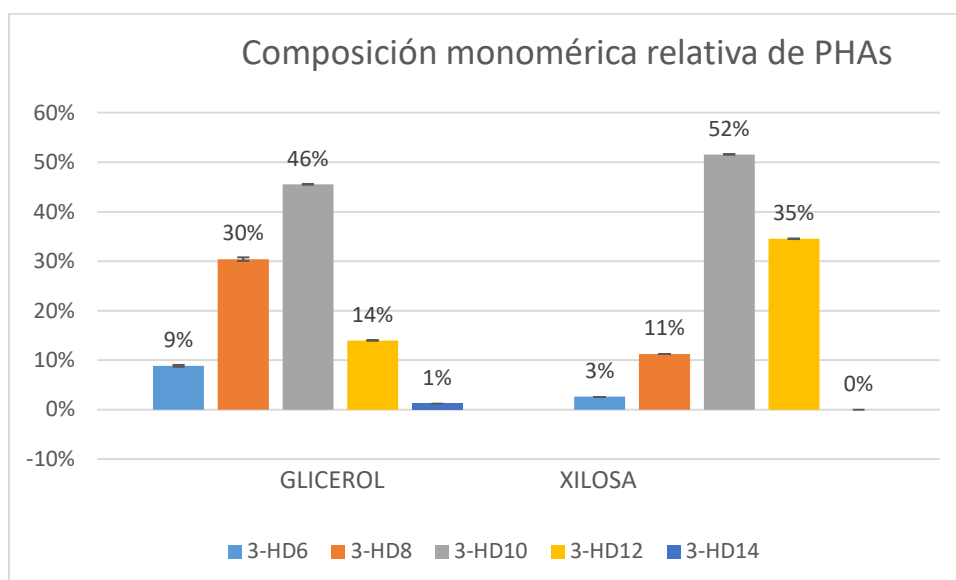


Grafico 6—Composición monomérica relativa de mcl-PHA en los cultivos en lote con glicerol y xilosa como únicas fuente de carbono. Los datos mostrados son de células liofilizadas tomadas a las 62,5hs de ensayo para el caso de glicerol, y a las 63,5hs en el caso de xilosa como fuente carbonada. Las proporciones de cada monómero fueron calculadas a partir de la Ecuación 1 indicada en MATERIALES Y METODOS.

Cuantificación de PHA por GC-MS

Una vez identificados los 3-hidroxiácidos presentes en las muestras de los cultivos en presencia de glicerol y xilosa como fuentes de carbono, se procedió a cuantificar el PHA total acumulado. Como se describe en materiales y métodos se utilizaron diferentes métodos.

La cuantificación por GC-MS se basó en lo descrito por Tan et al (2014). Se calculó la cantidad PHA para cada cultivo en lote en los distintos tiempos a partir de la Ecuación 2, Ecuación 3 y Ecuación 4. La concentración del estándar interno, ácido benzoico fue de 20,6 mg/ml.

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos de contenido % CDM para las muestras a distintos tiempo de ambos matraces. El mayor contenido de polímero fue de

0,447% CDM y se obtuvo en el cultivo con glicerol como fuente de carbono a las 62,5 horas de incubación (muestra T8). Las células crecidas en presencia de xilosa acumularon un 0,058% de polímero, valor obtenido a las 63,5hs (muestra T6).

Tabla 12 –Relación percentil entre la cantidad de polímero calculado según lo descrito por (Tan, Chen, Ge, et al. 2014), en relación a la biomasa celular

F. Carbono	Tiempo	Contenido de PHA (%)
Glicerol	T4	0,120
	T6	0,354
	T8	0,447
Xilosa	T3	0,046
	T5	0,076
	T6	0,058

Cuantificación de PHA por método de fluorescencia de Rojo Nilo

Se realizó una curva de calibración utilizando biomasa liofilizada de *H. seropedicae* Z69 con 40% de PHB (Grafico 7). Las concentraciones de biomasa utilizados para la realización de la curva de calibración se detallan en la Tabla 13. Se obtuvo un R^2 de 0,9967 en la curva, y la ecuación de la recta para poder cuantificar la cantidad de PHA es:

Ecuación 5

$$Y=177,53x+60,306$$

Tabla 13 – Concentraciones de biomasa liofilizada en cada punto de la curva de calibración

Muestra	Concentración (mg/ml)
C1	0,60
C2	0,90
C3	1,20
C4	1,56
C5	1,91
C6	2,39
C7	2,99

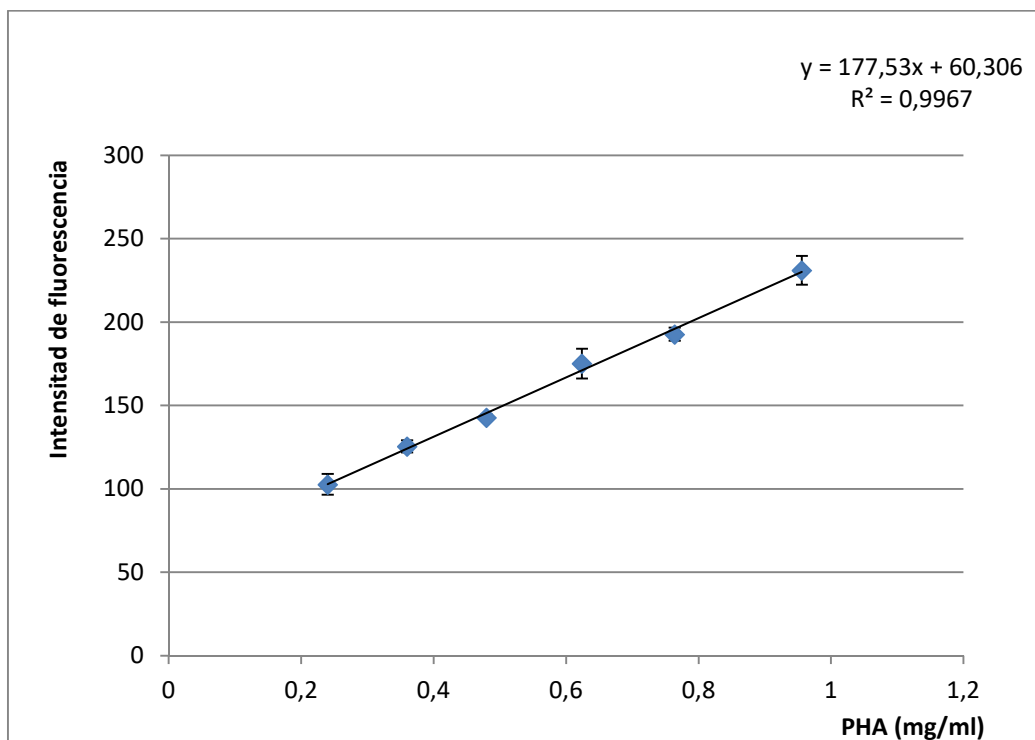


Grafico 7 – Curva de calibración realizada a partir de biomasa liofilizada de *H. Seropedicae* Z69 con un 40% PHB

En la Tabla 14 se muestran los resultados de la cuantificación de las muestras de la cepa RM5. Se obtuvieron resultados para las muestras T6 y T8, tomadas a las 39,5hs y 62,5hs, respectivamente del cultivo con glicerol mientras que para el cultivo con xilosa sólo se pudo cuantificar el punto T3 (23,5hs). Esto se debió a que el resto de los puntos quedaron fuera de la escala de la curva de calibración.

Tabla 14 – Resultados obtenidos a partir de la cuantificación por fluorescencia con Rojo Nilo. Las muestras utilizadas provienen de los cultivos en lote utilizando glicerol o xilosa como fuente de carbono, extraídas a distintos tiempos de los cultivos.

	Glicerol		Xilosa
	T6	T8	T3
Biomasa (mg/ml)	1,70	1,30	8,51
Total Polímero (mg/ml)	0,52	0,88	0,20
Contenido de PHA (%)	30,71	68,02	2,34

Extracción de PHA de Pseudomonas spp. RM5 por método de Soxhlet

Los métodos de cuantificación de los PHAs por GC-MS y detección por Rojo Nilo, previamente utilizados, se realizaron a partir de células liofilizadas. Para cuantificar los PHAs por gravimetría se requiere extraer el polímero.

Mediante el método Soxhlet, se extrajo el material polimérico acumulado en las células de la muestra T8 (62,5 hs) del cultivo en lote de la cepa RM5 en presencia de glicerol y de la muestra T6 (63,5 hs) del cultivo en presencia de xilosa. Se obtuvo 29,7mg de PHA al utilizar glicerol como fuente de carbono, un 9,4% sobre la biomasa total, mientras que al utilizar xilosa se obtuvo 6,1mg, correspondiente a un 3,2% de la biomasa total (Tabla 15). En la Tabla 16 se compara y resume los resultados obtenidos mediante todos los métodos de cuantificación. En la Ilustración 11 se observa el PHA extraído mediante este método.

Tabla 15 – Resultados de la extracción de PHA por método de Soxhlet, a partir de biomasa obtenida a tiempo final para los cultivos en lote de RM5 utilizando glicerol o xilosa como fuente de carbono.

Fuente de carbono	Biomasa (mg)	PHA (mg)	Contenido PHA (%)
Glicerol	316,2	29,7	9,4
Xilosa	187,9	6,1	3,2

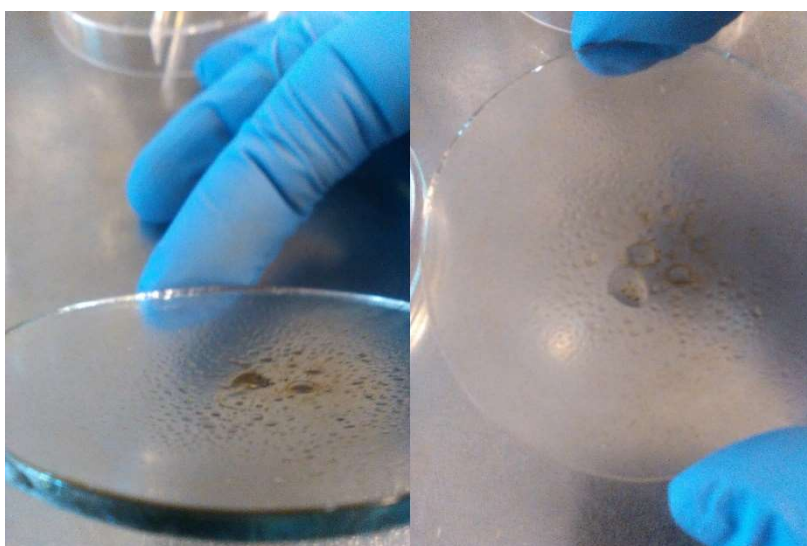


Ilustración 11 – PHA obtenido a partir de la muestra a tiempo final del cultivo en lote utilizando glicerol como fuente de carbono. La imagen demuestra lo obtenido luego de la extracción por Soxhlet y una vez que la acetona se evaporó por completo.

Tabla 16 - Tabla comparativa de los resultados de cuantificación a partir de las distintas técnicas.

Fuente de Carbono	Método de Cuantificación	Muestra	% PHA
Glicerol	Soxhlet	T8	9,4%
	GC-MS		0,447%
	Rojo Nilo		68,02%
	GC-MS	T6	0,354%
	Rojo Nilo		23,65%
		GC-MS	T3
Xilosa	Soxhlet	T6	3,2%
	GC-MS		0,058%
	GC-MS	T5	0,076%
	GC-MS	T3	0,046%
	Rojo Nilo		2,34%

Obtención de aislamientos antárticos capaces de crecer y acumular PHA en presencia de Xilosa

Detección de producción de PHA

A partir de las muestras antárticas colectadas en “Punta Nebles” e “Isla Ardley”, ambas ubicadas en la Isla Rey Jorge (ver materiales y métodos), se obtuvieron 15 aislamientos con morfología diferente crecidos en placas de MM con xilosa como fuente de carbono. Las mismas fueron repicadas en placas con medio TY hasta visualizar colonias homogéneas, lo que sugiere la presencia de haber obtenido cultivos puros. Todos los aislamientos crecieron tanto en medio R2A como en MM (excepto aislamiento 20). En la Tabla 17 se resumen el origen de los aislamientos obtenidos, los resultados de crecimiento y desarrollo de fluorescencia en presencia de Rojo Nilo en medio MM y R2A y las temperaturas de incubación. De los 15 aislamientos obtenidos, se identificaron 8 posibles productores de PHA en medio R2A y 7 en MM (Ilustración 12 e Ilustración 13). En R2A los aislamientos que fluorescen en la prueba de Rojo Nilo fueron 1, 5, 3, 3A, I y J, logrando una intensidad de fluorescencia muy cercana al control positivo (Ilustración 12). Todos los cultivos comienzan a acumular a partir de los 2 días, excepto I y J, en los cuales se observa fluorescencia a partir del cuarto día de incubación.

Tabla 17 – Aislamientos antárticos con sus respectivos orígenes de muestreo, pruebas de Rojo Nilo en medio R2A y MM y temperaturas de incubación.

Aislamiento	Muestra	Fluorescencia Rojo Nilo R2A Xil 10g/l			Fluorescencia con Rojo Nilo MM Xil 10g/l (72hs)	Temperatura de incubación
		2 días	4 días	7 días		
1	Punta Nebles	Si	Si	Si	Si	25°C
2	Punta Nebles	No	No	No	Si	25°C
4	Punta Nebles	No	No	No	Si	25°C
5	Punta Nebles	Si	Si	Si	Si	25°C
8	Punta Nebles	Si	Si	Si	Si	25°C
9	Punta Nebles	Si	Si	Si	Si	25°C
20	Punta Nebles	No	No	No	N/D ¹	25°C
3	Punta Nebles	Si	Si	Si	No	30°C
3 ^a	Punta Nebles	Si	Si	Si	No	30°C
A	Punta Nebles	No	No	No	No	12°C
C	Punta Nebles	No	N/D	N/D	No	12°C
D	Punta Nebles	No	N/D	N/D	No	12°C
E	Punta Nebles	No	No	No	Si	12°C
I	Isla Ardley	No	Si	Si	No	12°C
J	Isla Ardley	No	Si	Si	No	12°C

¹ No determinado

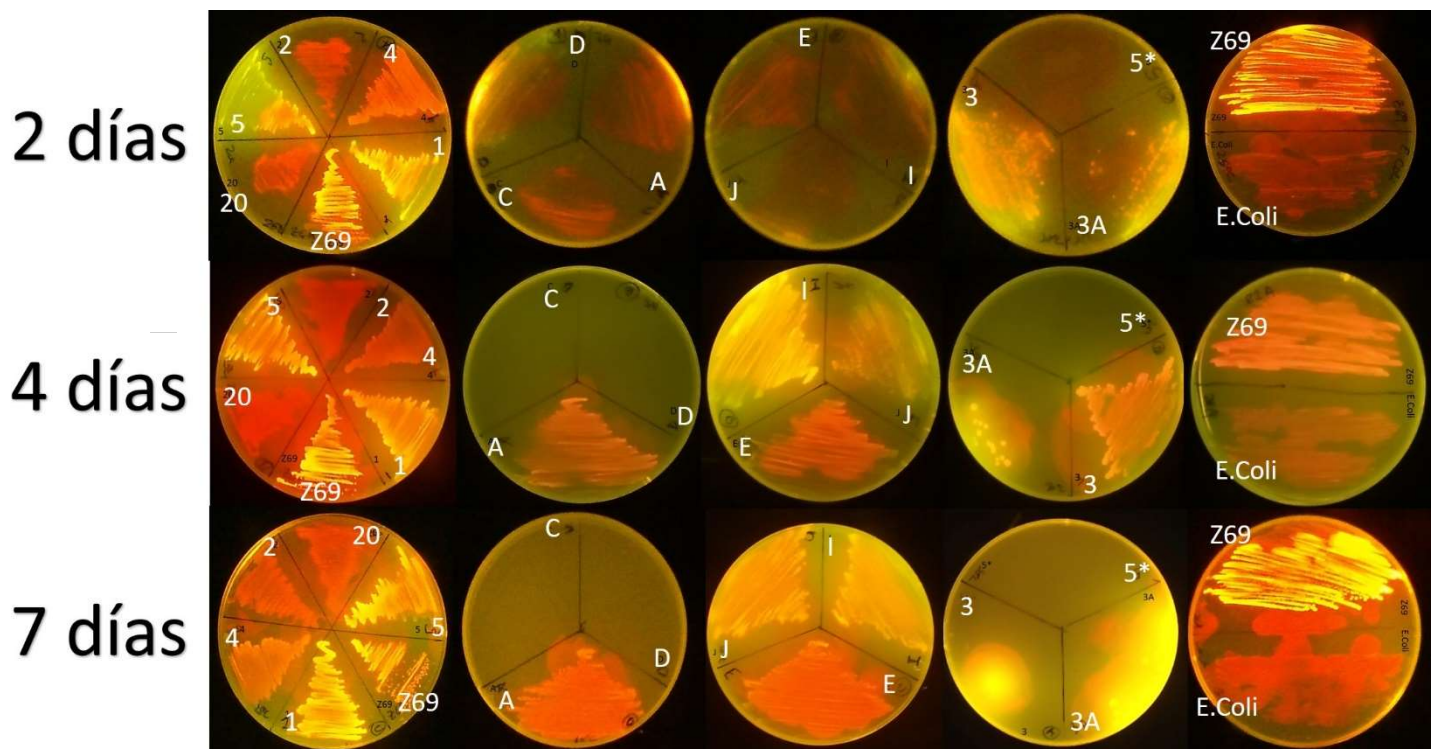


Ilustración 12—Tinción con Rojo Nilo de los aislamientos antárticos crecidos en placas con medio R2A Xilosa 10g/l durante 2, 4 y 7 días. Las temperaturas de incubación están indicadas en la Tabla 17. Se utilizó como control positivo a *H. seropedicae* Z69 y como control negativo *E. coli* Top10 (*E. coli*), ambas crecidas en R2A Xilosa 10g/l a 25°C.

En los cultivos realizados en MM con xilosa, los aislamientos en los que se detectó acumulación de PHA fueron el 1, 2, 4, 5, 8, 9 y E. El aislamiento 2 fue descartado para posteriores experimentos debido a que se observó una menor intensidad en comparación al resto de los aislamientos. Sin embargo hay que remarcar que ninguno de los mismos alcanzó una intensidad de fluorescencia equiparable a *H. seropedicae*.

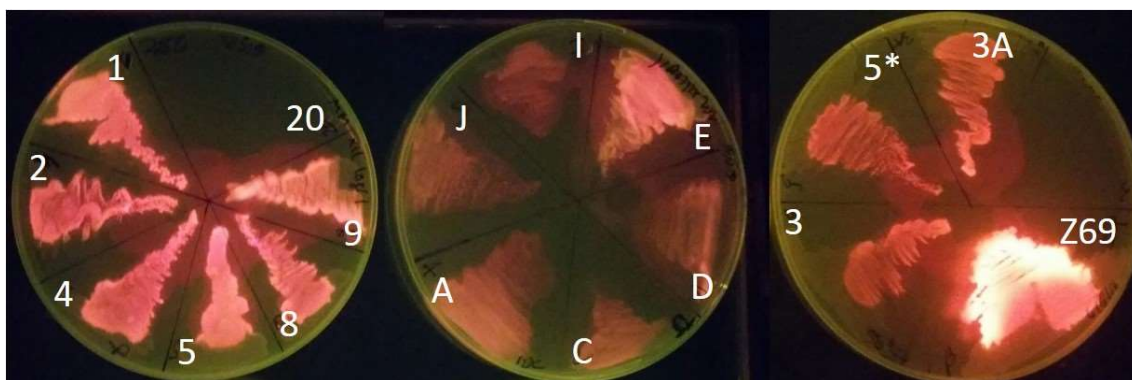


Ilustración 13—Tinción con Rojo Nilo de los aislamientos antárticos crecidos en placas con medio MM Xilosa 10g/l durante 72hs. Las temperaturas de incubación están indicadas en la Tabla 17. Se utilizó como control positivo a *H. seropedicae* Z69 crecida durante 72 hs en el mismo medio a 30°C.

Perfiles de Crecimiento

Se determinaron los perfiles de crecimiento en MM con xilosa como fuente de carbono de los aislamientos antárticos 1, 4, 5, 8,9 y E, seleccionados por presentar fluorescencia con la tinción de Rojo Nilo, siendo considerados como potenciales acumuladores de PHA (Grafico 8).

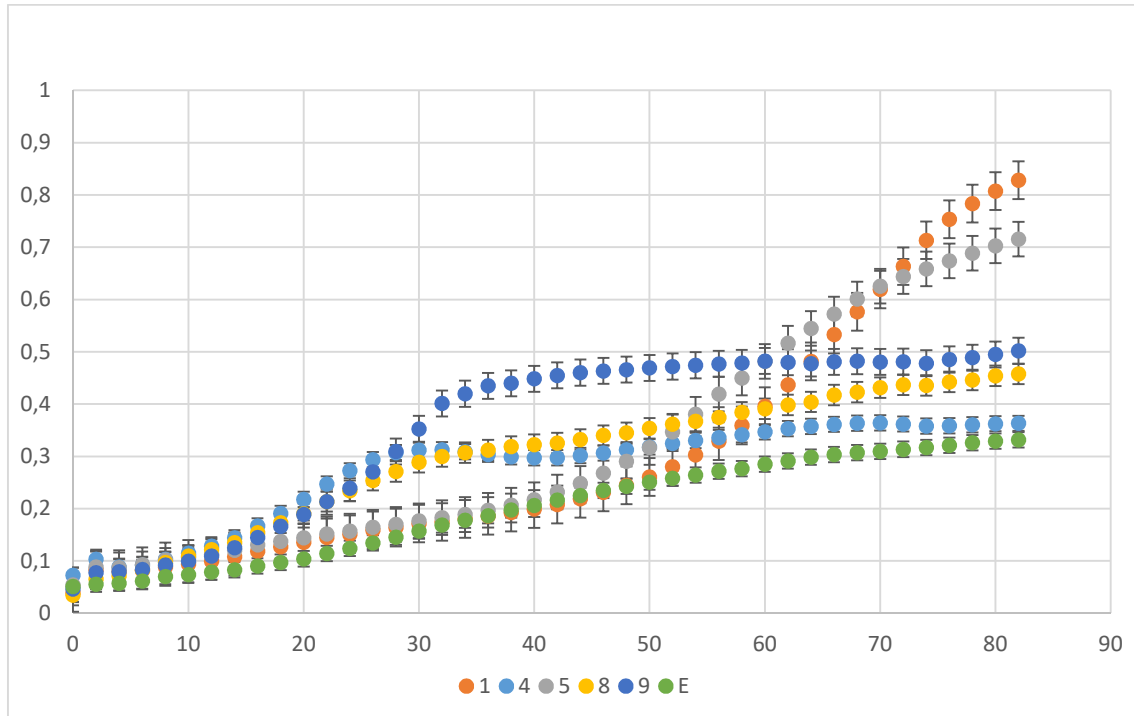


Grafico 8 - Curva de crecimiento de aislamientos antárticos en MM Xilosa 10g/l, incubados por 82hs a 30°C en placas de cultivo de 96 pocillos.

El aislamiento que alcanzó una mayor DO fue el aislamiento 1, seguido por el 5; los resultados de DO máxima y velocidad de crecimiento obtenidos por cada aislamiento se describen en la Tabla 18. Todos los aislamientos provienen de cultivos incubados a 25°C, excepto E que proviene de una incubación a 12°C, pudiendo todos crecer a 30°C. Los aislamientos 4, 8 y 9 presentaron perfiles de crecimiento similares, alcanzaron la fase estacionaria a las 30 horas de incubación, y la DO alcanzada en dicho momento es similar, salvo el aislamiento 9 que presenta una mayor DO. En los aislamientos 1 y 5 se observa el inicio de una fase exponencial a las 48hs del cultivo. El aislamiento E tiene un crecimiento menor comparado con el resto los aislamientos.

Tabla 18 - Densidad óptica máxima y velocidad máxima de crecimiento alcanzadas por aislamientos antárticos en la fase exponencial de las curvas de crecimiento.

Aislamiento	D.O. máx	Velocidad de crecimiento máx	Intervalo Fase Exponencial (hs)
1	0,83± 0,13	0,04	50-82
4	0,36± 0,12	0,05	8-30
5	0,72± 0,07	0,03	42-82
8	0,46± 0,02	0,05	4-30
9	0,50± 0,04	0,06	10-36
E	0,33± 0,04	0,02	20-82

Identificación de aislamientos antárticos

Se amplificó en los aislamientos 1, 4, 5, 9, E y RM5 un fragmento del gen que codifica para la subunidad ribosomal del ARNr 16, obteniendo un tamaño esperado de 1500bp. El aislamiento 8 fue descartado para este ensayo ya que se observó una contaminación en la placa, no pudiendo aislarlo nuevamente. Las secuencias nucleotídicas de los fragmentos obtenidos por PCR se obtuvieron por secuenciación a partir de los cebadores 27f y 1492r. Una vez alineadas las secuencias, se compararon con la base de datos de GenBank empleando el programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov) identificando a todos los aislamientos como *Pseudomonas* spp. (Tabla 19).

Tabla 19 – Resultados del análisis de las secuencias de los aislamientos al compararlas con la base de datos genbank. Los resultados de los aislamientos 1 y 4 son a partir de las secuencias obtenidas utilizando el cebador 27F

Aislamiento	Pares de base	cobertura	% de identidad	Especie
1	261	100%	99%	<i>Pseudomonas</i> spp.
4	300	100%	99%	<i>Pseudomonas</i> spp.
5	695	100%	99%	<i>Pseudomonas</i> spp.
9	460	100%	100%	<i>Pseudomonas</i> spp.
E	635	100%	100%	<i>Pseudomonas</i> spp.
RM5	517	100%	99%	<i>Pseudomonas</i> spp.

Identificación del tipo de PhaC en la cepa RM5 y demás aislamientos obtenidos.

Se amplificaron mediante PCR los fragmentos correspondientes a los genes *phbC* y *phaC* II utilizando juegos de cebadores específicos para cada uno de estos genes (ver materiales y Tabla 5)

No se obtuvo producto de PCR en ninguno de los aislamientos para el gen *phbC*, que codifica para la enzima PHA sintasa clase I. El control positivo utilizado fue la cepa Z69 de *H. seropedicae* que acumula PHB y P(3HB-co-3HV), para la cual se obtuvo el producto de PCR del tamaño esperado (500bp) (Ilustración 14).

Para el aislamiento 4 y la cepa *Pseudomonas* spp RM5 se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado para los genes *phaC1/phaC2* (Ilustración 15). Los genes *phaC1/phaC2* que codifica para la enzima PHA sintasa clase II. En el caso de la cepa RM5 este resultado es concordante con la acumulación de monómeros de cadena media observados por GC-MS. Los resultados de ambos experimentos están resumidos en la Tabla 20.

Tabla 20 – Resultados de los ensayos de PCR de los fragmentos de los genes *phbC* y *phaC1/phaC2* para cada aislamiento.

Aislamiento	<i>phbC</i>	<i>phaC1/phaC2</i>
1	-	-
4	-	+
5	-	-
9	-	-
E	-	-
RM5	-	+

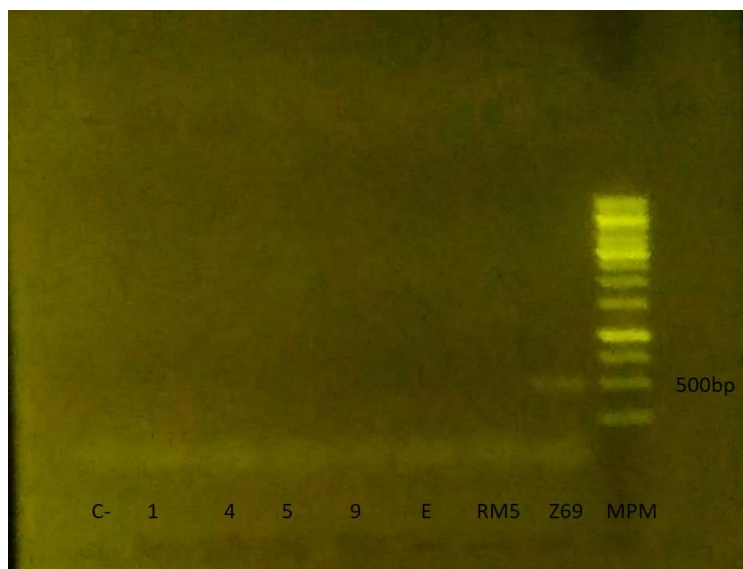
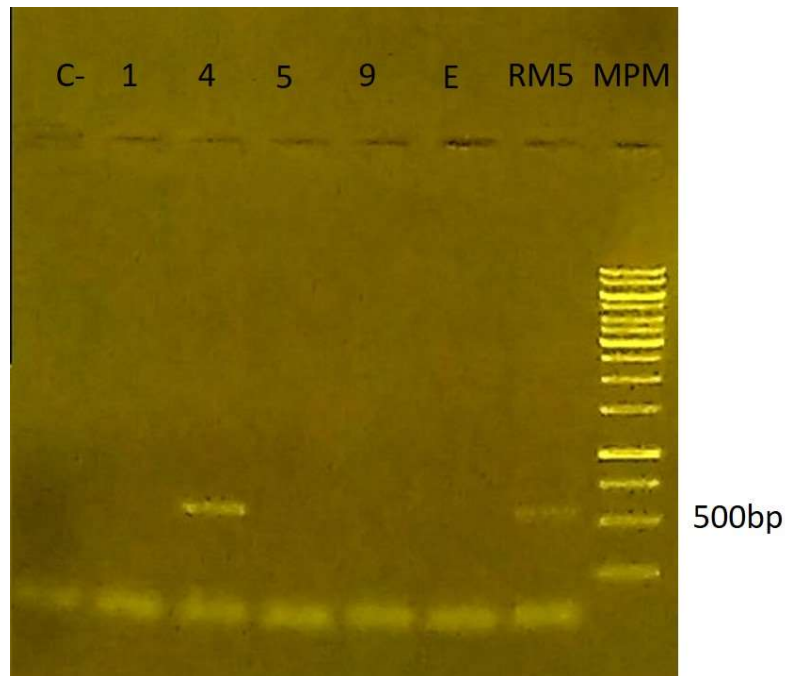


Ilustración 14 - Electroforesis de Gel de agarosa 1%. PCR del fragmento del gen *phbC*, correspondiente a la PHA sintasa clase I. El Marcador de peso molecular (MPM) es GeneRuler DNA Ladder 1kb.

Ilustración 15 - Electroforesis de Gel de agarosa 1%. PCR de los fragmentos de los genes *phaC1/phaC2*, correspondientes a la PHA sintasa clase II. El Marcador de peso molecular (MPM) es GeneRuler DNA Ladder 1kb.



DISCUSION

Detección de la producción de PHA de *Pseudomonas* spp. RM5

Se procedió a la tinción con Rojo Nilo del aislamiento RM5 crecido en placas con MM y R2A, con xilosa o glicerol como fuente de carbono, incubadas durante 2, 4 y 7 días (Ilustración 9, Ilustración 10). La presencia de fluorescencia indica la posible acumulación de PHAs en ambos medios de cultivo y con ambas fuentes de carbono. Estos resultados están de acuerdo con lo obtenido en trabajos anteriores en nuestro laboratorio, donde este aislamiento creció y acumuló PHAs en medio R2A y MM, utilizando glucosa y glicerol como fuentes de carbono, y se determinó la presencia de monómeros de cadena media (mcl-HA) por GC-MS.

Se observó que RM5 presenta mayor intensidad de fluorescencia cuando se cultiva en presencia de glicerol como fuente de carbono que cuando consume xilosa. La intensidad de fluorescencia en placas con glicerol es similar a la observada en el control positivo *H. seropedicae* Z69, el cual acumula un contenido apreciable de PHB al crecer en presencia de glucosa y xilosa como fuente de carbono (Catalán et al. 2007).

Perfiles de crecimiento de RM5

Los perfiles de crecimiento de RM5 crecida en presencia de glicerol o xilosa como fuente de carbono a distintas concentraciones, indicaron que el glicerol es una buena fuente de carbono para RM5. Se obtuvo un crecimiento máximo a una concentración de 20g/l de glicerol, no observando diferencias con la concentración de 30g/l (Grafico 1). En los crecimientos donde se utilizó el licor de glicerina, se observó una disminución del crecimiento a medida que aumentó la concentración de dicho sustrato, siendo el crecimiento totalmente inhibido cuando se utilizó 50% de licor de glicerina. Esto se puede haber debido a un efecto de toxicidad ya que el licor de glicerina es un subproducto obtenido en la producción del biodiesel, pudiendo llegar a contener entre un 0,5% y un 20% de metanol, el cual ejerce un alto grado de toxicidad (Poblete-Castro et al. 2014). Sin embargo, se ha reportado que varias cepas de *P.putida* han logrado crecer y acumular mcl-PHAs utilizando glicerol crudo o licor de glicerina sin filtrar como fuente de carbono, obteniendo hasta un 35% de PHA (Poblete-Castro et al. 2014). Dados estos antecedentes y los resultados obtenidos en este trabajo sería interesante continuar con el estudio de la producción de PHAs por la cepa RM5, utilizando licor de glicerina como fuente de carbono. Por otro lado, los valores de velocidad de crecimiento máximo y densidad óptica máxima en los perfiles con 20% de licor de glicerina y 15g/l de glicerol fueron similares (Tabla 10). Según los resultados la mejor concentración para utilizar a en posteriores ensayos esta entre un 10-20% de licor de glicerina.

Determinación de Biomasa y acumulación de PHA en cultivos en lote de RM5

La biomasa total obtenida en los cultivos en lote con glicerol y xilosa como fuente de carbono, fueron acordes a lo esperado según lo obtenido en los perfiles de crecimiento, en los cuales la cepa RM5 alcanzó aproximadamente el doble de DO durante el crecimiento en glicerol comparado con xilosa, ocurriendo lo mismo con la velocidad de crecimiento (Tabla 11).

En ambos cultivos en lote, se observa una fase exponencial y una fase de estacionaria, la cual es alcanzada aproximadamente a las 40hs de incubación (Grafico 4, Grafico 5). La detección de los PHAs sintetizados por RM5 durante dichos cultivos, se realizó por GC-MS. En este análisis se identificaron únicamente monómeros de longitud de cadena media, de 6, 8, 10, 12 carbonos en el material analizado a partir del cultivo con xilosa y con glicerol, y adicionalmente de 14 carbonos únicamente con glicerol.

Los resultados obtenidos con glicerol están de acuerdo con lo obtenido en el trabajo anterior realizado en nuestro laboratorio, en donde se obtuvieron mcl-PHAs con monómeros de 6, 8, 10 y 12 carbonos (Tesis de Grado Rocio González), pero no fueron identificados hidroxiacidos 3-tetrahidroxidecanoicos (3-HD14). Sin embargo, Goh y Tan (2012) reportaron un aislamiento antártico del género *Pseudomonas*, el cual produjo mcl-PHAs utilizando glicerol como fuente de carbono con el mismo perfil de monómeros, incluyendo el hidroxiacido 3-HD14.

Se comprobó que RM5 acumula mcl-PHAs, lo cual concuerda con el trabajo de Davis y colaboradores (2013), donde se describió una cepa de *P.putida* capaz de sintetizar hasta un 22% de mcl-PHAs a partir de xilosa como única fuente de carbono.

Por otro lado, el hidroxiaácido más abundante en ambos cultivos fue el 3-hidroxidecanoico (3-HD10). Este resultado es similar al descrito en la bibliografía para una variedad de especies del género *Pseudomonas*, donde se identificó el 3-HD10 como principal monómero producido en cultivos con glicerol como fuente de carbono (Pappalardo et al. 2014; Fontaine et al. 2017; Goh & Tan 2012). Si bien no se ha reportado la composición monomérica de mcl-PHAs producidos por bacterias de éste género utilizando xilosa como fuente de carbono, si se describió la presencia de 3-HD10 como el monómero más abundante en muestras de cultivos de una cepa de *Pseudomonas* crecida en presencia de un hidrolizado de césped deslignificado y pretratado, la cual contiene xilosa como el segundo azúcar más abundante (Davis et al. 2013).

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, en cuanto a la fuente de carbono utilizada y el tipo de HA obtenido es posible inferir que RM5 utiliza la ruta de síntesis de *novo* de ácidos grasos (Vía III) para producir éstos monómeros de cadena media. Esto podría ser comprobado mediante la presencia del gen que codifica para la enzima acil-ACP-CoA transacilasa (*phaG*) por PCR (Anjum et al. 2016).

Cuantificación de PHAs

La cuantificación del material polimérico producido en los cultivos en lote se llevó cabo por tres métodos: por GC-MS, según lo descrito por Tan, Chen, Ge, y colaboradores (2014), utilizando las ecuaciones Ecuación 2, Ecuación 3 y Ecuación 4 (materiales y métodos), por medio del desarrollo de fluorescencia por tinción con Rojo Nilo (Gorenflo et al. 1999), y por gravimetría, previa extracción del material polimérico, éste último sólo fue realizado para la muestra final del cultivo.

La cuantificación de fluorescencia utilizando Rojo Nilo no se pudo realizar en todas las muestras ya que algunos valores de fluorescencia quedaron por fuera de la curva de calibración, por lo que tuvieron que ser descartados (Tabla 14). El contenido de PHA % CDM obtenido por cada técnica difieren ampliamente (Tabla 21). Mediante la cuantificación por GC-MS se obtienen contenidos cercanos al 1% CDM, mientras que los valores de cuantificación por fluorescencia de Rojo Nilo son del entorno del 20% al 68% para el cultivo con glicerol y un 2,3% para el cultivo con xilosa. Bacterias del género *Pseudomonas* produce generalmente entre el 1 y 30% de mcl-PHA (Tan, Chen, Li, et al. 2014), dependiendo de la fuente de carbono, la ruta para la síntesis de los HA y la estrategia de fermentación utilizada. Por lo tanto, hay una gran variabilidad en cuanto al contenido de mcl-PHA en este género de bacterias. El método elegido por excelencia para la cuantificación de los PHAs es la cromatografía gaseosa con estandar interno y curva de calibración, para cada uno de los monómeros a determinar. En este caso la cuantificación se basó en la determinación de GC-MS descrita por Tan, Chen, Ge, y colaboradores (2014) utilizando las ecuaciones 2, 3 y 4 (ver materiales y métodos) sin necesidad de curvas de calibración. De manera de verificar estas ecuaciones, se calculó el contenido de PHB de muestras de *H. seropedicae*, previamente cuantificadas por GC-MS utilizando una curva de calibración realizada con un estandar de PHB con una pureza del 90%. (Tesis Doctorado, Ana Inés Catalán). Se comprobó para estas muestras, que la cuantificación utilizando dichas ecuaciones, coincide con la cuantificación por curva de calibración con estandar de PHB, teniendo un margen de error de un 19%. Estas diferencias concuerdan con los resultados obtenidos por Tan, Chen, Ge, y colaboradores (2014), y es el margen de error aceptable según los criterios de control de calidad prescritos para la mayoría de los métodos de la US EPA (Tan, Chen, Ge, et al. 2014).

Por otro lado, la cuantificación de fluorescencia con Rojo Nilo resultó en contenidos de PHAs mucho mayores, los cuales están de acuerdo a lo observado cualitativamente para RM5 crecida en placas de medio MM y R2A con glicerol (Ilustración 9), donde la intensidad de fluorescencia fue similar a la desarrollada por el control positivo *H. seropedicae* Z69 (40% de PHB). El Rojo Nilo es un colorante lipofílico que se une a otros compuestos lipídicos, (Greenspan et al. 1985; Alemán-Nava et al. 2016; Kimura et al. 2004), por lo cual la intensidad de fluorescencia observada puede estar sobreestimada. Kranz y colaboradores (1997) determinaron que el límite de detección del Rojo Nilo es de entre un 5% a 10% de PHAs. Es importante tener en cuenta que en dicho trabajo se utilizó una cepa de *Rhodobacter capsulatus*, la cual es capaz de acumular únicamente scl-PHAs, por lo que podrían haber diferencias entre la intensidad de fluorescencia emitida al interaccionar el Rojo Nilo con scl-PHAs y al interaccionar con mcl-PHAs. El Rojo Nilo interacciona con la capa superficial del gránulo de PHA, siendo la intensidad de fluorescencia dependiente del área superficial del gránulo y no particularmente de la masa, pudiendo ser el límite de detección de mcl-PHAs menor al de scl-PHAs (Zuriani et al. 2013).

Estos datos explicarían la sobreestimación de mcl-PHA para la técnica cuantitativa de fluorescencia de Rojo Nilo, en la cual se utilizó una curva de calibración realizada con células de *H. seropedicae* con un 40% CDM de PHB. Para poder utilizar esta técnica rápida de cuantificación se debería tener una curva de calibración para PHAs de cadena corta y media.

Para ambos cultivos en lote, se observó un aumento en la producción de mcl-PHA una vez entrada en la fase estacionaria aproximadamente a las 40 horas de incubación. En el caso del cultivo en presencia de glicerol, la muestra T6 corresponde a las 39,5hs y la T8 a 62,5hs de incubación (ver Grafico 4) y en el cultivo en presencia de xilosa la muestra T5 a las 48hs y T6 a las 63,5hs de incubación (ver Grafico 5). Para ambos cultivos se observa un aumento de mcl-PHA entre las muestras tomadas en fase exponencial con las tomadas en fase estacionaria (Tabla 12). Este aumento en la cantidad de mcl-PHAs en la fase estacionaria, coincide con lo obtenido por varios autores a partir de diferentes especies de *Pseudomonas*, una de ellas proveniente del glaciar Ártico (Sathiyarayanan et al. 2017; Pappalardo et al. 2014).

También se realizó extracción de mcl-PHAs por el método de Soxhlet, solo para las muestras correspondiente a tiempo final de los cultivos. Se determinó por gravimetría la cantidad de polímero acumulado (peso seco). Con el valor del peso seco se calculó el contenido de polímero (% CDM), que fueron de 9,4% y 3,2% para las muestras del cultivo con glicerol y con xilosa, respectivamente. Estos valores no coinciden con los obtenidos por el resto de las metodologías de cuantificación, y es probablemente debido a que se utilizó poca cantidad de biomasa y no se realizó una precipitación de los mcl-PHAs con metanol luego de rotavaporar las muestras, según lo descrito por Davis y colaboradores (2013). Es necesario repetir la extracción de mcl-PHA a partir de esta metodología, utilizando una mayor cantidad de biomasa y siguiendo el protocolo completo.

Tabla 21 – Comparación de los porcentajes de PHA obtenidos a partir de la cuantificación por GC-MS y fluorescencia por tinción con Rojo Nilo

Muestra	Contenido PHA (%) (Tan, Chen, Ge, et al. 2014)	Contenido PHA (%) (Gorenflo et al. 1999)
Glicerol T6	0,345	30,71
Glicerol T8	0,447	68,02
Xilosa T3	0,046	2,34

Aislamientos antárticos

A partir de las muestras antárticas de Punta Nebles e Isla Ardley, se intentó obtener nuevos aislamientos microbianos capaces de crecer con xilosa como fuente de carbono y potenciales productos de PHA.

A partir de la prueba de Rojo Nilo realizada a los aislamientos crecidos en presencia de xilosa como fuente de carbono (Ilustración 12, Ilustración 13), se obtuvieron mayores intensidades de fluorescencia en comparación a los ensayos realizados a *Pseudomonas* spp. RM5 en placas con xilosa (Ilustración 10). La intensidad desarrollada por varios aislamientos fue similar a la alcanzada por *H. seropedicae* Z69, que puede producir hasta un 50% de PHB con esta fuente de carbono (Malán Courdín 2011). Todos los aislamientos obtenidos en éste trabajo fueron identificados dentro del género *Pseudomonas* (Tabla 19). Los aislamientos que mejores perspectivas generan son el número 1 y 5, los cuales pudieron acumular PHAs en ambos medios de cultivo y presentan una DO superior al resto de los aislamientos (Tabla 14). Los resultados de crecimiento y fluorescencia de las *Pseudomonas* spp 1 y 5 obtenidas en este trabajo los convierten en posibles candidatos para la producción de mcl-PHA a partir de xilosa.

Amplificación de los fragmentos de genes *phaC*

El aislamiento RM5 de *Pseudomonas* spp. acumula mcl-PHAs, de 6 a 14 carbonos, dependiendo de la fuente de carbono utilizada. Utilizando cebadores específicos para los genes que codifican para la PHA sintasa, se obtuvo para la cepa RM5 un producto de PCR del tamaño esperado a los genes *phaC1* y *phaC2* (Ilustración 15). Estos dos genes codifican para las enzimas PHA sintasa clase II, las cuales reconocen monómeros de cadena media y han sido descritas comúnmente en *Pseudomonas* productoras de mcl-PHA (Solaiman et al. 2000). Como era de esperar, no logramos amplificar un fragmento correspondiente al gen *phbC* en RM5 (Ilustración 14), que no sintetiza monómero de cadena corta. En el control positivo, *H. seropedicae* Z69, se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado para el fragmento del gen que codifica para la *phbC* según lo descrito por Kadouri y colaboradores (2002). No se obtuvo producto de PCR correspondiente al gen *phbC* en, ninguno de los aislamientos obtenidos en este trabajo. Esto concuerda con las características generales del género *Pseudomonas*, ya que muy pocas especies de este género producen PHB, siendo más común la producción de mcl-PHA (Kahlon 2016). Por otro lado, el único aislamiento seleccionado que amplificó los fragmentos de los genes *phaC1/ phaC2* fue el aislamiento 4. Este resultado en conjunto con las pruebas de tinción con Rojo Nilo indica que este aislamiento acumularía mcl-PHA. De esta manera este método molecular mediante la amplificación de los genes que codifican para las PHA

sintasas resultaría interesante para una rápida identificación y verificación de organismos que acumulan mcl-PHA (Solaiman et al. 2000).

No se obtuvieron productos de amplificación en los aislamientos 1, 5, 9 y E. Romo y colaboradores(2007) identificaron mediante tinción con Negro Sudan B la posible acumulación de PHA en una cepa del género *Pseudomonas*, sin embargo no fueron capaces de amplificar los genes que codifican para las PHA sintasas. Estos resultados son similares a los obtenidos en éste trabajo. Es importante tener en cuenta que existe una variación entre un 8 y un 96 % en las secuencias de las PHA sintasas de todas las clases (Singh et al. 2009). Para confirmar la síntesis de PHA por parte de estos aislamientos, es necesario un análisis por GC-MS para verificar la presencia de hidroxiácidos y un posterior análisis molecular según los resultados obtenidos, ya que no se descarta la posibilidad de que la fluorescencia observada sea debida a otros compuestos lipídicos (Romo et al. 2007).

CONCLUSIONES

- ✓ *Pseudomonas* spp cepa RM5 es capaz de acumular mcl-PHA cuando crecen en medio definido en presencia de glicerol o xilosa como únicas fuentes de carbono
- ✓ Las concentraciones óptimas de glicerol como fuente de carbono para el crecimiento de RM5 en medio MM están comprendidas en el intervalo entre 20-30 g/l
- ✓ Las concentraciones óptimas de xilosa como fuente de carbono para el crecimiento de RM5 en medio MM fueron entre 10-15 g/l
- ✓ El crecimiento de RM5 fue óptimo utilizando licor de glicerina fue con una concentración al 10%. RM5 no pudo crecer con una concentración de esta fuente al 50%
- ✓ La cepa RM5 cultivada en matraz Erlenmeyer creció mejor utilizando glicerol como fuente de carbono en comparación a xilosa, obteniendo prácticamente el doble de biomasa y velocidad de crecimiento en los cultivos en lote
- ✓ El 3-HD10 es el monómero más abundante identificado en los biopolímeros acumulados por RM5
- ✓ RM5 acumuló un 0,45% (mediante GC-MS) de mcl-PHAs en fase estacionaria utilizando glicerol como fuente de carbono
- ✓ RM5 acumuló un 0,08% (GC-MS) de mcl-PHAs en fase estacionaria utilizando xilosa como fuente de carbono
- ✓ No se logró una extracción exitosa de biopolímeros mediante la técnica de Soxhlet.
- ✓ Se comprobó la identidad de la cepa RM5 como perteneciente al género *Pseudomonas* mediante el análisis de la secuencia del fragmento del gen de la subunidad 16S ARNr.
- ✓ RM5 amplificó los fragmentos de los genes *phaC1/phaC2*, comprobando la presencia de la PHA sintasa de clase II
- ✓ Todos los aislamientos antárticos candidatos a acumular PHAs con xilosa como fuente de carbono en MM fueron identificados pertenecientes al género *Pseudomonas*.
- ✓ Los aislamientos 1 y 5 crecieron mejor en MM con 10g/l de xilosa como fuente de carbono.
- ✓ El aislamiento 4 fue el único que amplificó los fragmentos de los genes *phaC1/phaC2*.
- ✓ Ningún aislamiento amplificó el fragmento del gen *phbC*

PERSPECTIVAS

- Optimización de cultivos en lote de *Pseudomonas* spp.RM5 utilizando licor de glicerina como fuente de carbono. Determinación de la biomasa total alcanzada, análisis cuali y cuantitativo del PHA acumulado. Optimizar la extracción por método de Soxhlet de los PHAs acumulados en cultivos de RM5 utilizando xilosa o glicerol, siguiendo el protocolo completo de Davis y colaboradores (2013) y un posterior análisis por GC-MS de la muestra extraída. De ésta manera se confirma que los monómeros identificados a partir de células liofilizadas sean componentes del PHA.
- Realizar perfiles de crecimiento a distintas concentraciones de xilosa para los aislamientos 1, 4 y 5. Seleccionar la concentración óptima de dicha fuente de carbono para realizar cultivos en lote y evaluar producción de biomasa, identificación del material polimérico acumulado y posterior cuantificación.

Bibliografía

- Alemán-Nava, G.S. et al., 2016. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. *Journal of Microbiological Methods*, 128, pp.74–79.
- Anderson, A.J. & Dawes, E.A., 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, 54(4), pp.450–472.
- Anjum, A. et al., 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, pp.161–174.
- Borrero-de Acuña, J.M. et al., 2014. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. *Microbial cell factories*, 13(1), p.88.
- Brandl, H. et al., 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly (3-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(8), pp.1977–1982.
- Bugnicourt, E. et al., 2014. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), pp.791–808.
- Camacho, A. & Fernández-Valiente, E., 2005. Un mundo dominado por los microorganismos. Ecología microbiana de los lagos antárticos. *Ecosistemas*, 14(2), pp.64–76.
- Catalán, A.I. et al., 2007. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), pp.1352–1357.
- Catalán, A.I. et al., 2016. Synthesis of polyhydroxybutyrate by *herbaspirillum seropedicae* Z69 Lac⁺ using whey permeate. , 18(4), pp.875–882.
- Catalán, A.I., 2017. Desarrollo de estrategias dirigidas a modificar el metabolismo de *Herbaspirillum seropedicae* para mejorar la producción de polihidroxicanoatos.
- Davis, R. et al., 2013. Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology*, 150, pp.202–209.
- Encarnación, S. et al., 2002. Ania regulates reserve polymer accumulation and global protein expression in *Rhizobium etli*. *Journal of Bacteriology*, 184(8), pp.2287–2295.
- Faveau, C. et al., 2006. Synthetic studies on a phenyl-laulimalide analogue. *Tetrahedron Letters*, 47(47), pp.8305–8308.
- Fontaine, P., Mosrati, R. & Corroler, D., 2017. Medium chain length polyhydroxyalkanoates biosynthesis in *Pseudomonas putida* mt-2 is enhanced by co-metabolism of glycerol/octanoate or fatty acids mixtures. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, pp.430–435.
- Goh, Y.S. & Tan, I.K.P., 2012. Polyhydroxyalkanoate production by antarctic soil bacteria isolated from Casey Station and Signy Island. *Microbiological Research*, 167(4), pp.211–219.
- Gorenflo, V. et al., 1999. Quantification of bacterial polyhydroxyalkanoic acids by Nile red staining. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), pp.765–772.
- Greenspan, P. et al., 1985. Nile Red : Red " A Selective Fluorescent Stain Stain for Intracellular Lipid Lipid Drüplets Droplets für. , (10), pp.965–973.

- Huang, L. et al., 2016. The composition analysis and preliminary cultivation optimization of a PHA-producing microbial consortium with xylose as a sole carbon source. *Waste Management*, 52, pp.77–85.
- Jiang, X., Ramsay, J.A. & Ramsay, B.A., 2006. Acetone extraction of mcl-PHA from *Pseudomonas putida* KT2440. *Journal of Microbiological Methods*, 67(2), pp.212–219.
- Kadouri, D. et al., 2002. Identification and isolation of genes involved in poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phbC mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), pp.2943–2949.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E. & Okon, Y., 2003. Poly 3-hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phaZ mutant. *Archives of Microbiology*, 180(5), pp.309–318.
- Kahlon, R.S., 2016. *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*.
- Kimura, K., Yamaoka, M. & Kamisaka, Y., 2004. Rapid estimation of lipids in oleaginous fungi and yeasts using Nile red fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), pp.331–338.
- Kováts, E., 1958. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil I: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helvetica Chimica Acta*, 41(7), pp.1915–1932.
- Kranz, R.G., Gabbert, K.K. & Madigan, M.T., 1997. Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification. Positive Selection Systems for Discovery of Novel Polyester Biosynthesis Genes Based on Fatty Acid Detoxification. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 63(8), pp.3010–3013.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. En: Stackebrandt E., Goodfellow M. (ed), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. *John Wiley and Sons, New York, NY.*, pp.115–175.
- Madison, L.L. & Huisman, G.W., 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(1), pp.21–53.
- Malán Courdín, A.K., 2011. *Estudio de la producción de poli-3-hidroxibutirato en Herbaspirillum seropedicae z69 a partir de azúcares presentes en la hemicelulosa.*
- Le Meur, S. et al., 2012. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440. *BMC biotechnology*, 12(1), p.53.
- Mozejko-Ciesielska, J. & Kiewisz, R., 2016. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research*, 192, pp.271–282.
- Pappalardo, F. et al., 2014. Production of filmable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates produced from glycerol by *Pseudomonas mediterranea*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, pp.89–96.
- Poblete-Castro, I. et al., 2014. Comparison of mcl-Poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis by different *Pseudomonas putida* strains from crude glycerol: citrate accumulates at high titer under PHA-producing conditions. *BMC biotechnology*, 14(1), p.110.
- Pouton, C.W. & Akhtar, S., 1996. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 18(2), pp.133–162.
- Rai, R. et al., 2011. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 72(3), pp.29–47.
- Rehm, B.H.A., 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nature reviews. Microbiology*, 8(8), pp.578–592.

- Rehm, B.H. a, 2003. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. *The Biochemical journal*, 376, pp.15–33.
- Romo, D.M.R. et al., 2007. A most effective method for selecting a broad range of short and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate producing microorganisms. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(3), pp.348–357.
- Sathiyarayanan, G. et al., 2017. Production and characterization of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates copolymer from Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. PAMC 28620. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, pp.710–720.
- Serrano Cañadas, E., 2001. ESPACIOS PROTEGIDOS Y POLÍTICA TERRITORIAL EN LAS ISLAS SHETLAND DEL SUR (ANTÁRTIDA).
- da Silva, G.P., Mack, M. & Contiero, J., 2009. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), pp.30–39.
- Singh, M., Patel, S.K. & Kalia, V.C., 2009. *Bacillus subtilis* as potential producer for polyhydroxyalkanoates. *Microbial Cell Factories*, 8(1), p.38.
- Solaiman, D.K., Ashby, R.D. & Foglia, T. a, 2000. Rapid and specific identification of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate synthase gene by polymerase chain reaction. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(6), pp.690–694.
- Solaiman, D.K.Y. et al., 2006. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6), pp.783–789.
- Solaiman, D.K.Y., Catara, V. & Greco, S., 2005. Poly(hydroxyalkanoate) synthase genotype and PHA production of *Pseudomonas corrugata* and *P. mediterranea*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(2), pp.75–82.
- Tan, G.Y.A., Chen, C.L., Ge, L., et al., 2014. Enhanced gas chromatography-mass spectrometry method for bacterial polyhydroxyalkanoates analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(3), pp.379–382.
- Tan, G.Y.A., Chen, C.L., Li, L., et al., 2014. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymers*, 6(3), pp.706–754.
- Tribelli, P.M. & López, N.I., 2011. Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles*, 15(5), pp.541–547.
- Verlinden, R.A.J. et al., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), pp.1437–1449.
- Vogt, S. & Braun, M., 2004. Influence of glaciers and snow cover on terrestrial and marine ecosystems as revealed by remotely-sensed data. *Pesquisa Antártica Brasileira*, 118, pp.105–118.
- Zuriani, R. et al., 2013. A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(3), pp.472–478.

ANEXO I

Composición de Medios de Cultivo

TY (Tryptona-Extracto de Levadura)

Extracto de Levadura.....	3g
Tryptona.....	5g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,05g
H ₂ O destilada.....	c.s.p 1L

Medio Mineral Mínimo (MM)

KH ₂ PO ₄	1,5g
NaHPO ₄	3,5g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,01g
Citrato férrico amoniacal.....	0,06g
Solución de elementos trazas....	1,0ml
H ₂ O destilada.....	c.s.p 1L
pH:	7.0

Solución de elementos trazas:

H ₃ BO ₃	0,3g
CoCl ₂ .6H ₂ O.....	0,2g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1g
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,03g
NaMoO ₄ .2H ₂ O.....	0,03g
NiCl ₂ .6H ₂ O.....	0,02g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,01g
H ₂ O destilada.....	c.s.p. 1L

R₂A

Proteasa Peptona.....	0,5g
Ácidos casamínos.....	0,5g
Extracto de levadura.....	0,5g
Almidón Soluble.....	0,5g
Piruvato de sodio.....	0,3g
K ₂ HPO ₄	0,3g
MgSO ₄	0,05g
NaCl.....	3,0g
H ₂ O destilada.....	c.s.p 1L

Obtención y tratamiento de Licor de Glicerina

Licor de Glicerina

Residuo generado en la producción de biodiesel en ALUR. Tratamiento del residuo: se mezcló en partes iguales el residuo con agua destilada, se llevó el pH a 7 con ácido Clorhídrico y se filtró con papel Whatman durante toda la noche. Se esterilizó por autoclave 20 minutos a 120 °C.

Composición buffer de corrida

TAE 50X

Tris base.....	242g
Ácido acético glacial.....	57ml
EDTA 0.5M pH= 8.0.....	100ml
H ₂ O.....	c.s.p 1L

Taq DNA Polimerasa

La Taq DNA Polimerasa utilizada en todas las reacciones de PCR fue TopTaq DNA Polymerase (QIAGEN, Alemania).

ANEXO II

Secuencias utilizadas para la identificación de los aislamientos

AISLAMIENTO	SECUENCIA 27F
RM5	GATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAATTAAT ACTTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAAC TCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAA TCGGAATTAAGTGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAG TTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAA AACTGTGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTG TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGC GAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAG CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG TAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTG GCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGC CGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTTGACGGGGGGCCCGCACA
1	CAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTG GTTTGTAAAGTTGAATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAC TGCATGCAAACTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGG AATTTCTGTTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACA CCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAG GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TC
4	CCCCAGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACTGACTA GAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTTAGCGGTGAAA TCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACC TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCAA CTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGC ATTAAGTTGACCGCCTGGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAA

5	<p>TTTAAGTTGGGAGGAAGGGCCGTTACCTAATACGTATCGGTTTT GACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCA GCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA GGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGAATGTGAAA TCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATGCAAACTGGCAAGCT AGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAA ATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCAC CTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAA ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCA ACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACG CATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAC TCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCCTTGAC ATCCAATGAATCTGCCAGAGATGGCGGAGTGCCTTCGGGAGCA TTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAG ATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGT TACCAG</p>
9	<p>CTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAA TACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGAT GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGA CGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAAATTTCTGTGTAGC GGTGAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGC GACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGG GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACG ATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAG CTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGT TAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCG</p>
E	<p>CACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTAGTGT TTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCA GCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA CTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGAATGTG AAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAACTGGCAA GCTAGAGTATGGTAGAGGGTAGTGGAAATTTCTGTGTAGCGGT GAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC TACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAG CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG TCAACTAGCCGTTGGGAGTCTTGAACCTTAGTGGCGCAGCTA ACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCAT GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCCTTG ACATCCAATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAAC ATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAG</p>

