

---

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Microorganismos  
productores de enzimas  
hidrolíticas provenientes del  
oligoqueto antártico,  
*Grania* sp.**

*Lorena Herrera*

*Orientadora: Susana Castro Sowinski<sup>1</sup>  
Co-orientador: Rodrigo Ponce de León<sup>2</sup>*

*Tribunal: Cora Chalar<sup>1</sup>, Uriel Koziol<sup>1</sup>*

- 1. Sección Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias*
- 2. Sección zoología de Invertebrados, Facultad de Ciencias*

*Julio, 2015*

# Índice

RESUMEN .....	5
1 INTRODUCCIÓN .....	7
¿Qué es la Biotecnología? .....	7
1.1 Enzimas.....	7
1.1.2 Hidrolasas.....	8
1.1.2.1 Proteasas.....	9
1.1.2.2 Lipasas y esterases .....	10
1.1.2.3 Glicosilasas .....	10
1.1.2.3.1 Agarasas .....	10
1.1.2.3.2 Amilasas .....	11
1.1.2.3.3 Celulasas.....	11
1.2 Celulasas: las carbohidrasas que ocupan el 20% del mercado mundial de enzimas .....	11
1.2.1 Celulosa: estructura del polímero sustrato de las celulasas .....	11
1.2.2 Clasificación de celulasas .....	12
1.2.3 Organismos productores de celulasas .....	15
1.2.3.1 Plantas.....	15
1.2.3.2 Animales.....	15
1.2.3.3 Microorganismos celulolíticos .....	15
1.2.4 Celulasas en biotecnología.....	16
1.2.4.1 Industria textil .....	17
1.2.4.2 Industria de los detergentes .....	17
1.2.4.3 Industria alimenticia.....	17
1.2.4.4 Industria papelera .....	18
1.2.4.5 Industria de los biocombustibles .....	18
1.3 Antártida como fuente de enzimas novedosas.....	19
1.3.1 Continente antártico .....	19
1.3.2 Enzimas microbianas adaptadas al frío .....	20
1.4 <i>Grania</i> sp. y su intestino.....	20
Hipótesis.....	22

Objetivos .....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos específicos.....	23
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.1 Colecta de <i>Grania</i> sp. ....	24
2.2 Enriquecimiento de microorganismos productores de enzimas hidrolíticas utilizando medios diferenciales .....	25
2.2.1 Siembra en superficie sobre medios diferenciales .....	25
2.2.2 Enriquecimiento en medios diferenciales líquidos .....	26
2.2.3 Reaislamiento de colonias en medio LB.....	27
2.3 Exploración del potencial hidrolítico de los diferentes aislamientos .....	27
2.3.1 Revelado o visualización de actividades hidrolíticas, en placas.....	27
2.4 Identificación morfológica y molecular de los microorganismos celulolíticos .....	28
2.4.1 Tinción de Gram y observación al microscopio.....	28
2.4.2 Identificación molecular de las bacterias.....	29
2.4.2.1 Preparación del templado de ADN.....	29
2.4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y visualización de fragmentos de amplificación .....	30
2.4.2.3 Purificación del fragmento de amplificación, secuenciación y análisis de la secuencia .....	31
2.4.2.4 Análisis filogenético.....	32
2.5 Evaluación del potencial celulolítico de las bacterias seleccionadas.....	32
2.6 Evaluación del potencial sacarificador de las bacterias celulolíticas .....	33
2.6.1 Diferentes medios de cultivo para la posible producción de celulasas .....	33
2.6.2 Actividad celulolítica del sobrenadante .....	33
2.7 SDS-PAGE.....	33
3 RESULTADOS .....	35
.....	35
3.1 Aislamiento de microorganismos hidrolíticos.....	36
3.2 Potencial hidrolítico de los diferentes aislamientos .....	36
3.3 Microorganismos celulolíticos: identificación morfológica y molecular.....	38
3.3.1. Tinción de Gram .....	38

3.3.2	Identificación molecular de las bacterias celulolíticas .....	40
3.3.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa y visualización de los fragmentos de amplificación .....	40
3.3.2.2	Identificación de las bacterias celulolíticas .....	41
3.3.2.3	Análisis de filogenias .....	43
3.3.3	Actividad amilolítica .....	45
3.3.4	Evaluación del potencial celulolítico .....	46
3.4	Actividad de sobrenadantes.....	49
3.5	SDS-PAGE.....	50
4	DISCUSIÓN.....	53
	Microflora de <i>Grania</i> sp. ....	53
	Celulasas sicrófilas, un aporte a la biotecnología .....	56
	Ensayo preliminar de producción de celulasas por AUG 38 .....	57
	Localización extracelular de las celulasas: ¿Libres o asociadas a la membrana? .....	59
	¿Qué proteínas hay en los sobrenadantes?.....	60
5	CONCLUSIONES .....	61
6	BIBLIOGRAFÍA .....	62
	ANEXO .....	72
	Medios de cultivo.....	72
	SDS-PAGE.....	74
	Otros <i>Buffers</i> y soluciones.....	76

## RESUMEN

Las enzimas son catalizadores biológicos muy útiles en procesos biotecnológicos. Entre estas, las hidrolasas ocupan la gran mayoría del mercado mundial de enzimas. Ejemplos de hidrolasas son las proteasas (que hidrolizan enlaces peptídicos), lipasas y esterasas (que hidrolizan enlaces éster de triglicéridos de cadena larga y corta, respectivamente), glicosilasas (como amilasas, que hidrolizan almidón; agarasas, que degradan agar; celulasas, que actúan sobre compuestos celulósicos). Estas enzimas se utilizan en las industrias alimenticias, textiles, de detergentes, en los procesos de biorremediación, producción de fármacos, agroquímicos, papel y biocombustibles, entre otros.

Las enzimas adaptadas al frío (sicrófilas) son las producidas por los microorganismos que se reproducen a bajas temperaturas (sicrófilos y sicrotolerantes, temperatura óptima de crecimiento inferiores o iguales a 15 °C y de 15 °C a 20 °C, respectivamente). Poseen una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, comparado con las enzimas derivadas de microorganismos mesófilos y termófilos (temperatura óptima de crecimiento 35-39 °C y por encima de los 45 °C, respectivamente). En la búsqueda de enzimas sicrófilas, se propuso la siguiente hipótesis: *Grania* sp.; un oligoqueto que habita las costas de la Bahía Maxwell (Antártida), posee una microflora que ayudaría a degradar los componentes de las algas, (como proteínas, lípidos, almidón, agar, celulosa, entre otros), mientras que el oligoqueto brindaría un nicho apropiado para que se desarrolle una comunidad microbiana. Entre estos microorganismos, podríamos encontrar algunos productores de proteasas, lipasas, agarasas, amilasas y celulasas activas en frío, con potenciales usos en biotecnología.

Durante este trabajo se obtuvo una colección de 55 aislamientos microbianos del intestino de *Grania* sp. (bacterias y levaduras) proteolíticos, agarolíticos, amilolíticos y celulóliticos. El resto del trabajo se focalizó en las bacterias celulóliticas. Estas se identificaron por secuenciación y comparación en bases de datos del gen codificante para la subunidad ribosomal 16S, y la filiación se verificó construyendo árboles filogenéticos. Además, se determinó su potencial celulólitico en placa conteniendo carboxi metil celulosa (CMC) a diferentes temperaturas. El aislamiento identificado

como *Pseudomonas* sp. AUG 38 presentó el mayor potencial celulolítico a 10, 20 y 30 °C, y se tomó como modelo para poner a punto la producción de celulasas, probando distintos sustratos celulósicos como principal fuente de carbono y energía.

El objetivo a largo plazo de este trabajo sería obtener un sobrenadante de cultivo capaz de hidrolizar (sacarificar) celulosa a temperaturas compatibles con la de fermentación alcohólica realizada comúnmente por *Saccharomyces cerevisiae* (30 - 35 °C) y poder realizar ambos procesos en un solo paso para la obtención de bioetanol.

# 1 INTRODUCCIÓN

## ¿Qué es la Biotecnología?

En un informe realizado por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), publicado en 1982, se define la biotecnología como la “*aplicación de los principios científicos y técnicos al tratamiento de los materiales por los agentes biológicos para obtener bienes y servicios*”; siendo los “agentes” microorganismos, células animales y vegetales, o enzimas; y los “bienes y servicios” los productos de las industrias farmacéuticas, biomédicas, de la alimentación y de transformación de materias primas en general para numerosos servicios (Cegarra, 2012).

Comparado con los métodos tecnológicos que aplican procesos químicos tradicionales, la biotecnología proporciona múltiples ventajas a las industrias que la utilizan. En muchos casos, los procesos biotecnológicos permiten un mayor rendimiento, pero más importante es que suelen ser más amigables con el ambiente, ya que reducen la cantidad de productos contaminantes. Además, algunos procesos biotecnológicos se encargan de solucionar problemas de contaminación, lo cual conocemos como biorremediación (Singh & Ward, 2004).

### 1.1 Enzimas

Muchas reacciones químicas ocurren espontáneamente, mientras otras requieren de un catalizador para que ocurran en tasas significativas. Este catalizador no se consume ni se altera durante la reacción, y en teoría podría ser utilizado indefinidamente en la conversión de un sustrato a su producto, aunque en la práctica no se puede reutilizar indefinidamente (Illanes, 2008). Las enzimas son catalizadores biológicos, y son además una de las herramientas utilizadas en biotecnología.

Las enzimas se clasifican, según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), según la naturaleza de las reacciones químicas que catalizan, y se les asigna un número EC (*Enzyme Commission*) (Voet et al., 2009).

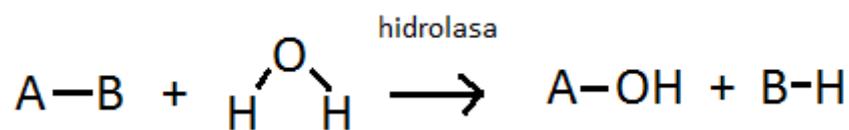
Existen seis grupos de enzimas:

- 1) óxidoreductasas, EC 1, que catalizan reacciones de oxidoreducción;
- 2) transferasas, EC 2, involucradas en la transferencia de grupos funcionales;
- 3) hidrolasas, EC 3, que catalizan reacciones de hidrólisis;
- 4) liasas, EC 4, que eliminan grupos funcionales para formar dobles enlaces;
- 5) isomerasas, EC 5, que intervienen en reacciones de isomerización; y
- 6) ligasas, EC 6, que catalizan la formación de enlaces acoplado a la hidrólisis de ATP

En base a los objetivos de esta tesis, las siguientes secciones se focalizarán en la información sobre las hidrolasas, que son las enzimas que ocupan la gran mayoría del mercado de enzimas a nivel mundial (Monte et al., 2013). Específicamente, se realizará mención a las proteasas y lipasas/esterasas así como a las glicosilasas (también llamadas carbohidrasas), con énfasis en las celulasas.

### 1.1.2 Hidrolasas

Las hidrolasas (EC 3) son las enzimas que catalizan la hidrólisis de un enlace químico, según se muestra en la Figura 1.1.



**Figura 1.1** Ecuación de reacción de hidrólisis, mediada por una hidrolasa

Según el tipo de enlace que hidrolizan, a este tipo de enzimas se les asigna un segundo número EC, según se indica en la Tabla 1.1.

**Tabla 1.1** Clasificación de hidrolasas

Número EC	Enlace sobre el que actúa	Ejemplos
3.1	Éster	Lipasas, esterases
3.2	Glicosídico	Celulasas, agarasas, amilasas
3.3	Éter	Éter hidrolasas
3.4	Peptídico	Proteasas
3.5	Carbono-Nitrógeno (no peptídico)	Amidasas
3.6	Anhídrido	GTP asas
3.7	Carbono-Carbono	Oxaloacetasas
3.8	Hidrógeno-halógeno	Haloalcano dehalogenasas
3.9	Fósforo-Nitrógeno	Fosfoamidasas
3.10	Fósforo-Azufre	Ciclamoto sulfhidrolasas
3.11	Fósforo-Carbono	Fosfonopiruvato hidrolasas
3.12	Azufre-Azufre	Tritionato hidrolasa
3.13	Carbono-Azufre	UDP sulfoquinovosa sintasa

Datos tomados de <http://enzyme.expasy.org/>

### 1.1.2.1 Proteasas

Las proteasas o peptidasas son las enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos (EC 3.4, Tabla 1.1). Dependiendo de si hidrolizan enlaces peptídicos dentro o en la terminación de la cadena peptídica, se las clasifica en endopeptidasas o exopeptidasas, respectivamente. Estas enzimas también se clasifican en familias en base a su estructura tridimensional y al aminoácido característico presente en su sitio activo, lo cual se indica con una letra: S, serina proteasas; C, cisteína proteasas; M, proteasas metálicas; A, proteasas aspárticas; G, glutamato proteasas; N, asparragino proteasas; y T, treonina proteasas. Por más información, se puede consultar la base de datos de proteasas conocida como MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

Este grupo de enzimas tiene aplicación en diversos campos en la industria. Abarcan la alimenticia, como durante la elaboración de cerveza, quesos, panificación, preparación

de concentrados de proteína; industria de la curtiembre (depilación de cueros); industria textil, por ejemplo en el tratado de la seda; industria de detergentes, como aditivo de jabones en polvo para lavar ropa; industria farmacéutica, en el tratamiento de heridas purulentas; biorremediación; industria fotográfica, entre otros (Kumar & Takagi, 1999; Joshi & Satyanarayana, 2013).

### **1.1.2.2 Lipasas y esterasas**

Ambas son enzimas que hidrolizan enlaces éster (EC 3.3). Las lipasas catalizan la hidrólisis de ácidos grasos de cadenas largas en los triglicéridos, generalmente insolubles en agua. En cambio, las esterasas presentan actividad sobre sustratos solubles en agua, hidrolizando ácidos grasos de cadena corta. Existe una base de datos centralizada (LIPABASE; <http://www.lipabase-pfba-tun.org>) que proporciona información sobre lipasas de diferentes especies, e incluye información taxonómica, así como aspectos fisicoquímicos y datos moleculares de las mismas.

Ambos tipos de enzimas tienen importante aplicación en biocatálisis: industria farmacéutica, producción de agroquímicos, también en la producción de biodiesel, y en la industria de los detergentes (Fojan et al., 2000; Joseph et al., 2007).

### **1.1.2.3 Glicosilasas**

Las glicosilasas o glicosil hidrolasas son enzimas que hidrolizan el enlace Glicosídico (EC 3.2). La base de datos CAZy (Carbohydrate Active Enzyme; <http://www.cazy.org/>) describe las familias de enzimas que degradan, modifican o crean enlaces glucosídicos. Ejemplos de éstas son las agarasas, amilasas y celulasas.

#### **1.1.2.3.1 Agarasas**

El agar está compuesto por una mezcla de agarosa y agaropectina, ambos son complejos de galactosa. Constituye el 60 % del peso seco de las algas rojas. A partir de su hidrólisis se obtienen numerosos azúcares monoméricos, que son utilizados en la industria de

biorrefinería y producción de biocombustibles (Chi et al., 2012). Las agarasas, son responsables de su hidrólisis enzimática. Son clasificadas según el patrón de clivaje en dos tipos:  $\alpha$ -agarasas (E.C. 3.2.1.158), y  $\beta$ -agarasas (E.C. 3.2.1.81), las cuales actúan sobre enlaces  $\alpha$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 respectivamente (Ting & Moo, 2010).

### 1.1.2.3.2 Amilasas

Estas enzimas son capaces de hidrolizar almidón. Éste es un polímero de glucosas unidas por enlaces  $\alpha$  1-4, con algunas ramificaciones  $\alpha$ -1,6 que ante su hidrólisis por estas enzimas, libera moléculas de glucosa, dextrina (oligosacárido ópticamente activo), y otros oligosacáridos. Se usan en la industria del papel (en procesos de desteñido) y en la alimenticia (para suavizar la textura del pan y otros horneados) (Asgher et al., 2007).

### 1.1.2.3.3 Celulasas

Las celulasas son las enzimas responsables de la degradación de la celulosa. En general los organismos producen varias enzimas que actúa en forma sinérgica hidrolizando la celulosa y hemicelulosa. Estas enzimas presentan actividad endocelulasa, exocelulasa y  $\beta$ -glucosidasa, que degradan la celulosa a oligosacáridos, hasta llegar al monosacárido que compone la celulosa: la glucosa (Cavaco, 1998).

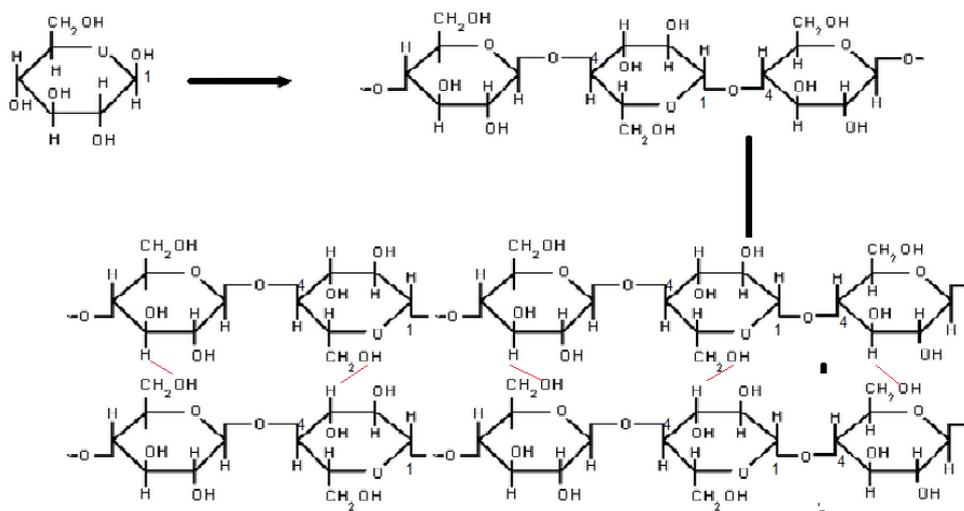
## 1.2 Celulasas: las carbohidrasas que ocupan el 20% del mercado mundial de enzimas

### 1.2.1 Celulosa: estructura del polímero sustrato de las celulasas

Las plantas sintetizan alrededor de  $4 \times 10^9$  toneladas de celulosa anuales (Tomme et al., 1995), también las algas producen una gran cantidad, (Baldán et al., 2001), y constituye una fuente renovable de azúcares.

La celulosa es un polímero lineal de alto peso molecular, compuesto por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$  1-4, formando cadenas que a su vez se ordenan mediante enlaces de hidrógeno con otras cadenas, generando diversos arreglos cristalinos (Fig. 1.2) (Guarnizo et al., 2009; Park et al., 2010).

La hemicelulosa, en cambio es un heteropolisacárido compuesto por unidades de hexosas, pentosas y sus ácidos urónicos (Vibe & Ulvscov, 2010). Este polímero forma parte de las paredes de las células vegetales y recubren las fibras de celulosa.



**Figura 1.2** Celulosa. Arriba a la izquierda, se muestra una molécula de glucosa. A la derecha se muestra una cadena de glucosas unidas por enlaces  $\beta$  1-4. Más abajo se muestran los enlaces de hidrógeno que se forman entre los átomos de distintas cadenas, conectando así las diferentes cadenas de glucosas.

### 1.2.2 Clasificación de celulasas

Estas enzimas se clasifican según el sitio o punto de acción donde realizan la hidrólisis de la cadena de celulosa (Fig. 1.3). Las endoglucanasas (EC 3.2.1.4) hidrolizan enlaces internos de la celulosa, produciendo cadenas de oligosacáridos y por lo tanto aumentando el número de extremos. Las exoglucanasas, actúan en los extremos de la cadena de polisacáridos de celulosa, liberando celobiosa (catalizado por las celobiohidrolasas EC 3.2.1.91) o glucosa (catalizado por las glucanohidrolasas EC 3.2.1.73) (Sadhu & Maiti, 2013). Las celobiasas o  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21) son

también exoglucanasas, pero en este caso hidrolizan el enlace  $\beta$ -glucosídico de la cellobiosa, liberando dos moléculas de glucosa.

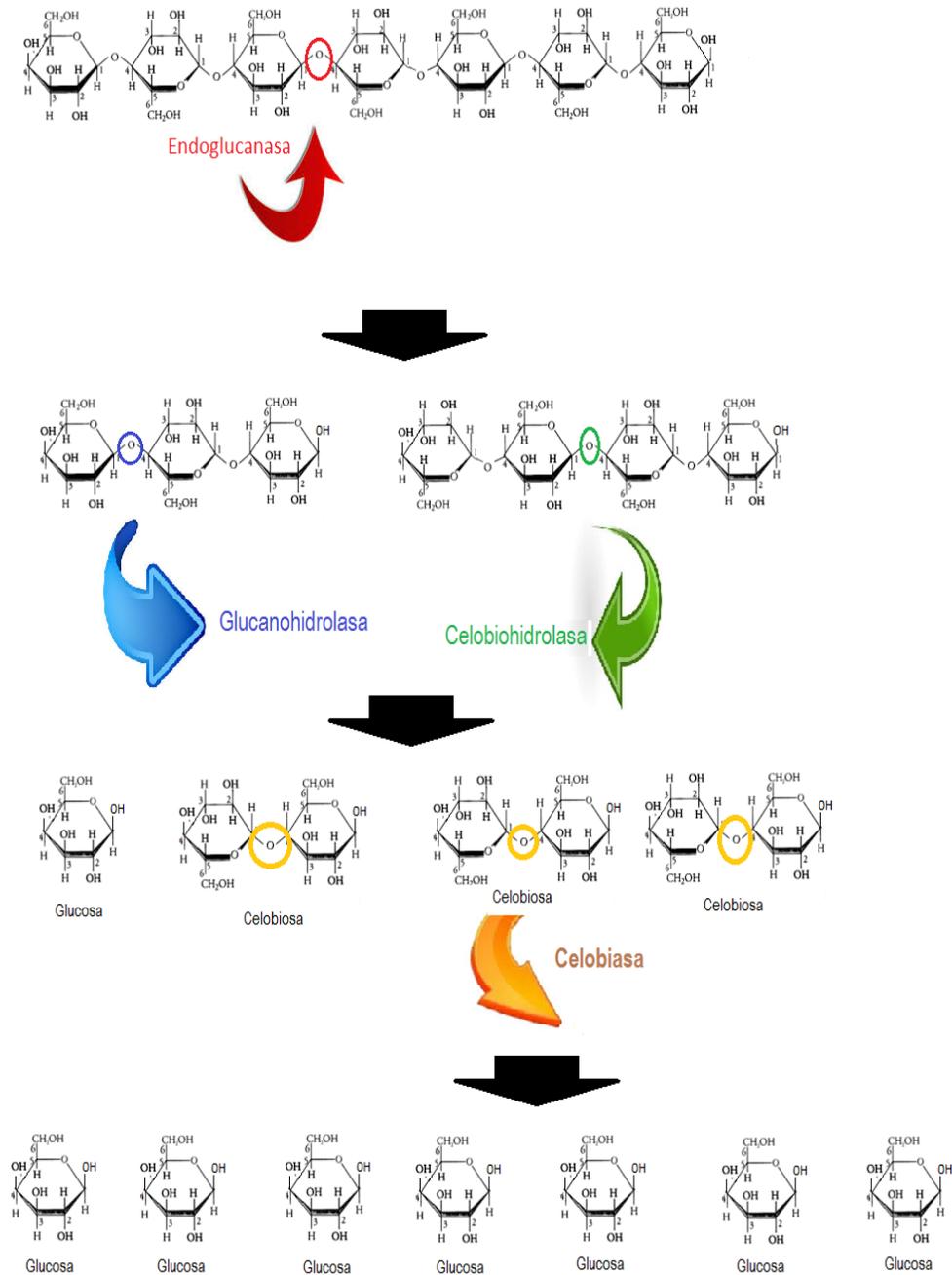
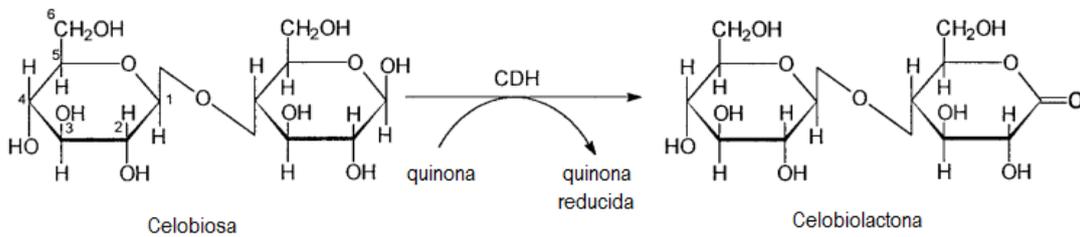


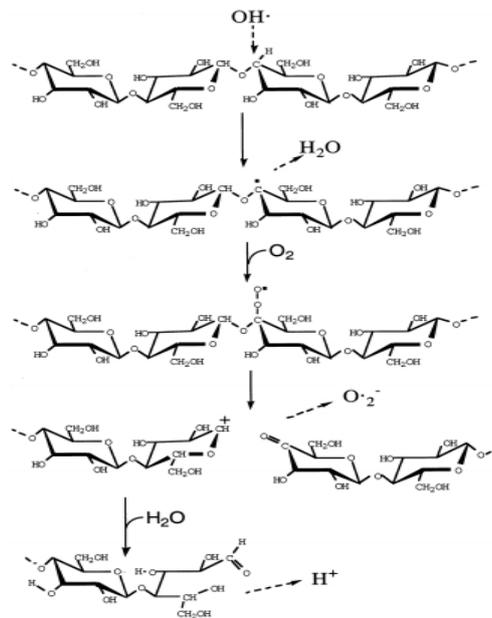
Figura 1.3 Celulasas y su modo de acción.

Existen además celulasas oxidativas (no hidrolasas) como la celobiosa deshidrogenasa que despolimeriza indirectamente la celulosa. Esta enzima oxida la celobiosa a celbiolactona (Fig. 1.4), utilizando mayormente quinonas como aceptor de electrones (Cohen et al., 1997; Cameron & Aust, 2001). Sin embargo, se sugiere que también podría actuar sin un aceptor aromático, produciendo radicales libres (reacción de Fenton), los cuales atacarían los enlaces  $\beta$ -1,4 de la celulosa, despolimerizándola según se muestra en la Figura 1.5 (Henriksson et al., 2000).

También hay celulasas fosforilasas que actúan sobre la celulosa, liberando residuos de glucosa, pero usando pirofosfatos en vez de agua como nucleófilo (Saranraj et al., 2012).



**Figura 1.4** Reacción catalizada por la Celobiosa deshidrogenasa (CDH). Se da la oxidación de celobiosa a celbiolactona.



**Figura 1.5** Esquema de despolimerización de celulosa a partir de radicales libres. Imagen tomada de Henriksson et al. (2000).

### 1.2.3 Organismos productores de celulasas

Tanto algunos eucariotas como algunos procariotas pueden sintetizar celulasas (Davison & Blaxter, 2005; Tanimura et al. 2013). Sin embargo, durante esta tesis se hará hincapié en la producción de celulasas por procariotas.

#### 1.2.3.1 Plantas

Existen celulasas sintetizadas por las plantas, que actúan en diversas etapas del desarrollo vegetal, hidrolizando las paredes celulares (Bennett & Christoffersen, 1986).

#### 1.2.3.2 Animales

También existe degradación de celulosa por parte de algunos animales que producen celulasas endógenas. Estas han sido detectadas en nematodos parásitos de plantas (por ejemplo *Globodera rostochiensis*), así como en algunos artrópodos terrestres (insectos como la termita *Nasutitermes takasagoensis*) y moluscos como los gasterópodo marinos *Dolabella auricularia* y *Aplysia kurodai*, quienes resultan ficófagos gracias a ello (Watanabe & Tokuda, 2001, 2010; Lo et al. 2011; Tsuji et al., 2013). Sin embargo, la mayoría de los animales no pueden degradar la celulosa por sí solos, y cuentan para ello con una microflora simbiote con capacidad celulolítica (Brune & Ohkuma, 2011).

#### 1.2.3.3 Microorganismos celulolíticos

Numerosas bacterias y hongos, así como también algunos protozoarios, degradan naturalmente la celulosa. Los hay aerobios, anaerobios, mesófilos, termófilos (Saranraj et al., 2012) y sicrofilos (Kasana & Gulati, 2011), neutrófilos, alcalófilos, acidófilos y halófilos, por lo cual se dice que los microorganismos celulolíticos colonizan una gran variedad de ambientes (Ljungdahl & Eriksson, 1985).

Se han aislado microorganismos con capacidad celulolítica provenientes del suelo, de intestinos de animales, por ejemplo termitas, así como del rumen y de sedimentos

marinos y lagos, entre otros (Deng & Tabatabai, 1994; Wenzel et al., 2002, Teather & Wood, 1982).

Algunas especies de hongos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Aspergillus*, *Phanerochaete*, *Fusarium* y *Talaromyces* se han reportado como celulolíticas (Mc Hale & Coughlan 1981, Persson, et al., 1991).

También especies pertenecientes a los géneros bacterianos *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora*, *Streptomyces*, *Ruminococcus*, *Bacteroides*, *Erwinia*, *Acetivibrio*, (Shweta, 2012) *Cellvibrio*, *Nocardiopsis*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* (Sadhu & Maiti, 2013), producen enzimas celulolíticas.

Estos microorganismos celulolíticos producen una variedad de módulos enzimáticos que actúan sinérgicamente sobre la celulosa. En algunos microorganismos (por ejemplo *Clostridium thermocellum*) las celulasas se organizan en un complejo de degradación, denominado celulosoma (Bayer et al., 1998).

No existen muchos reportes sobre la regulación de la producción de celulasas por microorganismos. Se conoce que la expresión de las celulasas en *Trichoderma reesei* se induce solamente en presencia del sustrato celulósico y se reprime si hay una fuente de azúcares simples disponibles para utilizar como fuente de carbono y energía (Sukumaran et al., 2005). El estudio y optimización de la producción de celulasas activas por parte de los microorganismos está en auge, debido a la importancia de estas enzimas en el mercado biotecnológico.

#### 1.2.4 Celulasas en biotecnología

La celulosa es el biopolímero más abundante de la Tierra, y constituye una significativa fuente de azúcares económicos (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2011). Sin embargo, su estructura cristalina no es fácil de degradar ni por métodos enzimáticos ni químicos (Jiménez et al., 2010). Por ello se continúa la búsqueda de nuevas celulasas, que puedan contribuir a la industria de una manera eficiente. Las celulasas y hemicelulasas ocupan el 20 % del mercado mundial de enzimas (Mantyla et al., 1998; Bhat, 2000) y tienen numerosas aplicaciones industriales, algunas de las cuales se describirán a continuación.

#### 1.2.4.1 Industria textil

Las celulasas se utilizan para el tratamiento de telas producidas con fibras de celulosa. Por ejemplo, el acabado final de los *jeans* (producidos con tejido de algodón) se da mediante lavados con piedra pómez (lavado a la piedra). Sin embargo, últimamente estos tratamientos se están sustituyendo por tratamientos enzimáticos con celulasas, que cortan las fibras de la superficie del algodón, permitiendo un tratamiento más suave y menos abrasivo. El tratamiento enzimático resulta más económico y amigable con el medio ambiente, que otros tratamientos mecánicos y químicos (Belghith et al., 2001; Ibrahim et al., 2011).

#### 1.2.4.2 Industria de los detergentes

Las celulasas se utilizan en detergentes para ropa. Estas enzimas, junto a lipasas y proteasas, se agregan a los detergentes químicos, optimizando la limpieza y tratamiento de la ropa. Para este uso, se seleccionan aquellas enzimas activas a pH alcalino, alta concentración de sales y tensoactivos, entre otros.

Su modo de acción ayuda a la limpieza, ya que al ponerse en contacto selectivamente con las fibras de celulosa, actúan eliminando la suciedad entre las fibras (Cavaco, 1998). A su vez, mejoran la apariencia del tejido, ya que eliminan fibrillas que se desprenden durante el uso, dejando la superficie más lisa, con el color más visible; disminuyen la hidrofobicidad de la tela, lo que facilita el lavado; y aumentan su suavidad (Kuhad et al., 2011).

#### 1.2.4.3 Industria alimenticia

Las celulasas se utilizan en numerosos procesos de la industria alimenticia. Se usan para la extracción de jugos vegetales, producción de néctares y purés, en la extracción de aceite de oliva, tratamiento de semillas y granos. También se usan en la elaboración de cerveza, en la industria del vino, en la extracción de carotenoides, etc. Se usan además

en la industria de la panificación, para aumentar la cantidad de monosacáridos en la masa, incrementando así su elasticidad. (Coughlan & Folan, 1978; Nadeem et al., 2009).

Además, las celulasas se agregan como aditivos en forrajes, optimizando las propiedades nutritivas de los alimentos al facilitar su digestión (Saranraj et al., 2012).

#### 1.2.4.4 Industria papelera

Tradicionalmente, la obtención de pulpa de celulosa se realiza de forma mecánica. Sin embargo, si se realiza una refinación y molienda de la materia prima leñosa de forma mecánica, y luego se hace un tratamiento con celulasas y hemicelulasas (enzimas que degradan la hemicelulosa), se obtiene una pulpa de celulosa más resistente y más barata. También son utilizadas para el tratamiento de fibras de celulosa, por ejemplo para reducir asperezas e incrementar el brillo, entre otros.

A su vez, se utilizan para el tratamiento del papel a reciclar. El tratamiento con celulasas ayuda a desprender los colorantes presentes en estos, facilitando su reciclaje (Bhat, 2000).

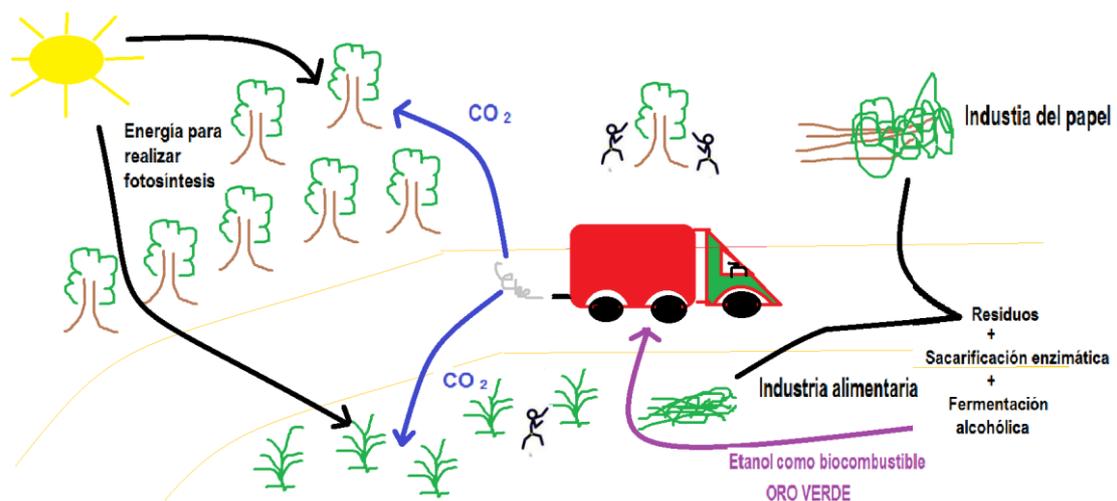
#### 1.2.4.5 Industria de los biocombustibles

Actualmente estamos experimentando un cambio de paradigma, dejando de lado la economía social en base al petróleo, a una economía basada en recursos renovables. La celulosa es un material vegetal abundante y renovable. El uso de las celulasas para la degradación (sacarificación) de residuos vegetales representa una prometedora forma de obtener azúcares, los que por fermentación darán etanol. Este etanol de celulosa se conoce con el nombre de “oro verde” (Pichs, 2008) (Figura 1.5) y puede utilizarse como biocombustible, con dos ventajas: la obtención económica del alcohol y la utilización de materiales celulósicos considerados subproductos industriales (Knauf & Moniruzzaman, 2004; Chandel et al., 2012, Zittelli, et al., 2013).

A su vez, la sacarificación enzimática es más amigable con el medio ambiente, comparado con la hidrólisis ácida o básica de celulosa con productos químicos. Y

comparada con la hidrólisis a altas temperaturas, la enzimática requiere menor consumo de energía.

Generalmente el proceso de sacarificación se realiza de manera independiente a la fermentación. Sin embargo, existe una activa búsqueda de procedimientos para realizar ambos procesos (sacarificación y fermentación) en un solo paso. Por ejemplo, este proceso podría realizarse con microorganismos anaeróbicos que puedan sacarificar el material vegetal al mismo tiempo que realicen la fermentación alcohólica, con rendimientos significativos (Wilson, 2009).



**Figura 1.5** Producción de biocombustibles. Se muestra un ciclo donde se utilizan los residuos vegetales en la producción de etanol, obteniéndose energía renovable.

### 1.3 Antártida como fuente de enzimas novedosas

#### 1.3.1 Continente antártico

La Antártida abarca los territorios al sur del paralelo 60 °S. Con excepción de la península antártica, todo el territorio se ubica dentro del Círculo Polar Antártico. Tiene una superficie de unos 14 millones de km<sup>2</sup>, y solo el 1 % se encuentra libre de hielo. Es el continente más frío, más seco y más ventoso de todo el planeta. La temperatura del mes más cálido (enero) promedia los 0,4 °C en la costa y los -40 °C en el interior del continente; mientras que en el invierno, el promedio oscila los -23 °C a -68 °C. (Moreano

& Riofrío, 2010), sin embargo, a pesar del clima, existen numerosos seres vivos que están adaptados a las severas condiciones de Antártida.

### 1.3.2 Enzimas microbianas adaptadas al frío

Las enzimas adaptadas al frío o enzimas psicrófilas, son las enzimas producidas por los microorganismos que son capaces reproducirse a bajas temperaturas (psicrófilos y psicrotolerantes). Los psicrófilos tienen temperatura óptima de crecimiento a 15 °C, o inferiores (Morita, 1975) y los psicrotolerantes crecen a 0 °C, pero su temperatura óptima de crecimiento está en el rango de los 15 a 20 °C. Las enzimas producidas por estos de microorganismos poseen una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, comparado con las enzimas derivadas de microorganismos mesófilos y termófilos (temperatura óptima de crecimiento 35-39 °C y por encima de los 45 °C, respectivamente). Existen registros de enzimas psicrófilas capaces de catalizar, a bajas temperaturas, reacciones a velocidades de hasta un orden de magnitud mayor que las enzimas homólogas mesófilas (D'Amico et al., 2006; Madigan et al. 2003).

### 1.4 *Grania* sp. y su intestino

*Grania* es un género de oligoquetos, perteneciente a la familia Enchytraeidae. Este género posee 72 especies descritas que habitan desde costas a grandes profundidades oceánicas de diferentes partes del mundo, desde aguas tropicales, hasta aguas frías (De Wit, 2010). Por ejemplo, uno de sus hábitats es la costa de la Bahía Maxwell en la Isla Rey Jorge, Antártida, donde existe una especie de este género, aún no reportada en la bibliografía (comunicación personal del Prof. Rodrigo Ponce de León).

Los oligoquetos *Grania*, son gusanos delgados y pequeños. Se identifican por los siguientes caracteres morfológicos: las quetas, glándulas medioventrales, estilete peneal, coloración y posesión de cabeza (De Wit, et al., 2011).

En particular, la especie con la cual trabajamos durante esta tesis, se alimenta de las algas rojas y pardas presentes en la playa frente a la Base Científica Antártica Artigas

(Figura 1.6). Se trata de un oligoqueto de aproximadamente 7 mm de largo y 1 mm de diámetro.



**Figura 1.6** *Grania* sp. presente en las costas de la Bahía Maxwell, Antártida. Gentileza de Florencia Salvo.

Existen trabajos que reportan microflora de oligoquetos de diversos géneros, como *Phalldrillus*, *Inanidrillus*, *Olavius*, *Tubificoides*, *Fridericia*, *Mesenchytraeus*, entre otros (Giere & Langheld, 1987; Rashed et al. 1992; Blazejak, 2005; Rühland, 2010, Muirakami et al. 2015). Pero hasta donde conocemos, no existiría información sobre la composición de la microflora intestinal de oligoquetos del género *Grania*.

Como se trata de animales que viven en la Antártida, y son animales ectotermos, cuya temperatura corporal varía según el ambiente, se cree que su microflora asociada es sicrófila o sicrotolerante.

## Hipótesis

Basados en que el oligoqueto de estudio en esta tesis, *Grania* sp., se alimenta de las algas rojas y pardas presentes en la costa de la Bahía Maxwell, nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo: *Grania* sp. posee una microflora intestinal, donde existiría un mutualismo: los microorganismos degradan los componentes de las algas, y *Grania* sp. brinda un nicho apropiado para que se desarrolle una comunidad microbiana en su intestino. Estos microorganismos producirían y secretarían enzimas hidrolíticas capaces de participar en los procesos digestivos, a bajas temperaturas, dado a que los oligoquetos son ectotermos. Entre estos microorganismos, deberían encontrarse algunos productores de celulasas sicrofílicas, y se podría explorar su potencial uso en algunas industrias, tales como para la producción de bioetanol.

## Objetivos

### Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la microflora intestinal de *Grania* sp. de origen antártico. Analizar la capacidad de estos microorganismos de producir enzimas hidrolíticas activas a bajas temperaturas, para futuras aplicaciones biotecnológicas.

### Objetivos específicos

1. Aislar microorganismos provenientes del intestino del oligoqueto *Grania* sp., utilizando medios de cultivo diferenciales para la selección de microorganismos agarolíticos, lipolíticos, proteolíticos y celulolíticos, a bajas temperaturas.
2. Probar la capacidad de todos los aislamientos de producir diferentes enzimas hidrolíticas.
3. Identificar, por secuenciación de la subunidad ribosomal 16S, aquellos microorganismos que posean actividades interesantes.
4. Analizar los microorganismos productores de celulasas, determinando la capacidad de éstos para producir enzimas celulolíticas a distintas temperaturas (10 °C, 20 °C y 30 °C).
5. Evaluar la capacidad de sacarificación del microorganismo que demostraría mayor capacidad hidrolítica de celulosa a 20 °C y 30 °C.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

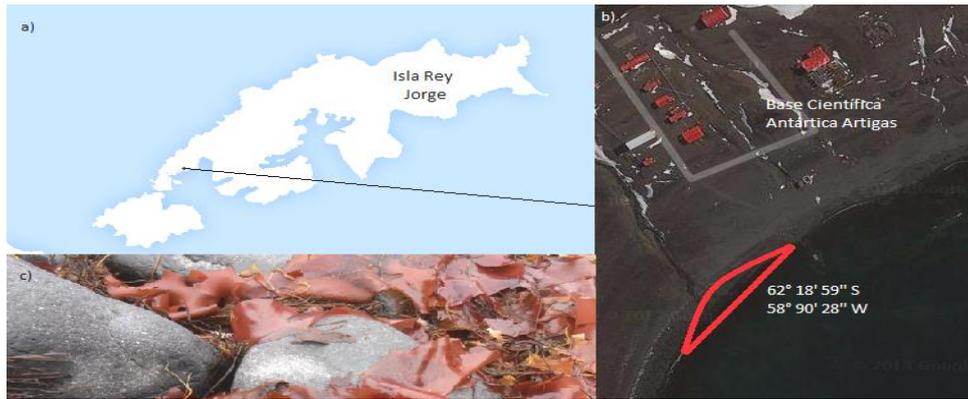
### 2.1 Colecta de *Grania* sp.

Se colectaron oligoquetos *Grania* sp. en las costas de la Bahía Maxwell, de la Isla Rey Jorge (62° 18' 59" S; 58° 90' 28" W), próximos a la Base Científica Antártica Artigas (BCAA) (Fig. 2.1). La búsqueda de oligoquetos se realizó entre las algas rojas y pardas presentes en la playa. Con guante de látex se tomaron las algas y oligoquetos y se colocaron en una bolsa de nylon del tipo Zyploc, para su traslado al laboratorio de la BCAA.

Los animales se separaron de restos de algas cerrando la bolsa en forma hermética, para que luego de unas horas de almacenamiento en la heladera (10 °C) los oligoquetos migraran por la superficie interna de la bolsa, en busca de oxígeno, separándose de las algas.

Los oligoquetos se tomaron con pinza estéril (por flambeado) y se lavaron tres veces en suero fisiológico estéril (SFE; Anexo Otros *Buffers* y soluciones). Finalmente, se procedió a la remoción de sus intestinos en forma aséptica, por parte del Prof. Rodrigo Ponce de León.

Debido al pequeño tamaño de los oligoquetos (aproximadamente de 1 mm de diámetro y 7 mm de longitud) fue difícil extraerles el intestino; por lo que se les realizó un corte longitudinal, exponiendo el contenido intestinal al medio. A su vez se los cortó transversalmente en fragmentos de 2 mm. Los trozos se sumergieron en 5 mL de SFE estéril y la ruptura de los mismos se realizó en forma mecánica. Se tomaron con una jeringa de 1 mL y se forzaron a pasar por una aguja de 0,4 mm de diámetro, vaciando su contenido en un tubo Falcon estéril de 15 mL. El procedimiento de ruptura se realizó dos veces más, para finalmente obtener el homogenizado, conteniendo material animal y microbiano.



**Figura 2.1.** Lugar de la colecta de oligoquetos. a) Isla Rey Jorge, Antártida, b) Bahía Maxwell y Base Científica Antártica Artigas. La zona de colecta se muestra indicada con rojo; c) Algas rojas y pardas presentes entre las rocas.

## 2.2 Enriquecimiento de microorganismos productores de enzimas hidrolíticas utilizando medios diferenciales

El homogeneizado se utilizó para sembrar medios diferenciales para el aislamiento de microorganismos capaces de producir las siguientes enzimas hidrolíticas: celulasas, lipasas, agarasas y proteasas (Fig. 2.2).

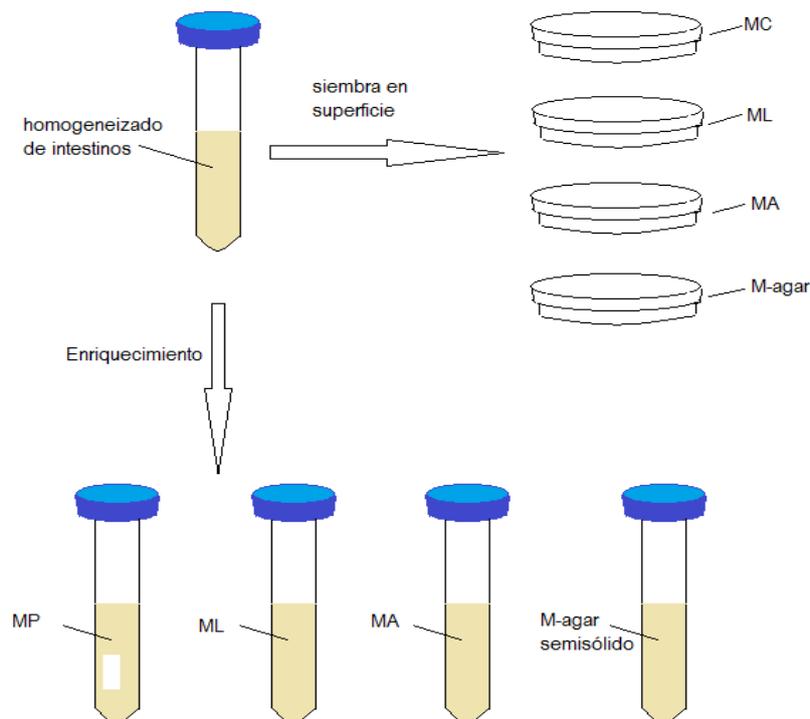
### 2.2.1 Siembra en superficie sobre medios diferenciales

Se realizó la siembra en superficie de 100  $\mu$ L del homogeneizado sobre placas conteniendo los diferentes medios diferenciales (ver Anexo de Medios de Cultivo), solidificados con agar al 1.5%; y se incubaron a 10 °C durante una semana. Los medios se denominaron MC, ML y MA, y se utilizaron para favorecer el crecimiento de aquellos microorganismos que utilizaran como principal fuente de carbono a carboxi-metil celulosa (CMC), leche descremada y aceite de oliva, respectivamente. De esta manera se favorece el crecimiento de microorganismos con actividad celulolítica, proteolítica y lipolítica, respectivamente. También se realizó la siembra en superficie sobre placas que contenían medio M-agar, sin el agregado de una fuente de carbono adicional (excepto la triptona y el extracto de levadura, que se agregaron en pequeñas concentraciones),

para aislar microorganismos capaces de licuar el agar (agarolíticos), aunque estos microorganismos podrían directamente ser detectados en cualquiera de los otros medios ensayados. Los medios se describen en el Anexo de Medios de cultivo.

### 2.2.2 Enriquecimiento en medios diferenciales líquidos

Por otro lado, se sembraron 200  $\mu$ L del homogeneizado en tubos conteniendo 5 mL de medios líquidos de enriquecimiento diferenciales, y se incubó con agitación (200 rpm) a 10 °C. En este caso se utilizaron los medios MP (donde se utilizó papel de filtro estéril para el enriquecimiento en microorganismos celulolíticos), ML y MA. Y a su vez se utilizaron tubos con medio semisólido (M-agar semisólido), para el enriquecimiento en microorganismos agarolíticos. Luego de los 15 días de incubación, se sembraron 100  $\mu$ L de los diferentes cultivos en superficie, sobre placas conteniendo medio LB (Anexo de Medios).



**Figura 2.2.** Siembra en superficie y enriquecimiento para microorganismos que utilicen celulosa (MC), papel (MP), leche (ML), aceite (MA) o agar (M-Agar) como principal fuente de carbono.

### 2.2.3 Reaislamiento de colonias en medio LB

Se reaislaron las colonias obtenidas según se describen en las secciones 2.2.1 y 2.2.2 (provenientes tanto de las placas con medios diferenciales, como de los caldos de enriquecimiento diferencial) en medio LB. Luego se seleccionaron y numeraron aquellas colonias con diferente morfología (tamaño, color, superficie y borde). La colección de microorganismos se almacenó a -80 °C en glicerol al 15 %.

## 2.3 Exploración del potencial hidrolítico de los diferentes aislamientos

Todos los aislamientos, indistintamente del medio desde el cual fueron aislados, se analizaron en los distintos medios sólidos diferenciales para estudiar la capacidad de producir diferentes enzimas hidrolíticas a 10 °C. Desde cultivos frescos, crecidos en placas con LB, los aislamientos se sembraron con ansa estéril (por incineración) en placas conteniendo los medios: ML, MC, MA y M-agar. Se realizaron tres réplicas biológicas para cada determinación. Las placas se incubaron a 10 °C hasta observar crecimiento de la colonia, y se procedió al revelado de actividad celulolítica y la observación del desarrollo de actividad proteolítica, lipolítica y agarolítica.

Los aislamientos bacterianos que presentaron actividad celulolítica se probaron posteriormente en medio de cultivo con almidón soluble como fuente de carbono (medio MS; S por *Starch*), para explorar la capacidad de los microorganismos de desarrollar actividad amilolítica.

### 2.3.1 Revelado o visualización de actividades hidrolíticas, en placas

Los microorganismos proteolíticos (capaces de hidrolizar la caseína y otras proteínas de la leche) y los lipolíticos (capaces de degradar el aceite de oliva) se distinguieron por producir halos de transparencia alrededor de la colonia.

Los microorganismos con actividad agarolítica (capaces de degradar agar) se identificaron por deformar el agar de la placa, produciendo una depresión del medio debajo y alrededor de la colonia.

Los microorganismos celulolíticos (capaces de degradar CMC) se identificaron porque producen un halo de hidrólisis del CMC, alrededor de la colonia, luego del revelado con el colorante rojo Congo. El revelado se realizó de la siguiente forma: la superficie de la placa se cubrió con una solución de rojo Congo al 0,1% (en agua destilada), se incubó por 15 min a temperatura ambiente, y se lavó con solución de NaCl 0,1 M para quitar el exceso de rojo Congo. En caso positivo, los halos de hidrólisis se visualizan en una tonalidad más clara, alrededor de la colonia, sobre un fondo rojo. La identificación se basa en que el rojo Congo se une fuertemente a los polisacáridos que contienen enlaces  $\beta$  1-4 entre D-glucopiranosidos y con D-glucanos unidos por enlaces  $\beta$  1-3 (Teather & Wood, 1982). Por ello, ante la hidrólisis del CMC, por parte de las enzimas celulolíticas secretadas por los microorganismos, se pueden observar halos de hidrólisis sobre un fondo rojo.

Los microorganismos amilolíticos (capaces de hidrolizar almidón), producen halos de hidrólisis tras el revelado con lugol. Se cubrió la superficie de la placa con lugol (yodo molecular en solución de yoduro de potasio) al 5%. Luego de 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con NaCl 0,1 M. Las colonias con capacidad amilolítica producen halos más claros sobre el fondo azul. Esta coloración se debe a la formación de cadenas de poliyoduro (generalmente triyoduro,  $I_3^-$ ) que se enlazan con el almidón en las hélices del polímero.

## 2.4 Identificación morfológica y molecular de los microorganismos celulolíticos

El trabajo se continuó con los microorganismos que presentaron actividad celulolítica.

### 2.4.1 Tinción de Gram y observación al microscopio

A todos los microorganismos que degradaron CMC se les realizó la tinción de Gram, para clasificarlos en Gram-negativos o Gram-positivos, y observar la forma, agrupación y tamaño de los mismos. Además, la observación permite distinguir las levaduras de las bacterias.

Se preparó un frotis, tocando con punta de ansa la colonia, y esparciéndola con una gota de agua sobre un portaobjeto. Se secó y fijó pasando el portaobjeto tres veces cerca de la llama de un mechero. Se colocó el portaobjetos sobre un soporte para tinciones y se cubrió con solución de cristal violeta al 2 %. Se incubó un min a temperatura ambiente y se lavó suavemente con agua de la canilla. Se cubrió con solución de lugol al 3 % y se incubó un min. Se lavó con agua, se cubrió con etanol 95 % y se incubó por 30 seg moviendo suavemente el portaobjetos. Se lavó con etanol 95% hasta que no se arrastró más colorante. Se lavó con agua. Se cubrió con solución de safranina de concentración 2,5 ng/mL y luego de 15 seg se lavó y dejó secar. Se observó al microscopio de campo claro con lente de inmersión (100 X objetivo, 10 X ocular).

A partir de la observación microscópica, se continuó el trabajo con los aislamientos bacterianos.

## 2.4.2 Identificación molecular de las bacterias

Los aislamientos bacterianos, que por su morfología de colonia y apariencia ante el microscopio lucían diferentes, se identificaron a nivel molecular. Para ello se amplificó y secuenció un fragmento del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal, para su análisis en las bases de datos.

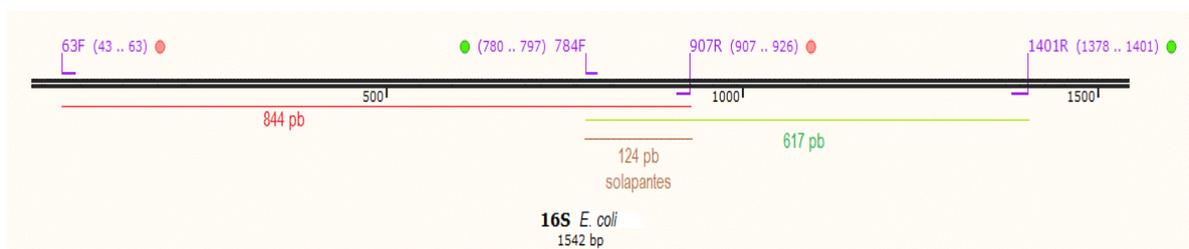
### 2.4.2.1 Preparación del templado de ADN

Se realizaron lisados celulares para obtener el templado de ADN para las PCRs.

Para cada uno de los aislamientos, se trabajó con placas de cultivo recién crecidas. En forma aséptica se tomó el crecimiento de media placa de cultivo en 1 mL de NaCl 1 M estéril y se resuspendió en vortex. Se centrifugó durante 5 min a 8000 rpm, y se descartó el sobrenadante. El *pellet* celular se lavó dos veces con 1 mL de agua Milli Q estéril. Por último, el *pellet* se resuspendió en 100 µL de agua Milli Q estéril, se sometió a ebullición durante 5 min, e inmediatamente se congeló a -20 °C, para producir el choque térmico y lisis celular. Luego se centrifugó durante 5 min a 8000 rpm y se utilizó el sobrenadante como templado de ADN.

## 2.4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y visualización de fragmentos de amplificación

Para amplificar una región del gen 16S se realizó la técnica de PCR utilizando dos juegos de cebadores universales: 1401R - 784F y 907R - 63F, utilizados por Marínez, 2008; (que amplifican fragmentos de 617 y 844 pares de bases, respectivamente) (Tabla 2.1). Cada templado de ADN se amplificó con ambos juegos de cebadores. Estos juegos de cebadores permiten la amplificación de dos fragmentos con secuencias solapantes en 124 nucleótidos, según su posición en *Escherichia coli*, amplificando un total aproximado de 1337 pares de bases (Fig 2.3).



**Figura 2.3.** Esquema de amplificación de los cebadores utilizados, según su posición en *E. coli*.

**Tabla 2.1.** Cebadores para amplificar una región parcial del gen 16S.

Cebador	Secuencia	Temperatura de fusión (Tm)
1401 R	5' CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG 3'	59,1 °C
784 F	5' AAA CAG GAT TAG ATA CCC 3'	58,3 °C
907 R	5' CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT 3'	40,5 °C
63 F	5' CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3'	49,2 °C

El cebador 907 R es degenerado y la R en su secuencia significa A o G.

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  de Buffer de reacción 10X (conteniendo  $\text{MgCl}_2$  25mM; c.f. 2.5 mM), con 2  $\mu\text{L}$  de cada cebador (preparados en agua apirógena estéril para inyectables, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (c.f. 1  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de mezcla de dNTPs (2 mM de cada dNTP preparados en agua para inyectables; (c.f. 1 mM), 1  $\mu\text{L}$  de templado de ADN y 0,2  $\mu\text{L}$  de la enzima Taq DNA polymerase (Bioline 5 U/ $\mu\text{L}$ ; número de catálogo BIO-21085).

El programa de ciclado fue: desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C; seguido de 27 ciclos de desnaturalización de un min a 95 °C, hibridación de cebadores por un min a 58 °C para 907 R - 63 F y 59 °C para 1401 R - 784 F, y extensión de cebadores de un minuto (se utilizó aproximadamente 60 seg de extensión cada 1000 pb a amplificar) a 72 °C. Por último se programó una extensión final de 5 min a 72 °C.

La separación y visualización de los fragmentos se realizó mediante electroforesis y tinción con el intercalante Good View (fabricante SBS). Se realizó la siembra de 2  $\mu\text{L}$  del producto de PCR en un gel de agarosa al 1 %, con Good View incluido (1  $\mu\text{L}$  cada 25  $\mu\text{L}$  de agarosa). La separación de fragmentos se realizó a 60 V, y la presencia de los mismos se evidenció con luz UV. El resultado se registró utilizando el equipo G-BOXm.

#### 2.4.2.3 Purificación del fragmento de amplificación, secuenciación y análisis de la secuencia

La purificación de los fragmentos amplificados desde el gel de agarosa se realizó con el kit comercial ISOLATE DNA Kits (Bioline; Cat. No. BIO-52029), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación de Macrogen, en Corea, desde ambos extremos.

La edición de las secuencias se realizó en forma manual y el empalme de las mismas se realizó utilizando la herramienta BLAST (bl2seq) de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Luego se procedió a la comparación de las secuencias obtenidas con la información depositada en las bases de datos de NCBI y RBD (ribosomal data base, [http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)).

#### 2.4.2.4 Análisis filogenético

Se construyeron árboles filogenéticos para visualizar las relaciones filogenéticas entre los microorganismos analizados y otros de referencia, tomados de la base de datos que ofrece NCBI. Como secuencias de referencia se utilizaron las tres primeras secuencias, que mostraron mayor porcentaje de similitud (por BLASTn). Solo se trabajó con secuencias verificadas y que en su mayoría se relacionaban a microorganismos publicados en la revista *International Journal of Systematic*.

El alineamiento de secuencias se realizó utilizando *ClustalW* con el *software* MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011) y luego se procedió al análisis filogenético y construcción de árboles según los algoritmos de Máxima Parsimonia (*Maximum Parsimony Tree*) y Unión de Vecinos (*Neighbor-Joining Tree*), utilizando 1000 réplicas (*bootstrap*) para la confiabilidad de los mismos. Se tomó como raíz externa el 16S de *Bacillus licheniformis*.

#### 2.5 Evaluación del potencial celulolítico de las bacterias seleccionadas

Los aislamientos bacterianos con potencial celulolítico se crecieron en medio LB líquido a 10 °C (200 rpm) hasta fase exponencial, cuando alcanza una densidad óptica (parámetro indirecto de cuantificación celular) aproximada de 0,4 a 620 nm, medida en un lector de placas de ELISA (camino óptico de 0,5 cm). Los cultivos se realizaron por triplicado para obtener tres réplicas biológicas.

Luego se sembró una gota de cultivo, tomado con ansa (volumen aproximado de 5 µL), por triplicado sobre placas con MC solidificado con agar al 1,5 %. Se incubaron tres placas de cada réplica de cultivo a 10 °C, 20 °C y 30 °C. Las placas se revelaron por el agregado de rojo Congo, tal cual se describió en 2.3.1, a los 7, 9 y 11 días de sembradas. Se registró el tamaño promedio de los diámetros de hidrólisis y de las colonias (promedio de los diámetros tomados en forma perpendicular). El potencial celulolítico se expresó como la relación entre el tamaño del halo de hidrólisis y de colonia.

Se seleccionaron los microorganismos que demostraron un buen potencial celulolítico en la placa (mayor tamaño relativo de los halos de hidrólisis) (Sección 3.3.4).

## 2.6 Evaluación del potencial sacarificador de las bacterias celulolíticas

### 2.6.1 Diferentes medios de cultivo para la posible producción de celulasas

Los microorganismos se crecieron en medio LB (10 °C y 200 rpm) hasta fase exponencial y luego se inocularon (volumen de inóculo del 1%) matraces de 250 mL, conteniendo 50 mL de Medio Mínimo (cuya composición se muestra en Anexo de Medios) con CMC, Avicel, Celulosa o  $\alpha$ -Celulosa como fuente de carbono y energía, y otro matraz con glucosa como control. Los matraces se incubaron a 30 °C y a 20 °C durante 24 y 48 hs, con agitación de 200 rpm. De esta manera se espera inducir la producción de celulasas, activas a temperatura ambiente.

El cultivo se centrifugó durante 15 min a 8000 rpm, y el sobrenadante (preparado enzimático) se filtró con filtros de 0.45  $\mu$ m (sobrenadante libre de células) y se almacenó a -20 °C.

### 2.6.2 Actividad celulolítica del sobrenadante

Para verificar si los sobrenadantes presentaban actividad celulolítica, se sembraron 20  $\mu$ L de preparado enzimático en placas de Petri conteniendo Medio Mínimo con CMC, y Medio Mínimo con celulosa solidificado, y se incubaron a 20, y 30 °C durante 24 y 48 hs. Luego se revelaron con la técnica de rojo Congo.

## 2.7 SDS-PAGE

Para analizar el perfil de proteínas secretadas en los diferentes medios de cultivo, cada preparado enzimático (sección 2.6.1), se analizó mediante electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Para ello se utilizó un gel concentrador al 5% y separador al 12% (Ver Anexo SDS-PAGE). Para la preparación de la muestra a sembrar, se mezclaron 30,8  $\mu$ L de extracto enzimático (sobrenadante) con 8  $\mu$ L de *Buffer* de carga 5X y 1,2  $\mu$ L de DTT 1 M (cf: 40 mM) y se calentó durante 5 min a 95 °C en baño de agua. Luego se sembraron 30  $\mu$ L de muestra

en cada pocillo. La separación de proteínas se realizó a un voltaje de 100 V hasta que el frente de corrida alcanzó el gel separador, y luego el voltaje se aumentó a 180 V. El proceso electroforético se detuvo cuando el frente de corrida alcanzó un centímetro del final del gel. La composición del *Buffer* de corrida Tris-Glicina con SDS (pH 8,3).

Las bandas de proteínas se visualizaron por tinción con azul brillante de Coomasie R250 al 0,1% preparado en una solución de etanol-acético-agua y posteriores lavados con solución decolorante (Ver anexo de *Buffers* y soluciones). Se utilizaron 5  $\mu$ L del marcador de peso molecular “Unstained Protein Molecular weight marker” (Cat. No. #SMO 0431) de Fermentas, para la estimación del tamaño molecular relativo.

### 3 RESULTADOS

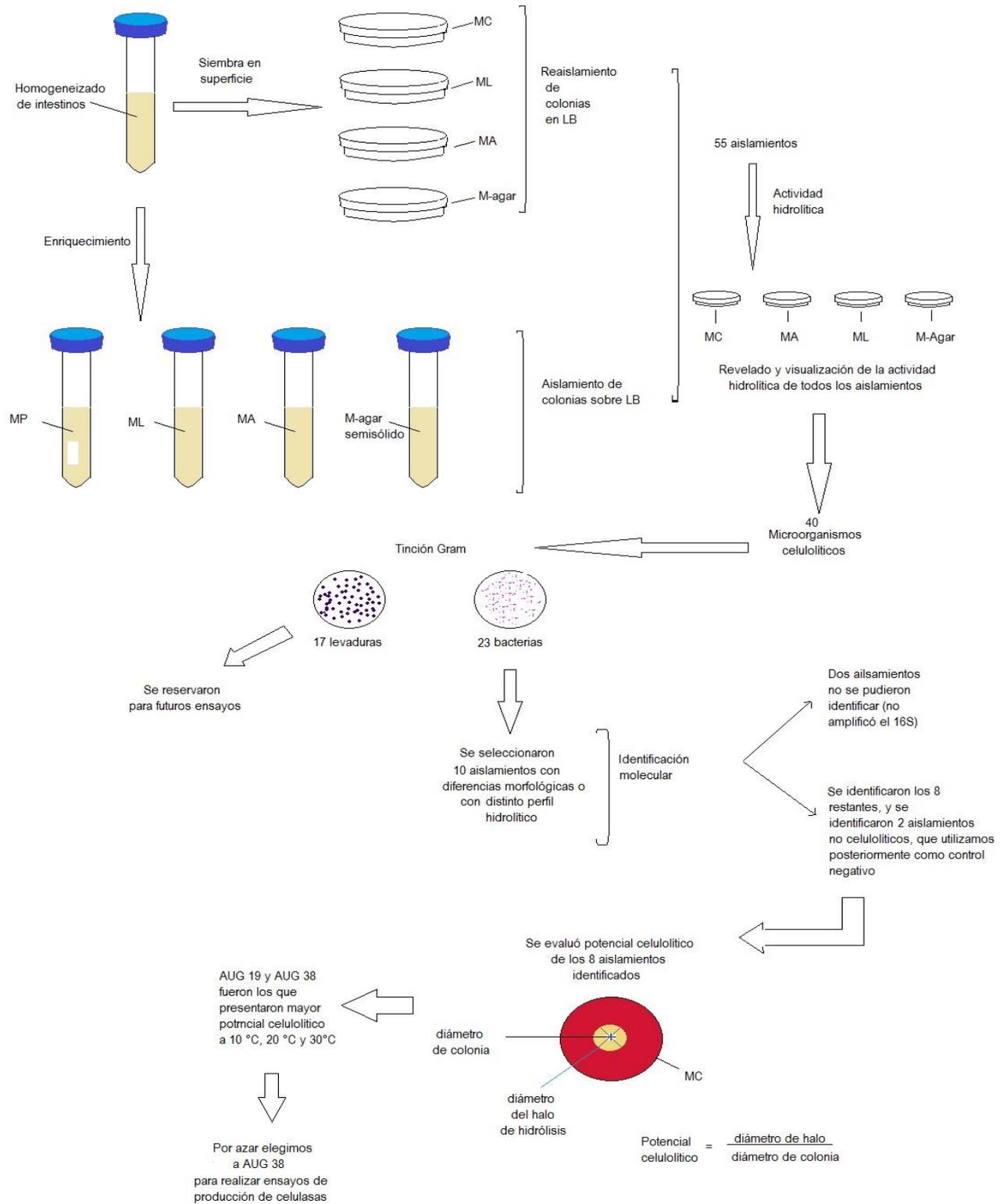


Figura 3.1 Esquema general del trabajo

### 3.1 Aislamiento de microorganismos hidrolíticos

A partir del macerado de intestinos de oligoquetos *Grania* sp. se realizaron enriquecimientos de microorganismos en medios diferenciales. Se obtuvieron 55 aislamientos: 18 capaces de crecer en ML; 16 capaces de crecer en MP y MC (ambos sustratos celulósicos); 10 capaces de crecer en MA y 11 aislamientos provenientes de medio M-agar y M-agar semisólido.

### 3.2 Potencial hidrolítico de los diferentes aislamientos

Para determinar si los aislamientos producían varias enzimas hidrolíticas a baja temperatura, se probaron las actividades de los 55 aislamientos en los cuatro medios sólidos diferenciales (MC, MA, ML y M-Agar) a 10 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 3.1.

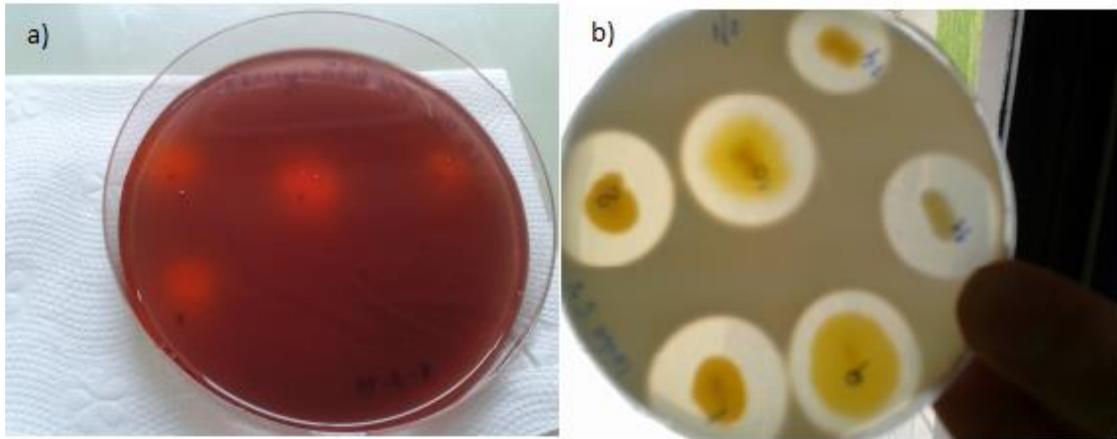
**Tabla 3.1.** Caracterización fenotípica y capacidad de hidrolizar diferentes sustratos de los aislamientos

Aislamiento	Medio diferencial de procedencia	Coloración de la colonia	Actividad			
			Proteolítica	Celulolítica	Agarolítica	Lipolítica
AUG 1	Leche	Amarilla	+	+	+	-
AUG 2	Leche	Amarilla	+	-	-	-
AUG 3	Leche	Manteca	-	-	-	-
AUG 4	Leche	Blanca	-	-	-	-
AUG 5	Leche	Blanca	-	+	-	-
AUG 6	Leche	Rosada	-	+	-	-
AUG 7	Leche	Rosada	-	+	-	-
AUG 8	Leche	Blanca	+	+	-	-
AUG 9	Leche	Amarilla	+	-	-	-
AUG 10	Leche	Amarilla	+	-	-	-
AUG 11	Leche	Blanca	+	+	-	-
AUG 12	Leche	Rosada	-	+	-	-
AUG 13	Leche	Amarilla	-	-	-	-
AUG 14	Leche	Amarilla	+	-	-	-
AUG 15	Leche	Amarilla	-	-	-	-
AUG 16	Leche	Amarilla	-	-	-	-
AUG 17	Leche	Rosada	-	+	-	-
AUG 18	Leche	Amarilla	-	-	-	-
AUG 19	CMC y MP	Blanca	+	+	-	-
AUG 20	CMC y MP	Blanca	+	+	-	-
AUG 21	CMC y MP	Blanca	+	+	-	-
AUG 22	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-

AUG 23	CMC y MP	Blanca	+	+	-	-
AUG 24	CMC y MP	Blanca	+	+	-	-
AUG 25	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-
AUG 26	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-
AUG 27	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-
AUG 28	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-
AUG 29	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-
AUG 30	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-
AUG 31	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-
AUG 32	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-
AUG 33	CMC y MP	Rosada	-	+	-	-
AUG 34	CMC y MP	Blanca	-	+	-	-
AUG 35	Aceite	Amarilla	+	-	-	-
AUG 36	Aceite	Amarilla	+	-	-	-
AUG 37	Aceite	Amarilla	+	-	-	-
AUG 38	Aceite	Blanca	+	+	-	-
AUG 39	Aceite	Amarilla	+	-	-	-
AUG 40	Aceite	Amarilla	+	-	-	-
AUG 41	Aceite	Rosada	-	+	-	-
AUG 42	Aceite	Amarilla	+	+	-	-
AUG 43	Aceite	Rosada	-	+	-	-
AUG 44	Aceite	Rosada	-	+	-	-
AUG 45	Agar	Blanca	+	+	-	-
AUG 46	Agar	Blanca	+	+	-	-
AUG 47	Agar	Blanca	-	+	-	-
AUG 48	Agar	Blanca	+	+	-	-
AUG 49	Agar	Blanca	+	+	-	-
AUG 50	Agar	Blanca	-	+	-	-
AUG 51	Agar	Amarilla	+	+	+	-
AUG 52	Agar	Blanca	+	+	-	-
AUG 53	Agar	Blanca	-	+	-	-
AUG 54	Agar	Blanca	+	+	-	-
AUG 55	Agar	Blanca	+	+	-	-

De izquierda a derecha se muestra el nombre de referencia asignado a cada aislamiento, el medio diferencial desde el cual fue aislado, la coloración de colonia, y que tipo de actividad hidrolítica presentó. “+” significa que presenta actividad, “-“significa que no se detectó actividad en ese medio.

Se encontraron microorganismos capaces de hidrolizar CMC, agar y leche (Fig. 3.1). No se encontraron microorganismos capaces de degradar aceite de oliva, pues no se observó halo transparente alrededor de la colonia (comparado con una cepa control de nuestro laboratorio). El 10 % de los aislamientos no presentó ninguna actividad; el 56 % presentó una sola actividad y el 31 % de los aislamientos presentó dos actividades. Solo dos aislamientos presentaron tres actividades hidrolíticas, y ninguno de ellos presentó las cuatro actividades testeadas.



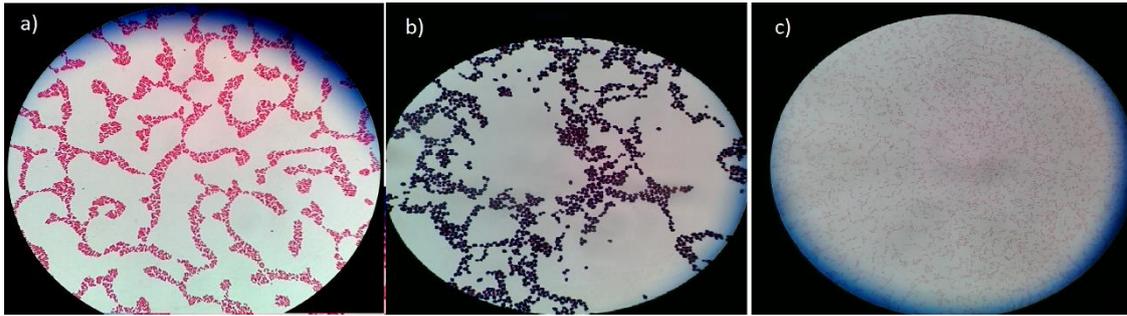
**Figura 3.1.** Visualización de placas. a) Se visualizan los halos de hidrólisis de CMC tras el revelado con rojo Congo. b) Se observan los halos transparentes alrededor de las colonias con capacidad proteolítica, capaces de degradar proteínas presentes en la leche.

### 3.3 Microorganismos celulolíticos: identificación morfológica y molecular

El trabajo se continuó con los microorganismos que presentaron capacidad celulolítica. Dentro de estos, 17 aislamientos resultaron ser levaduras.

#### 3.3.1. Tinción de Gram

Se procedió a la observación de los microorganismos capaces de degradar CMC al microscopio, con tinción de Gram. Se observaron 17 levaduras y 23 bacterias (Fig. 3.2). Se seleccionaron 10 microorganismos de menor tamaño (bacterias), con distinta morfología de colonia, o distinto perfil hidrolítico; los cuales se describen en la Tabla 3.2.



**Figura 3.2.** Tinción de Gram. Se muestran las fotografías de los microorganismos tras su observación con microscopio de campo claro bajo un aumento de 100x objetivo bajo inmersión de aceite, 10X ocular. Se muestran tres ejemplos representativos: a) AUG 11, coco Gram negativo b) AUG 30, levadura y c) AUG 35, bastones largos y finos Gram negativos.

**Tabla 3.2.** Caracterización por Gram de 10 aislamientos bacterianos que presentaron actividad celulolítica

Aislamiento	Tinción de Gram	Forma
AUG 1	Negativo	Bastones largos y finos
AUG 5	Negativo	Coco
AUG 8	Negativo	Bastón
AUG 11	Negativo	Coco
AUG 19	Negativo	Bastón
AUG 35*	Negativo	Bastones largos y finos
AUG 36*	Negativo	Bastones largos y finos
AUG 38	Negativo	Bastón
AUG 47	Negativo	Coco
AUG 50	Negativo	Coco
AUG 51	Negativo	Bastones largos y finos
AUG 55	Negativo	Bastón

\*Los aislamientos AUG 35 y AUG 36 no presentan actividad celulolítica, pero se continuó trabajando con ellos como control negativo.

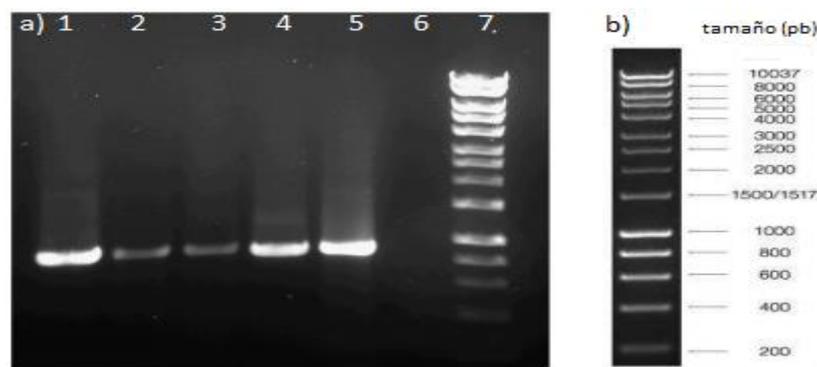
### 3.3.2 Identificación molecular de las bacterias celulolíticas

Con el fin de identificar los aislamientos, se secuenciaron los fragmentos codificantes para un fragmento de la subunidad 16S del ARN ribosomal, según se describió en Materiales y Métodos.

#### 3.3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa y visualización de los fragmentos de amplificación

Se logró amplificar fragmentos del tamaño esperado con ambos juegos de cebadores para los aislamientos AUG 1, 5, 8, 11, 19, 35, 36, 38 y 51. Para los aislamientos AUG 47 y AUG 55 no se obtuvo amplificación con ninguno de los dos juegos de cebadores.

Para AUG 50 se logró obtener un fragmento de amplificación sólo con el juego de cebadores 784 F – 1401 R. Para obtener un fragmento de mayor cantidad de pares de bases se intentó amplificar AUG 50 con otro juego de cebadores: 1522 R y 27 F, que amplificarían fragmentos de aproximadamente 1495 pb según su posición en *E. coli*, pero tampoco fue posible obtener amplificación. En la Fig. 3.2 se muestra el perfil de amplificación de fragmentos de ADN para un juego de cebadores, de sólo algunos aislamientos.



**Figura 3.2.** Perfil de amplificación del gen 16S ADNr, utilizando el juego de cebadores 907 R y 63 F. a) De izquierda a derecha se muestra el producto de amplificación obtenido utilizando como templado el ADN obtenido de las bacterias AUG 1, AUG 35, AUG 36, AUG 8 y AUG 38 (carriles 1 a 5). Se sembraron 2  $\mu$ L de mezcla de PCR. El control negativo (realizado con la misma mezcla de PCR, pero con agua en vez de templado de ADN) se muestra en el carril 6. En el carril 7 se muestra el marcador de peso molecular Hyperladder 1 kb (5  $\mu$ L). b) Imagen del marcador de peso molecular, indicando el tamaño en pares de bases correspondiente a cada banda.

### 3.3.2.2 Identificación de las bacterias celulolíticas

Los fragmentos de amplificación se purificaron y se enviaron para su secuenciación a Macrogen. Las secuencias se editaron, empalmaron y se analizaron como se indicó en Materiales y Métodos.

El análisis de las secuencias empalmadas se realizó en las bases de datos NCBI y RDB. Los resultados se muestran en la Tabla 3.3. Todos los aislamientos mostraron entre 99 y 100% de identidad con un género determinado utilizando la base de datos de NCBI, y entre 100 y 93% utilizando RDB. Por lo tanto, desde este punto del trabajo, cada aislamiento se identificará por su género, pero no se le asignará especie hasta una mejor caracterización de los mismos, realizando una estrategia polifásica.

Las bacterias celulolíticas aisladas de *Grania* sp. se identificaron como pertenecientes a los géneros *Flavobacterium*, *Psychrobacter* y *Pseudomonas*. La secuencia 16S del aislamiento AUG 50 se alineó con secuencias de bacterias de los géneros *Rahnella*, *Serratia*, y *Ewingella*, todos miembros de la familia Enterobacteriaceae, dejando su identificación a nivel de género en forma incierta. Desde este punto, se denominará a AUG 50 solo como una enterobacteria.

**Tabla 3.3.** Análisis de las secuencias 16S de los aislamientos celulolíticos.

Aislamiento	NCBI			RDB		
	% de Identidad	Microorganismo	N° de acceso	% de identidad	Microorganismo	N° de acceso
AUG 1	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365466.1	99,5%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365466
	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365464.1	99,2%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365464
	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365465.1	98,2%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365465
AUG 5	100%	<i>Psychrobacter</i> sp.	KF365479.1	99,9%	<i>Psychrobacter</i> sp.	KF365479
	99%	<i>Psychrobacter</i> sp.	JX196634.1	98,2%	<i>Psychrobacter</i> sp.	JQ800041
	99%	<i>Psychrobacter</i> sp.	JX196632.1	98,1%	<i>Psychrobacter</i> sp.	JQ799990

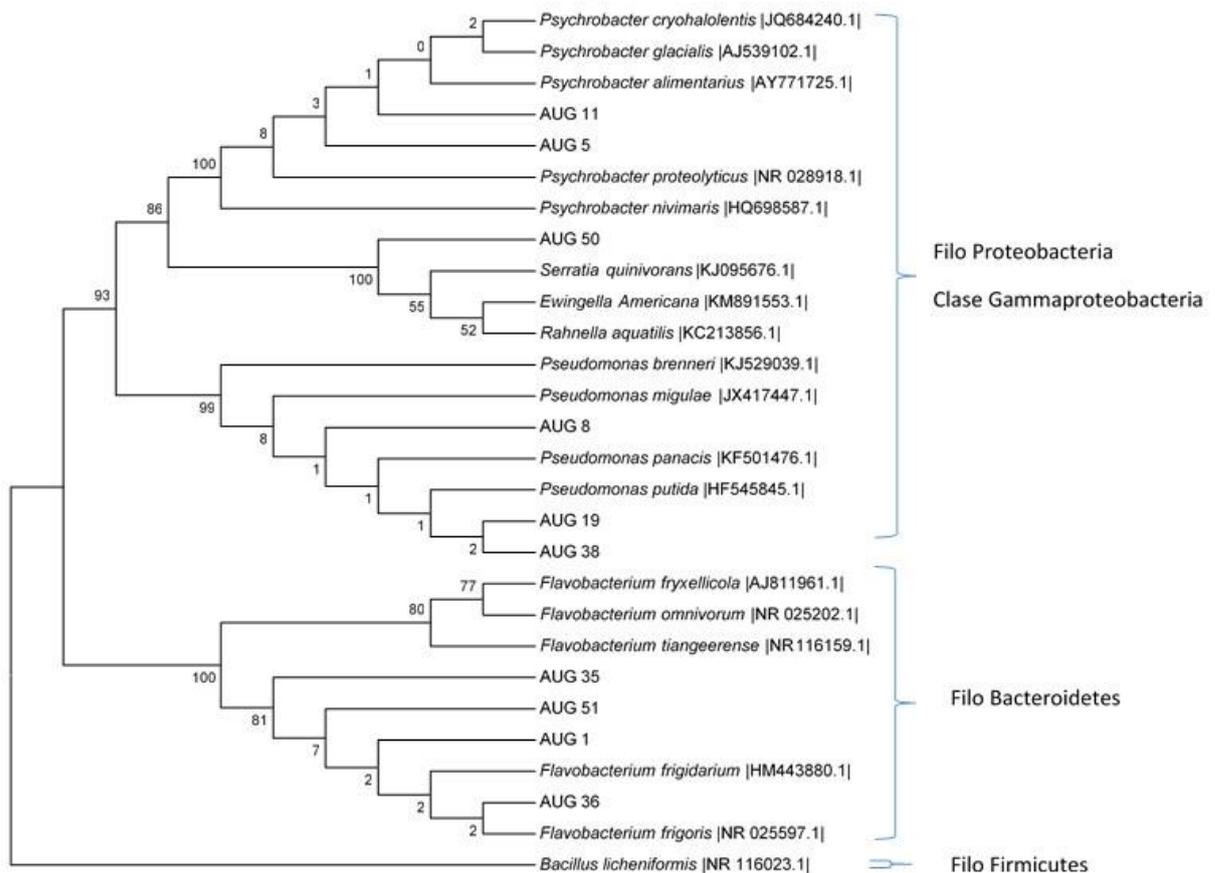
AUG 8	100%	<i>Pseudomonas</i> sp.	KF366099.1	100%	<i>Pseudomonas</i> sp.	AF321239
	100%	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC306429.1	100%	swine manure bacterium	AY167969
	100%	<i>Pseudomonas</i> sp.	KF720926.1	100%	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ862549
AUG 11	99%	<i>Psychrobacter</i> sp.	KF365479.1	98,6%	<i>Psychrobacter</i> sp.	KF365479
	99%	<i>Psychrobacter</i> sp.	JQ800055.1	97,1%	<i>Psychrobacter</i> sp.	JQ799990
	99%	<i>Psychrobacter</i> sp.	JQ800041.1	97,1%	<i>Psychrobacter</i> sp.	JQ800055
AUG 19	99%	<i>Pseudomonas</i> sp.	KF366099.1	94,9 %	<i>Pseudomonas</i> sp.	AF321239
	99%	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC306429.1	94,9%	swine manure bacterium	AY167969
	99%	<i>Pseudomonas</i> sp.	KF720926.1	94,9%	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ862549
AUG 35	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365464.1	99,5%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365464
	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365466.1	99,2%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365466
	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365465.1	98,7%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365465
AUG 36	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365466.1	99,8%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365466
	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365464.1	99,4%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365464
	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365465.1	98,5%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365465
AUG 38	100%	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ224623.1	100%	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ844526
	100%	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ844526.1	99,4%	swine manure bacterium	AY167969
	99%	<i>Pseudomonas</i> sp.	KF366099.1	99,4%	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ862549
AUG 50	100%	<i>Rahnella</i> sp.	KC306420.1	98,7%	<i>Rahnella aquatilis</i>	AY253920
	100%	<i>Serratia proteamaculans</i>	KC951919.1	98,0%	<i>Ewingella americana</i>	JF706505
	100%	Enterobacteriaceae bacterium	HF678392.2	97,8%	<i>Rahnella</i> sp.	JF706505

AUG 51	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365466.1	94,3%	<i>Flavobacterium</i> <i>frigidarium</i>	HM443880
	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365464.1	93,0%	<i>Flavobacterium</i> sp.	JQ800033
	99%	<i>Flavobacterium</i> sp.	KF365465.1	92,7%	<i>Flavobacterium</i> sp.	HM443878

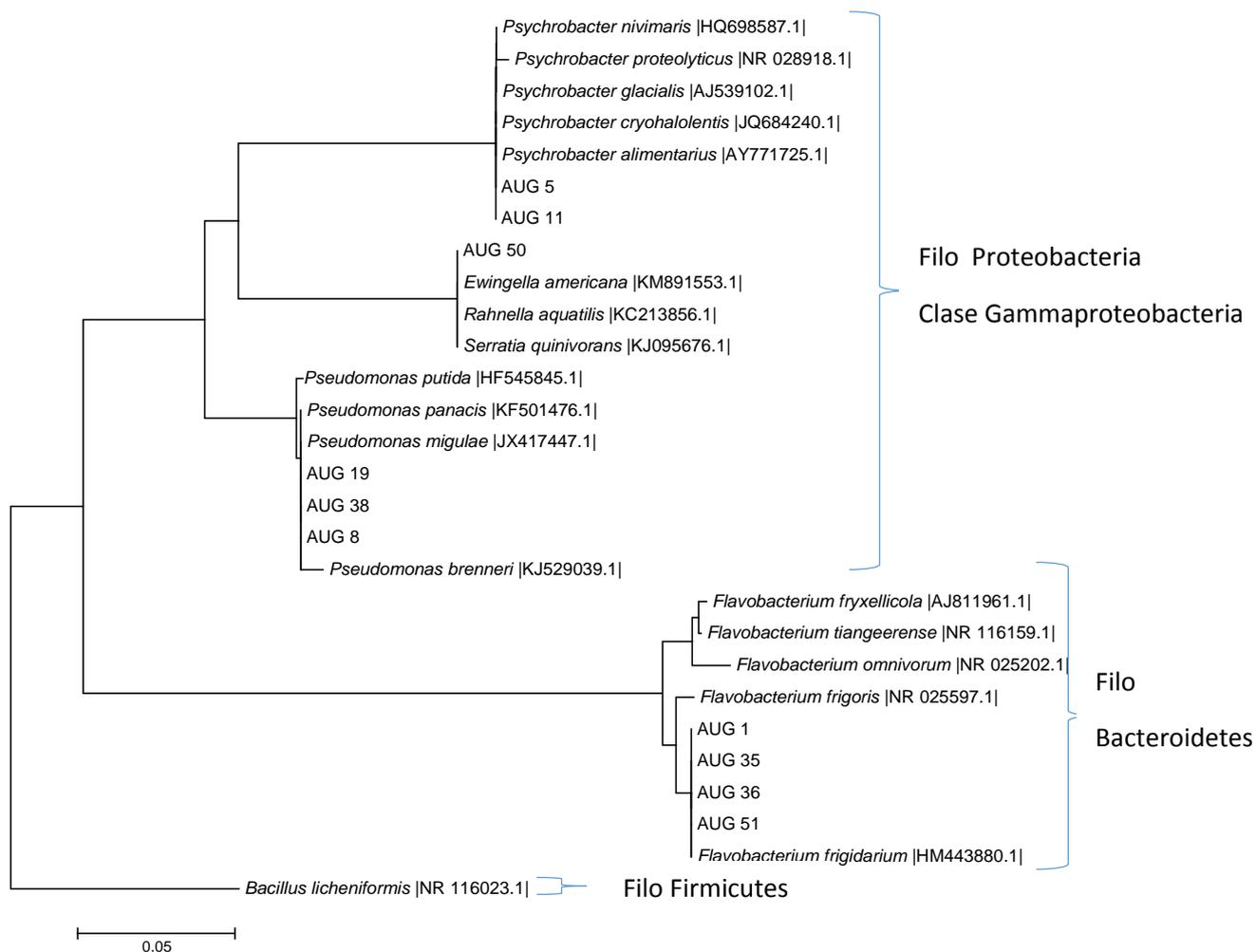
Para cada secuencia (o aislamiento) se muestran las tres primeras secuencias del BLAST en las bases de datos de NCBI y RDB. Para cada una se muestran el porcentaje de identidad con los microorganismos más cercanos, y el número de acceso a las respectivas secuencias.

### 3.3.2.3 Análisis de filogenias

La filiación de cada aislamiento se verificó realizando árboles filogenéticos con el programa MEGA 5.2. Los resultados se muestran en las Fig. 3.4 y 3.5.



**Figura 3.4** Árbol construido con el test de Máxima Parsimonia, con apoyo de 1000 réplicas. Se muestran los valores de *bootstrap* en cada nodo del árbol, que demuestra el soporte estadístico, y junto a cada especie se indica el número de acceso del NCBI a la secuencia. Se empleó a *Bacillus licheniformis* como grupo externo.



**Figura 3.5** Árbol construido con el test de *Neighbor Joining*. Se observan los nodos cuyo *bootstrap* fue mayor a 50. Junto a cada especie se indica el número de acceso del NCBI para la secuencia 16S. Se empleó a *Bacillus licheniformis* como grupo externo. La barra representa la distancia entre las especies, por sustitución nucleotídica.

Ambos árboles filogenéticos presentan una topología similar, dando soporte al resultado de la filogenia. Como era esperado, los aislamientos AUG 5 y AUG 11 se agruparon con el género *Psychrobacter* (ambas secuencias son 99 % idénticas); los aislamientos AUG 8, AUG 19 y AUG 38, se agruparon con el género *Pseudomonas*, las tres son de secuencia similar (99 % de identidad); y el aislamiento AUG 50 se agrupó con

*Ewingella*, *Rahnella* y *Serratia*. Todos estos aislamientos se agruparon, ya que poseen filo y clase en común (*Proteobacteria* y *Gammaproteobacteria*, respectivamente).

Los aislamientos AUG1, AUG 35, AUG 36 y AUG 51 se agruparon con los del género *Flavobacterium*, y se separaron con un gran soporte de las Proteobacterias. A su vez se realizó un alineamiento entre sus secuencias, y resultan 99 % idénticas.

Las secuencias de los aislamientos AUG 5 y AUG 11 fueron alineadas y se encontró que solo diferían en un par de bases. Ambas presentaron 99 % de identidad respecto a la bacteria *Psychrobacter glacincola*. Las bacterias AUG 8 y AUG 38 presentaron 99% de identidad con *Pseudomonas cf. synxantha*. Ambas bacterias reportadas fueron aisladas del intestino de un bacalao atlántico *Gadus morhua*, que vive en aguas frías. (Lazado, et al. 2012). AUG 5 también presenta un 99 % de identidad con *Psychrobacter cryohalolentis*, y AUG 8 presenta un 97 % de identidad con una *Pseudomonas* sp., ambas provenientes del intestino del salmón atlántico *Salmo salar* (Askarian, et al. 2012).

### 3.3.3 Actividad amilolítica

Como parte de la caracterización del potencial de hidrólisis de polisacáridos de los aislamientos celulolíticos, se probaron todos los aislamientos que identificamos en medio MS, y se encontró que solamente AUG 51 presentó actividad amilolítica (Fig. 3.6).



**Figura 3.6** Visualización de actividad amilolítica tras el revelado con lugol. Se observan pequeños puntos sin coloración, que corresponden al tamaño de la colonia, donde el lugol no pudo teñir; y en la parte inferior se observa un halo de hidrólisis de almidón (mucho mayor al diámetro de la colonia), por parte del aislamiento AUG 51.

### 3.3.4 Evaluación del potencial celulolítico

Con el fin de comparar el potencial celulolítico de las bacterias seleccionadas, se determinó el tamaño del halo de hidrólisis de CMC y de la colonia, a diferentes temperaturas (Tabla 3.4 y 3.5), y se calculó el potencial celulolítico relativo (tamaño del halo/tamaño de colonia; Tabla 3.6).

**Tabla 3.4.** Tamaño de la colonia y del halo de hidrólisis del CMC (en cm). Los aislamientos se crecieron por triplicado (a, b, c), y cada uno se sembró por triplicado en medio MC. Las placas se incubaron a 10, 20 y 30 °C. El revelado de actividad celulolítica se realizó a los 7, 9 y 11 días posteriores a la siembra e incubación.

Aislamiento	Tamaño de la colonia									Tamaño de halo de hidrólisis								
	10°C			20°C			30 °C			10 °C			20 °C			30 °C		
	7d	9d	11d	7d	9d	11d	7d	9d	11d	7d	9d	11d	7d	9d	11d	7d	9d	11d
AUG 1 a	0,2	0,3	0,4	0	0	0	0	0	0	2,2	1,8	2,8	-	-	-	-	-	-
AUG 1 b	0,2	0,2	0,4	0	0	0	0	0	0	2,0	2,0	1,6	-	-	-	-	-	-
AUG 1 c	0,2	0,2	0,5	0	0	0	0	0	0	1,7	1,5	2,6	-	-	-	-	-	-
AUG 35 a	0,1	0,2	0,3	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 35 b	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 35 c	0,2	0,3	0,2	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 36 a	0,1	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 36 b	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 36c	0,1	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 51 a	0,5	0,8	0,8	0,8	0,9	1,0	0	0	0	1,4	2,0	2,0	1,5	2,3	2,3	-	-	-
AUG 51 b	0,7	0,8	0,8	0,7	1,0	0,9	0	0	0	1,3	1,9	1,8	1,5	2,0	2,0	-	-	-
AUG 51 c	0,7	0,8	0,8	0,7	1,0	1,0	0	0	0	1,4	1,8	1,9	1,6	2,0	2,1	-	-	-
AUG 38 a	0,7	0,5	0,6	0,9	0,8	0,9	0,8	0,6	0,7	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AUG 38 b	0,5	0,5	0,6	0,8	0,8	0,9	0,6	0,6	0,8	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AUG 38 c	0,6	0,5	0,5	0,8	0,9	1,0	0,6	0,7	0,8	*	*	*	*	*	*	*	*	*

AUG 19 a	0,5	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,7	0,7	1,0	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AUG 19 b	0,5	0,4	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	1,0	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AUG 19 c	0,7	0,7	0,5	0,8	0,7	0,9	0,8	0,8	0,8	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AUG 5 a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 5 b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 5 c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 11 a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 11 b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AUG 11 c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

El "0" indica que no hubo crecimiento de colonia; el "\*" indica que el halo de hidrólisis cubrió la placa, y no se pudo medir; y "-" indica ausencia de halo de hidrólisis. "d" significa días transcurridos desde la siembra e incubación a las diferentes temperaturas.

Según los resultados presentados en la Tabla 3.4, los aislamientos AUG 5 y AUG 11 no crecieron en las condiciones ensayadas. De acuerdo a ensayos anteriores, son bacterias de crecimiento lento en placas, y necesitarían más tiempo para lograr formar una colonia visible.

Las placas sembradas con los aislamientos AUG 19 y AUG 38 presentaron grandes halos de hidrólisis, hidrolizando toda la placa de MC e impidiendo registrar un diámetro de halo de hidrólisis. Como estábamos que ocurriría lo mismo con los aislamientos AUG 8 y AUG 50 (según experimentos anteriores el crecimiento y velocidad de hidrólisis parecían ser similares, datos no mostrados), se procedió a realizar un ensayo del potencial celulolítico de estos dos últimos aislamientos al día 4 post incubación a las temperaturas correspondientes (Tabla 3.5).

Los aislamientos AUG 35 y AUG 36 no habían presentado actividad celulolítica, por lo que se registraron como control negativo. A diferencia de los anteriores, los aislamientos AUG 1 y AUG 51, quienes también son flavobacterias, presentaron actividad celulolítica. Cabe destacar que ningún aislamiento registrado como flavobacterias, creció a 30 °C, una característica del género, que está reportado como sícrófilo.

**Tabla 3.5.** Tamaño de colonia y halo de hidrólisis del CMC (cm). Se muestran los aislamientos AUG 50 y AUG 8 crecidos por triplicado (a, b, c) y sembrados en medio MC a 10, 20 y 30 °C, también por triplicado. El revelado de la actividad celulolítica se realizó a los 4, 9 y 11 días posteriores a la siembra e incubación.

Aislamiento	Tamaño de la colonia									Tamaño de halo de hidrólisis								
	10 °C			20 °C			30 °C			10 °C			20 °C			30 °C		
	4d	9 d	11d	4d	9 d	11d	4d	9d	11d	4d	9d	11d	4d	9 d	11d	4d	9d	11d
AUG 50 a	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	2,0	1,9	2,2	*	*	*	3,0	*	*
AUG 50 b	0,4	0,5	0,6	0,4	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5	2,0	1,8	2,8	*	*	*	3,0	*	*
AUG 50 c	0,4	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6	0,5	0,5	0,4	1,5	2,0	2,4	3,2	*	*	*	*	*
AUG 8 a	0,4	0,5	0,5	0,6	0,9	0,9	0,5	0,9	0,8	2,0	2,2	*	3,0	*	*	*	*	*
AUG 8 b	0,4	0,6	0,5	0,6	0,9	0,8	0,5	0,8	0,8	2,0	2,3	*	3,1	*	*	*	*	*
AUG 8 c	0,4	0,4	0,5	0,6	0,9	0,9	0,5	0,8	0,8	2,0	2,0	*	3,1	*	*	*	*	*

El "0" indica que no hubo crecimiento de colonia; el "\*" indica que el halo de hidrólisis cubrió la placa, y no se pudo medir ya que se solapó con los halos de sus colonias vecinas y "-" indica ausencia de halo de hidrólisis.

Con los datos obtenidos en las Tablas 3.4 y 3.5 se procedió a calcular la relación diámetro de halo de hidrólisis respecto al diámetro de colonia, o potencial celulolítico de los aislamientos bacterianos. Dichos datos se representan en la Tabla 3.6.

La flavobacteria AUG 1 solo tiene potencial celulolítico a los 10 °C; mientras que AUG 51 tiene potencial a los 10 y 20 °C. AUG 8 presenta mayor potencial a los 20 y 30 °C que a los 10 °C. La enterobacteria AUG 50, tiene mayor potencial a 20 °C. Estos resultados sugieren que los aislamientos celulolíticos presentarían diferente potencial celulolítico, dependiendo de la temperatura de crecimiento del mismo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los aislamientos con mayor potencial de degradar CMC a 10 °C, 20 °C y 30 °C son los aislamientos AUG 19 y AUG 38, los cuales se resaltan en la Tabla 3.6. Ambos pertenecen al género *Pseudomonas*, y difieren solo en seis pares de bases en las secuencias obtenidas (datos no mostrados). Tienen morfología de colonia similar (color blanquecino, circular, borde liso), son bacilos

cortos, Gram negativos. Su capacidad hidrolítica sería similar (se realizaron ensayos en una misma placa con MC con AUG 19 y AUG 38, y el halo de hidrólisis fue similar); por lo que se seleccionó al azar a AUG 38, para continuar con el trabajo.

**Tabla 3.6** Potencial celulolítico de los aislamientos. Se presentan los resultados obtenidos a diferentes temperaturas y diferente tiempo de incubación.

Aislamiento	10 °C				20 °C				30 °C			
	4d	7d	9d	11d	4d	7d	9d	11d	4d	7d	9d	11d
<i>Flavobacterium</i> sp. AUG 1		10±1	8 ± 2	5 ± 2		-	-	-		-	-	-
<i>Psychrobacter</i> sp. AUG 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. AUG 8	5,0±0,1		4,4±0,5	*	5,1±0,1		*	*	5,0±0,1		*	*
<i>Psychrobacter</i> sp. AUG 11	-		-	-	-	-	-	-		-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. AUG 19		*	*	*		*	*	*		*	*	*
<i>Flavobacterium</i> sp. AUG 35		0	0	0		-	-	-		-	-	-
<i>Flavobacterium</i> sp. AUG 36		0	0	0		-	-	-		-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. AUG 38		*	*	*		*	*	*		*	*	*
Enterobacteria AUG 50	4,6±0,6		3,8±0,2	4,7±0,6	*		*	*	7,5±0,1		*	*
<i>Flavobacterium</i> sp. AUG 51		2,2±0,4	2,4±0,1	2,4±0,1		2,1±0,2	2,2±0,3	2,2±0,4				

“0” significa que no hubo halo, “-” significa que no creció. Los cuadros vacíos indican que no se reveló en ese día. “\*” indica que no se puede calcular la relación, ya que el diámetro del halo de hidrólisis cubrió toda la placa. Estos se resaltan con fondo verde, ya que serían los aislamientos con mayor potencial para continuar con el trabajo.

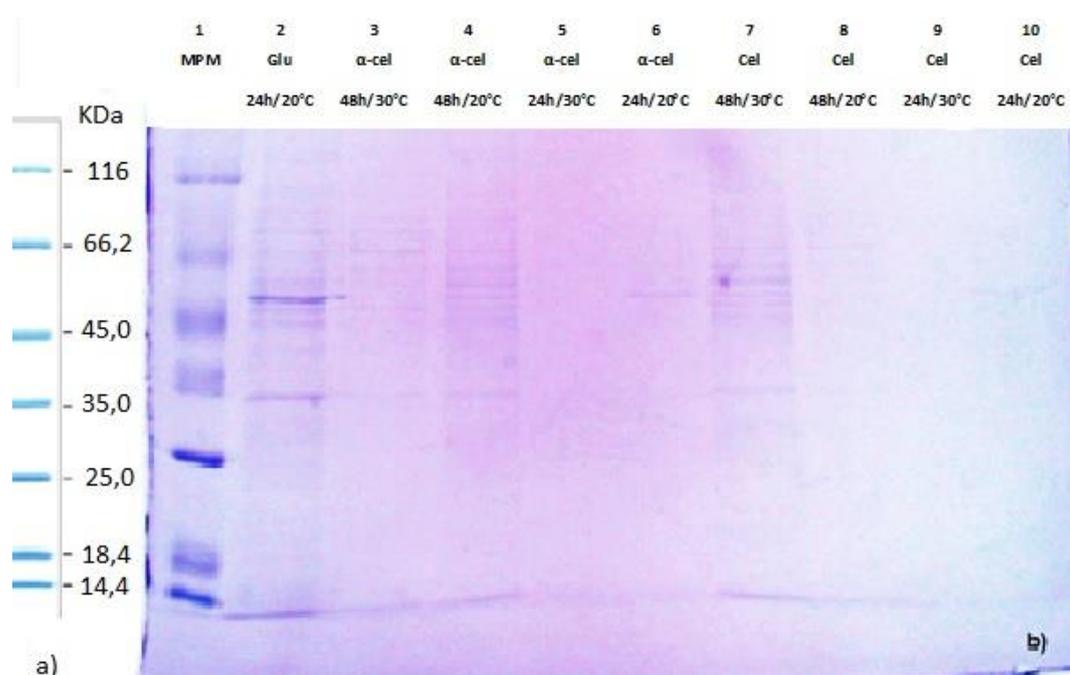
### 3.4 Actividad de sobrenadantes

El aislamiento *Pseudomonas* sp. AUG 38 se creció en medio líquido con diferentes sustratos celulósicos y el sobrenadante de cultivo se filtró utilizando filtros de 0.45 µm para obtener un extracto enzimático libre de células. La actividad celulolítica de estos extractos se reveló colocando gotas del mismo sobre placas con CMC, tal como se indicó

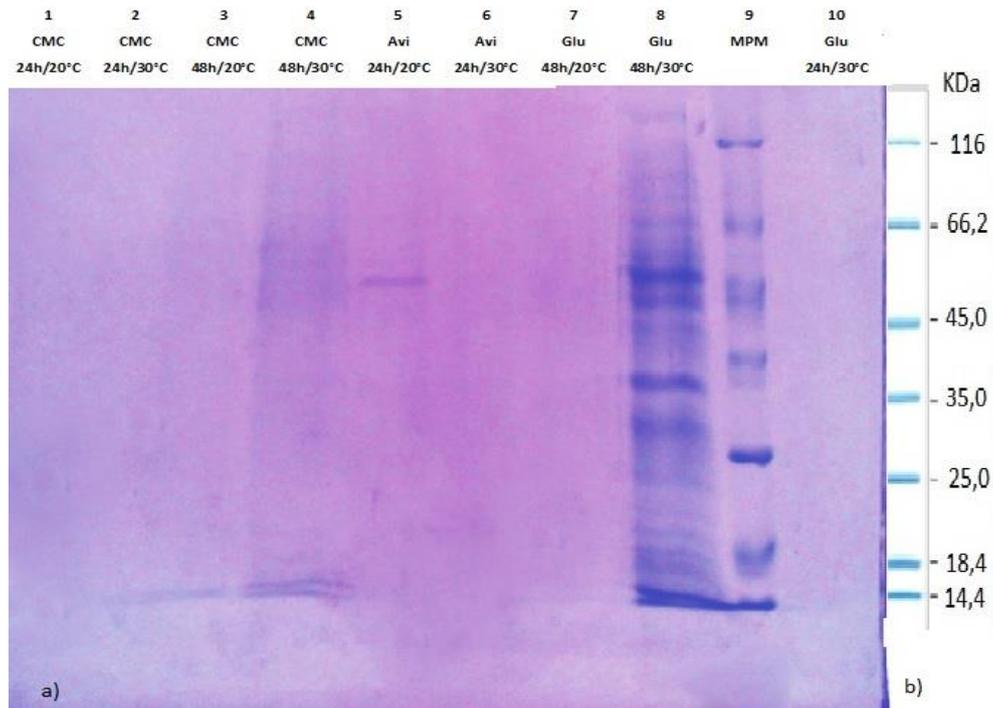
en la sección 2.6.2. Luego del revelado con rojo Congo, no se observó halo de hidrólisis para ninguna de las condiciones testeadas.

### 3.5 SDS-PAGE

Con el fin de observar los perfiles de proteínas secretadas por AUG 38, cuando crece con glucosa y con distintos sustratos celulósicos (celulosa, Avicel, CMC y  $\alpha$ -celulosa), se realizó una electroforesis de proteínas, mediante la técnica de SDS-PAGE, utilizando los extractos enzimáticos o sobrenadantes como muestras a analizar; tal como se explica en Materiales y Métodos. El perfil de proteínas de los sobrenadantes se muestra en las Figuras 3.7 y 3.8.



**Figura 3.7** a) Imagen del marcador de peso molecular, con el tamaño correspondiente a cada banda, en kDa. b) SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivo de AUG 38, luego de su crecimiento en distintas fuentes carbonadas. En el pocillo: 1, marcador de peso molecular;. En el pocillo 2, sobrenadante de MM con glucosa (24 hs, a 20 °C); 3, sobrenadante de MM con  $\alpha$ -celulosa (48 hs, a 30 °C); 4, sobrenadante de MM con  $\alpha$ -celulosa (48 hs, a 20 °C); 5, sobrenadante de MM con  $\alpha$ -celulosa (24 hs, a 30 °C); 6, sobrenadante de MM con  $\alpha$ -celulosa (24 hs, a 20°C); 7, sobrenadante de MM con celulosa (48 hs, 30 °C); 8, sobrenadante de MM con celulosa (48 hs, 20 °C); 9, sobrenadante de MM con celulosa (24 hs, 30 °C) y 10, sobrenadante de MM con celulosa (24 hs, 20 °C).



**Figura 3.8** a) SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivo de AUG 38, en distintas condiciones y distintas fuentes carbonadas. En el pocillo: 1, sobrenadante de MM con CMC (24 hs, a 20 °C); 2, sobrenadante de MM con CMC (24 hs, a 30 °C); 3, sobrenadante de MM con CMC (48 hs, a 20 °C); 4, sobrenadante de MM con CMC (48 hs, a 30 °C); 5, sobrenadante de MM con avicel (24 hs, a 20 °C); 6 sobrenadante de MM con avicel (24 hs, a 30 °C); 7, sobrenadante de MM con glucosa (48 hs, a 20 °C); 8 sobrenadante de MM con glucosa (48 hs, a 30 °C); 9, marcador de peso molecular; 10, sobrenadante de MM con glucosa (24 hs, a 30 °C) b) Imagen del marcador de peso molecular, con el tamaño correspondiente a cada banda, en kDa.

Se observaron mayor número de bandas en los sobrenadantes de AUG 38 crecidos en Medio Mínimo con glucosa, que los sobrenadantes de cultivo que tenían sustratos celulósicos. No se ve una apreciable diferencia en número y tamaño de bandas para los cultivos crecidos con el mismo sustrato a distintas temperaturas, ni una correlación con los que estuvieron 24 hs respecto a los que estuvieron 48 hs. En algunos pocillos no se observan bandas (Figura 3.7: pocillos 5 y 9; Figura 3.8: pocillos 1, 2, 3, 6 y 7), mientras que en el resto de los pocillos se observan varias bandas de distintos tamaños (Figura 3.7: pocillos 2, 3, 4, 7 y 8; Figura 3.8: pocillo 8).

Existen dos bandas (de 55 kDa y 35 kDa aproximadamente) que se ven en todos los pocillos de los cuales se distinguen bandas, quizás estas proteínas se excretan

constitutivamente por parte de AUG 38. A diferencia de lo que esperábamos, no se observan bandas de distintos tamaños en los carriles crecidos con sustratos celulósicos, respecto a las observadas en los carriles con glucosa.

## 4 DISCUSIÓN

Actualmente, las industrias requieren procesos tecnológicos eficientes y limpios, y en muchos casos las soluciones biotecnológicas han demostrado ser de gran utilidad para la sustentabilidad de las empresas. Numerosos investigadores buscan opciones novedosas para realizar procesos industriales en forma económica y más amigable con el medioambiente. Por ello, el uso de microorganismos aislados de ambientes extremos, o sus enzimas, constituyen una excelente alternativa para satisfacer esta creciente demanda del mercado biotecnológico (Maki et al., 2009; Flores, et al. 2010).

Por ello, este trabajo final de grado orientado hacia el área de Biotecnología, intenta contribuir a la búsqueda de microorganismos productores de enzimas hidrolíticas activas a bajas temperaturas. Nos propusimos trabajar en el aislamiento e identificación de microorganismos hidrolíticos de la microflora de *Grania* sp., como un nicho novedoso para la búsqueda de este tipo de microorganismos. Finalmente focalizamos el trabajo en las bacterias celulolíticas.

### Microflora de *Grania* sp.

Durante este trabajo de tesis de grado, fue posible aislar microorganismos productores de enzimas hidrolíticas provenientes de *Grania* sp.. El objetivo era obtener microorganismos de la microflora intestinal del oligoqueto, pero como no fue posible diseccionar los intestinos por su pequeño tamaño, se trabajó con el animal entero. Por este motivo, no descartamos la posibilidad de que algunos microorganismos aislados hayan provenido del tegumento externo que persistieron luego de los lavados o de otra parte del oligoqueto.

Se aislaron microorganismos capaces de producir celulasas, agarasas, amilasas y proteasas a bajas temperaturas. No se logró aislar microorganismos lipolíticos, capaces de hidrolizar aceite de oliva (compuesto por triacilgliceroles de ácidos grasos de cadena larga, cuya hidrólisis enzimática se da por las lipasas). Faltaría explorar la presencia de

microorganismos con actividad esterasa, analizando la hidrólisis de triacilgliceroles de ácidos grasos de cadena corta, como por ejemplo la tributirina.

En cuanto a los medios utilizados para enriquecer diferencialmente, se puede señalar que en el medio ML, crecieron microorganismos no proteolíticos; que probablemente utilizaron otras fuentes de carbono presentes en leche, (por ejemplo lactosa) o las pequeñas cantidades de triptona y extracto de levadura presentes en el medio. En el medio MA no crecieron microorganismos lipolíticos, probablemente los microorganismos aislados a partir de este medio consumieran las pequeñas cantidades de triptona y extracto de levadura también presentes en este medio. Se esperaba encontrar mayor cantidad de microorganismos que hidrolizaran agar, ya que este constituye el 60 % del peso seco de las algas rojas, sin embargo, solo dos aislamientos presentaron esta actividad, y solamente uno de ellos fue aislado a partir del medio M-Agar. Los medios con sustratos celulósicos (MP y MC) fueron los que funcionaron mejor, ya que todos los aislamientos obtenidos a partir del enriquecimiento inicial en ellos, presentaron actividad celulolítica.

Luego de una búsqueda en las bases de datos, no se encontraron publicaciones donde se haya explorado el potencial hidrolítico de bacterias del intestino de oligoquetos de la familia Enchytraeidea. Por este motivo, creemos que este trabajo podría ser la primera contribución a la identificación de la microbiota hidrolítica en oligoquetos *Grania*.

Se identificaron bacterias productoras de enzimas celulolíticas de los filos Bacteroidetes y Proteobacteria; en particular la clase Gammaproteobacteria. Al igual que en otros estudios sobre la microflora intestinal de oligoquetos de los géneros *Mesenchytraeus* y *Fridericia* (familia Enchytraeidea) (Rashed et al., 1992; Murakami et al., 2015), durante este trabajo se lograron aislar bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium*. En particular, Murakami et al. (2015) informan sobre la diversidad de la microflora de *Mesenchytraeus solifugus* de origen glacial, a través de la secuenciación de una librería del gen 16S, entre las que encuentran especies de *Pseudomonas* y *Flavobacterium*. Ellos además demuestran que la mayoría de las bacterias detectadas están estrechamente relacionadas con las bacterias de la criósfera (superficie de la Tierra donde el agua se encuentra en estado sólido). Los autores plantean la posibilidad de que estos

oligoquetos del hielo explotan a las bacterias del glacial como potenciales simbioses intestinales transitorios. Esto es análogo a lo que sucede con las lombrices de tierra, donde las bacterias ingeridas del suelo contribuyen a la nutrición del hospedero como simbioses intestinales transitorios (Wüst et al., 2011). Particularmente, algunos de los géneros bacterianos identificados en la microflora de nuestra *Grania* sp. (*Pseudomonas* y *Flavobacterium*) también se han encontrado en la superficie de algas presentes en aguas frías de Japón y en la Isla Rey Jorge (Miyashita et al., 2010; Tropeano et al., 2013). De acuerdo con lo reportado por Murakami, et al. (2015), los resultados sugieren que estos microorganismos probablemente ingresaron al intestino de *Grania* sp. junto con su fuente de alimentos: las algas.

Por otra parte, en los alineamientos con mayor porcentaje de identidad al gen 16S realizados durante el BLAST, se encontraron secuencias de especies bacterianas provenientes de intestinos de los peces de agua fría: *Salmo salar* (salmón) y *Gadus morhua* (bacalao). Esto reforzaría el hecho de que habríamos logrado aislar microorganismos provenientes del intestino del oligoqueto.

En particular, nuestro objetivo no radicaba exactamente en conocer toda la microflora de *Grania* sp., sino solamente aquellos microorganismos cultivables con propiedades hidrolíticas, especialmente celulósicas. Sin embargo, sería interesante realizar un estudio con estrategia metagenómica, mediante la secuenciación del 16S para identificar de forma eficiente la diversidad de bacterias o arqueas, o del 18S para las levaduras, y así también identificar microorganismos no cultivables (Furrie, 2006).

A su vez, sería interesante investigar qué función están teniendo los microorganismos en asociación con *Grania* sp.. Podríamos analizar los ARNm que están sintetizando los microorganismos en este ambiente, realizando por ejemplo una RT-PCR a partir de una purificación del ARN del macerado de oligoquetos, con cebadores que hibriden para enzimas hidrolíticas reportadas en estos microorganismos. De esta manera, podríamos demostrar que los microorganismos sintetizan las enzimas hidrolíticas en su ambiente natural, y que probablemente cumplen un rol en la digestión de su hospedero; ayudando en la digestión de algas, degradando agar, celulosa, almidón y proteínas presentes en éstas.

## Celulasas sicrofílicas, un aporte a la biotecnología

Aunque se realizó una búsqueda de microorganismos productores de varias enzimas hidrolíticas activas en frío, el trabajo se centró principalmente en las bacterias productoras de celulasas. En particular, las celulasas sicrofílicas podrían tener relevancia en la producción de biocombustibles. Actualmente los procesos de sacarificación enzimática del material celulósico se realizan con enzimas mesófilas (trabajan en forma óptima entre los 40 - 60 °C; Han, et al. 2012), y luego se fermenta, generalmente por *Saccharomyces cerevisiae*, a temperaturas cercanas a los 30 - 35 °C. Sin embargo, se podrían utilizar enzimas sicrofílicas para degradar el material celulósico (sacarificación) y para fermentar de manera conjunta con levaduras o bacterias mesófilas, ya que ambos procesos (sacarificación por parte de la enzima sicrofílica y fermentación) podrían realizarse en condiciones óptimas en un mismo rango de temperatura (Cinelli et al., 2015). De contar con levaduras o bacterias que sacarifiquen y fermenten a una misma temperatura, también se podría realizar el procedimiento en forma conjunta (trabajar con un solo microorganismo, y sus propias celulasas).

El hecho de que se fermenten los azúcares al mismo tiempo que son liberados por las celulasas, mejoraría el rendimiento de la hidrólisis, ya que las celulasas se inhiben a altas concentraciones de glucosa (Wiman, et al. 1986; Huston, et al. 2008). De esta forma, se aumentaría la velocidad de sacarificación, y se daría la producción de etanol en un solo paso, disminuyendo costos operativos.

La sacarificación enzimática conjunta a la fermentación también presenta algunas desventajas: 1) el etanol generado durante la fermentación, inhibe de manera no competitiva las celulasas, por lo cual no se alcanza un rendimiento óptimo en la combinación de ambos procesos (Ghosh et al., 1982); 2) las enzimas comerciales sacarificadoras suelen ser costosas; y 3) si no se trabaja a temperaturas elevadas pueden proliferar microorganismos capaces de competir con el microorganismo fermentador, disminuyendo su rendimiento. Una solución alternativa a esta última desventaja sería adicionar antibióticos capaces de controlar la contaminación (Cinelli et al., 2015), pero el uso de antibióticos suele ser muy costoso y además, los efluentes generados podrían contener el antibiótico.

Como parte de este trabajo se evaluó el potencial celulolítico de las bacterias crecidas a distintas temperaturas. Se vio que este potencial varía dependiendo del género bacteriano. Las flavobacterias no crecieron a 30 °C, por ende no producen celulasas a esta temperatura. En las *Pseudomonas* spp., no se detectó diferencia del potencial celulolítico respecto a la temperatura, pero se notó una leve tendencia de mayor potencial celulolítico a 20 y 30 °C respecto a 10 °C. En la enterobacteria AUG 50, también observamos diferencias; a los 20 °C presentó mayor potencial celulolítico. Debemos aclarar que el potencial celulolítico, tal y como lo calculamos en este trabajo, no está directamente relacionado con la temperatura óptima de sacarificación de las enzimas, porque las enzimas están en el sistema "bacteria", *in vivo*. Para saber exactamente la temperatura óptima de hidrólisis de las celulasas, deberíamos realizar ensayos enzimáticos *in vitro* con las enzimas purificadas, y cuantificar su actividad a las distintas temperaturas, por ejemplo: 1) con métodos de determinación de azúcares reductores (por ejemplo utilizando el método del dinitro salicílico, DNS) y 2) utilizando sustratos celulósicos con grupo cromóforos azo capaces de liberarse ante la hidrólisis enzimática y medirse espectrofotométricamente (ejemplo azo-avicel o azo-celulosa).

### Ensayo preliminar de producción de celulasas por AUG 38

El trabajo prosiguió con la bacteria que presentaba mayor potencial celulolítico en placa: *Pseudomonas* sp. AUG 38.

Las celulasas son un conjunto de enzimas. Para promover la excreción de todas sus posibles variedades, se creció AUG38 en medio mínimo con distintos sustratos celulósicos (CMC,  $\alpha$ -celulosa, celulosa y Avicel) como fuente de carbono y energía. Las endoglucanasas hidrolizan los enlaces glicosídicos presentes en las regiones amorfas de la celulosa, y su producción se puede inducir utilizando sustratos solubles, como carboximetil celulosa (CMC) y  $\alpha$ -celulosa. Las exoglucanasas son activas en las regiones cristalinas de la celulosa, y su producción se puede inducir con sustratos como el Avicel (celulosa microcristalina); este tipo de enzimas no son activas frente al CMC. Las  $\beta$ -glucosidasas se producen utilizando  $\alpha$ -celulosa como fuente de carbono, y no presentan actividad frente a la celulosa cristalina (Saranraj, et al. 2012; Sheta, 2012). Los

sobrenadantes de cultivo, libres de células, no hidrolizaron ni celulosa, ni CMC, según los ensayos descritos en Materiales y Métodos (2.6.2 - Actividad celulolítica del sobrenadante). Este resultado podría explicarse por:

*-No se trabajó en las condiciones óptimas de producción y excreción de la enzima. Se debería ajustar el tiempo, temperatura y aireación del medio de crecimiento, así como determinar el mejor medio de cultivo.*

Tiempo de crecimiento: Se debería determinar en qué etapa de crecimiento *Pseudomonas* sp. AUG 38 se produce y excreta las celulasas. Sólo contamos con ensayos previos realizados en placa, donde se observa degradación de CMC y celulosa luego de 24 hs de incubación (datos no mostrados), por ello decidimos tomar sobrenadantes luego de 24 y 48 hs de crecimiento. Sin embargo, podríamos tomar muestras a tiempos mayores y analizar la actividad celulolítica. También se podría realizar cuantificación de células viables, y analizar el crecimiento de células en los distintos medios.

Temperatura de crecimiento: Los cultivos se realizaron a 20 y 30 °C. Según los resultados obtenidos en placas conteniendo CMC, se determinó que a esta temperatura sí se estarían expresando las celulasas, pero este resultado podría variar cuando se trabaja en medio líquido.

Aireación del cultivo: Se utilizó una agitación constante de 200 rpm. Podría ser que las celulasas se expresaran en condiciones de menor o mayor agitación, según se ha reportado (Deka et al. 2013).

Composición del medio de cultivo: Se utilizó un medio de cultivo mínimo reportado para la expresión de celulasas (Hankin & Anagnostakis, 1977). Este medio ya había sido probado para AUG 38, solidificado con agar, y se había observado halo de hidrólisis del CMC (datos no mostrados). Sin embargo, se debería tener en cuenta su composición en elementos traza, el pH, o las fuentes de carbono utilizadas (realizar ensayos con sustratos celulósicos como única fuente de carbono, por ejemplo) (Mandels & Reese, 1957; Deng & Tabatabai, 1995; Gupta et al., 2011; Sethi et al., 2013).

*-Secreción de proteasas junto con las celulasas: AUG 38 es una bacteria que produce también una proteasa extracelular, y esta enzima podría estar degradando otras proteínas extracelulares como las celulasas. Si al momento de analizar el sobrenadante,*

las proteasas de AUG 38 degradaron las celulasas, no se detectaría actividad celulolítica. La degradación de celulasas por proteasas extracelulares fue demostrada por Haab et al. (1990), que encontraron que pequeñas cantidades de una proteasa excretada por *Trichoderma reesei* presenta una alta afinidad por las celulasas producidas por el hongo; incluso los autores observaron modificación proteolítica en purificados de celulasas. Para enfrentar este posible problema, deberíamos investigar las proteasas de AUG 38, su modo de acción, y como disminuir o anular su actividad.

*-Baja concentración enzimática:* Cuando observamos degradación de la celulosa alrededor de la colonia, tenemos una gran cantidad de células. Probablemente en el medio líquido, las celulasas se encuentren muy diluidas en el sobrenadante, y el método de revelado con rojo Congo, en placas, no tenga la sensibilidad para evidenciar la posible actividad. Podríamos concentrar las proteínas presentes en el sobrenadante, por ejemplo, realizando una precipitación de todas las proteínas con sulfato de amonio, y posterior purificación con columnas de desalado (Bakare et al., 2005), o con centricones (si previamente conocemos su peso molecular). Luego sembrar el concentrado proteico sobre placas de celulosa y observar si hay degradación, y también determinar la actividad enzimática usando sustratos celulósicos.

### Localización extracelular de las celulasas: ¿Libres o asociadas a la membrana?

Se ignora si las celulasas en AUG 38 están libres en el medio de cultivo o asociadas a la membrana de la bacteria. Los resultados sugieren que serían enzimas extracelulares, dado que se observa degradación de celulosa insoluble en placa, reveladas con rojo Congo. No obstante, no se observó degradación de celulosa por parte del sobrenadante libre de células ensayado; por lo que se propone que las celulasas podrían estar adheridas a la pared celular. Existen reportes de complejos proteicos de celulasas, denominados celulosomas; donde las enzimas se organizan, coordinando sus dominios de unión a carbohidratos (distintas regiones de celulosa) y mantienen una eficiencia de hidrólisis de celulosa, mejor que con las enzimas separadas. En la mayoría de los casos; estos complejos se encuentran adheridos a la pared celular por medio de proteínas de

anclaje. Ejemplos de microorganismos productores de celulosomas adheridos a la pared son: *Ruminococcus flavefaciens*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Acetivibrio celulosolvens*, *Clostridium thermocellum* (Lind et al., 2002; [http://www.weizmann.ac.il/Biological\\_Chemistry/scientist/Bayer](http://www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Bayer)). Sin embargo, se cree que no es el caso, ya que se observan halos de hidrólisis de tamaño mucho mayor al de la colonia (centímetros más allá de la colonia), y estos complejos no son tan extensos.

### ¿Qué proteínas hay en los sobrenadantes?

A través del ensayo SDS-PAGE, se visualizaron distintas bandas proteicas en los sobrenadantes de AUG 38; sin embargo, se debería ajustar el proceso electroforético. Habría que realizar un previo ensayo de Bradford de cuantificación proteica, y sembrar en cada pocillo una concentración igual de proteínas, ajustar el grado de entrecruzamiento del gel, e incluso realizar diferentes protocolos de tinción, por ejemplo la tinción con plata.

De todas maneras, con los resultados obtenidos hasta el momento, observamos bandas que se podrían enviar a identificar por MS (espectrometría de masa) y comparar los perfiles peptídicos en las bases de datos para conocer si alguna, o varias de ellas corresponden a celulasas.

Además, se podrían realizar ensayos de zimograma, donde a partir de una electroforesis nativa se realiza un revelado específico para celulasas. Así se podría determinar la presencia y número de proteínas con actividad celulósica (Béguin, 1983). Este ensayo se podría realizar con el sobrenadante de cultivo libre de células, así como también con extracción de proteínas de membrana externa (celulosoma anclado a la pared).

## 5 CONCLUSIONES

Durante este trabajo se contribuyó al conocimiento de la microflora intestinal de *Grania* sp.. Además, se aislaron microorganismos con capacidad hidrolítica a bajas temperaturas, los que pueden considerarse una potencial fuente de enzimas novedosas con utilidad en biotecnología. Básicamente, el trabajo se focalizó en los microorganismos celulolíticos: bacterias y levaduras, capaces de sacarificar CMC a distintas temperaturas. Se pudo identificar las bacterias celulolíticas y clasificarlas según su potencial para degradar CMC. Se seleccionó una bacteria por su alto potencial celulolítico y se inició también el estudio de la optimización de parámetros para la producción de las celulasas activas a bajas temperaturas.

Como perspectivas, se planea optimizar las condiciones de producción de las celulasas en medio líquido por parte de AUG 38. Además, se identificarán las levaduras con capacidad celulolítica, se determinará su potencial celulolítico, se analizará su capacidad para realizar fermentación alcohólica, y finalmente se realizarán ensayos de sacarificación y fermentación conjunta para la producción de bioetanol.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

Asgher, M., Asad, J., Rahman, S., Legge, R. (2007) A thermostable  $\alpha$ -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79, 950–955.

Askarian, F., Zhou, Z., Olsen, R., Sperstad, S., Ringo, E. (2011) Culturable autochthonous gut bacteria (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzyme and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture*, 326-329.

Bakare, M., Adewale, I., Ajayi, A., Shonukan, O. (2005) Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*, 4, 9, 898-904.

Baldán, B., Andolfo, P., Navazio, L., Tolomio, C., Mariani, P. (2001) Cellulose in algal cell wall: an “*in situ*” localization. *European Journal of Histochemistry*, 45, 51-56.

Bayer, E., Chanzy, H., Lamed, R., Shoham, Y. (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8, 548–557.

Béguin, P. (1983) Detection of cellulose activity in polyacrilamide gels using Congo red stained agar replicas. *Analytical Biochemistry*, 131, 2, 333-336.

Belghith, H., Ellouz, S., Gargouri, A. (2001) Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Pol6) cellulases. *Journal of Biotechnology*, 89, 257-262.

Bennett, A., Christoffersen, R. (1986) Synthesis and processing of cellulase from ripening avocado fruit. *Plant Physiology*, 81, 830-835.

Bhat, M. (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18, 355–383.

Blazejak, A. (2005) Phylogenetic and functional characterization of symbiotic bacteria in gutless marine worms (Annelida, Oligochaeta). Tesis de doctorado. Universidad de Bremen, Instituto Max Planck de Microbiología Marina.

Brune, A., Ohkuma, M. (2011) Role of the Termite Gut Microbiota in Symbiotic Digestion *Biology of Termites: a Modern Synthesis*, 439-475.

Cameron, M., Aust, S. (2001) Cellobiose dehydrogenase—an extracellular fungal flavocytochrome. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 2–3, 129–138.

Cavaco, A. (1998) Mechanism of cellulase action in textile processes. *Carbohydrate Polymers*, 37, 273-277.

Cegarra, J. (2012) Biotecnología. En *Actualidad y perspectiva científica*. 14, 6, 304-305.

Chandel, A., Chandrasekhar, G., Borges, M., 3, Silvério, S. (2012) The realm of cellulases in biorefinery development. *Critical Reviews in Biotechnology*, 32, 3, 187–202.

Chi, W., Chang, Y., Hong, S. (2012) Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94, 917-930.

Cinelli, B., Castilho, L., Freire, D., Castro, A. (2015) A brief review on the emerging technology of ethanol production by cold hydrolysis of raw starch. *Fuel*, 150, 721-729.

Coughlan, M., Folan, M. (1978) Cellulose and cellulases: Food for thought, food for the future? *International Journal of Biochemistry*, 10, 103-108.

D'Amico, S., Collins, T., Marx, J., Feller, G., Gerday, C. (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Reports*, 7, 385-389.

Davison, A., Blaxter, M. (2005) Ancient Origin of Glycosyl Hydrolase Family 9 Cellulase Genes. *Oxford Journals: Molecular Biology and Evolution*, 22, 5, 1273-1284.

De Wit, P. (2010) Systematics of *Grania* (Clitellata: Enchytraeidae), an interstitial annelid taxon. Tesis de Doctorado. Universidad de Gotenburgo, Suecia.

De Wit, P., Rota, E., Erséus, C. (2011) Phylogeny and character evolution in *Grania* (Annelida, Clitellata). *Zoologica Scripta*, 40, 5, 509-519.

Deka, D., Das, S., Sahoo, N., Das, D., Jawed, M., Goyal, D., Goyal, A. (2013) Enhanced Cellulase Production from *Bacillus subtilis* by Optimizing Physical Parameters for Bioethanol Production. *ISRN Biotechnology*, 1-11.

Deng, S., Tabatabai, M. (1994) Cellulase activity of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1347-1354.

Deng, S., Tabatabai, M. (1995) Cellulase activity of soils: effect of trace elements. *Soil Biology and Biochemistry*, 27, 7, 977-979.

Flores, M., Zavaleta, A., Zambrano, Y., Cervantes, L., Izaguirre, V. (2010). Bacterias halófilas moderadas productoras de hidrolasas de interés biotecnológico. *Ciencia e investigación*, 13, 1, 42-46.

Fojan, P., Jonson, P., Petersen, M., Petersen, S. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*, 82, 1033–1041.

Furrie, E. (2006) A molecular revolution in the study of intestinal microflora. *Gut*, 55, 2, 141-143.

Ghosh, P., Pamment, N., Martin, R. (1982) Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose: effect of  $\beta$ -D-glucosidase activity and ethanol inhibition of cellulases. *Enzymes, Microbiology and Technology*, 4, 425-430.

Giere, O., Langhied, C. (1987) Structural organisation, transfer and biological fate of endosymbiotic bacteria in gutless oligochaetes. *Marine Biology*, 93, 4, 641-650.

Guarnizo, A., Martínez, P., Valencia, H. (2009) Biomass and cellulose pretreatments for saccharification. *Scientia et Technica*, Año XV, 49, 284-289.

Gupta, P., Samant, K., Sahu, A. (2011) Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*, 1-6.

Haab, D., Hagspiel, K., Szakmary, K., Kubicek, C. (1990) Formation of the extracellular proteases from *Trichoderma reesei* QM 9414 involved in cellulase degradation. *Journal of Biotechnology*, 16, 187-198.

Han, L., Feng, J., Zhang, S., Ma, Z., Wang, Y., Zhang, X. (2012) Alkali pretreated of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1, 53-61.

Hankin, L., Anagnostakis, S. (1977) Solid Media Containing Carboxymethylcellulose to Detect C, Cellulase Activity of Micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, 98, 109-115.

Henriksson, G., Johansson, G., Pettersson, G. (2000) A critical review of cellobiose dehydrogenases. *Journal of Biotechnology*, 78, 93-113.

Huston, A. (2006) *Biotechnological Aspects of Cold-Adapted Enzymes en Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*. Editor: Margesin, R. Editorial: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 20, 347-363.

Ibrahim, N., Badry, K., Eid, M., Hassan, M. (2011) A new approach for biofinishing of cellulose-containing fabrics using acid cellulases. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1, 116-121.

Illanes, A. (2008) *Enzyme Biocatalysis Principles and Applications*. Editorial Springer. Chile. 1, 1-3.

Jiménez, R., Fake, G., Carroll, J., Hood, E., Howard, J. (2010) A novel method for evaluating the release of fermentable sugars from cellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 5, 206-211.

Joseph, B., Ramteke, P., Thomas, G., Shrivastava, N. (2007). Standard Review Cold-active microbial Lipases: a versatile tool for industrial applications. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2 (2), 039-048.

Joshi, S., Satyanarayana, T. (2013) *Biotechnology of Cold-Active Proteases*. *Biology*, 2, 755-783.

Kasana, R., Gulati, A. (2011) Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. *Journal of Basic Microbiology*, 51(6), 572–579.

Knauf, M., Moniruzzaman, M. (2004) Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal*, 106, 1263, 147-150.

Kuhad, R., Gupta, R., Singh, A. (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011, 1-10.

Kumar, G., Takagi, H. (1999) Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*, 15, 561–594.

Lazado, C., Caipang, C., Kiron, V. (2012) Enzymes from the gut bacteria of Atlantic cod, *Gadus morhua* and their influence on intestinal enzyme activity. *Aquaculture nutrition*, 18, 423-431.

Ljungdahl, L., Eriksson, K. (1985) Ecology of Microbial Cellulose Degradation. *Advances in Microbial Ecology*, 8, 237-299.

Lo, N., Tokuda, G., Huatanabe, H. (2011) Evolution and function of endogenous termite cellulases. En *Biology of termites: a modern synthesis*. Editores: Bignell, D., Roisin, Y., Lo, N. Editorial Springer. 51-68

Lynd, L., Weimer, P., Van Zil, W., Pretorius, I. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 3, 506-577.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2004) Crecimiento Microbiano, en *Brock Biología de los Microorganismos*, 10ª edición, Editorial Pearson-Prentice Hall, Madrid, España; 6, 151-168.

Maki, M., Leung, K., Quin, W. (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, 5, 5, 500-516.

Mandels, M., Reese, E. (1957) Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *Journal of Bacteriology*, 73, 2, 269-278.

Mantyla A, Paloheimo M, Suominen P. (1998) Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*. *Enzymes, biological control and commercial applications*, 2, 291–309.

Martínez, M. (2008) Aislamiento, identificación y filogenia de microorganismos productores de proteasas de la Antártida, isla Rey Jorge: una aproximación al estudio molecular de las proteasas producidas. Tesina de Grado. Universidad de la República, Uruguay.

Mc Hale, A., Coughlan, M. (1981) The cellulolytic system of *Talaromyces emersonii*: Purification and characterization of the extracellular and intracellular  $\beta$ -Glucosidases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 662, 152-159.

Miyashita, M., Fujimura, S., Nakagawa, Y., Nishizawa, M., Tomizuka, N., Nakagawa, T., Nakagawa, J. (2010) *Flavobacterium algicola* sp. nov., isolated from marine algae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 344–348.

Monte, A., Cutiño, B., Gonzáles, J., Gonzáles, D., Figueroa, V., Cao, R. (2013) Aplicación de enzimas en biocatálisis. Perspectivas de la utilización de nanoarreglos como biocatalizadores. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 2, 2, 7-23.

Moreano, H., Riofrío, M. (2010) ¿Qué es la Antártida? en *Antártida Educa*, Editores Cortegoso, P., Redbull, F., Editorial Gráfica Latina.

Morita, R. (1975) Psicophilic Bacteria. *Bacteriology Reviews*, 39, 2, 144-167.

Murakami, T., Segawa, T., Bodington, D., Dial, R., Takeuchi, N., Kohshima, S., Hongoh, Y. (2015) Census of bacterial microbiota associated with the glacier ice worm *Mesenchytraeus solifugus*. *Microbiology Ecology*, 91, 1-28.

Nadeem, M., Saquid, M., Anjum, F., Asgher, M. (2009) Improving Bread Quality by Carboxymethyl Cellulase Application. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11, 6, 727-730.

Park, S., Baker, J., Himmel, M., Parrilla, P., Johnson, D. (2010) Research Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 1-10.

Persson, I., Tjerneld, F., Hahn-Hägerdal, B. (1991) Fungal Cellulolytic Enzyme Production: A Review. *Process Biochemistry* 26, 65-74.

Pichs, R. (2008) Temas relevantes del debate actual sobre energía y desarrollo, en *Temas de Economía Mundial*. Editora Hernández, G., 13, 117-134.

Quiroz-Castañeda, R., Folch-Mallol, J. (2011) Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *Biotecnología aplicada*, 28, 4, 1-11.

Rashed, H., Szabó, L., Dózsa, K. (1992) On the composition of the intestinal microbiota of *Fridericia egemon* (Enrichytridae). *Soil Biological and Biochemistry*, 24,12, 1291-1294.

Rühland, C. (2010) Characterization of bacterial endo- and ectosymbionts of oligochaete worms from marine sediments: Phylogeny and metabolic potential. Tesis de doctorado, Universidad Bremen, Instituto Max Planck de Microbiología Marina, Bremen, Alemania.

Sadhu, S., Maiti, K., (2013) Cellulase Production by Bacteria: A Review. *British Microbiology Research Journal*, 3, 3, 235-258.

Saranraj, P., Stella, D., Reetha, D. (2012) Microbial Cellulases and its Applications: a review. *International Journal of Biochemistry & Biotech Science*, 1, 1-12.

Sethi, S., Datta, A., Gupta, B., Gupta, S. (2013) Optimization of cellulase production from bacteria isolate from soil. Hindawi Publishing Corporation, *Biotechnology*, 1-8.

Shweta, A. (2012) Cellulases of Bacterial Origin and their Applications: A Review. *International Journal of Science and Research*, 3, 10, 1652-1655.

Singh, A., Ward, O. (2004) *Biotechnology and Biorremediation: an overview*. *Soil Biology*, 2, 1-5.

Sukumaran, K., Singhanian, R., Pandey, A. (2005) Microbial Cellulases: Production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 64, 832-844.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary

Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

Tanimura, A., Liu, W., Yamada, K., Kishida, T., Toyohara, H. (2013) Animal cellulases with focus on aquatic invertebrates. *Fish Science*, 71, 1-13.

Teather, R., Wood, P. (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied Environmental Microbiology*, 43, 4, 777-780.

Ting, X., Moo, S. (2010) Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Marine Drugs*, 8, 1, 210-218.

Tomme, P., Warren, R., Gilkes, N. (1995) Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances in Microbial Physiology*. Ed. Academic Press Limited, editor Poole. R., 37, 1-81.

Tropeano, M., Vázquez, S., Coria, S., Turjanski, A., Cicero, D., Bercovich, A., Mac Cormack, W. (2013) Extracellular hydrolytic enzyme production by proteolytic bacteria from the Antarctic. *Polish Polar Research*, 34, 3, 253-267.

Tsuji, A., Tominaga, K., Nishiyama, N., Yuasa, K. (2013). Comprehensive enzymatic analysis of the cellulolytic system in digestive fluid of the Sea Hare *Aplysia kurodai*. Efficient glucose release from sea lettuce by synergistic action of 45 kDa endoglucanase and 210 kDa  $\beta$ -glucosidase. *PLOS ONE*, 8, 6, 1-13.

Vibe, H., Ulvskov, P. (2010) Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 263-289.

Voet, D., Voet, J., Pratt, C. (2009) *Fundamentals of Biochemistry*. Second edition. Editorial Panamericana. Argentina. 11, 314-316.

Watanabe, H., Tokuda, G. (2001) Review: Animal cellulases. *Cellular Molecular Life Science*, 58, 1167-1178.

Watanabe, H., Tokuda, G. (2010) Cellulolytic systems in insects. Annual Review in Entomology, 55, 609-632.

Wenzel, M., Schönig, I., Berchtold, M., Kämpfer, P., König, H. (2002) Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. Journal of Applied Microbiology, 92, 32-40.

Wiman, C., Spindler, D., Grohmann, K., Lastic, S. (1986) Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose with the yeast *Brettanomyces clausenii*. Biotechnology and Bioengineering, 17, 221-238.

Wilson, D. (2009) Cellulases and biofuels. Current Opinion in Biotechnology, 20, 3, 295-299.

Wüst, P., Horn, M., Drake, H. (2013) *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae* as active fermenters in earthworm gut content. The ISME Journal, 5, 92-106.

Zittelli, G., Rodolfi, L., Bassi, N., Biondi, N., Tredici, M. (2013) Photobioreactors from microalgal Biofuel Production. En Algae for Biofuels and Energy, editores: Borowitzka, M., Moheimani. Editorial Springer, 7, 115-133

## **ANEXO**

### Medios de cultivo

#### **1. Medio rico LB**

Para 1 L de medio: 10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 10 g de NaCl.

#### **2. Medios diferenciales**

MC (Medio Carboxi-metil celulosa)

Para 1 L de medio: se mezclan 0,5 g de triptona, 0,25g de extracto de levadura, 0,5 g de NaCl, 15 g de agar y 5 g de Carboxi-metil celulosa. Se afora a 1 L con agua destilada Milli Ro, y se autoclava durante 20 min a 121 °C.

ML (Medio Leche)

Para 1 L de medio: se mezclaron 50 g de leche en polvo descremada con 500 mL de agua destilada Milli Ro. Se colocaron en autoclave durante 10 min a 121 °C. Por otra parte se mezclaron 15 g de agar, con 0,5 g de triptona, 0,25g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl, y se aforó con agua destilada Milli Ro hasta 500 mL. Se colocó en autoclave durante 20 min a 121 °C. Luego se termostataron ambas soluciones (autoclavadas en forma separada, ya que la leche se carameliza si se autoclava un tiempo mayor a 10 min) en estufa a 60 °C, hasta que ambas estuvieron a la misma temperatura. Luego se mezcló la solución de leche con la solución con agar, agitando hasta que lució homogéneo, y se pasó a placas de Petri de manera aséptica.

\*Para el medio leche líquido se procedió de igual manera, pero sin agregar agar. Previo a autoclavarse se distribuyó en tubos de precultivo.

MA (Medio Aceite)

Para 1 L de medio: se mezclaron 20 mL de aceite de oliva con 15 g de agar, 0,5 g de triptona, 0,25 g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl. Se aforó a 1 L con agua destilada y se elevó su temperatura hasta fundir el agar. Inmediatamente se licuó la solución, utilizando un mixer, hasta que quedó en una tonalidad blanca (se distribuyó el aceite en toda la solución). Luego se autoclavó durante 20 min a 121 °C.

\*Para el medio aceite líquido se procedió de la misma manera; solo que no se agregó agar, y una vez obtenido el homogeneizado de aceite se distribuyó en tubos de precultivo y se autoclavó.

#### MP (Medio Papel)

Se mezclaron en 1 L de agua Milli Ro: 0,5 g de triptona, 0,25g de extracto de levadura y 0,5 g de NaCl. Se disolvieron los solutos y se distribuyeron 4mL de medio en tubos de cultivo. Luego se autoclavaron durante 20 min a 121 °C. De manera independiente se cortaron tozos de papel de filtro Whatman® 3MM de aproximadamente 30 mg, y se autoclavaron. Luego de manera aséptica se tomaron trozos de papel de filtro atoclavado (tomado con pinza estéril por flambeado) y se colocó uno en cada tubo.

#### M-Agar (Medio Agar)

Se mezclaron 0,5 g de triptona, 0,25g de extracto de levadura, 0,5 g de NaCl y 15 g de agar en 1 L de agua Milli Ro. Luego se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

#### M-Agar semisólido

Se mezclaron 0,5 g de triptona, 0,25g de extracto de levadura, 0,5 g de NaCl y 2 g de agar en 1 L de agua Milli Ro. Se fundió el agar elevando la temperatura de la solución y se distribuyó en tubos de cultivo. Se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

#### MS (M starch, M almidón)

Se mezclaron 0,5 g de triptona, 0,25g de extracto de levadura, 0,5 g de NaCl ,15 g de agar y 20 g de almidón soluble en 1 L de agua Milli Ro. Luego se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

### 3. Medio Mínimo de inducción de producción enzimática

Se realizó la mezcla de los solutos en 1 L de agua Milli Ro y se esterilizó por autoclave durante 20 min a 121 °C.

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 mg
MgSO <sub>4</sub>	200 mg
CaCl <sub>2</sub>	1 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 µg
MnSO <sub>4</sub>	10 µg
ZnSO <sub>4</sub>	70 µg
CuSO <sub>4</sub>	50 µg
MoO <sub>3</sub>	10 µg
Extracto de levadura	1 g
Sustrato celulósico*	5 g

\*El sustrato varía entre Celulosa, Avicel, Carboximetil celulosa y α-celulosa.

## SDS-PAGE

### 1. Gel separador 12%

H<sub>2</sub>O -1,6 mL

Tris Base 1,5 M, pH 8,8 - 1,3 mL

SDS 10% - 0,05 Acrilamida Mix 30% - 2,0 mL

TEMED - 0,002 mL

Persulfato de amonio (PSA) 10% - 0,05 mL

Se realizó la mezcla de las soluciones y se colocó en soporte para gel de 0,5 mm de espesor.

## **2. Gel Concentrador 5%**

H<sub>2</sub>O - 1,5 mL

Tris HCl 1,0 M, pH 6,8 - 0,65 mL

SDS 10% - 0,05 mL

Acrilamida Mix 30% - 0,35 mL

TEMED - 0,005 mL

PSA 10% - 0,01 mL

Se mezclaron las soluciones y se colocaron en cima del gel separador (ya polimerizado). Se colocó el peine de pocillos y se dejó polimerizar, para luego realizar la siembra.

## **3. Buffer de carga de proteínas 5X**

Tris 1 M, pH 6,8 - 3,75 mL

SDS 20% - 3 mL

Azul de Bromofenol - 9 mg

Glicerol - 4,5 mL

H<sub>2</sub>O csp 10,5 mL

## **4. Buffer corrida proteínas con SDS 1X pH= 8,3**

Tris Base - 3 g

Glicina - 14,4 g

SDS - 1g

H<sub>2</sub>O milli Ro 1 L

## **5. Buffer TRIS**

Tris Base - 60,57 g

pH= 7,6

Diluir en 800 mL de H<sub>2</sub>O.

Ajustar el pH con HCl concentrado. Completar el volumen a 1 L.

## **6. Acrilamida Mix 30%**

Acrilamida 30%

Bis-acrilamida 0,8%

Preparado en H<sub>2</sub>O milli Ro y filtrado.

## **7. Solución de Tinción**

H<sub>2</sub>O 500 mL

EtOH 95% 400 mL

Ácido Acético Glacial 100 mL

Azul Brillante de Coomasie R250 1 g

## **8. Solución Decolorante**

H<sub>2</sub>O 500 mL

EtOH 95% 400 mL

Ácido Acético Glacial 100 mL

## **Otros *Buffers* y soluciones**

### **1. *Buffer* TAE 0,5X**

Tris Base - 2,42 g

Ácido Acético Glacial - 0,57 mL

EDTA 0,5 M, pH 8 - 1 mL

H<sub>2</sub>O csp 1 L

### **2. SFE: Suero fisiológico estéril**

NaCl 0,9 %

Se diluye en H<sub>2</sub>O y se esteriliza por filtración (filtros de 0,2 µm).