



Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Tesis de grado
Licenciatura en Bioquímica

ANÁLISIS DE MICROORGANISMOS CAPACES DE SINTETIZAR POLIHIDROXIALCANOATOS, AISLADOS DE MUESTRAS ANTÁRTICAS

Rocío González Porley

TUTORA: MSc. Ana Inés Catalán

CO-TUTORA: Dra. Silvia Batista

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Laboratorio de Microbiología Molecular

Año 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a Ana Inés Catalán por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme realizar mi tesis, por su ayuda y por haberme enseñado tanto.

A Karen Malán por su ayuda constante y por compartir sus conocimientos, así como a Silvia Batista por su contribución a nuestro trabajo.

Al resto del equipo que allí trabaja, principalmente a Gastón Azziz por su ayuda en el manejo de programas informáticos y soporte técnico, a María, Cecilia, Mini, Vero, Dani, etc.

A mi madre, a quien dedico mi vida, por haberme dejado el mayor conocimiento y enseñarme a no bajar los brazos.

A mis hermanos por siempre empujarme hacia adelante con su constante aliento.

A mis hermanas de la vida a las que les tocó la peor parte, aguantarme.

RESUMEN

Los polihidroxialcanoatos (PHA) son polímeros de hidroxiaácidos sintetizados por una amplia variedad de microorganismos como reserva de carbono y energía. Los microorganismos que acumulan PHAs poseen mayor sobrevivencia en condiciones adversas, como la exposición a un alto índice UV y las bajas temperaturas, así como en condiciones de baja disponibilidad de carbono. La familia de los PHAs es muy amplia, abarca polímeros compuestos por hidroxiaácidos con largos de cadena carbonada que van de 3 hasta 16 átomos de carbono. Estos compuestos son termoplásticos, biodegradables y bio-compatibles, constituyendo un buen material sustituto de los plásticos petroquímicos.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar e identificar microorganismos capaces de sintetizar PHAs y caracterizar la composición monomérica de esos polímeros acumulados, a partir de una colección de aislamientos provenientes de la Antártida marítima (Península Fildes, Isla Rey Jorge).

Se evaluó la capacidad de sintetizar PHAs mediante tinción con rojo Nilo en una colección de aislamientos antárticos obtenida previamente en el laboratorio y conservados a -80°C en glicerol. Las condiciones de cultivo de los aislamientos seleccionados como potenciales productores de PHAs fueron ajustadas de modo de promover el crecimiento y acumulación de polímero. Se ajustó la composición del medio definido, la temperatura de incubación y la concentración de la fuente de carbono agregada. La composición monomérica de los polímeros acumulados fue establecida por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS).

Los aislamientos productores de PHA se identificaron mediante el análisis de secuencia de parte del gen que codifica para la subunidad 16S ARNr.

Como resultado del trabajo, se seleccionaron seis aislamientos como candidatos a acumular PHAs. Se ensayaron distintas condiciones de crecimiento, se seleccionó como medio de cultivo el medio mineral definido MM y como temperatura de incubación 25°C , para continuar el estudio de la producción de PHAs. Se identificaron los aislamientos como pertenecientes al género *Pseudomonas* (5) y *Janthinobacterium* (1). Los PHAs acumulados por los aislamientos pertenecientes al género *Pseudomonas*, cultivados con glucosa o glicerol como únicas fuentes de carbono, contenían 3-hidroxiaácidos de 4 a 14 átomos de carbono. Por otro lado, el aislamiento identificado como *Janthinobacterium* crecido en presencia de glucosa o glicerol, acumuló PHA compuesto únicamente por el monómero 3-hidroxibutirato.

Estos resultados permitieron identificar nuevos aislamientos que producen PHAs de cadena larga, interesantes por sus propiedades termoplásticas. Los mismos constituyen un punto de partida para continuar estudiando la síntesis de estos compuestos por estos microorganismos productores.

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS	5
1.1.1 Características y estructura	5
1.1.2 Biosíntesis	7
1.1.3 PROPIEDADES	10
1.1.3.1 Propiedades físico-químicas	10
1.1.3.2 Biodegradabilidad	11
1.1.3.3 Naturaleza renovable	11
1.1.4 APLICACIONES	11
1.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA Y ASPECTOS AMBIENTALES DE LAS ISLAS SHETLAND DEL SUR	12
1.3 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN BACTERIANA DE PHAs	14
2. OBJETIVOS	15
2.1 GENERAL	15
2.2 ESPECÍFICOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 MEDIOS DE CULTIVO Y MICROORGANISMOS	16
3.1.1 Medios de cultivo	16
3.1.2 Microorganismos	16
3.2 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHAs	16
3.3 PERFILES DE CRECIMIENTO	17
3.3.1 Selección del medio de cultivo	17
3.3.2 Selección de temperatura de crecimiento	17
3.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS POLÍMEROS SINTETIZADOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA (GC-MS)	18
3.4.1 Obtención de biomasa microbiana	18
3.4.2 Síntesis de los metil-ésteres de hidroxiácidos	18
3.4.3 Análisis por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS)	19
3.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	19
3.5.1 Preparación de lisado de células	19
3.5.2 Amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr	20

3.5.2.1 Amplificación por PCR	20
3.5.2.2 Visualización de ADN y productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa	21
3.5.2.3 Análisis de las secuencias	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHA	23
4.2 PERFILES DE CRECIMIENTO	28
4.2.1 Selección del medio de cultivo	28
4.2.1.1 Acumulación de PHA en Medio Mineral MM	33
4.2.2 Selección de la temperatura de crecimiento	34
4.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MONOMÉRICA DE LOS BIOPOLÍMEROS	38
4.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS	39
5. CONCLUSIONES	45
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	46
7. BIBLIOGRAFIA	47
ANEXO I	50
ANEXO II	53
ANEXO III	56

1. INTRODUCCIÓN

1.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

1.1.1 Características y estructura

Los polihidroxicanoatos son poliésteres lineales biodegradables, producidos en la naturaleza por fermentación de azúcares o lípidos, almacenados en cuerpos de inclusión en el interior del citoplasma de células microbianas (fig. 1)¹. Constituyen una forma de almacenamiento de carbono y energía, y su acumulación ocurre bajo condiciones desbalanceadas de crecimiento, por ejemplo durante el agotamiento de algún nutriente esencial como el fósforo, nitrógeno u oxígeno^{2, 3, 4}.

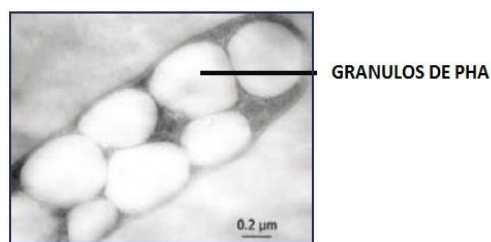


Figura 1. Gránulos de PHA en el interior de una célula bacteriana¹.

Los PHAs son polímeros de hidroxiacidos cuya fórmula general se muestra en la figura 2.

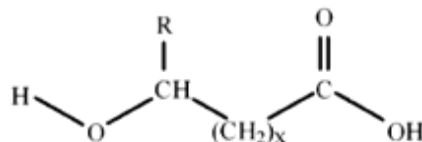


Figura 2. Estructura química de un monómero de PHA⁵.

Los monómeros se encuentran unidos por enlace éster entre el grupo carboxilo de un monómero y el grupo hidroxilo del monómero siguiente^{1, 5}. En la actualidad se han descrito más de 100 clases de monómeros que pueden formar parte de estos PHAs.

En general, los PHAs se clasifican en dos clases principales en base al largo de la cadena de carbono de los monómeros, siendo los PHAs de cadena corta (ssc-PHAs) aquellos que contienen en su estructura monómeros entre 3 – 5 carbonos y los de cadena media (msc-PHAs), aquellos que contienen monómeros entre 6 – 16 átomos de carbono (fig. 3)^{1, 2, 3}.

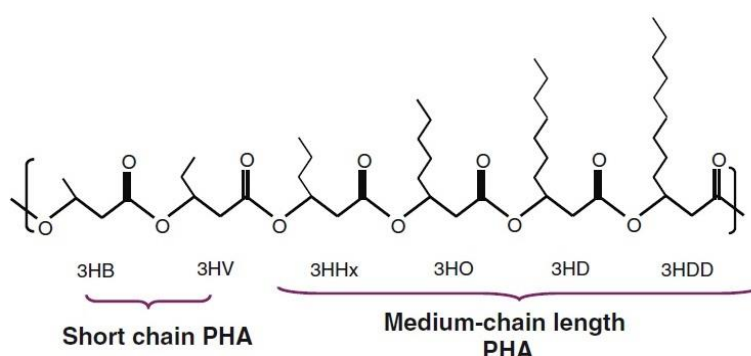


Figura 3. Estructuras comunes de monómeros de PHA. 3HB: 3-hidroxibutirato, 3HV: 3-hidroxivalerato, 3HHx: 3-hidroxihexanoato, 3HO: 3- hidroxioctanoato, 3HD: 3-hidroxidecanoato, 3HDD: 3-hidroxidodecanoato².

Los PHAs pueden ser homopolímeros, cuando están compuestos por un solo tipo de monómero o heteropolímeros cuando están compuestos por dos o más monómeros diferentes. Dentro de los homopolímeros, el Poli (3-hidroxibutirato) (PHB) fue el primer PHA de cadena corta descubierto y el más estudiado. Es producido por un amplio rango de géneros bacterianos. Por otro lado, los msc-PHAs generalmente se presentan como heteropolímeros y son acumulados principalmente por bacterias del género *Pseudomonas*¹⁴ al crecer en presencia de azúcares. Sin embargo, se han descrito algunas especies de *Pseudomonas* que acumulan PHB en presencia de ácidos grasos^{6, 7, 8}.

1.1.2 Biosíntesis

La composición monomérica de los PHA se encuentra determinada por diversos factores, tales como la fuente de carbono utilizada y las rutas metabólicas que conducen a su síntesis¹.

Las rutas biosintéticas se pueden resumir básicamente en 3 vías. Las mismas van a ser las encargadas de suministrar los monómeros hidroxiacil-CoA, que luego la enzima PHA sintasa va a polimerizar mediante la formación del enlace éster.

- 1) **Ruta clásica de síntesis de PHB.** El 3-hidroxibutiril-CoA, monómero del PHB, es sintetizado a partir de acetil-CoA por medio de 3 reacciones secuenciales. En la primera reacción, catalizada por la β -cetiolasas (codificada por el gen *phaA*), dos moléculas de acetil-CoA son condensadas para formar el acetoacetil-CoA. En una segunda reacción, éste es reducido a 3-hidroxibutiril-CoA por acción de una acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (codificada por el gen *phaB*). Finalmente, el 3-hidroxibutiril-CoA es polimerizado a PHB por la enzima PHA sintasa (codificada por el gen *phaC*). Esta ruta es la vía principal para la síntesis de PHB descrita en la mayoría de las bacterias que acumulan este polímero^{9,10}.
- 2) **β -oxidación.** Esta ruta es utilizada cuando los ácidos grasos son utilizados como fuente de carbono. Los intermediarios generados durante la β -oxidación pueden ser derivados al correspondiente 3-hidroxiacil-CoA, gracias a la acción de una serie de enzimas. Entre estas enzimas se encuentran: una 3-cetoacil-CoA reductasa, una epimerasa, una enoil-CoA hidratasa y una acil-CoA oxidasa. La β -oxidación es la ruta descrita para la síntesis de monómeros en bacterias del género *Pseudomonas* como *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales son capaces de crecer en presencia de ácidos grasos. El largo de cadena del 3-hidroxiacil-CoA producido va a estar relacionado con el largo de cadena del ácido graso suministrado como fuente de carbono. Por lo tanto, es posible encontrar monómeros del mismo largo de cadena que el ácido graso consumido o más cortos, con 2, 4, 6 carbonos menos, dada la eliminación de acetil-CoA en cada ciclo de la β -oxidación^{1, 9, 10}.

- 3) **Síntesis “*de novo*” de ácidos grasos.** Esta ruta también ha sido descrita en bacterias del género *Pseudomonas*, las cuales al crecer en presencia de carbohidratos son capaces de sintetizar monómeros de cadena larga entre 8 y 10 átomos de carbono. Esta ruta implica una 3-hidroxiacil-ACP-CoA transferasa (proteína PhaG) y una malonil-CoA-ACP transacilasa (FabD), que contribuyen con el suministro de 3-hidroxiacil-ACP para formar el monómero de PHA, el 3-hidroxiacil-CoA. Para la polimerización interviene una PHA sintasa. La especie asociada a esta vía es *Pseudomonas mendocina*^{9, 10}.

En la figura 4 se muestra una foto de las diferentes rutas descritas.

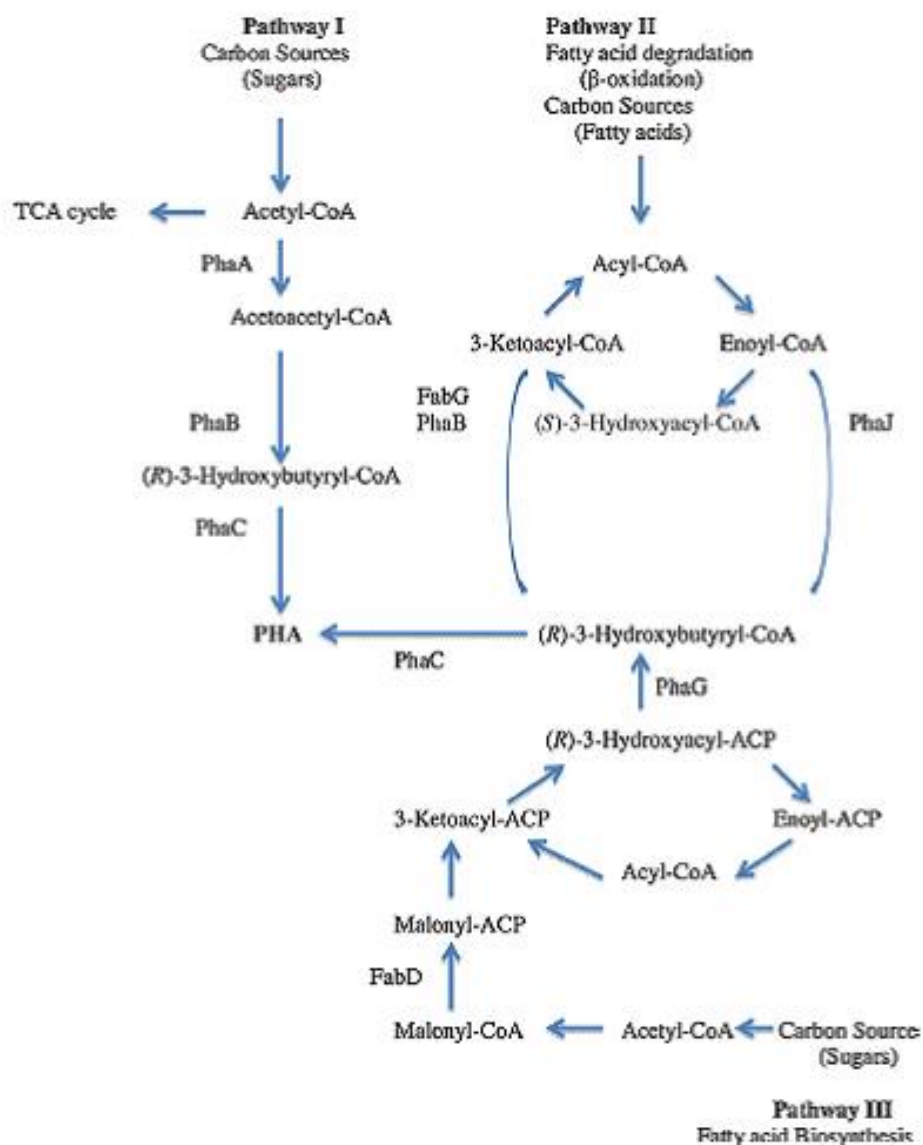


Figura 4. Resumen de las 3 principales vías de biosíntesis de PHAs¹⁰.

1.1.3 PROPIEDADES

1.1.3.1 Propiedades físico-químicas

La microscopía de fuerza atómica y la espectroscopía confocal de Raman son técnicas que se utilizan para el análisis de los gránulos de PHA. Los bioplásticos pueden ser aislados por diferentes protocolos, incluyendo pasos de centrifugación, extracción con solventes como cloroformo, trifluoroetanol, propileno, carbonato de dicloroetano, entre otros. Su composición monomérica se puede determinar por cromatografía de gases (GC) acoplada a un espectrómetro de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (NMR)¹¹.

La masa molecular de los PHAs varía según el microorganismo productor. Se encuentra generalmente en el orden de los 50.000 a 1.000.000 Da.

Dentro de la célula el PHB se encuentra en un estado fluido, pero luego de la extracción con solventes orgánicos se vuelve altamente cristalino. En este estado, es un material rígido pero frágil. La temperatura de fusión es relativamente alta, alrededor de 170 °C y al ser cercana a la temperatura de descomposición del polímero, dificulta su procesamiento. La producción del copolímero de 3-hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato da lugar a un copolímero que es menos frágil y rígido, el cual se puede utilizar para preparar *films*, con propiedades cercanas a las del polipropileno. En contraste con estos compuestos, los PHAs de cadena media tienen un menor nivel de cristalinidad y son más elásticos^{5, 12, 13}.

Tabla 1. Propiedades de diferentes PHAs y del polipropileno¹⁴.

Parameter	Value for ^b :				
	P(3HB)	P(3HB-3HV)	P(3HB-4HB)	P(3HO-3HH)	PP
T_m (°C) ^c	177	145	150	61	176
T_g (°C) ^d	2	-1	-7	-36	-10
Crystallinity (%)	70	56	45	30	60
Extension to break (%)	5	50	444	300	400

***P (3HB)**: poli (3-hidroxibutirato), **P (3HB-3HV)**: poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) conteniendo 20% 3HV, **P (3HB-4HB)**: poli (3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) conteniendo 16% 4HB, **P (3HO-3HH)**: poli (3-hidroxiocetanoato-co-3-hidroxihexanoato) conteniendo 11% 3HH, y **PP**: polipropileno.

T_m: temperatura de fusión.

T_g: temperatura de transición vítrea

1.1.3.2 Biodegradabilidad

Una propiedad interesante de los PHAs es su biodegradabilidad. En la naturaleza existen microorganismos capaces de degradar el PHA mediante la secreción de PHA-hidrolasas y PHA-depolimerasas. La actividad enzimática depende de la composición del polímero, de su forma física y de las condiciones ambientales. El tiempo de degradación de una pieza típica de PHB es de unos pocos meses a años^{14, 15}.

1.1.3.3 Naturaleza renovable

La producción de PHAs se basa en recursos renovables. La producción fermentativa utiliza productos agrícolas como azúcares y ácidos grasos como fuente de carbono y energía. Estas materias primas se generan mayormente a partir de agua y CO₂ y luego de su conversión a PHA biodegradable, los productos de su degradación incluyen la recuperación del CO₂ y agua. De esta manera, tanto la síntesis como su biodegradación son totalmente compatibles con el ciclo del carbono. Esto representa una ventaja frente al uso de las reservas de combustibles fósiles, las que son cada vez menores^{14, 15}.

1.1.4 APLICACIONES

Considerando las propiedades termoplásticas, biocompatibles y biodegradables de los PHAs, se han propuesto variadas aplicaciones en las que se podrían sustituir a los polímeros de origen petroquímico. Estas aplicaciones van desde el desarrollo de materiales de envasado y de revestimiento, hasta sustitutos para materiales de uso médico (Tabla 2)^{14, 15}.

Tabla 2. Resumen de las aplicaciones de los biopolímeros de acuerdo a sus propiedades^{14, 15}.

PROPIEDAD	APLICACIÓN	EJEMPLOS
Biodegradabilidad/Termoestabilidad	Materiales de envasado	Bolsas, vasos, utensilios, botellas, etc.
Biocompatibilidad	Implantes biomédicos	Placas de hueso, sustitutos de la piel, mallas quirúrgicas, etc.
Biodegradabilidad	Biocombustibles	Ésteres: 3-hidroxibutirato de metilo, 3-hidroxialcanoato de metilo
Biodegradabilidad/Biocompatibilidad	Producción de pequeñas moléculas	Solventes orgánicos

1.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA Y ASPECTOS AMBIENTALES DE LAS ISLAS SHETLAND DEL SUR

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

Las islas Shetland del Sur están ubicadas en el océano Glacial Antártico. La isla Rey Jorge es la más grande de este archipiélago. La península Fildes está ubicada al suroeste de la isla y es el área más extensa sin cobertura de hielo permanente de la misma. Durante la estación estival, el paisaje rocoso se cubre de pequeños arroyos y cañadas de deshielo que se forman con agua proveniente del glaciar y nieve fundida. A medida que avanza el verano se forman alfombras de briofitas, líquenes y tapetes microbianos de forma aislada¹⁶.

Los tapetes microbianos están constituidos por densas comunidades de microorganismos dispuestos siguiendo un patrón de estratificación vertical (fig. 5). Esto se visualiza por la diferente coloración de las capas, como consecuencia de los pigmentos producidos por los

organismos establecidos en cada una de ellas. Las comunidades microbianas se entremezclan en los tapetes con partículas de sedimento o precipitados minerales. Estos tapetes se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes considerados extremos como lagos salinos e hipersalinos, fuentes termales, desiertos y zonas polares^{5, 16}.

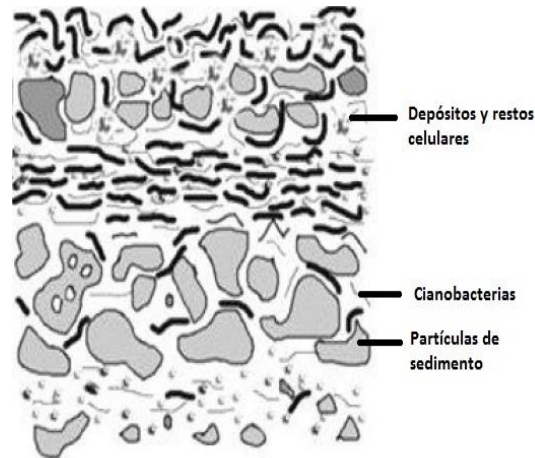


Figura 5. Imagen representativa de la estructura de un tapete microbiano¹⁶.

El estudio de este tipo de comunidades microbianas ha permitido establecer la presencia de microorganismos que acumulan en su interior polímeros de reserva como los polihidroxialcanoatos (PHAs), como forma de resistir las condiciones extremas de estos ambientes^{1, 6}.

Se ha sugerido que la acumulación de PHAs en *Pseudomonas* de la Antártida, constituye un mecanismo de adaptación para soportar el estrés oxidativo y los cambios drásticos de temperatura en estos ambientes¹. López y colaboradores (2009) aislaron de muestras antárticas una bacteria que permitió definir una nueva especie de *Pseudomonas*, identificada como *Pseudomonas extremaustralis*. Este microorganismo es capaz de sintetizar PHB y posee alta resistencia al calor y al estrés oxidativo, así como una mayor tolerancia al frío^{6, 8}.

1.3 IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN BACTERIANA DE PHAs

Los poliésteres han sido objeto de estudio de muchos trabajos de investigación. La importancia de éstos radica en sus propiedades como bio-compatibilidad y bio-degradabilidad y en la posibilidad de utilizarlos como reemplazo de los polímeros petroquímicos, debido principalmente a la creciente acumulación de plásticos en el ambiente.

Entre las ventajas que presentan frente a los plásticos químicos se encuentra el proceso de producción, el cual es amigable con el ambiente. El mismo es posible a partir de recursos renovables, mediante el uso de microorganismos¹⁰. Excepto por el establecimiento de algunas compañías y plantas pilotos, la producción a nivel industrial se encuentra aún en proceso de investigación, debido a los altos costos que presenta en comparación con la de los plásticos químicos¹⁷. La búsqueda de nuevos microorganismos productores es una de las áreas de investigación en PHAs, más importantes. Esta línea de estudio está dirigida a identificar organismos que sean mejores productores o capaces de sintetizar nuevos tipos de polímeros (en cuanto a su composición química) e identificar nuevas rutas metabólicas, etc.

Como fue mencionado anteriormente, los PHAs constituyen un mecanismo para almacenar carbono y energía, otorgándole al organismo productor ventajas de sobrevivencia frente a condiciones ambientales adversas. El continente antártico constituye un ambiente hostil, por lo que presumimos que los microorganismos que habitan dicho lugar probablemente sean capaces de acumular este tipo de biopolímero.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Seleccionar y analizar microorganismos capaces de sintetizar PHAs, a partir de una colección de microorganismos aislados de muestras de tapetes antárticos.

2.2 ESPECÍFICOS

- a. Seleccionar aislamientos que produzcan PHA al consumir diferentes fuentes de carbono.
- b. Determinar las condiciones de crecimiento que mejoren la acumulación de PHA, incluyendo la composición del medio de cultivo y temperatura de crecimiento.
- c. Analizar la composición del polímero sintetizado por los aislamientos cultivados en presencia de diferentes fuentes de carbono.
- d. Identificar los aislamientos mediante el análisis del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S ARNr.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MEDIOS DE CULTIVO Y MICROORGANISMOS

3.1.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo fueron: caldo nutriente TY y LB (Luria-Bertani), medio R₂A y los medios minerales definidos MM y LGI (Ver composición de medios en ANEXO I). En los casos donde fueron utilizados en estado sólido, se les agregó agar a una concentración final de 15 g/L.

Los medios R₂A, LGI y MM, fueron suplementados con una de las siguientes fuentes de carbono: sacarosa, glucosa, glicerol o xilosa, a la concentración final indicada en cada caso. Las fuentes de carbono fueron preparadas y agregadas al medio de cultivo correspondiente luego de la esterilización por autoclave.

3.1.2 Microorganismos

Se utilizaron la cepa Z69 de *Herbaspirillum seropedicae*¹⁸ y la cepa S17.1 de *Escherichia coli*¹⁹, como control positivo y negativo de síntesis de PHA, respectivamente²⁰. Los aislamientos obtenidos en este trabajo se denominaron I, II, III, V, VII y X.

3.2 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHAS

Se analizó la capacidad de los aislamientos seleccionados de acumular PHA. Para ello, los organismos se sembraron en placas con medio sólido R₂A con 10 g/L de glucosa, xilosa, sacarosa o glicerol como fuentes de carbono. Las placas se incubaron a 25°C durante 72 horas. Luego fueron teñidas con una solución de rojo Nilo 0,1% (m/v en acetona), según lo descrito por Kranz y col. (1997)²¹. La fluorescencia se observó bajo luz UV (300nm) en un transiluminador.

H. seropedicae Z69 y *E. coli* S17.1 fueron crecidas y mantenidas en medio sólido TY y LB, respectivamente.

3.3 PERFILES DE CRECIMIENTO

Los crecimientos fueron monitoreados a lo largo de tiempo por medidas de densidad óptica (DO) a 620nm en Colorímetro ERMA AE-22 (EEUU).

3.3.1 Selección del medio de cultivo

Se determinó el perfil de crecimiento de los aislamientos crecidos en dos medios minerales definidos de cultivo: LGI y MM. Se utilizaron tubos con 5 mL de medio de cultivo y se adicionó glucosa como fuente de carbono, a una concentración final de 10 g/L. Los tubos fueron inoculados con 100 µL de un cultivo crecido en caldo TY, durante 24 horas a 25°C en agitador orbital a 150 r.p.m. Los tubos luego de inoculados, se incubaron a 25°C en agitador orbital a 150 r.p.m, durante 72 horas. El ensayo se realizó por duplicado. Se incluyó un tubo sin inocular como control de contaminación.

3.3.2 Selección de temperatura de crecimiento

Para determinar el perfil de crecimiento a diferentes temperaturas, se usó el medio de cultivo seleccionado previamente para cada aislamiento, siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Las temperaturas evaluadas fueron 4°C, 25°C, 30°C y 37°C. El ensayo se realizó por triplicado.

3.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS POLÍMEROS SINTETIZADOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA (GC-MS)

3.4.1 Obtención de biomasa microbiana

Los aislamientos crecidos en placas con medio TY fueron usados para sembrar tubos con 5 mL de caldo TY. Estos tubos se incubaron con agitación a 25°C durante 24 horas. Volúmenes de 100 µL de estos cultivos fueron usados para inocular tubos con 5 mL de MM suplementado con glicerol o glucosa como fuentes de carbono, a una concentración final de 20 g/L. Estos tubos se incubaron con agitación a 25°C durante 24 horas. Los 5 mL de cultivo se utilizaron para inocular matraces Erlenmeyer con 25 mL de medio MM con glucosa o glicerol, a una concentración final de 20 g/L. Los matraces fueron incubados durante 48 horas a 25°C en agitador orbital a 150 r.p.m.

Luego de 48 horas, las células fueron colectadas por centrifugación (Centrifuga Hitachi 20 PR-52, Japón) a 10.000 r.p.m por 10 min. El *pellet* celular se lavó 2 veces con 10 mL de H₂O destilada y se guardó a -20°C para su posterior liofilización (BW-18B Frezze Dryer, Bluewave Industries Co. China).

3.4.2 Síntesis de los metil-ésteres de hidroxiácidos

A partir de células liofilizadas, se realizó un protocolo de esterificación con metanol bajo condiciones de catálisis ácida. Este ensayo permite obtener los metil ésteres derivados de los hidroxiácidos, según lo descrito por Brandl y col. (1988)²². Se transfirió a un tubo de vidrio con tapa de rosca, 20 mg de células liofilizadas. Se agregó 1 mL de CHCl₃, 1 mL de H₂SO₄ 15% en metanol y 50 µL de una solución 20 mg/mL de ácido benzoico en metanol (SIGMA). El ácido benzoico fue incorporado como estándar interno. La mezcla se incubó durante 140 min a 100°C. Una vez culminada esta etapa, los tubos se dejaron enfriar y se les agregó 0,5 mL de H₂O desionizada. Se mezcló durante 1 minuto por vortex y se mantuvo en reposo hasta visualizar la separación de fases. Se transfirió la fase orgánica a un tubo limpio y se colocó una punta de espátula de sulfato de sodio para retirar todo el exceso de agua. Finalmente, la misma se filtró a través de algodón y se colocó en viales para su inyección en el equipo.

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

Se utilizó un cromatógrafo de gases GC MS-QP2010 Ultra Shimadzu equipado con una columna HP-5MS ([5% fenil]-metil poli siloxano). Se inyectó 1 μ L de muestra con un split 50:1. Se utilizó He como gas *carrier* a un flujo de 1 mL/min. La corrida se realizó en modo TIC y la identificación fue realizada por comparación con bibliotecas de espectros de masas comerciales (NIST, Wiley). Se confirmó la identidad de los hidroxiácidos realizando una nueva corrida en modo SIM e identificando los cuatro iones característicos de los hidroxiácidos: 43, 71, 74, 103, según lo descrito por Tan y co. (2014)²³.

Programa de separación y análisis:

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

3.5 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

3.5.1 Preparación de lisado de células

Se transfirió una pequeña cantidad de células crecidas por 24 horas en placas con medio TY a un tubo de microfuga conteniendo 100 μ L de H₂O destilada. La suspensión celular se incubó a 100°C durante 15 min. Luego se transfirieron los tubos a -20°C y se incubaron durante 15 min. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 14000 r.p.m. en una centrifuga Spectrafuge 24D (Sigma), durante 10 min. El sobrenadante se utilizó como molde para la reacción de PCR.

3.5.2 Amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr

3.5.2.1 Amplificación por PCR

Se realizó la amplificación por PCR de una región del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S ARNr, utilizando los cebadores universales 1492R y 27F²⁴ (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR.

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

La mezcla de reacción, para un volumen final de 25 µL, se detalla en la Tabla 4. Se incluyó como control positivo a la cepa Z69 de *H. seropedicae* y un control negativo sin templado.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador GenePro thermal Cycler TC-E (China) bajo el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de 15 " a 95°C, 30 s a 55°C y 1,5 min a 70°C, y una etapa de extensión de 5 min a 70°C.

Tabla 4. Mezcla para la reacción de PCR para un volumen final de reacción de 25 µL.

Reactivos	Concentración final	Volumen a agregar (µL)
Mango Mix 2X	1x	12,5
Cebador 1492R (100 µM)	10 µM	2,5
Cebador 27F (100 µM)	10 µM	2,5
Molde	-	2
H ₂ O	-	5,5

MangoMixTM (BIOLINE, Inglaterra) es una mezcla de reacción 2X para PCR que contiene la enzima ADN polimerasa MangoTaqTM, MgCl₂ a una concentración de 5 mM y dNTPs.

3.5.2.2 Visualización de ADN y productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR y el ADN genómico de los lisados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % en buffer TAE 1X (ver composición en ANEXO 1)²⁵. Se utilizó el colorante Good View II (1,8 µL para 45 mL de gel) (SBS, China) para visualizar el ADN. Como *buffer* de carga se colocaron 2 µL de 6X DNA Loading DYE (Thermo Scientific, EEUU). Se sembraron 3 µL y 7 µL de lisado y productos de PCR, respectivamente. Se utilizó el marcador de peso molecular Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas, EEUU) (0.5µg/µL) (fig. 6). La corrida se llevó a cabo a 90V durante 45 min, en *buffer* de corrida TAE 1X en una cuba de electroforesis horizontal (Sigma-Aldrich, EEUU). Los fragmentos de ADN se visualizaron en un transiluminador Safe Imager™ 2.0 Blue-Light (Invitrogen, EEUU).

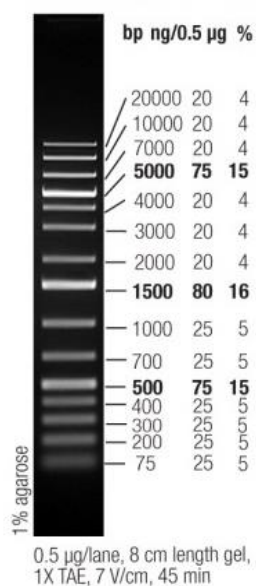


Figura 6. Marcador de peso molecular Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

3.5.2.3 Análisis de las secuencias

Los productos de PCR que exhibieron el tamaño esperado en el perfil electroforético (1500 pb) se enviaron a secuenciar a MACROGEN (Corea del Sur). Los fragmentos se secuenciaron usando ambos cebadores (27F y 1492R). Mediante programas informáticos se procedió con su análisis. Se utilizó el programa Chromas Lite para editar manualmente las secuencias y eliminar aquellas regiones de baja calidad. Las secuencias forward y complementaria se ensamblaron mediante el programa DNA Baser. Las secuencias del gen de 16S ARNr se compararon contra la base de datos 16 S ARNr de Genbank, usando el programa *BLASTn* 16S ARNr (www.ncbi.nlm.nih.gov). La construcción del árbol filogenético se realizó mediante el programa MOLE BLAST (NCBI), utilizando diferentes secuencias del género *Pseudomonas* y *Janthinobacterium* como referencias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE PHA

Se partió de 5 aislamientos: f7(2), f7(3), f7(1), f8(3) y f8(6), provenientes de muestras de tapetes microbianos colectadas durante la campaña del Instituto Antártico Uruguayo (IAU) en el año 2008 y conservados a -80°C en suspensión con glicerol al 20%.

Para la obtención de cultivos puros, se sembraron los aislamientos almacenados a -80°C en placas con medio TY y se incubaron a 25°C durante 24 horas. Los crecimientos que presentaron diferentes tipos de colonias se volvieron a re-aislar en nuevas placas con medio TY y fueron incubadas en las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió hasta obtener cultivos presuntivamente puros, exhibiendo colonias con una morfología uniforme, en base a características macroscópicas. De este modo, a partir del aislamiento f7 (1) se aislaron dos tipos de colonias, al igual que para el aislamiento f8 (6), para los aislamientos f7 (2) y f7 (3) se aislaron 4 tipos diferentes de colonias, mientras que del aislamiento f8 (3) se obtuvo una sola colonia (Tabla 5). Las principales diferencias que presentaron las colonias fueron en la coloración (amarilla y blanca), tamaño y gomosidad. De esta forma, fue posible obtener 10 aislamientos que se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Aislamientos obtenidos a partir de las muestras obtenidas de tapetes antárticos, conservadas a -80°C en glicerol.

AISLAMIENTO INICIAL	NOMENCLATURA
f7(1)	X; III
f7(2)	IV; V; VI; VII
f7(3)	IV; V; VI; VII
f8(3)	II
f8(6)	VIII; IX

Los aislamientos obtenidos se sembraron en placas con medio R₂A en presencia de varias fuentes de carbono. Luego de incubadas a 25°C, se tiñeron las colonias con solución de rojo Nilo. En las figuras 7 y 8 se muestran las fotos tomadas bajo luz UV, correspondientes a los aislamientos crecidos en medio R₂A con las diferentes fuentes de carbono. Se puede observar la fluorescencia de las colonias, lo que indica la probable acumulación de PHA.

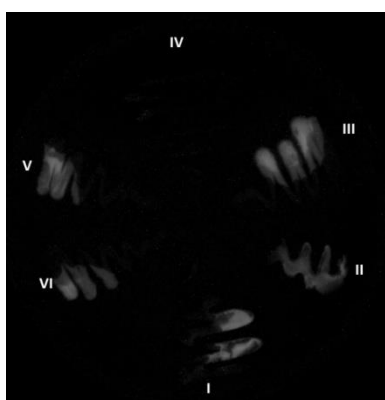
En cuanto a la técnica de tinción con rojo Nilo, es importante destacar que la misma es utilizada para la detección de acumulación de lípidos, tales como triacilglicerol o ésteres de colesterol, en el citoplasma de diferentes células, no siendo una técnica específica para la tinción de polihidroxialcanoatos²⁶.

Para la selección de algunas de las fuentes de carbono a ensayar, se consideraron compuestos que formaran parte de subproductos o residuos industriales, de bajo costo. Estos fueron: xilosa, sacarosa y glicerol. La xilosa es uno de los carbohidratos más abundantes de la hemicelulosa. Este polímero forma parte de la biomasa lignocelulósica, generado como subproducto de la industria forestal y de biocombustibles. La sacarosa es un disacárido presente en la melaza obtenida de la cristalización del azúcar. El glicerol se genera en grandes cantidades como subproducto de la industria del biodiesel. Se incluyó glucosa como fuente de carbono de referencia.

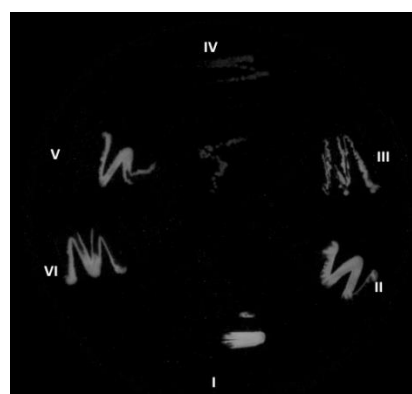
En las imágenes se observa que si bien todos los aislamientos fueron capaces de crecer en medio R₂A con xilosa, sacarosa, glucosa o glicerol como fuentes de carbono, no todos fueron capaces de fluorescer en esas condiciones (fig. 7 y 8). La selección se llevó a cabo comparando visualmente la intensidad de la fluorescencia de cada aislamiento con la del control positivo *H. seropedicae* Z69 y el control negativo *E. coli* S17.1 (fig. 9).

De esta manera, se seleccionaron 6 aislamientos como potenciales productores de PHAs (Tabla 5). Ellos fueron: los aislamientos I, II, III, V, VIII y X.

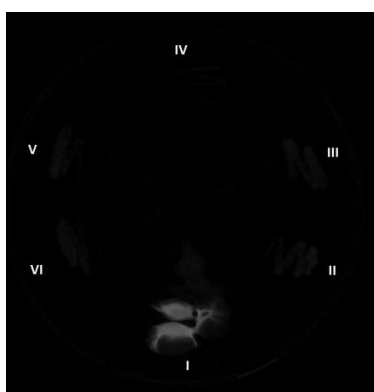
Los aislamientos IV y VII se descartaron por no presentar fluorescencia. Los aislamientos VI y V provienen del mismo tubo original a -80°C y a pesar que fueron en principio re aisladas como diferentes por el tamaño de la colonia, ambas crecieron y presentaron fluorescencia en las mismas fuente de carbono (ver Tabla 6). Por lo tanto se seleccionó el aislamiento V para continuar el trabajo. De la misma manera, el aislamiento IX se lo consideró similar al aislamiento VIII (Tabla 6). Estas conclusiones fueron posibles una vez que se obtuvieron cultivos uniformes a partir de los aislamientos iniciales.



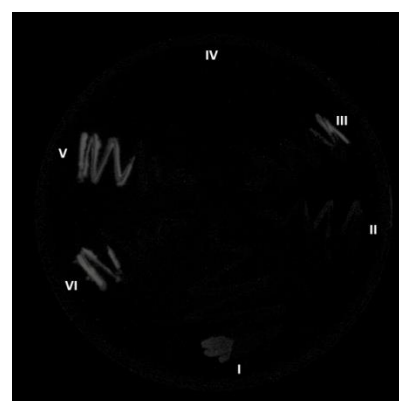
A - R₂A + glicerol



B - R₂A + glucosa

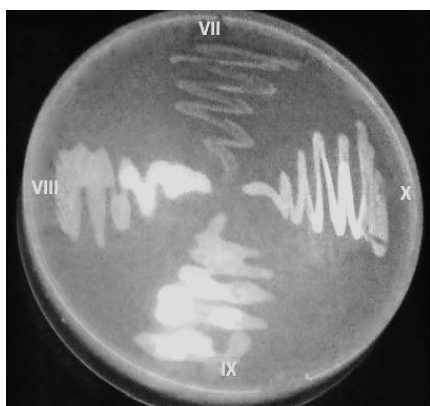


C - R₂A + sacarosa

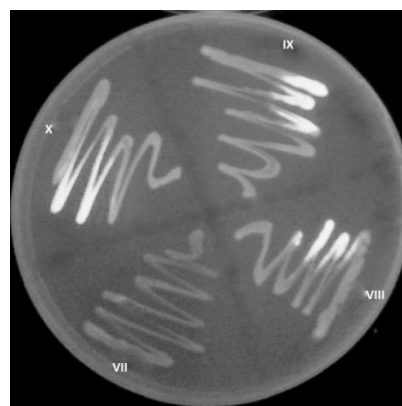


D - R₂A + xilosa

Figura 7. Placas con medio R₂A y diferentes fuentes de carbono, con los aislamientos I a VI, teñidos con la solución de rojo Nilo, visualizados bajo luz UV.



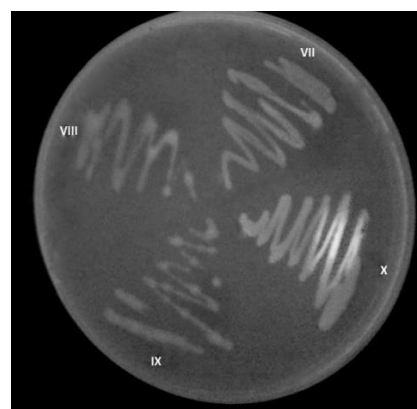
A - R₂A + glicerol



B - R₂A + glucosa



C - R₂A + sacarosa



D - R₂A + xilosa

Figura 8. Placas con medio R2A y diferentes fuentes de carbono, con los aislamientos VII a X, teñidos con la solución de rojo Nilo, visualizados bajo luz UV.

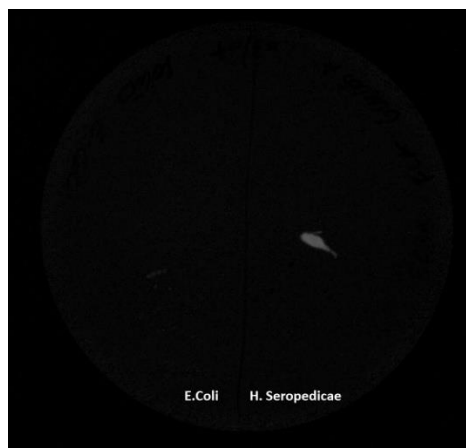


Figura 9. Control positivo y negativo en medio R₂A con glucosa como fuente de carbono. A la derecha control positivo (*H. seropedicae*) y a izquierda control negativo (*E. coli*).

En la tabla 6 se listan los resultados observados en las placas.

Los resultados obtenidos indican que, para los organismos en estudio, la glucosa y el glicerol son buenos sustratos para evaluar la acumulación de PHA. En presencia de xilosa y sacarosa todos los aislamientos fueron capaces de crecer, pero no todos exhibieron fluorescencia (Tabla 6). Sin embargo, no se descarta la xilosa y sacarosa como posibles sustratos para la síntesis de PHAs. Como se mencionó en la introducción, la síntesis de PHAs ocurre cuando el microorganismo se encuentra en presencia de un exceso de fuente de carbono y en condiciones limitantes para el crecimiento (limitación de nitrógeno, fósforo, oxígeno). Es importante destacar que la identificación de posibles productores de PHAs se realizó en el medio R₂A, que no es un medio definido. Con el agregado de las distintas fuentes de carbono se buscó, además de evaluar dichos sustratos, generar en el medio un exceso de carbono. Sin embargo dada la composición del R₂A, posiblemente el crecimiento no se vio afectado por la limitación de algún nutriente esencial. Para poder concluir que estos aislamientos no acumulan PHAs en presencia de xilosa o sacarosa, se debería realizar el ensayo en un medio mineral definido utilizando dichos sustratos como única fuente de carbono.

A partir de estos resultados, se evaluaron para los posteriores ensayos de cultivos en matraces los medios minerales definidos MM y LGI y se seleccionaron la glucosa y el glicerol como las fuentes de carbono.

Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos con el ensayo de rojo Nilo en medio R₂A. El símbolo + indica la presencia de fluorescencia.

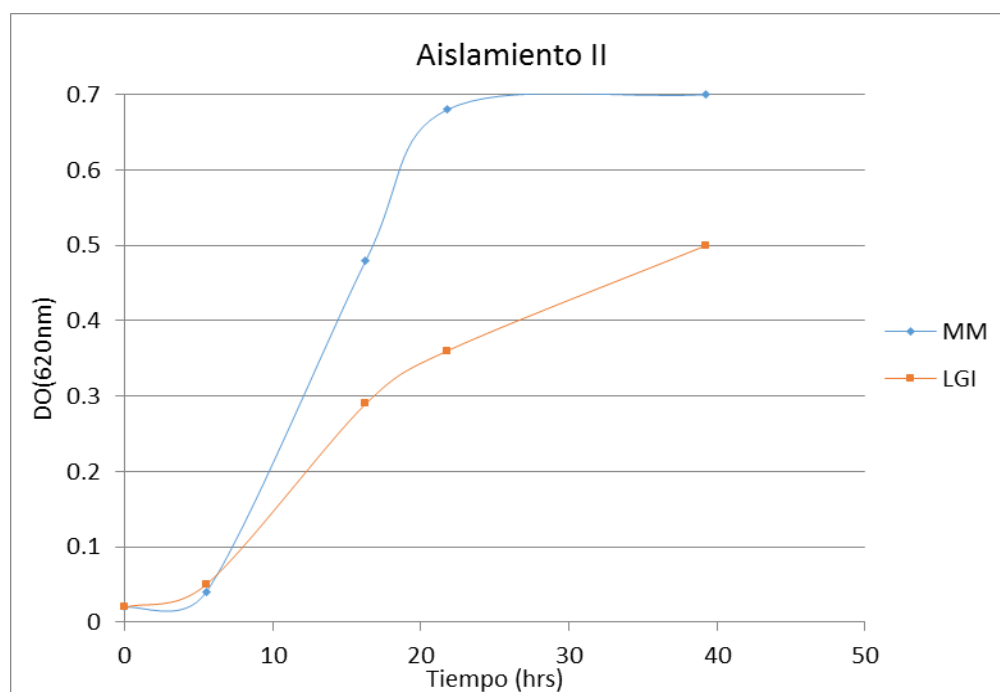
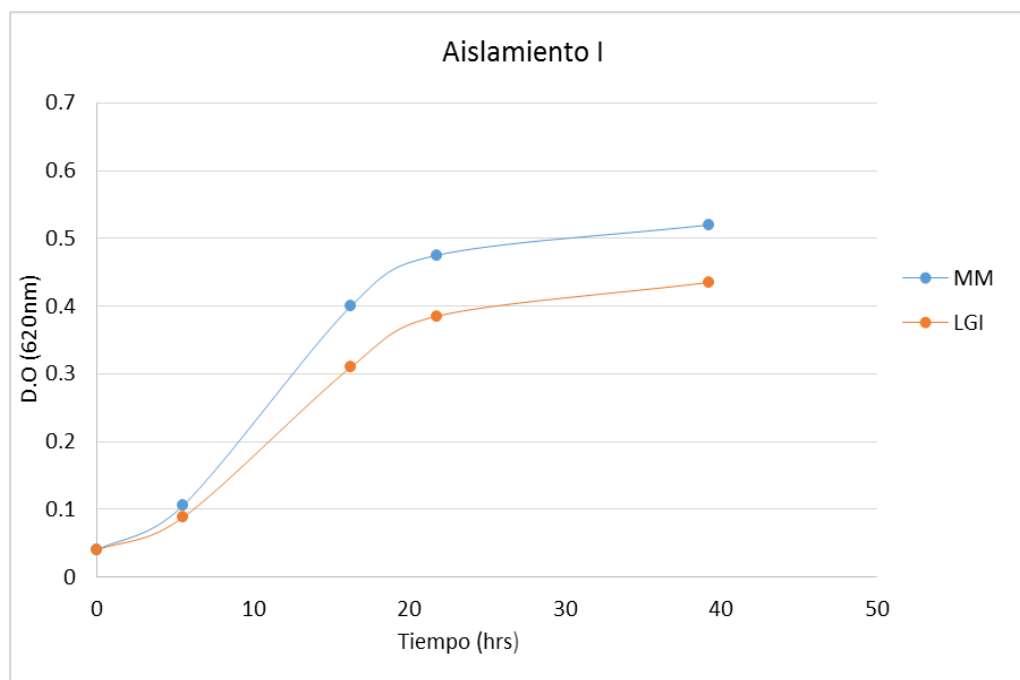
AISLAMIENTOS	FUENTE DE CARBONO			
	Sacarosa	Glucosa	Glicerol	Xilosa
I	+	+	+	-
II	-	+	+	-
III	-	+	+	+
IV	-	-	-	-
V	-	+	+	+
VI	-	+	+	+
VII	-	-	-	-
VIII	+	+	+	-
IX	+	+	+	-
X	+	+	+	+

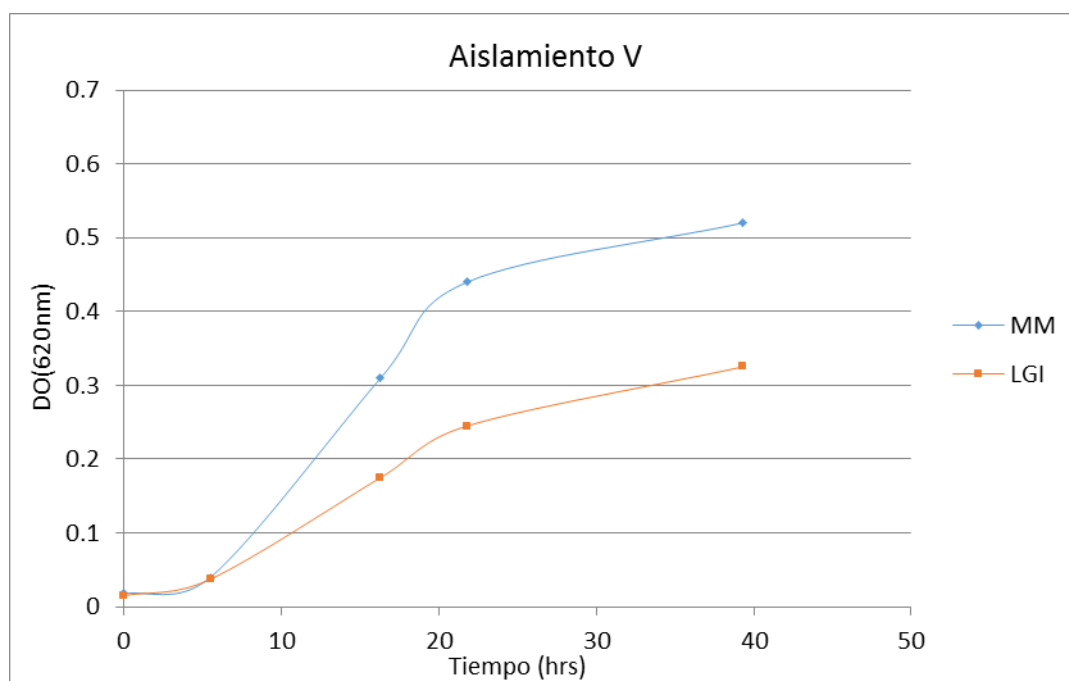
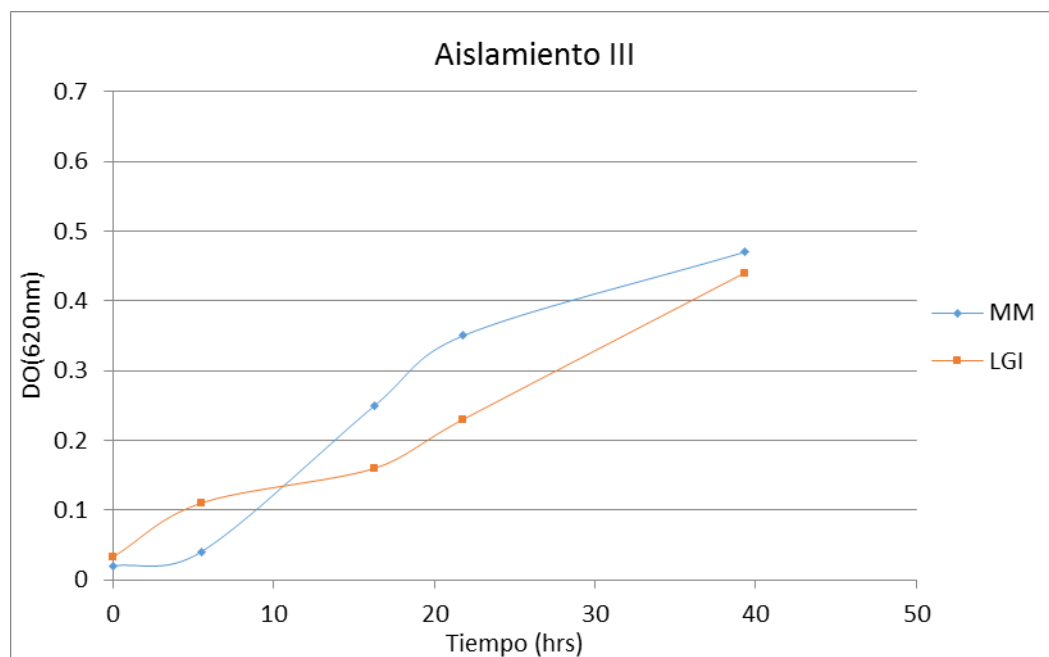
4.2 PERFILES DE CRECIMIENTO

4.2.1 Selección del medio de cultivo

Se determinaron los perfiles de crecimiento de los aislamientos cultivados en dos medios definidos (LGI y MM), por medidas de densidad óptica a 620 nm a lo largo del tiempo. Las curvas obtenidas se muestran en la figura 10.

Las determinaciones efectuadas no permiten distinguir todas las fases características de un crecimiento microbiano (*lag* o latencia, exponencial y estacionaria). Se observa parcialmente la fase de latencia y parte de la fase exponencial de crecimiento. Para obtener un perfil de crecimiento más informativo, las medidas de DO_{620nm} se deberían haber efectuado más frecuentemente y por un período más extenso.





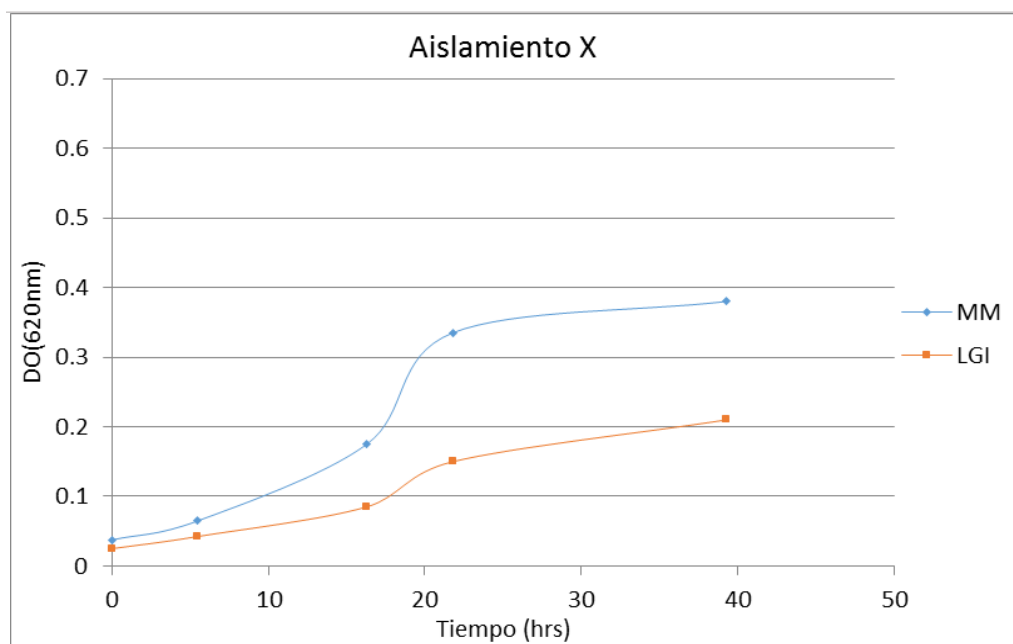
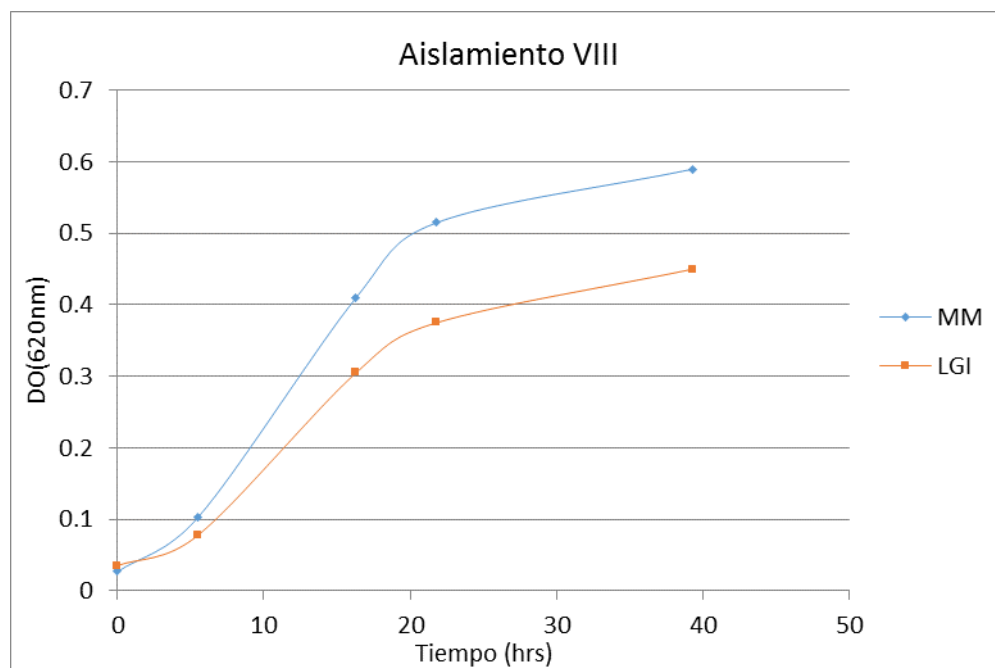


Figura 10. Perfiles de crecimiento de los aislamientos cultivados en medio MM y LGI, con glucosa como fuente de carbono.

Para poder comparar el crecimiento en ambos medios se calcularon las velocidades de crecimiento.

En la tabla 7 se muestran las velocidades máximas de crecimiento obtenidas para cada aislamiento en ambos medios de cultivo: MM y LGI, así como los valores de DO máxima obtenida para cada aislamiento.

Los resultados obtenidos con los seis aislamientos sugieren que, en nuestras condiciones de cultivo, los valores de velocidades no exhibieron grandes diferencias entre ambos medios. Respecto a los valores de DO máximos es posible observar que para el medio MM los mismos son mayores frente a los obtenidos para el medio LGI.

Se optó por usar el medio MM, dado que es más económico que el LGI, al contener una menor cantidad de sales de fosfato de potasio.

Tabla 7. Velocidades de crecimiento máximas y DO alcanzadas para cada aislamiento en el medio MM y LGI.

AISLAMIENTO	MM		MEDIO LGI	
	*velocidad máx.	**DO máx.	velocidad máx.	DO máx.
I	0,14	0,83	0,12	0,63
II	0,19	0,7	0,16	0,5
III	0,16	0,47	0,13	0,44
V	0,18	0,52	0,15	0,35
VIII	0,16	0,59	0,13	0,45
X	0,09	0,38	0,07	0,21

*Las velocidades de crecimiento se calcularon como la pendiente de la regresión Ln (DO) en función del tiempo, correspondiente al tramo lineal de 0 a 16 horas.

**La DO máx. corresponde a la alcanzada a las 40 horas para todos los aislamientos.

4.2.1.1 Acumulación de PHA en Medio Mineral MM

Los aislamientos seleccionados anteriormente como potenciales productores de PHAs en medio R₂A, fueron crecidos en placas con medio MM y glucosa como única fuente de carbono. Mediante la tinción con rojo Nilo se buscó determinar si dichos aislamientos presentaban también fluorescencia en el medio MM.

Como se puede observar en la figura 11, los resultados del ensayo en medio MM-glucosa fueron positivos para todos los aislamientos seleccionados.

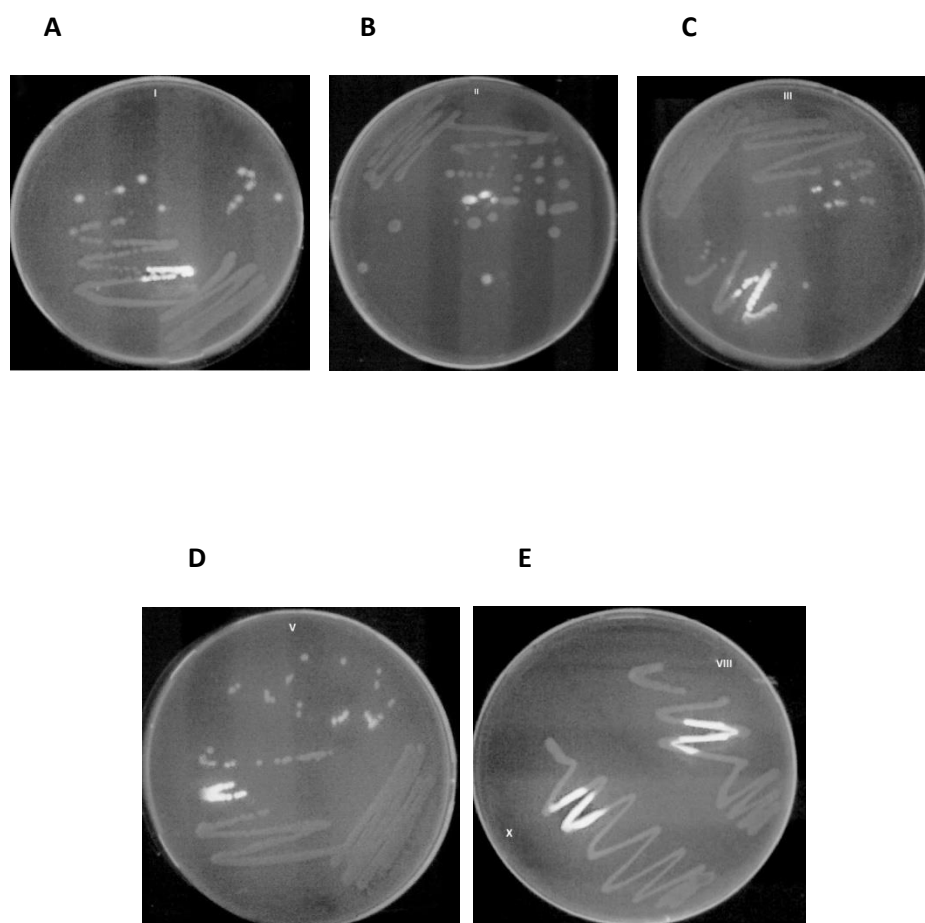


Figura 11. Resultados obtenidos con el ensayo de rojo Nilo en placas con medio MM y glucosa como fuente de carbono, para los 6 aislamientos seleccionados como productores de PHAs. A: aislamiento I, B: aislamiento II, C: aislamiento III, D: aislamiento V y E: aislamiento VIII (superior), X (inferior).

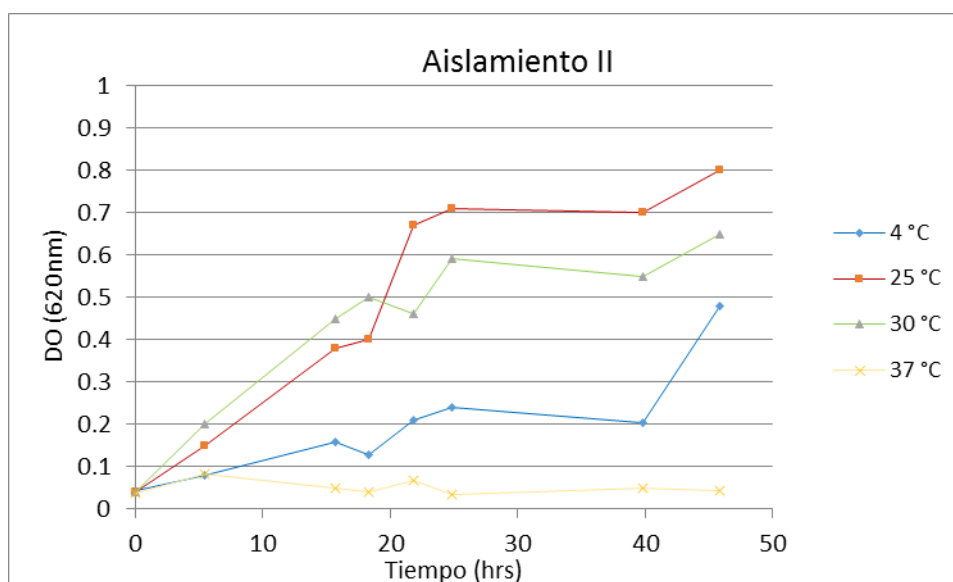
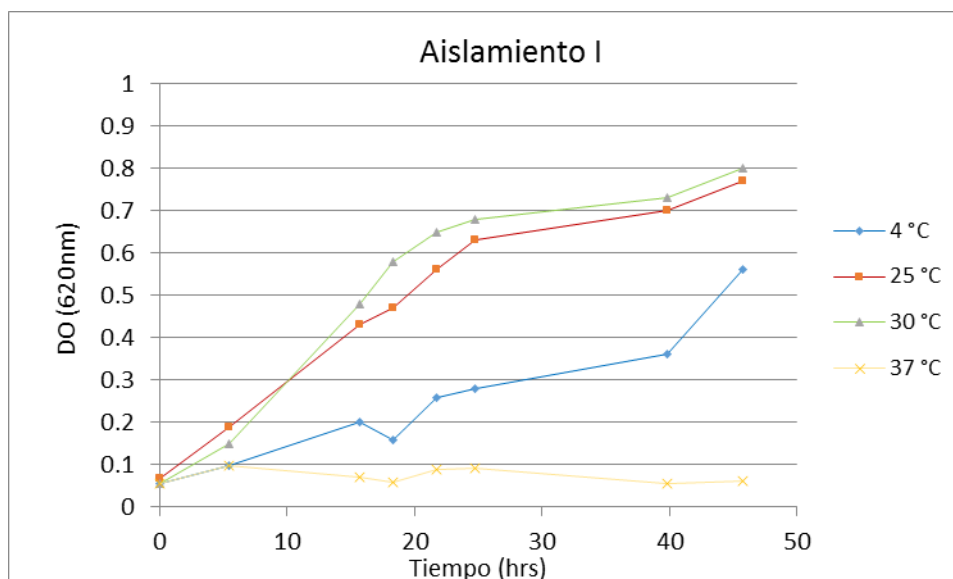
4.2.2 Selección de la temperatura de crecimiento

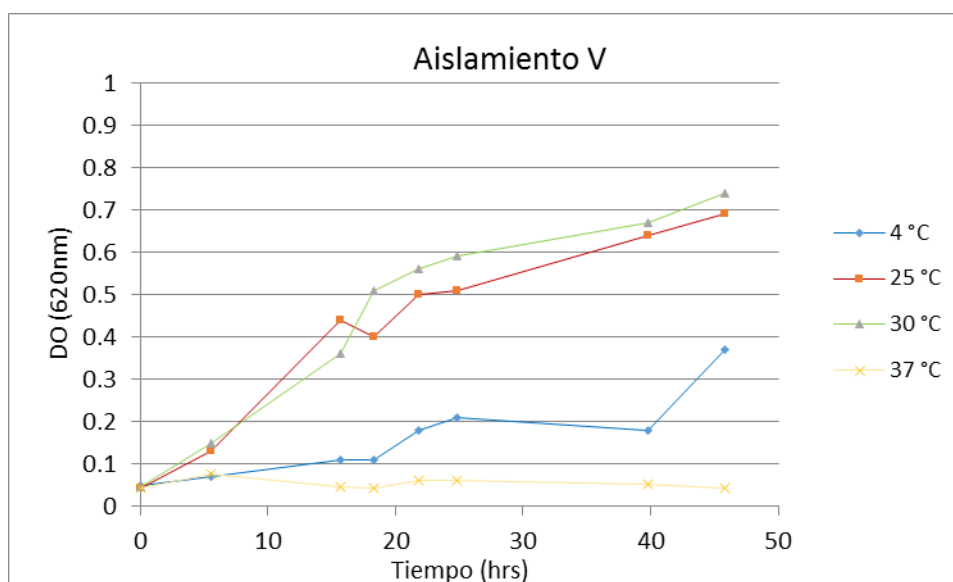
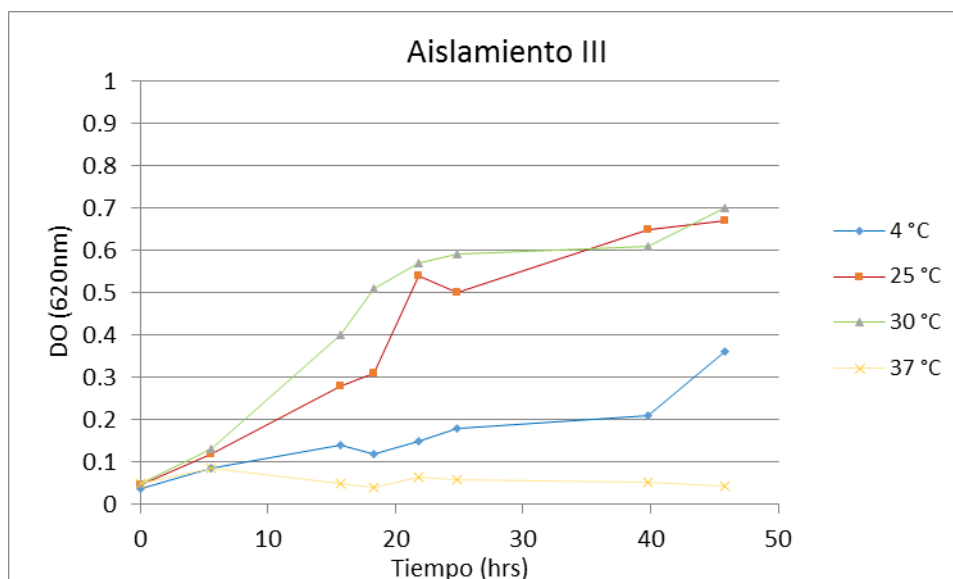
En la figura 12 se muestran los perfiles de crecimiento en el medio MM con glucosa como fuente de carbono, para cada uno de los aislamientos incubados a las siguientes temperaturas 4 °C, 25 °C, 3 °C y 37 °C.

Los aislamientos mostraron comportamientos similares a 25 y 30°C. Como se puede observar en los perfiles los valores de DO máximos alcanzados, fueron mayores a 25 °C en el caso de los aislamientos II y X, siendo en los otros casos muy similares para ambas temperaturas.

En los perfiles de crecimiento obtenidos a 4 °C, todos mostraron capacidad de crecimiento a dicha temperatura, indicando la presencia de organismos psicrótofos. Por otro lado a 37 °C la mayoría no mostró crecimiento, excepto el aislamiento X. En este caso el perfil de crecimiento fue similar al obtenido en 25 y 30 °C, alcanzando una DO menor.

En base a estos resultados no es posible determinar una temperatura óptima de crecimiento, dado que no hubo una diferencia marcada en el crecimiento de los aislamientos a 25°C y a 30°C. Para continuar con el trabajo se seleccionó 25 °C como temperatura de incubación para todos los aislamientos. Cabe indicar que los inóculos iniciales para este ensayo fueron obtenidos a partir de cultivos incubados a 25°C, pudiendo condicionar el perfil de crecimiento posterior de los microorganismos. Este ensayo debería haberse efectuado en su totalidad (cultivo en medio sólido y preparación del inóculo) a las temperaturas a ensayar.





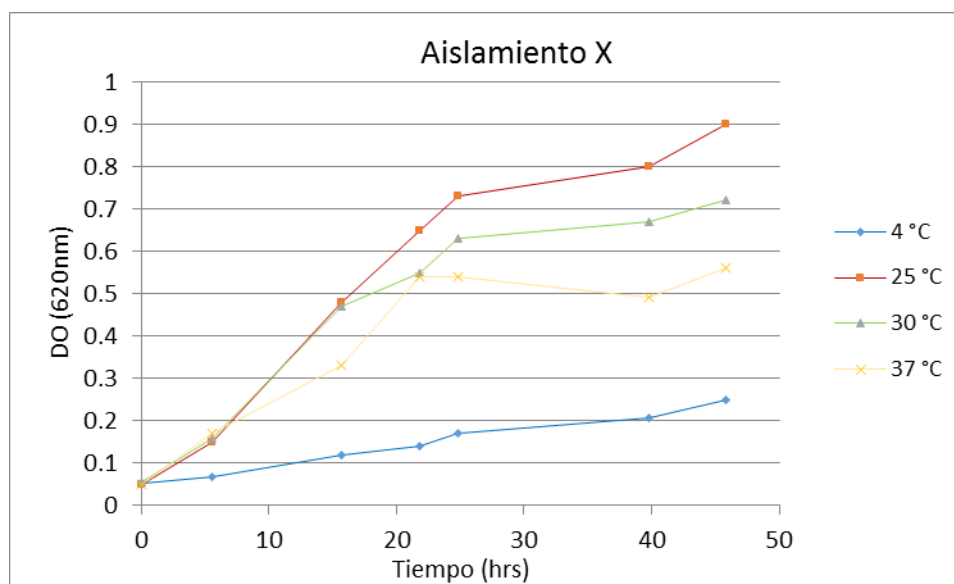
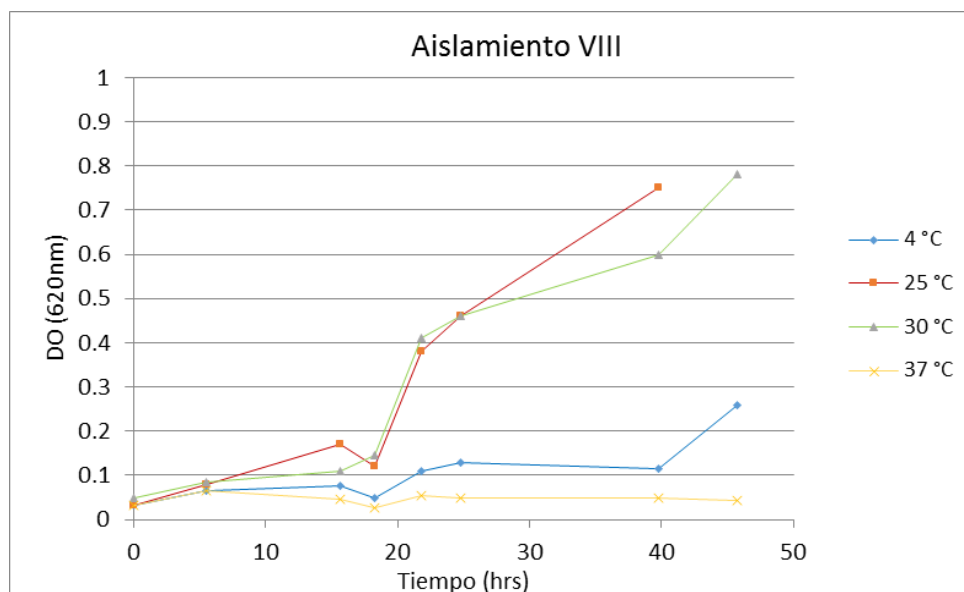


Figura 12. Perfiles de crecimiento para los diferentes aislamientos obtenidos por incubación en MM con glucosa, a las diferentes temperaturas de ensayo.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN MONOMÉRICA DE LOS BIOPOLÍMEROS

El análisis del tipo de PHAs sintetizado por los diferentes aislamientos se realizó únicamente a partir de células crecidas en presencia de glucosa o glicerol como únicas fuentes de carbono. En la tabla 8 se muestran los metil-ésteres de los hidroxiácidos identificados en el análisis por GC-MS.

En las biomasas de los aislamientos I, II, III y V obtenidas de cultivos en presencia de glucosa se identificaron únicamente monómeros o hidroxiácidos con largo de cadena media (msc-HA), componentes de los msc-PHAs. Por otro lado, el perfil cromatográfico obtenido a partir del aislamiento VIII mostró tanto la producción del 3-hidroxibutirato (3-HB) como de monómeros msc-HA, mientras que el obtenido a partir del aislamiento X mostró sólo producción de 3-HB. El análisis de la biomasa obtenida de cultivos en presencia de glicerol como fuente de carbono, mostró resultados similares a los obtenidos con glucosa, excepto por la pérdida de producción de 3-HB por parte del aislamiento VIII.

Este análisis fue cualitativo, permitiendo identificar la presencia de diferentes hidroxiácidos en las células analizadas.

Todos los aislamientos, excepto el II, mostraron diferencias en la producción con una u otra fuente de carbono, siendo la más notoria la aparición del 3-hidroxihexanoico en los aislamientos I, III, V y VIII al usar glicerol como fuente de carbono.

El aislamiento X mostró una clara preferencia por la producción de 3-HB, posiblemente perteneciente al homopolímero PHB, siendo éste el único hidroxiácido identificado en ambas fuentes de carbono.

Tabla 8. Metil-ésteres de hidroxiácidos identificados por GC-MS. El signo positivo indica la presencia del monómero.

	COMPUESTO (N° C)						
	4C	6C	8C	10C	12C	14C	18C
GLUCOSA							
AISLAMIENTO							
I	-	-	+	+	-	+	-
II	-	+	+	+	+	+	-
III	-	-	+	+	+	+	+
V	-	-	+	+	+	+	-
VIII	+	-	+	+	+	+	+
X	+	-	-	-	-	-	-
GLICEROL							
AISLAMIENTO							
I	-	+	-	-	+	-	-
II	-	+	+	+	+	+	-
III	-	+	+	+	+	+	-
V	-	+	+	+	+	-	-
VIII	-	+	+	+	-	+	+
X	+	-	-	-	-	-	-

*4C corresponde al hidroxiácido 3-hidroxibutírico, 6C 3- hidroxihexanoico, 8C 3-hidroxi octanoico, 10C 3- hidroxidecanoico, 12C 3-hidroxidodecanoico, 14C 3-hidroxitetradecanoico y 18C 3-hidroxi octadecanoico.

Para confirmar estos datos, se debería realizar el mismo análisis a partir de polímero purificado de manera de confirmar que los metil-ésteres de hidroxiácidos obtenidos a partir de la biomasa liofilizada son parte del polímero. La síntesis de msc-PHA a partir de glucosa u otros carbohidratos ha sido descrita en bacterias del género *Pseudomonas*⁵. Mediante los ensayos realizados fue posible determinar una fuente de carbono alternativa como el glicerol para la producción de estos monómeros.

4.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS

La corrida electroforética de los productos de PCR correspondiente a la amplificación de un fragmento del gen que codifica para la subunidad ribosomal del ARNr 16S, muestra la presencia de un fragmento de ADN del tamaño esperado (aprox. 1500pb) para todos los aislamientos (fig. 13).

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de PCR a partir de ambos cebadores, 27f y 1492r. Estas secuencias fueron editadas con el programa Chromas 2.4, eliminando las regiones de baja calidad. Se intentó ensamblar ambas secuencias, usando los resultados generados a partir del cebador 27f y la secuencia complementaria y reversa a partir de 1492r. Sin embargo, estas secuencias no pudieron ensamblarse en los aislamientos I y VIII, por la baja calidad de las secuencias obtenidas al usar el cebador 1492r. Es así que para el análisis filogenético de todos los aislamientos se usaron sólo las secuencias obtenidas a partir del cebador 27f, abarcando las regiones variables V1 y V2. Las secuencias se compararon con la base de datos de GenBank (16S ARNr) empleando el programa BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov).

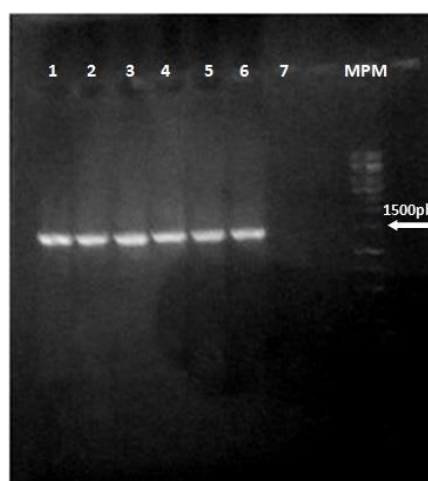


Figura 13. Perfil electroforético en gel de agarosa 1%. Se observan los productos de PCR obtenidos al usar cebadores universales dirigidos a amplificar el gen que codifica para la subunidad 16S ARNr. **Carriles:** **1:** aislamiento I, **2:** aislamiento II, **3:** aislamiento III, **4:** aislamiento V, **5:** aislamiento VIII, **6:** aislamiento X, **7:** control negativo y **MPM:** marcador de peso molecular.

Los resultados obtenidos para la identificación de cada aislamiento se muestran en la tabla 9. En la misma se indican los números de pares de bases utilizados en cada caso. Todas las secuencias se encuentran en el ANEXO II.

Tabla 9. Resultados obtenidos para la identificación de los aislamientos a partir de las secuencias 27F.

Aislamiento	Pares de bases	Query cover (%)	Identidad (%)	Nombre	Accession Number
I	769	94	96	<i>Pseudomonas mandelii</i>	114216.1
II	815	100	99	<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	117177.1
III	912	100	99	<i>Pseudomonas migulae</i>	114223.1
V	935	100	99	<i>Pseudomonas migulae</i>	114223.1
VIII	850	99	99	<i>Pseudomonas mandelii</i>	114216.1
X	1001	100	99	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	132608.1

La figura 14 muestra las relaciones de filogenia existentes entre los genes 16S ARNr de las diferentes cepas. De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 9, se observa que los aislamientos I, II, III, V y VIII pertenecen al género *Pseudomonas*. El árbol muestra que los aislamientos I y VIII presentan alta similitud entre ellos, al igual que los aislamientos III y V. Sin embargo, los perfiles de producción de hidroxíácidos de I y VIII difieren en los largos de cadenas obtenidos con las diferentes fuentes de carbono (Tabla 9). Por otro lado, el clon VIII presenta una alta identidad con *P. mandelii* (99%). Sin embargo, no es posible asignarle una identidad a nivel de especie, requiriendo el desarrollo de análisis complementarios.

Del mismo modo, los aislamientos III y V exhibieron también diferentes perfiles de producción de hidroxíácidos (Tabla 9). La identidad de estos aislamientos quedaría también limitada a nivel de género, dado que dentro de *Pseudomonas*, la asignación de especie requiere de ensayos adicionales. Para ello se deberían realizar estudios complementarios que incluyan ensayos polifásicos y/o análisis de genoma, a nivel de genes *housekeeping* (MLSA, *multilocus sequence analysis*). La similitud entre los aislamientos se debería verificar mediante rep-PCR o incluso mediante comparación de genomas.

El aislamiento II pertenecería en principio a la especie *Pseudomonas frederiksbergensis*, requiriendo esto su confirmación. El aislamiento X es el más alejado en el árbol, correspondiendo a *Janthinobacterium svalbardensis*. Este aislamiento presenta, para la secuencia analizada, una identidad del 99% con la correspondiente a una cepa de la especie.

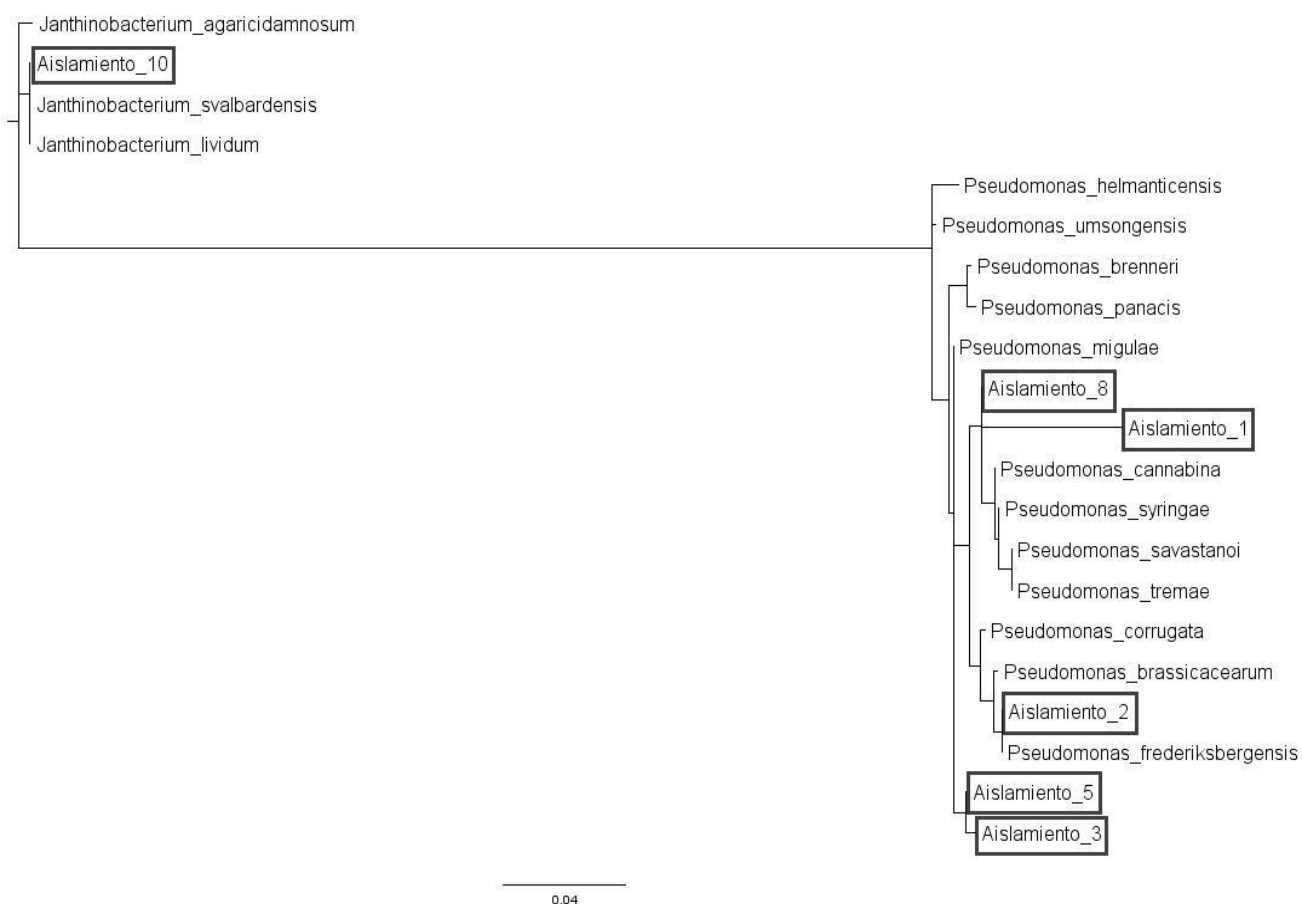


Figura 14. Árbol filogenético obtenido mediante el análisis de las secuencias de genes 16S ARNr utilizando el programa MOLE BLAST (NCBI). El árbol muestra las posiciones de los diferentes aislamientos comparados con organismos de especies vecinas, seleccionadas como referencia. Todas las secuencias utilizadas se muestran en el anexo. **La nomenclatura que aparece en el árbol corresponde a: aislamiento 1: I, aislamiento 2: II, aislamiento 3: III, aislamiento 5: V, aislamiento 8: VIII y aislamiento 10: X.**

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas a partir de nuestros aislamientos permitió establecer que existe una alta similitud con las correspondientes a especies de *Pseudomonas* poco caracterizadas, de acuerdo a nuestra revisión bibliográfica. Se conocen especies de *Pseudomonas* productoras de mcl-PHA (PHA de cadena larga) como *P. putida*, a partir de glucosa como fuente de carbono y *P. oleovorans* con octano como fuente de carbono²⁷. En cuanto a *P. frederiksborgensis*, se conoce su capacidad de sintetizar mcl-PHA a partir de ácido tereftálico como fuente de carbono (ácido utilizado como precursor del

poliéster)² y con octanoato como fuente de carbono se demostró la síntesis de PHA¹. En este trabajo se estableció que el aislamiento que presuntivamente pertenecería a esta especie es capaz de sintetizar mcl-PHA al consumir glucosa o glicerol como fuentes de carbono.

Observando el tipo de monómero identificado en los distintos aislamientos, es posible establecer que los aislamientos identificados como *Pseudomonas*, son los que presentaron monómeros de diferentes largos de cadena carbonada. El único aislamiento que sólo presentó el monómero 3-HB fue el identificado como *Janthinobacterium* (Tabla 8). Resultados similares fueron obtenidos por Goh y Tan a partir de aislamientos de muestras antárticas. En dicho trabajo, se estudió un número mayor de aislamientos, identificando un 80% de bacterias del género *Pseudomonas* y 20% de *Janthinobacterium*. Las primeras capaces de sintetizar mcl-PHA y las segundas sólo PHB¹.

La síntesis de PHAs por parte del género *Pseudomonas* ocurre principalmente a través de reacciones bioquímicas pertenecientes a la β -oxidación y/o a la síntesis de “*novo*” de ácidos grasos^{11, 15}. Según la bibliografía, la mayoría de las bacterias de este género que acumulan mcl-PHAs, no tienen la ruta clásica necesaria para la síntesis de PHB¹¹. Sin embargo, se han descrito algunos aislamientos de *Pseudomonas* capaces de sintetizar PHB⁶. En este trabajo se logró aislar una bacteria del género *Pseudomonas* (aislamiento VIII), que cuando crece en presencia de glucosa es capaz de sintetizar mcl-HA y 3-HB.

En cuanto al aislamiento X, correspondiente al género *Janthinobacterium*, posiblemente contiene sólo la ruta biosintética para la producción de PHB, por no haber mostrado síntesis de PHAs en las fuentes de carbono analizadas. De acuerdo con la bibliografía, las bacterias de este género contienen los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de polímeros con 4 átomos de carbono, pero se ha demostrado también que son capaces de sintetizar msc-PHAs¹¹. En este caso se trabajó con un organismo que sólo acumuló PHB en presencia de glucosa o glicerol como únicas fuentes de carbono.

La tabla 10 resume los resultados obtenidos en este trabajo y permite comparar los diferentes aislamientos. Dichas diferencias radican principalmente en la producción de hidroxiácidos en presencia de las diferentes fuentes de carbono.

Tabla 10. Resumen de los resultados obtenidos para la identificación preliminar de los aislamientos y producción de hidroxiácidos.

AISLAMIENTO	IDENTIFICACIÓN	AISLAMIENTO INICIAL	PRODUCCIÓN DE HIDROXIÁCIDOS	
			Glucosa	Glicerol
I	<i>Pseudomonas</i>	f7(3)	8C, 10C, 14C	6C, 12C
II	<i>Pseudomonas</i>	f8(3)	6C, 8C, 10C, 12C, 14C	6C, 8C, 10C, 12C, 14C
III	<i>Pseudomonas</i>	f7(1)	8C, 10C, 12C, 14C, 18C	6C, 8C, 10C, 12C, 14C
V	<i>Pseudomonas</i>	f7(2)	8C, 10C, 12C, 14C	6C, 8C, 10C, 12C
VIII	<i>Pseudomonas</i>	f8(6)	4C, 8C, 10C, 12C, 14C, 18C	6C, 8C, 10C, 12C
X	<i>Janthibacterium</i>	f7(1)	4C	4C

5. CONCLUSIONES

A partir de los aislamientos antárticos obtenidos fue posible confirmar la presencia de organismos productores de PHAs. Logramos ajustar, de forma preliminar, las condiciones para generar biomasa y acumular PHA, definiendo un medio de cultivo y una temperatura adecuadas para el crecimiento.

Se determinó la presencia de *Pseudomonas* como género predominante en los aislamientos analizados como potenciales productores de biopolímeros.

Se determinó la presencia de monómeros de cadena media o larga (mcl) en los aislamientos identificados como pertenecientes al género *Pseudomonas*, crecidos en presencia de glucosa o glicerol.

Se determinó la presencia del monómero de 3-HB en el aislamiento identificado como *Janthinobacterium* cultivado en presencia de glucosa y glicerol.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos, si bien son de carácter cualitativo, constituyen una base para el desarrollo de trabajos posteriores, orientados a definir las condiciones óptimas para la producción de PHAs, asociado esto a la búsqueda de diferentes fuentes de carbono accesibles y económicas.

Los trabajos futuros pueden enfocarse a estudiar los aislamientos del género *Pseudomonas* para la producción de PHAs. Se podría cuantificar la producción del polímero en medios de cultivos específicos.

Se podrían aislar los polímeros sintetizados y determinar sus propiedades físicas. Esto permitiría evaluar las posibles aplicaciones de estos materiales.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Goh, S.H. and Tan, K.T. (2012). Polyhydroxyalkanoate production by Antarctic soil bacteria isolated from Casey. *Microbiological Research*. 167:211-219.
2. Tan, G.Y.A., Chen, C.L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I.M.N., Li, Y., Zhao, L., Mo, Y. and Wang, J.Y. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*. 6:706-754.
3. Chen, G.Q. (2010). *Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates*. Microbiology monographs. Springer. 14:978-1007.
4. Wang, J.G. and Bakken, L.R. (1998). Screening of Soil Bacteria for Poly-b-Hydroxybutyric Acid Production and Its Role in the Survival of Starvation. *Microbiology Ecology*. 101:35-94.
5. Fonseca, L., Monteiro, J. y Rodriguez, H. (2009). Scale-Up and Design of Chemometric Models for the Production of MCL-PHAs by *Pseudomonas putida* KT2442. Instituto Técnico Superior, Universidade Técnica de Lisboa.
6. López, N., Pettinari, J., Stackebrandt, E., Tribelli, P., Potter, M., Steinbuchel, A and Mendez, B. (2009). *Pseudomonas extremaustralis* sp. nov, a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer isolated from an Antarctic Environmental Current Microbiology. 59:514-519.
7. De Smet, M., Eggink, G., Witholt, B., Kingma, J. and Wynberg, H. (1983). Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. *Journal of Bacteriology*. 154:870-878.
8. Tribelli, P. and López, N. (2011). Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilms formation and motility in the novel Antarctic species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions. *Extremophiles*. 15:541-547.
9. Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., C.D. Williams, C.D. and I. Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*. 102:1437-1449.
10. Anjum, A., Zuber, M., Zia, K., Noreen, A., Anjum, N. and Tabasum, S. (2016). Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 89: 161-174.
11. Luengo, J. M., García, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E. (2003). Bioplastics from microorganisms. *Current opinion in microbiology*. 6:251-260.

12. Otari, S.V and Ghosh, J.S. (2009). Production and Characterization of the Polymer Polyhydroxybutyrate-co-polyhydroxyvalerate by *Bacillus Megaterium* NCIM 2475. Current Research Journal of Biological Sciences. 2:23-26.
13. Ciesielski, S., Gomiak, D., Zeiko, J., Swiatecki, A., Grezesiak, J and Zdanowski, M. (2014). The Diversity of Bacteria Isolated from Antarctic Freshwater Reservoirs Possessing the Ability to Produce Polyhydroxyalkanoates. Currently Microbiology. 69: 594-603.
14. Anderson, A. J. and Dawes, E. A. (1990). Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. Microbiological Reviews. 54:450-472.
15. Madison, L. L. and Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. Microbiology and molecular biology reviews. 63:21-53.
16. Camacho, A y Valiente, E. (2005). Un mundo dominado por los microorganismos. Ecología microbiana de los lagos antárticos. Ecosistemas. 14:66-78.
17. Malan, A. K. (2011). Estudio de la producción de poli-3-hidroxibutirato en *Herbaspirillum seropedicae* Z69 a partir de azúcares presentes en la hemicelulosa. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Tesis de Grado. Montevideo, Uruguay.
18. Baldani, J.I., Baldani, V., L., D., Seldin, L. and Dobereiner, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. International Journal of Systematic Bacteriology. 36:86–93.
19. Simon, R., Priefer, U. & Puhler, A. (1983). A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Natural Biotechnology*, 1(9), pp.784–791.
20. Catalán, A.I., Ferreira F., Gill, P.G. and Batista, S. (2007). Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. Enzyme and Microbial Technology. 40: 1352–1357
21. Kranz, R.G., Gabbert, K.K. and Madigan, M.T. (1997). Positive selection systems for discovery of novel polyester biosynthesis genes based on fatty acid detoxification. Applied and Environmental Microbiology. 63: 3010-3013.
22. Brandl, H., Gross, R., Lenz, R. and Fuller, C. (1988). *Pseudomonas olearans* as a Source of Poly(β -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. Applied and Environmental Microbiology. 1977-1982.

23. Tan, G., Chen, C., Liya, G., Li, L., Wang, L., Zhao, L., Mo, Y., Tan, S. and Wang J. (2014). Enhanced Gas Chromatography-mass Spectrometry Method for Bacterial Polyhydroxyalkanoates Analysis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117: 379 –382.
24. Lane, D. J. and Wiley, J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York. Pp115-175.
25. Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
26. Greenspan, P., Mayer, E. P. and Fowler, S. D. (1985). Nile Red: A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *The Journal of Cell Biology*. 100:965-973.
27. Taciro, M. (2008). Processo Continuo de Producao de Polihidroxialcanoatos de Cadeia Media (PHA_{MCL}) sob Limitacao Multipla de Nutrientes. Instituto Butantan. Tesis de Doctorado en Biotecnología (Universidad de San Pablo, Brasil) Tese para obtencao do titulo de Doutor em Biotecnologia. San Pablo. http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-14012009-091928/publico/MarildaKeicoTaciro_Doutorado.pdf.

ANEXO I

A1.1 Composición de los medios de cultivo

TY (Tryptona-Extracto de levadura)

Extracto de levadura..... 3g
 Tryptona..... 5g
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05g
 H₂O desionizada.....c.s.p. 1L

LB (modificado)

Extracto de levadura..... 3g
 Tryptona..... 5g
 NaCl..... 5g
 H₂O desionizada.....c.s.p. 1L

Medio R₂A

Extracto de levadura..... 0,5g
 Proteasa peptona..... 0,5g
 Casaminoácidos.....0,5g
 Almidón soluble.....0,5g
 Piruvato de Na.....0,3g
 K_2HPO_4 0,3g
 MgSO_4 0,05g
 H₂O desionizada.....c.s.p. 1L

Medio Mineral (MM)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0g
Na_2HPO_4	3,5g
KH_2PO_4	1,5g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20% (m/v)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1% (m/v)
Citrato férrico amoniacal.....	6% (m/v)
Solución de elementos trazas...	1mL
H_2O desionizada.....	c.s.p. 1L

Solución de elementos trazas:

H_3BO_3	0,03g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,003g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,002g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,001g
H_2O desionizada.....	c.s.p. 0.1L

LGI

KH_2PO_4	11,9g
K_2HPO_4	2,13g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,64g
MgSO_4	0,1g
CaCl_2	0,015g
FeCl_3	0,010g
Na_2MoO_4	0,002g
H_2O desionizada	c.s.p. 1 L

A1.2 Composición *buffer* de corrida

TAE 50X

Tris base.....242g

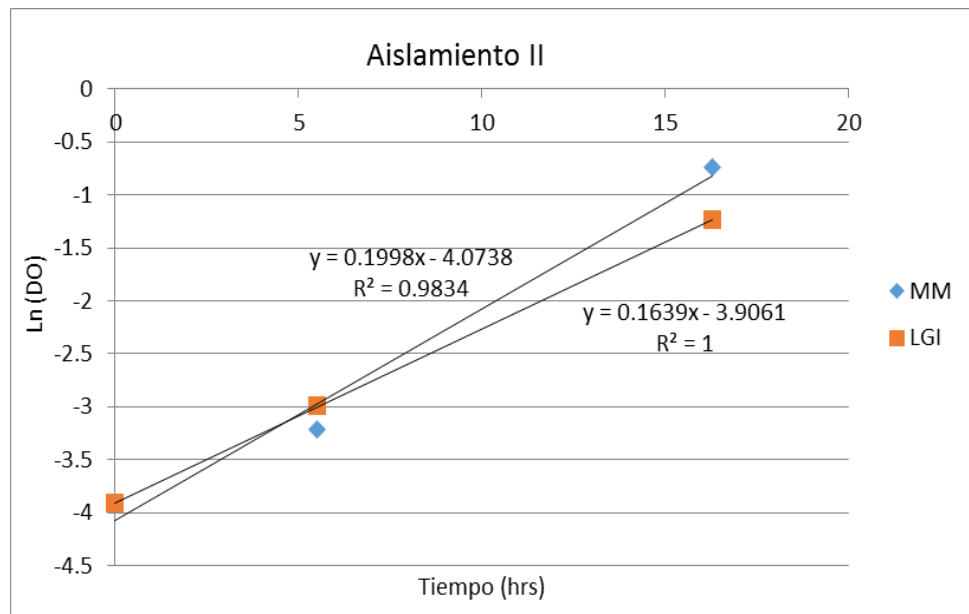
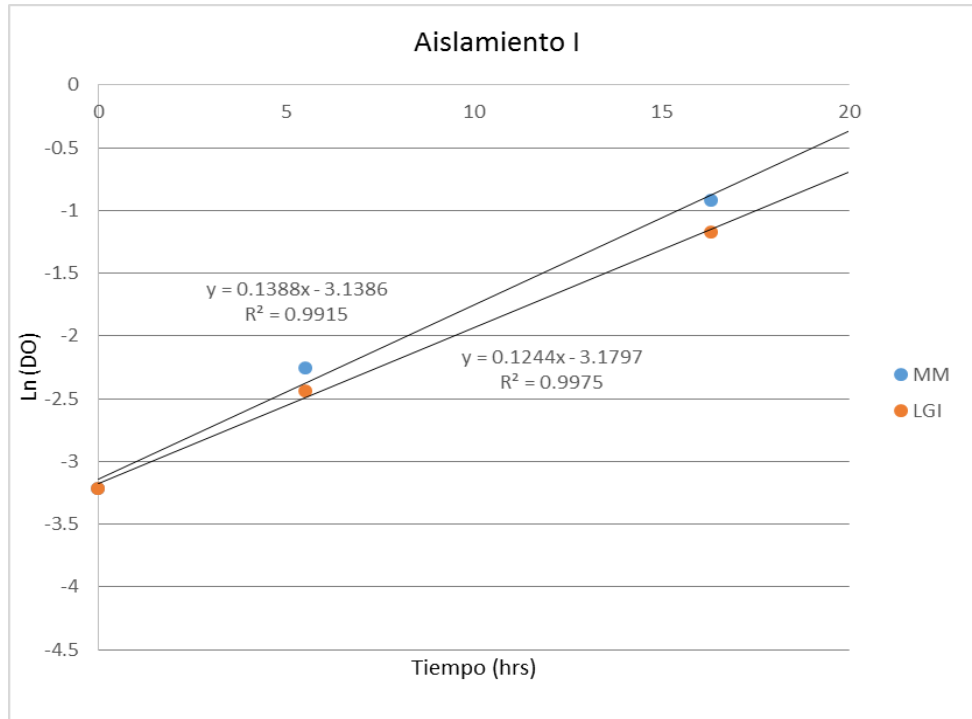
Ácido acético glacial.....57mL

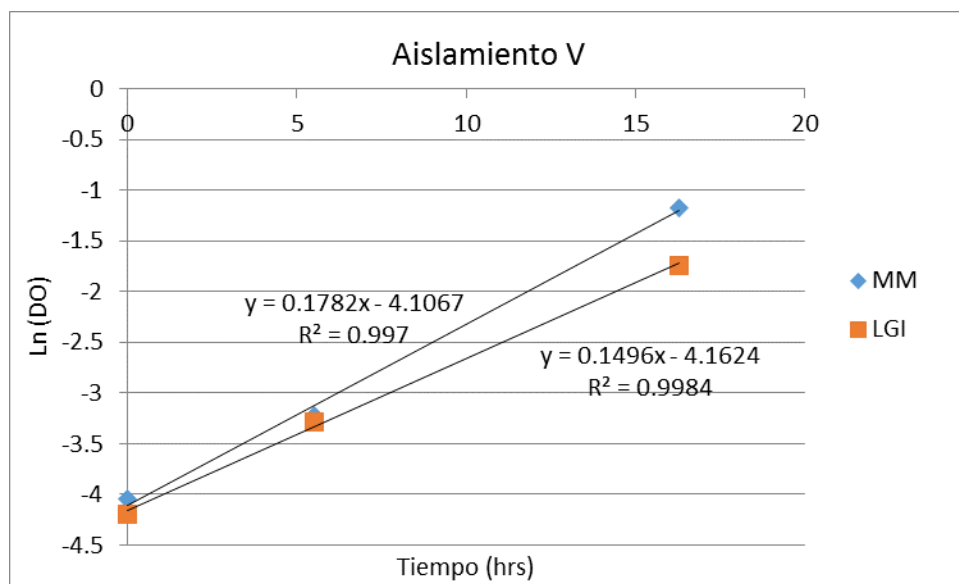
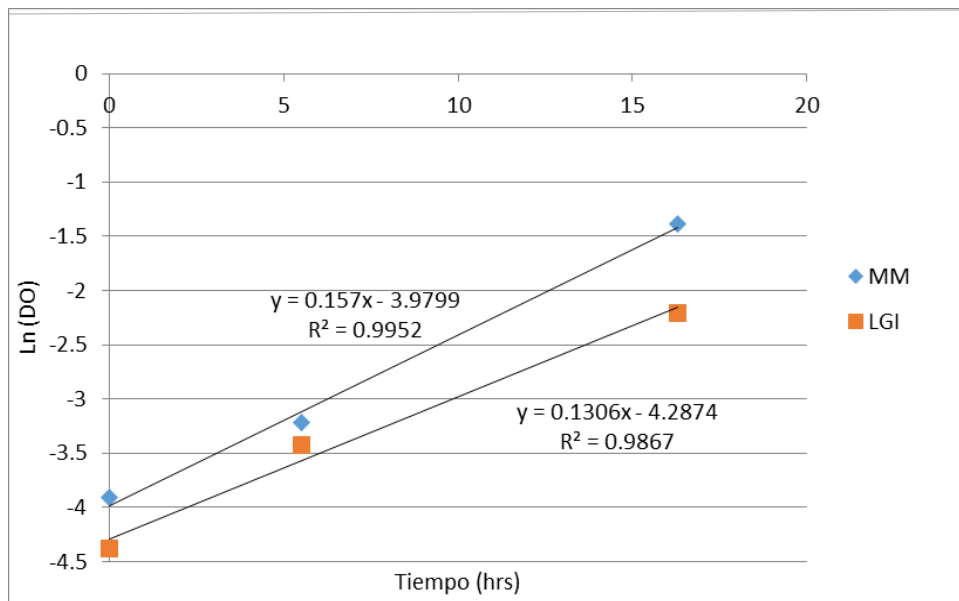
EDTA 0.5M pH = 8.0.....100mL

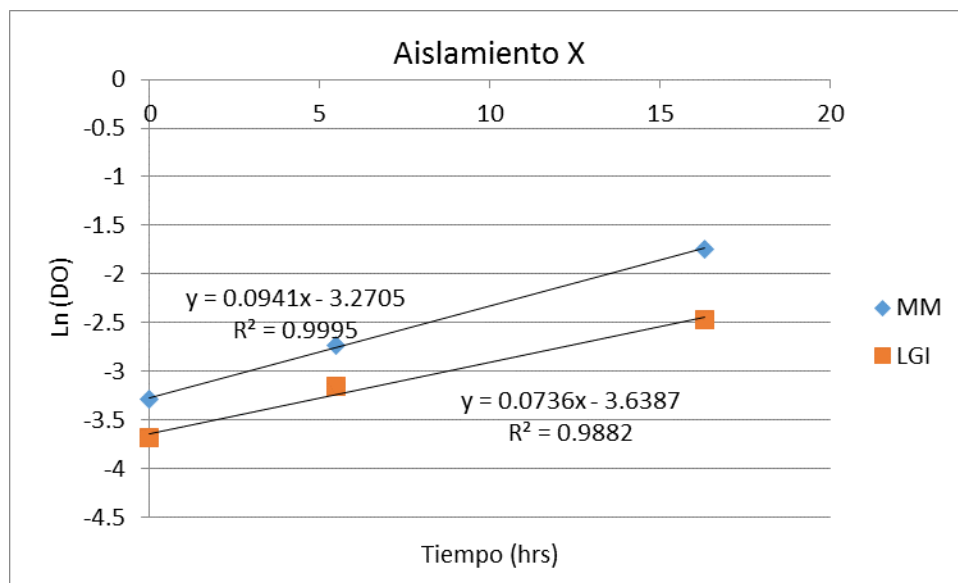
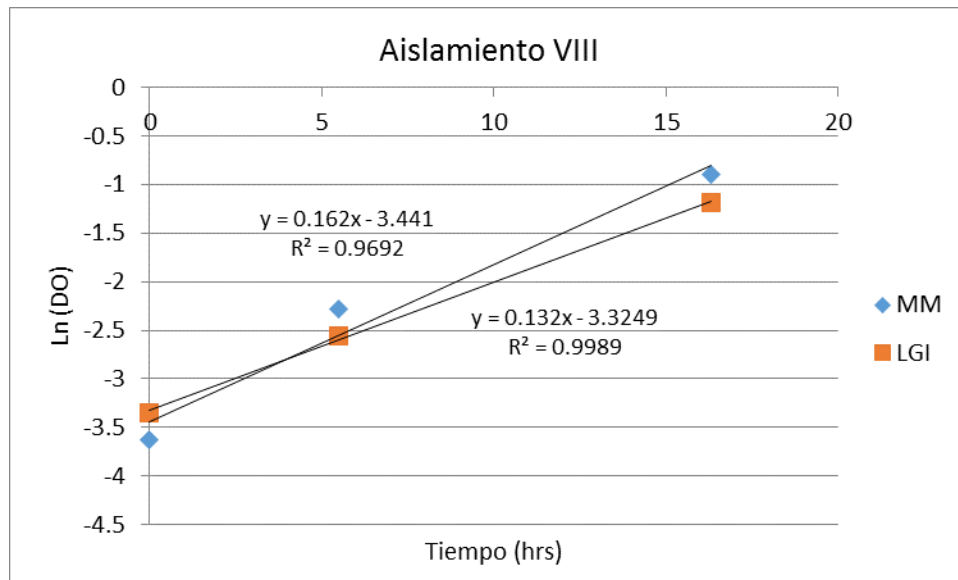
H₂O..... c.s.p. 1L

ANEXO II

A.2 Gráficos de velocidades de crecimiento calculadas para los diferentes aislamientos en Medio Mineral y LGI.







ANEXO III

A3.1 Secuencias utilizadas para la identificación de los aislamientos y la construcción del árbol filogenético.

AISLAMIENTO	SECUENCIA 27F
I	GCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGGCGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGT GGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT GCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGTG GTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA TTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAA GTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTG CCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTT GTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTATGGTAGAG GGTGGTGGAAATTCCTGGGTTCAGATGAAATGCGTAAATATTTTAAAGGAGAGCACCTGGCGGGAGGCGACCA CCCGGGAGTGATCCTGACGCTTAGGTGCCTAAAACGTGAGTGAGCAACCAGGGGTGGTATACCTCCGGCTGGT GGGTGCCCGTCCAAAAATGTCTA
II	TACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGGCGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCT CGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATG AGCCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATG ATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGC GAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGG GCATTTACCTAATACGTAAGTGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGG TAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCTGTTAAGTTGGATGT GAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACTGTGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGGTGGAATTT CCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGAC ACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAG CCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGC
III	GAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGGCGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAAC GCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAG ATGAGCCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACGGTCTGAGAGG ATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG GCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAA GGGCAGTAAATTAATACTTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGC GGTAAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTCTGTTAAGTTGGAT GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTCAAACTGTGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGGTGGTGGAAAT TTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTG AACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACT AGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAA GGTTAAGACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAG AACCTTACCACGCC

V	CGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATAC CGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCT AGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGT AGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCAT GCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAATTAATACTTTGC TGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGC GTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCTGTTAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACC TGGGAACTGCATTCAAACTGTCTGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATG CGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGC TCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTG ACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGCCTTGACA TCCAATGAACCTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGA
VIII	GCAGTCGAGCGGCAGCACGGGTACTTGTACCTGGTGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTG CCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGCATACGCTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCT TCGGGCCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGAT CCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG TGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA GCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTATCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCT AACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTA GGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTCAAACTGACAAGCTAGAGTAT GGTAGAGGGTGGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGC GACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCA CGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCCTTGGGAGCCTTGAGCTCTTACTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGC CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAC
X	TTGCTCTGGTGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTACCCTAGAGTGGGGGATAACGTAGCGA AAGTTACGCTAATACCGCATACGATCTAAGGATGAAAGTGGGGGATCGCAAGACCTCATGCTCGTGAGCGGCCG ATATCTGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAG CCACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGCGAAAG CCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCTCTTTTGTCAGGGAAGAAACGGTGA GAGCTAATATCTCTTGCTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA CGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTTGTAAGTCTGATGTGAAAT CCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTGGAGACTGCAAGGCTAGAATCTGGCAGAGGGGGGTAGAATTCCACGT GTAGCAGTGAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGTCAAGATTGACGCTC ATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCTACTAGTTGT CGGGTCTTAATTGACTTGGTAACGCAGCTAACGCGTGAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAA CTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTGATGCAACGCGAAAAACCTTAC CTACCTTGACATGGCTGGAATCCTTGAGAGATCAGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCAGTACACAGGTGCTGCATG GCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT

A3.2 Secuencias de microorganismos utilizados como referencia para la construcción del árbol filogenético.

Género	Secuencia
<i>Janthinobacterium lividum</i>	GTGGCGAACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTACCCTAGAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGC ATACGATCTAAGGATGAAAGTGGGGGATCGCAAGACCTCATGCTCGTGGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGT AGGGTAAAAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGT CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	GTGGCGAACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTACCCTAGAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGC ATACGATCTAAGGATGAAAGTGGGGGATCGCAAGACCTCATGCTCGTGGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGT AGGGTAAAAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGT CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	GTGGCGAACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTACCCTGGAGTGGGGGATAACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGC ATACGATCTACGGATGAAAGTGGGGGATCGCAAGACCTCATGCTCGTGGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGT AGGGTAAAAGCCTACCAAGGCATCGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGT CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGC ATACGTCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas corrugata</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGC ATACGTCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGC ATACGTCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT GAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCGC ATACGTCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGT GGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGT CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA

<i>Pseudomonas savastanoi</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCG CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACG GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas tremae</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCG CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACG GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas cannabina</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCG CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACG GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas syringae</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCG CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACG GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas brenneri</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCG CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG GTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACAC GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas panacis</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAATACCG CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG GTGGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACAC GGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
<i>Pseudomonas umsongensis</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGACAACGTCTCGAAAGGGACGCTAATACCG CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACG GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA

<i>Pseudomonas migulae</i>	GCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGCTCGGAAACGGACGCTAATACCG CATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTG GTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACG GTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
--------------------------------	--