

Tesis Doctoral

Estudio de bacterias del género Pseudomonas en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los polihidroxicanoatos

Di Martino, Carla

2015-04-29

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Di Martino, Carla. (2015-04-29). Estudio de bacterias del género Pseudomonas en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los polihidroxicanoatos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Di Martino, Carla. "Estudio de bacterias del género Pseudomonas en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los polihidroxicanoatos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-04-29.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Estudio de bacterias del género *Pseudomonas* en la
degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes:
análisis del efecto de los polihidroxicanoatos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Lic. Carla Di Martino

Director de Tesis: Dra. Laura Judith Raiger lustman

Consejera de Estudios: Dra. Nancy Irene López.

Fecha de Defensa: 29 de Abril de 2015.

Agradecimientos...

Se termina una etapa muy importante de mi vida... Miro hacia atrás, y veo a mucha gente a la que quiero agradecer el haber estado acompañándome... Familia, amigos, compañeros... este trabajo está dedicado a ustedes.

Lau, me estas enseñando desde que puse un pie en el laboratorio. Te debo mucho de mi formación y te voy a estar siempre agradecida por eso. Voy a guardar siempre en mi corazón los “abaaachoos” que me diste... y te voy a recordar siempre con una sonrisa cantando “mírenme...soy feliz...”

Nancy, gracias por poder contar con vos y tener siempre un buen consejo cada vez que lo necesite.

Julia, gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme y a recibirme con una sonrisa cada vez que te invadía el laboratorio.

Beatriz, gracias por todos los años compartidos y por permitirme hacer de su escritorio mi lugar de trabaja esto últimos meses.

Manu, Mili, Pau, José, Marie... Fue muy difícil tomar la decisión de no seguir en el laboratorio después de esta etapa... no porque me diera miedo cambiar de trabajo, sino porque me generaba mucha tristeza alejarme de gente que quiero tanto como a ustedes. Para mí no son mis compañeros de trabajo... son mis amigos... a los que siempre voy estar agradecida por los hermosos años que pasamos juntos. El trabajo de todos los días no hubiese sido igual sin ustedes.

Anto, surgió ese mimetismo paranormal (como vos bien llamaste) que nos lleno de risas e hizo que crezca un gran cariño entre las dos. Esmé, Rocío y Diego, gracias por el día a día... por la calidez que le dan al laboratorio y por sacarme una sonrisa siempre.

Mamá, Papá, Silvi, Naty y Juan... junto a Seba, son los pilares de mi vida. Gracias por aguantarme los momentos de locuras y malhumores... siempre confiaron en mí y me dieron energías para seguir. Gracias por preguntarme todos los días... “Y como andan los bichos?”, por el solo hecho de demostrarme que les importaba lo que hacía.

Seba, a vos más que a nadie tengo que agradecer el estar “ahí”. Venimos haciendo este camino juntos desde hace muchos años...Viviste como propios mis logros y mis

frustraciones y siempre me diste fuerzas para no aflojar. Gracias por ser mi compañero de vida...

Índice

Agradecimientos.....	2
Índice	4
Resumen.....	8
Abstract.....	10
Introducción	13
1. Contaminación por hidrocarburos.....	14
2. Remediación	16
2.1. Características microbianas involucradas en la biorremediación de hidrocarburos .	19
2.1.1. Capacidad de degradación de compuestos contaminantes	19
2.1.1.1. Degradación de Alcanos	19
2.1.1.2. Degradación de monoaromáticos	22
2.1.2. Accesibilidad al sustrato	26
2.1.2.1. Los Biosurfactantes	26
2.1.2.2. La superficie celular	29
2.1.3. Mecanismos de resistencia al estrés ambiental.....	30
2.1.3.1. Los Polihidroxicanoatos	30
2.2. Co-contaminación con hidrocarburos y metales.....	34
2.2.1. Metales: Cobre.....	35
2.2.2. Modelos de adsorción de metales	38
3. Generalidades de las especies del género <i>Pseudomonas</i>	39
3.1. Microorganismos con potencial biorremediador	39
3.1.1. <i>Pseudomonas extremaustralis</i>	40
3.1.2. <i>Pseudomonas</i> sp KA-08 y <i>Pseudomonas</i> sp KB-08	41
4. Desarrollo de la hipótesis de trabajo y objetivos	42

Objetivo general.....	42
Objetivos específicos:.....	42
Materiales y Métodos.....	44
1. Cepas y plásmidos utilizados	45
2. Condiciones de cultivo.....	46
2.1. Conservación de las cepas mediante glicerolados.....	46
2.2. Pre inóculos: Condiciones de acumulación y no acumulación de PHA	46
2.3. <i>P. extremaustralis</i>	46
2.4. KA-08, KA-mut y KB-08	47
2.4.1. Degradación de hidrocarburos complejos.....	47
2.4.2. Crecimiento y tolerancia a hidrocarburos.....	47
2.4.3. Determinación de acumulación de PHA en función a la fuente de carbono	48
2.4.4. Cuantificación de la producción de PHA.....	48
2.4.5. Curvas de Crecimiento	48
2.4.6. Degradación de hidrocarburos monoaromáticos	48
2.4.7. Producción de surfactantes	49
2.4.8. Ensayo MATH	49
2.4.9. Extracción de membranas.....	50
2.4.10. Biosorción de cobre.....	50
3. Técnicas de biología molecular	50
3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	50
3.2. Extracción de DNA plasmídico.....	53
3.3. Digestión con enzimas de restricción.....	54
3.4. Purificación de DNA.....	54
3.5. Reacciones de ligado.....	54
3.6. Electroforesis en geles de agarosa	54
3.7. Cuantificación de DNA en geles de agarosa	55

3.8. Obtención de <i>E. coli</i> competentes.....	55
3.9. Transformación de <i>E. coli</i>	56
4. Análisis bioinformáticos	56
4.1. Análisis filogenético	56
4.2. Análisis <i>in silico</i> del genoma de <i>P. extremaustralis</i>	57
4.3. Análisis del <i>cluster phaC1ZC2D</i>	57
5. Construcción de KA-mut.....	58
6. Determinaciones analíticas	59
6.1. Análisis de la formación de biofilms	59
6.2. Análisis de la producción de polihidroxialcanoatos.....	60
6.2.1. Tinción con Azul del Nilo	60
6.2.2. Cuantificación de la producción de PHA.....	60
6.3. Ensayos de degradación de hidrocarburos	61
6.3.1. Extracción de hidrocarburos complejos y análisis por cromatografía gaseosa .	61
6.3.2. Análisis de la degradación de hidrocarburos monoaromáticos por Head Space- GC	62
6.4. Análisis de la producción de biosurfactantes.....	62
6.4.1. Tensión superficial	62
6.4.2. Actividad Emulsificante.....	63
6.4.3. Extracción de surfactantes	63
6.4.4. Cromatografía en capa delgada, TLC.....	63
6.4.5. Placas CTAB.....	64
6.5. Análisis de la superficie celular	64
6.5.1. Afinidad celular a un hidrocarburo (test de MATH)	64
6.5.2. Purificación de membranas celulares.	64
6.5.3. Cuantificación de proteínas mediante el Método de Bradford.....	65
6.5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	66

6.5.5. Identificación de las proteínas de membrana por MALDI-TOF-TOF	67
6.6. Ensayos realizados con cobre	67
6.6.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de CuSO ₄	67
6.6.2. Ensayo de biosorción.	68
Anexo medios y buffers	69
Resultados.....	73
1. Análisis filogenético de <i>Pseudomonas</i> sp. KA-08 y <i>Pseudomonas</i> sp. KB-08	74
2. Búsqueda de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos	76
2.1. Alcanos.....	76
2.2. Monoaromáticos	83
3. Análisis de la tolerancia y la degradación de hidrocarburos	85
4. Análisis de la producción de compuestos biosurfactantes	90
5. Análisis del efecto del PHA sobre diversas variables involucradas en la capacidad biorremediadora de bacterias.....	95
5.1. Análisis de la síntesis de PHA en relación a la fuente de carbono	95
5.1. Análisis de los genes involucrados en la síntesis de PHA en la cepa KA-08.....	97
5.3. Construcción de KA-mut, mutante PHA-	99
5.4. Análisis de la tolerancia y la degradación de hidrocarburos	102
5.5. Análisis de la producción de compuestos biosurfactantes.....	105
5.6. Determinación de la afinidad celular a un hidrocarburo.....	107
5.7. Perfil proteico de la superficie celular	109
5.8. Biosorción de cobre	112
Conclusiones y Discusión	116
Conclusión general.....	132
Perspectivas futuras.....	133
Bibliografía.....	134

Resumen

Uno de los problemas ecológicos más relevantes en la actualidad es la contaminación ambiental. La biorremediación se ha convertido en una estrategia de gran utilidad, la cual requiere de microorganismos capaces de sobrevivir y adaptarse a estos ambientes contaminados. Ha sido descrito, que la acumulación de polihidroxialcanoatos (PHA) mejora la sobrevivencia, competitividad y la tolerancia al estrés. Debido a esto, se analizaron microorganismos capaces de acumular PHA aislados de ambientes naturales: *P. extremaustralis*, aislada de la Antártida; y *Pseudomonas* sp. KA-08 y *Pseudomonas* sp. KB-08, aisladas de ambientes con presencia de altas concentraciones de hidrocarburos. *Pseudomonas* sp. KA-08 se destacó por su capacidad de degradar hidrocarburos monoaromáticos (BTEX), tolerar altas concentraciones de los mismos y sintetizar compuestos tensioactivos. La búsqueda de los genes claves involucrados en la degradación de BTEX mostró la presencia de las vías TOL y TOD lo cual es un evento poco frecuente en el género *Pseudomonas*, alcanzando una alta tasa de degradación de xileno como ejemplo de BTEX. Este resultado la destaca como agente degradador de dicho contaminante. Finalmente se decidió analizar la resistencia y capacidad complejante de esta cepa metales pesados como el cobre el cual puede coexistir en algunos sitios contaminados con hidrocarburos. KA-08 toleró concentraciones cercanas a 4 mM de cobre y presentó una alta biosorción que ajusta al modelo de Langmuir.

Dado que la presencia de PHA favorece la adaptabilidad bacteriana al ambiente, se analizó el efecto que este polímero posee sobre diversas variables involucradas en la capacidad biorremediadora las cepas KA-08 y *Pseudomonas extremaustralis*. Los resultados de estos ensayos demostraron que la presencia de PHA en los inóculos de *P. extremaustralis* favorece la disgregación de biofilms e incrementa la producción de agentes que disminuyen la tensión superficial (TS). En concordancia con esto, se observó que en KA-08 el PHA también afecta favorablemente la síntesis de compuestos que disminuyen la TS. También se determinó que la acumulación de PHA afecta a la adherencia bacteriana al xileno y que dicho efecto podría ser extrapolable a otras *Pseudomonas*. Así mismo, la acumulación del polímero modificaría características de la superficie celular y produciría un efecto pequeño pero significativo sobre la degradación de xileno especialmente en su isómero más recalcitrante: o- xileno.

Los resultados presentados en este trabajo muestran por primera vez la implicancia de la capacidad de acumular PHA sobre características deseables en organismos biorremediadores y evidencian la potencialidad de *Pseudomonas* sp. KA-08 para ser utilizada como un nuevo agente de degradación de xileno y remoción de cobre de ambientes contaminados.

Palabras claves: *Pseudomonas* polihidroxicanoatos xileno biosurfactante

Study of bacteria belonging to *Pseudomonas* genus in hydrocarbon degradation and biosurfactants synthesis: analysis of polyhydroxyalkanoates effect

Abstract

One of the most important environmental problems is pollution. Bioremediation has become a useful strategy, which requires microorganisms that can survive and adapt to these contaminated environments. It has been reported that the accumulation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) improves survival, competitiveness and stress tolerance. Because of this, microorganisms capable of accumulating PHA isolated from natural environments were analyzed: *P. extremaustralis*, isolated from Antarctica; and *Pseudomonas* sp. KA-08 and *Pseudomonas* sp. KB-08, isolated from hydrocarbon contaminated environment.

Pseudomonas sp. KA-08 exhibits a high ability to degrade monoaromatic hydrocarbons (BTEX), to tolerate high concentrations thereof and synthesize surfactants. Searching of key genes involved in BTEX degradation showed the presence of both TOD and TOL pathways, which is a rare event in the genus *Pseudomonas*. Copper tolerance and complexing ability was also tested in KA-08 showing a MIC of 4 mM and high biosorption levels that fits the Langmuir model.

Due to PHA promotes bacterial adaptability to the environment; the effect of this polymer was analyzed. Our results showed that the presence of PHA in *P. extremaustralis*' inocula promotes biofilms dispersion and increases the production of biosurfactants. In concordance, we observed that PHA synthesis also increase biosurfactant production in KA-08. It was also determined that the accumulation of PHA affects bacterial adherence to xylene. This effect could be extrapolated to other *Pseudomonas*. Finally, polymer accumulation induced cell surface modifications and produced a small but significant effect on xylene degradation, especially the most recalcitrant isomer: o- xylene.

The results presented in this study showed for the first time the implication of PHA accumulation on bioremediation agents' desirable characteristics, and showed the potential of

Pseudomonas sp. KA-08 as a new agent of xylene degradation and removal of copper from contaminated environments.

Keywords: *Pseudomonas* polyhydroxyalkanoates xylene biosurfactant

Algunos de los resultados descritos en esta Tesis han sido publicados en los siguientes trabajos:

2014. Carla Di Martino, Mariela V. Catone, Nancy I. López, Laura J. Raiger lustman. Polyhydroxyalkanoates synthesis affects biosurfactant production and cell attachment to hydrocarbons in *Pseudomonas* sp. KA-08. *Current Microbiology*, 68: 735-742

2012. Paula M. Tribelli, Carla Di Martino, Nancy I. López, Laura J. Raiger lustman. Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*. *Biodegradation*, 23: 645-651

2012. Carla Di Martino, Nancy I. López, Laura J. Raiger lustman. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 67:15-20

2012. Paula M. Tribelli, Laura J. Raiger lustman, Mariela V. Catone, Carla Di Martino, Santiago Revale, Beatriz S. Méndez, Nancy I. López. Genome sequence of the polyhydroxybutyrate producer *Pseudomonas extremaustralis*, a highly stress-resistant antarctic bacterium. *Journal of Bacteriology* p. 2381–2382

Introducción

1. Contaminación por hidrocarburos

El petróleo y otros combustibles fósiles son la principal fuente de energía para las actividades humanas. Su utilización como fuente de energía y materia prima para la producción de diversos compuestos genera uno de los mayores problemas ambientales que debe enfrentar el mundo actual.

El medio ambiente se contamina al producirse derrames de petróleo, principalmente de crudo, el cual se caracteriza por tener una composición química sumamente compleja. Cada tipo de crudo tiene varios cientos de componentes diferentes y la composición, además, varía según la procedencia del mismo (Atlas and Bartha 2002 b).

El crudo puede contener diferentes compuestos, siendo básicamente una mezcla de hidrocarburos alifáticos, alicíclicos (estructuras cicloalifáticas saturadas), aromáticos y trazas de metales pesados (Tabla I.1). A partir de su refinado se obtienen diferentes derivados que potencialmente pueden ser contaminantes en el medio ambiente. El kerosén (Tabla I.2) y el gasoil/diesel (Tabla I.2) forman parte de las fracciones obtenidas de la destilación del petróleo en el proceso de refinado en un rango de puntos de ebullición entre 160-275°C para el kerosén y 250-425°C para el diesel, encontrando compuestos de 9 a 27 átomos de carbono, siendo los más abundantes los C9-C15 para el kerosén y C13-C27 para el diesel (Wang and Stout 2006).

Tabla I.1. Composición química y contenido de hidrocarburos típicos del crudo. Tablas modificadas a partir de Hyne 2001.

Elemento	Crudo	Hidrocarburo	Crudo
Carbono	84-87%	Parafinas (alifáticos)	15 al 60%
Hidrogeno	11-14%	Naftenos (alícíclicos)	30 al 60%
Sulfuro	0.06-2%	Aromáticos	3 al 30%
Nitrógeno	0.1-2%	Asfálticos	resto
Oxígeno	0.1-2%		
Metales pesados	<0.1%		

Tabla I.2. Composición promedio del kerosén y el diesel. Valores obtenidos a partir de Liang et al. 2005 y US EPA 2010.

Hidrocarburo (kerosén)	vol%	Hidrocarburo (diesel)	vol%
Parafinas (alifáticos y ramificados)	±70%	Parafinas (alifáticos)	28%
Naftenos (alícíclicos)		Parafinas (ramificadas)	54%
Aromáticos	11-25%	Naftenos (alícíclicos)	8%
Olefinas	<5%	PHA (alquil PHA)	0.26% (3.7%)
		Aromáticos	6.55%

Si bien la mayoría de los componentes del petróleo son biodegradables, su biodegradación es muy lenta (Atlas and Bartha 2002 b). Esto genera uno de los principales problemas de la industria petrolera debido a la alta contaminación producida por:

- i) algunos subproductos (altamente tóxicos), formados durante el refinado de petróleo, que son liberados inadvertidamente en el medio ambiente.
- ii) pérdidas en los tanques, oleoductos y diversas instalaciones industriales o a partir de fallas o accidentes en los sistemas de almacenaje o de transporte. En esos casos, los hidrocarburos alcanzan aguas abiertas y suelos, pudiendo llegar a contaminar napas

subterráneas y/o cursos de agua superficial. Si bien a nivel mundial, el volumen de derrame de petróleo es de 1.7 a 8.8 millones de toneladas métricas por año, no sólo los grandes derrames causan contaminación sino también los constantes pequeños derrames accidentales, debido a fenómenos naturales y por la actividad extractiva (Head and Swannell 1999). Los mares del planeta sufren cada año millones de pequeños derrames contaminantes procedentes de barcos, refinerías costeras y plataformas petrolíferas. Estas fuentes combinadas de hidrocarburos constituyen la causa principal de la contaminación ambiental.

La contaminación causada por el petróleo es de gran preocupación debido a que los hidrocarburos son tóxicos para muchas de las formas de vida existentes. La toxicidad de las moléculas de hidrocarburos y su disponibilidad para el metabolismo microbiano depende de su naturaleza química y física, así como el tipo de exposición al mismo y el tiempo (Abha and Singh 2012).

2. Remediación

Una vez ocurrido un derrame de hidrocarburos, estos comienzan a modificar sus propiedades físico-químicas. Los hidrocarburos sufren diversos procesos de eliminación y dispersión tales como la disolución, la oxidación fotoquímica, la evaporación, la adsorción, y la sedimentación (Figura I.1) (Wasmund et al. 2009).

Sin embargo, es principalmente el gran volumen de contaminantes vertido y la baja velocidad a la cual son degradados (en muchos casos producto de las condiciones ambientales), lo que hace a la contaminación por hidrocarburos un problema ambiental tan serio (Atlas and Bartha 1993). Por este motivo, en el caso de ambientes altamente contaminados, es necesaria la acción del hombre para acelerar este proceso. A esta intervención se la denomina **remediación**.

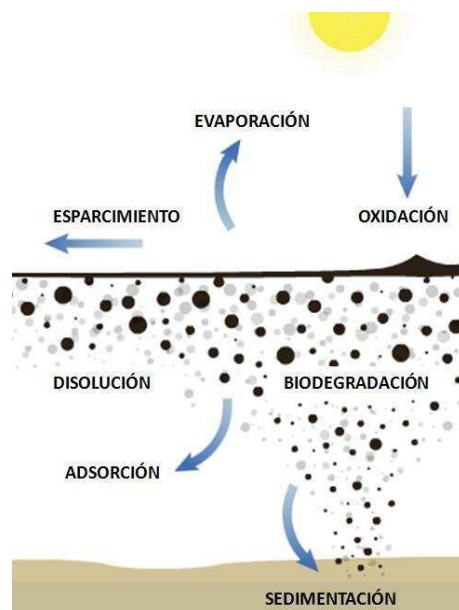


Figura I.1. Procesos de eliminación y dispersión luego de un derrame de hidrocarburos en el medio acuático.

Históricamente, la remediación de suelos y aguas se realizaba por medios físico- mecánicos (quema, remoción manual de los residuos, sedimentación con caliza o arena siliconada en ambientes acuáticos) o químicos (solubilización con detergentes). Sin embargo, estos procedimientos no eliminan el problema sino que lo trasladan a otro sistema, como el aire y aguas profundas, donde continúan afectando al ecosistema (Atlas and Bartha 2002). Por ello, el conocimiento de las dificultades derivadas de la contaminación y el desarrollo de nuevas metodologías para la depuración de ambientes contaminados constituyen un objetivo ecológico prioritario. En tal sentido, los microorganismos pueden ser actores importantes en relación a la remediación de ambientes contaminados, dado que, debido a su alta versatilidad metabólica, pueden ser utilizados en procesos relacionados con la degradación del petróleo y sus derivados.

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos, naturalmente presentes en los ecosistemas en bajas concentraciones. No es sorprendente entonces, que los microorganismos hayan desarrollado, a lo largo de su historia evolutiva, la capacidad de degradarlos. Cuando un sistema natural es contaminado por hidrocarburos, en las comunidades microbianas indígenas estarán presentes, probablemente, individuos pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos capaces de degradarlos. En la biodegradación de hidrocarburos, están

involucrados organismos tanto eucariotas como procariotas siendo los mayormente conocidos *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Candida* y *Sporobolomyces*, (Atlas 1981; Atlas and Bartha 1992; Bossert and Bartha 1984; Sarkhoh et al. 1990).

En las últimas décadas del siglo XX y primeros años del siglo XXI, se comenzaron a utilizar organismos capaces de degradar hidrocarburos para remediar sitios contaminados. A este proceso se lo denominó **biorremediación**.

Existen dos enfoques utilizados para la biorremediación:

En algunos casos, el sistema a tratar (sea un área de suelo, un cuerpo de agua, un efluente industrial, etc.) ha estado expuesto a contaminación por largos periodos (contaminación crónica). En estas circunstancias, el sistema suele presentar una microflora autóctona adaptada a esas condiciones, con una significativa proporción de sus componentes capaces de tolerar y/o degradar los contaminantes (Margesin and Schinner 1999). En estos casos, diversos autores han encontrado que un adecuado balance de los nutrientes disponibles, especialmente N y P, así como el ajuste de la relación C:N:P es suficiente para lograr una efectiva actividad biológica que reduzca significativamente la presencia de los contaminantes. Evidentemente, el resto de los factores ambientales (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) deben también mantenerse dentro de los límites tolerados por las poblaciones microbianas involucradas (Coulon et al. 2005; Margesin and Schinner 2001). Las técnicas basadas en mantener las características físico-químicas del ambiente en niveles que optimicen la actividad de la microflora autóctona se refieren como técnicas de bioestimulación.

Por otro lado, cuando un derrame de hidrocarburos ocurre sobre un sistema que no tiene una historia previa de exposición a los contaminantes (contaminación aguda), la flora autóctona se ve profundamente afectada. Bajo estas circunstancias, los microorganismos presentes no serán capaces de llevar a cabo una efectiva transformación de los contaminantes o solo podrán hacerlo luego de largos periodos de adaptación, frecuentemente incompatibles con los plazos del proceso de biorremediación. En estos casos, la inoculación con cepas microbianas adaptadas a los contaminantes ha mostrado ser una alternativa para lograr que ocurra la biorremediación y para acelerar los tiempos del

proceso (Stallwood et al. 2005; Straube et al. 2003). A esta técnica se la refiere como de bioaumentación.

Evidentemente, cualquiera sea la técnica de biorremediación elegida, existe otro sinnúmero de factores físicos, químicos y biológicos que condicionan la eficacia del proceso (Espeche et al. 1994; Coulon et al. 2005).

2.1. Características microbianas involucradas en la biorremediación de hidrocarburos

La capacidad para tolerar la toxicidad, acceder y degradar un hidrocarburo, radica en presentar el contexto genómico adecuado. Existen variadas estrategias a ser implementadas por los microorganismos biodegradadores, a fin de hacer frente a los contaminantes presentes en el ambiente. Entre las más conocidas, se destacan algunas enzimas, moléculas y estructuras celulares que posibilitan la interacción con distintos compuestos.

2.1.1. Capacidad de degradación de compuestos contaminantes

2.1.1.1. Degradación de Alcanos

Los alcanos son hidrocarburos saturados ampliamente distribuidos en ambientes acuáticos debido a una gran variedad de fuentes antropogénicas y naturales. Ellos constituyen la mayor fracción de hidrocarburos presentes en el petróleo crudo y refinado. Estos compuestos son considerados contaminantes, debido a que los alcanos de cadena corta actúan como disolventes de las membranas celulares, mientras que los alcanos más largos pueden contribuir a la formación de películas de aceite y manchas que pueden limitar los nutrientes y el intercambio de oxígeno (Wasmund et al. 2009). Es importante destacar que los alcanos también sirven como una importante fuente de carbono y de energía para algunos microorganismos. Por ejemplo, en ambientes marinos se ha descrito que los alcanos sufren los procesos de eliminación y dispersión anteriormente mencionados, sin embargo, la mayor vía de eliminación de alcanos en estos ambientes es a través de la biodegradación por parte de bacterias. La biodegradación de alcanos puede transcurrir en condiciones

anaerobias y aerobias, esta última permite que la degradación sea más rápida (Wasmund et al. 2009).

En presencia de oxígeno, las vías de oxidación de alcanos son iniciadas por una etapa de activación que implica la oxidación del sustrato. Si bien se han descrito diversos mecanismos de activación aeróbica, los sistemas enzimáticos que presentan como enzima clave una alcano hidroxilasa dependiente de oxígeno (monooxigenasa) que cataliza este paso inicial, son los más estudiados (Kloos et al. 2006) (Figura I.2).

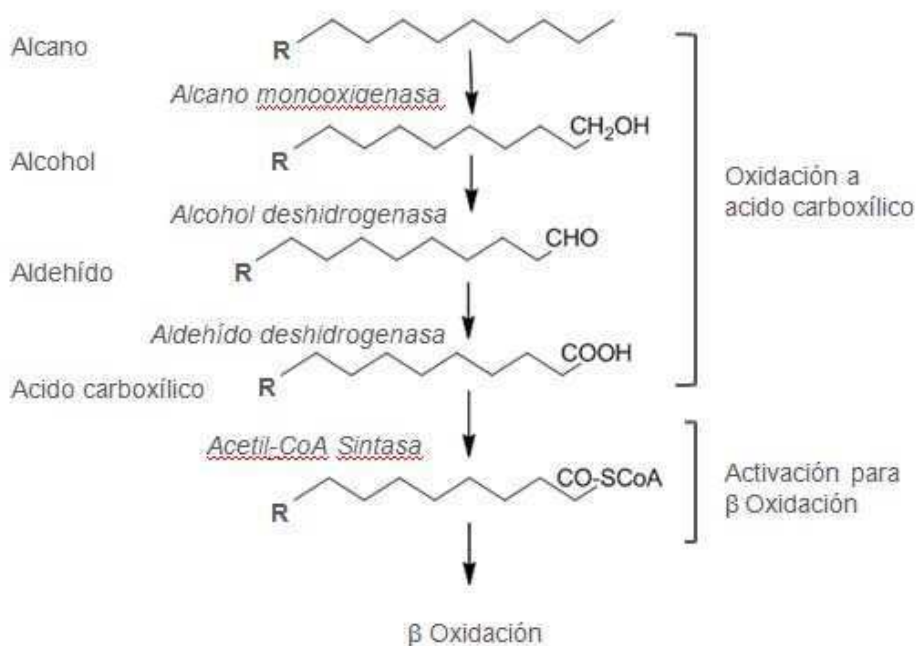


Figura I.2. Representación esquemática del catabolismo de los alcanos hasta su activación para ser metabolizados en la β Oxidación.

En las bacterias, la hidroxilación inicial de los n-alcanos se puede llevar a cabo por enzimas que pertenecen a diferentes familias (Tabla I.3).

Tabla I.3. Clasificación de las enzimas oxidantes de alcanos. El rango de los sustratos es aproximado (Rojo 2010).

Enzima	Características	Sustrato
PRM, propano monooxigenasa	Monooxigenasa de hierro no hémico similar a sMMO	C ₃
sBMO, butano monooxigenasa	Monooxigenasa de hierro no hémico similar a sMMO	C ₂ -C ₉
pBMO, butano monooxigenasa	Monooxigenasa que contiene cobre similar a pMMO	C ₂ -C ₉
CYP153	Citocromo P450 soluble	C ₅ -C ₁₂
Tipo AlkB	Monooxigenasa de hierro no hémico	C ₃ -C ₁₃ o C ₁₀ -C ₂₀
AlmA	Monooxigenasa unida a flavina	C ₂₀ -C ₃₆
LadA	Monooxigenasa termófila dependiente de flavina	C ₁₀ -C ₃₀
Dioxigenasa	Dioxigenasa de cobre dependiente de flavina	C ₁₀ -C ₃₀

Los microorganismos que degradan alcanos de cadena corta (C₂-C₄) presentan enzimas relacionadas con las metano monooxigenasas. Las cepas que degradan alcanos de cadena media (C₅-C₁₁), o alcanos de cadena larga (> C₁₂), con frecuencia contienen monooxigenasas de hierro no hémico, proteínas integrales de membrana, relacionados con la alcano hidroxilasa AlkB de *Pseudomonas putida* GPo1 (anteriormente *Pseudomonas oleovorans* GPo1). Sin embargo, algunas cepas contienen enzimas alcano hidroxilasas (proteínas hemo-tiolato) que pertenecen a la familia citocromo P450 subfamilia CYP153, las cuales son solubles y degradan alcanos de cadena media. El primer miembro caracterizado de este grupo fue la CYP153A1 de *Acinetobacter* sp. EB104 (Maier et al. 2001).

La ruta de degradación de alcanos más ampliamente caracterizada es la codificada en el plásmido OCT de *P. putida* GPo1. La primer enzima de esta vía es una monooxigenasa integral de membrana de dihierro no hémico, AlkB, que hidroxila alcanos en la posición terminal. AlkB requiere dos proteínas de transferencia de electrones solubles llamadas rubredoxina (AlkG) y rubredoxina reductasa (AlkT). Rubredoxina reductasa, a través de su

cofactor FAD, transfiere electrones de NAD(P)H a la rubredoxina, que a su vez transfiere los electrones a AlkB (Figura I.3).

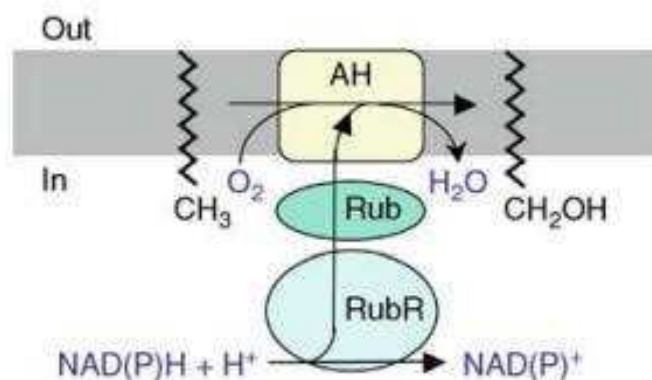


Figura I.3. Esquema de las enzimas involucradas en la oxidación de n-alcenos pertenecientes a la familia AlkB (Rojo 2010).

En las bacterias se han identificado vías alternativas de biodegradación que implican diferentes mecanismos de activación de n-alceno, pero los datos bioquímicos y moleculares son muy limitados.

En la actualidad la búsqueda del gen *alkB* en muestras ambientales, proporciona información útil para la evaluación del potencial biodegradador intrínseco presente en un sitio (Kloos et al. 2006).

2.1.1.2. Degradación de monoaromáticos

El benceno, el tolueno, el etilbenceno y los isómeros de xileno (BTEX) (Figura I.4) son los hidrocarburos monoaromáticos principales del petróleo y productos derivados de este, como la gasolina. Los derrames accidentales de gasolina y las fugas de los tanques de las estaciones de servicio son las principales fuentes de contaminación de los acuíferos. En comparación con otros hidrocarburos, los BTEX presentan una solubilidad en agua relativamente alta. Debido a su solubilidad en agua y sus toxicidades agudas y mutagénicas, los BTEX son clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (Tsao et al. 1998).

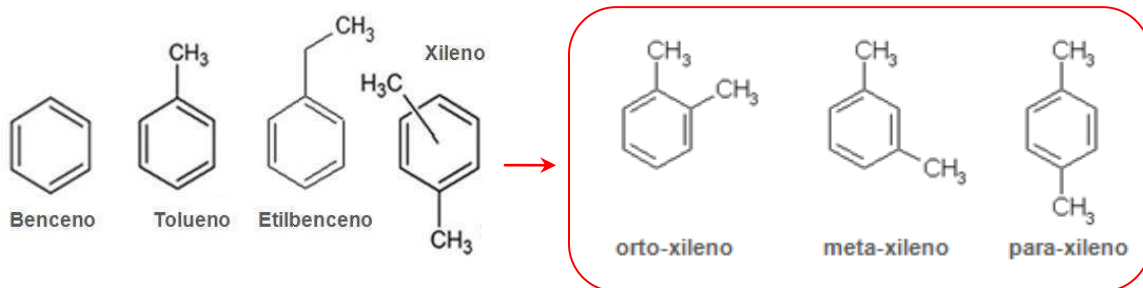


Figura I.4. Esquema de los hidrocarburos monoaromáticos benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX). Isómeros de xileno (orto-, meta- y para-xileno).

Bajo condiciones favorables, los BTEX son biodegradables (Tsao et al. 1998). La degradación aeróbica de los mismos ha sido ampliamente estudiada en diferentes microorganismos. Si bien existen diversas vías para la degradación, todas coinciden en los pasos claves:

- el ataque oxidativo inicial, o vía alta, que favorece la conversión del compuesto en una estructura catecol,
- la escisión de la estructura catecol (vía baja) que conlleva a la producción de compuestos que pueden ser metabolizados a través del metabolismo primario.

El ataque oxidativo inicial consiste en la oxidación directa del anillo aromático u oxidación del grupo metilo o etilo. Estas oxidaciones se pueden llevar a cabo a través de una monooxigenasa (anillo aromático o grupo alquilo) o una dioxigenasa (anillo aromático) (Hendrickx et al. 2006) (Figura I.5).

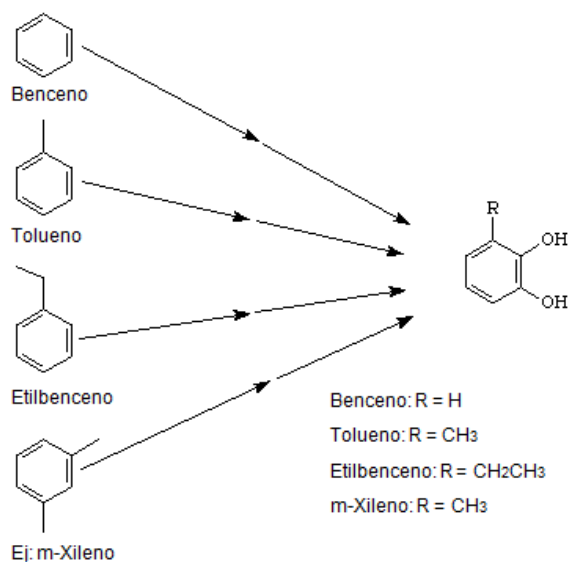


Figura I.5. Esquema de la formación de un catecol sustituido mediante alguna de las vías aerobias para la oxidación de los BTEX, modificado a partir de http://eawag-bbd.ethz.ch/BTEX/BTEX_map.html

Las dos vías altas principales en condiciones aeróbicas que conducen a la mineralización de los hidrocarburos BTEX son; la vía TOD, en la cual una enzima dioxigenasa (codificada por el gen *todC1*) ataca el anillo aromático, y la vía TOL, donde una enzima monooxigenasa ataca al sustituyente metilo (Figura I.6).

Para esta última vía se ha utilizado a *P. putida* mt-2 como organismo modelo. *P. putida* mt-2 alberga el plásmido TOL (pWWO), que contiene los genes que codifican las enzimas implicadas en la degradación de tolueno (entre otros hidrocarburos monoaromáticos), organizadas en dos operones. Como enzima clave de la etapa oxidativa inicial se destaca una xileno monooxigenasa (codificada por el gen *xyIA*), que cataliza la hidroxilación del grupo metilo. La enzima clave de la vía baja sería la catecol-2,3-dioxigenasa (codificada por el gen *xyIE*), que cataliza la transformación del catecol a semialdehído 2-hydroximuconico (Martínez-Lavanchy et al. 2010).

El benceno puede ser metabolizado solamente por la vía TOD, mientras que el tolueno y los xilenos pueden ser oxidado por la vía TOD o TOL (Tsao et al. 1998). Entre los isómeros de xileno, el o-xileno es el más recalcitrante dado no puede ser activado por las enzimas

correspondientes al sistema TOL ya que las mismas solo son capaces de actuar sobre tolueno y m-p-xileno (Burlage et al. 1989; Colombo et al. 2004). Debido a esto, las bacterias que degradan xilenos comúnmente se dividen en dos clases: aquellas capaces de degradar tanto m- y p-xileno, y las que pueden degradar solamente o-xileno. Muy rara vez, es detectada la capacidad de degradar los tres isómeros de xileno en el mismo organismo. Por lo tanto, las posiciones de los grupos metilo en el anillo aromático desempeñan un papel importante en la determinación de las bacterias capaces de crecer en estos hidrocarburos monoaromáticos (Colombo et al. 2004; Kim et al. 2002).

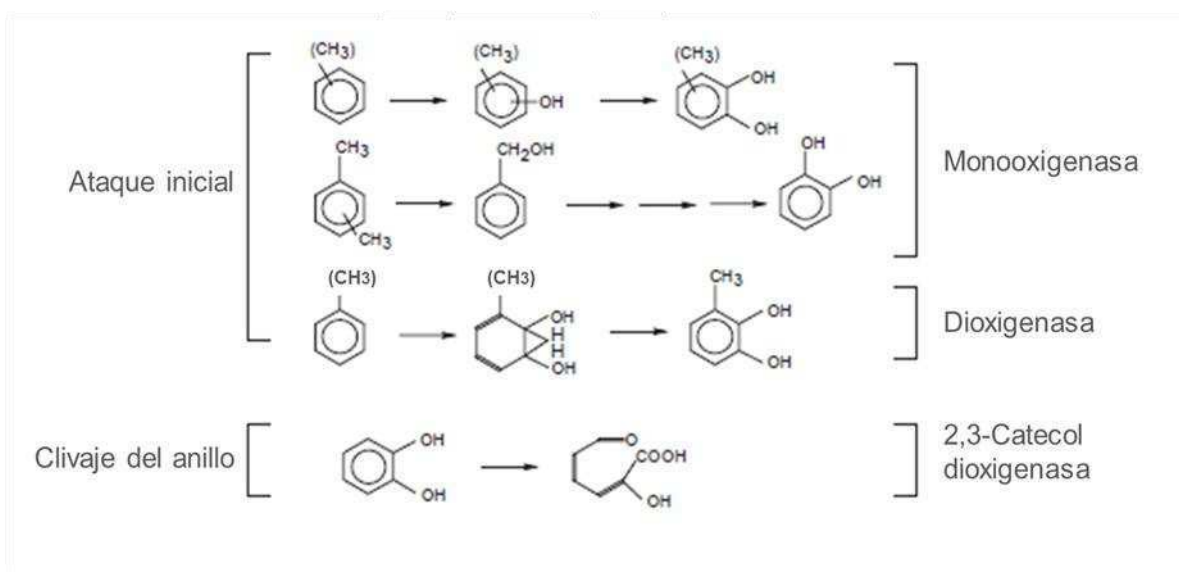


Figura I.6. Representación esquemática del catabolismo de los BTEX, modificado a partir de (Hendrickx et al. 2006).

La eliminación de los BTEX en el agua subterránea, puede llevarse a cabo mediante la biorremediación pasiva o activa *in situ*. Las decisiones en cuanto a si un sitio debe ser contenido y supervisado o si debe realizarse un tratamiento activo, se hacen en gran medida sobre una base empírica. Los conocimientos básicos sobre la distribución, la densidad de población y las actividades de los organismos que degradan los BTEX en los sitios contaminados pueden contribuir a la toma de decisiones racionales. La capacidad de detectar rápidamente y con precisión bacterias degradadoras de BTEX en el medio ambiente es de gran interés. Esto puede hacerse mediante la demostración de la presencia de

genotipos catabólicos implicadas en la degradación BTEX mediante PCR o sus correspondientes ARNm mediante RT-PCR (Hendrickx et al. 2006).

2.1.2. Accesibilidad al sustrato

2.1.2.1. Los Biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas anfipáticas producidos por una gran variedad de microorganismos, tales como las bacterias, los hongos y las levaduras (Arutchelvi and Doble 2010). Los microorganismos producen una amplia variedad de biosurfactantes de alto y bajo peso molecular, y naturaleza química (Figura I.7). La mayoría de estos compuestos poseen cabezas polares de naturaleza aniónica o neutra. Sólo unos pocos son de naturaleza catiónica tales como los que contienen grupos amino. La parte hidrofóbica de la molécula se basa en ácidos grasos de cadena larga, en hidroxiácidos o α -alquil- β -hidroxiácidos. La parte hidrofílica pueden ser hidratos de carbonos, aminoácidos, péptidos cíclicos, grupos fosfato, ácidos carboxílicos o alcoholes (Mulligan 2005).

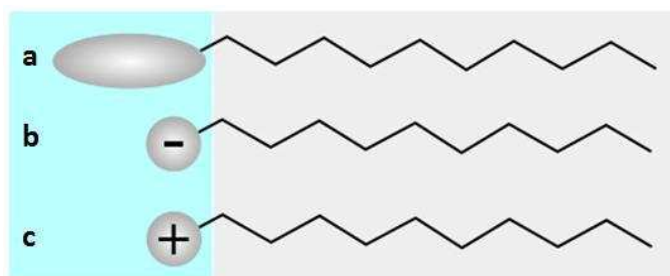


Figura I.7. Representación gráfica de la estructura de los surfactantes. a) cabeza polar neutra, b) cabeza polar aniónica, c) cabeza polar catiónica

Los surfactantes de bajo peso molecular pueden disminuir la tensión superficial e interfacial como actividad primaria. En los sistemas heterogéneos, los biosurfactantes tienden a agregarse en los límites entre las fases o interfaces. Forman una capa molecular interfacial que afecta las propiedades (energía superficial) de la superficie original. El motivo hidrofóbico de la molécula tensioactiva se localiza en la superficie hacia la fase hidrofóbica (generalmente la fase oleosa) mientras que el motivo hidrofílico se orienta hacia la solución o la fase hidrofílica (soluciones acuosas) (Fracchia et al. 2012) (Figura I.8).

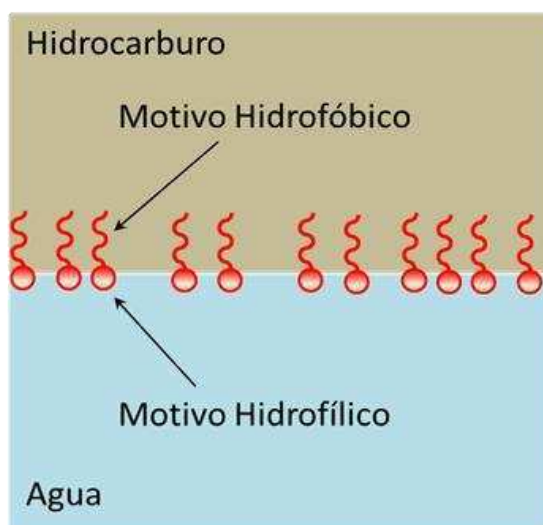


Figura I.8. Esquema de la distribución de una molécula anfipática en la interfase de líquidos inmiscibles.

En el caso de la tensión superficial (tensión presente en la interfase líquido-aire), los surfactantes la disminuyen debido a que interfieren en la formación de puentes de hidrogeno y otras fuerzas involucradas en la adhesión entre moléculas, mientras que en la tensión interfacial (entre las fases de líquidos inmiscibles) los surfactantes actúan como un “puente” formando una tercera fase de “microemulsion” que favorece la interacción entre la fase acuosa y la del hidrocarburo (Raiger lustman y López 2009). Los lipopéptidos, los glicolípidos, los flavolípidos, los fosfolípidos y los ácidos grasos son representantes comunes de este grupo (Fracchia et al. 2012).

Por otro lado, por lo general se hace referencia como bioemulsionantes a los surfactantes de alto peso molecular, dado que pueden formar y estabilizar aceite en agua o agua en emulsiones de aceite (Figura I.9), pero no son necesariamente eficientes en reducir la tensión superficial. Estos biosurfactantes de alto peso molecular son emulsionantes altamente eficientes que trabajan a bajas concentraciones y presentan considerable especificidad de sustrato. Están compuestos de polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas, etc (Fracchia et al. 2012).

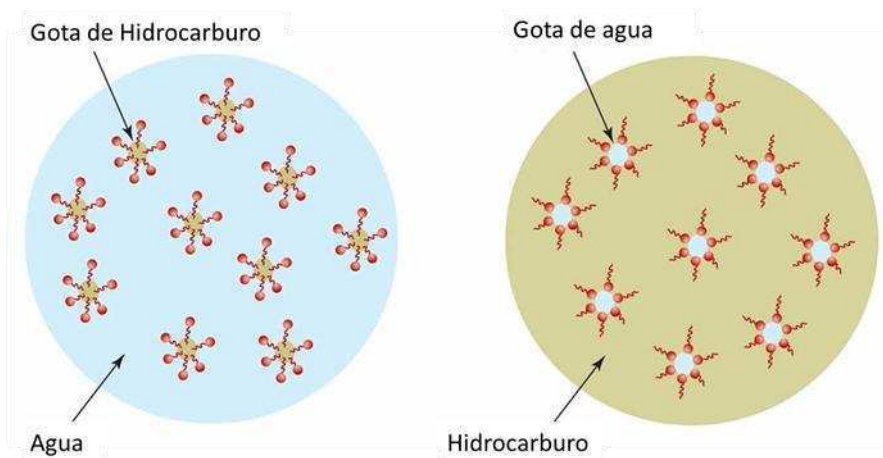


Figura I.9. Esquema de la acción emulsificante de algunos biosurfactantes de alto peso molecular.

El rol natural más destacado de los biosurfactantes es promover la interacción entre los microorganismos y los sustratos insolubles como los hidrocarburos. Algunos biosurfactantes / bioemulsificadores favorecen el crecimiento en sustratos hidrofóbicos insolubles en agua mediante el aumento de la biodisponibilidad (Fracchia et al. 2012).

Las funciones que tendrían estos surfactantes a la hora de aumentar la biodisponibilidad serían:

- Disminuir la tensión superficial (en el caso del agua puede reducirse de 72 mN/m a cerca de 27 mN/m), reducir la tensión interfacial y aumentar la solubilidad (Christofi and Ivshina 2002).
- Dispersar el petróleo aumentando la superficie de contacto.
- Aumentar la biodisponibilidad de compuestos hidrofóbicos mediante dos métodos: el primero de ellos es la solubilización y el segundo método es por movilización. En este caso, el agente surfactante se une a las moléculas adsorbidas a una superficie porosa (el lecho arenoso de las costas o las arcillas de las napas subterráneas) disminuyendo su tensión interfacial, separándolas de la matriz y aumentando la biodisponibilidad para su remediación o facilitando su remoción por medios físicos (Harwell et al. 1999).

Estas moléculas han sido de gran interés en los últimos años a causa de sus propiedades, incluyendo, su actividad tensioactiva, su menor toxicidad, su mayor biodegradabilidad y compatibilidad ambiental, en comparación con los tensioactivos sintéticos (Arutchelvi and Doble 2010).

En estudios recientes se ha mostrado que en la biorremediación en vertidos de petróleo, se puede utilizar el poder solubilizante de ciertos agentes tensioactivos para extraer sustancias contaminantes, que naturalmente presentan escasa solubilidad en agua y alta adherencia a las moléculas del suelo.

2.1.2.2. La superficie celular

La membrana externa de las bacterias Gram-Negativas es conocida por estar constituida de lipopolisacáridos (LPS), lipoproteínas, fosfolípidos, y diversas proteínas. La misma, presenta como propósito central, ser el sitio de interacción con el medio circundante. Se ha demostrado que la composición de la superficie celular sufre cambios sustanciales en respuesta a modificaciones en el medio ambiente y las condiciones nutricionales (Dufrene and Rouxhet 1996), como por ejemplo:

- Isomerización de *cis* a *trans* de los ácidos grasos insaturados como una respuesta a corto plazo, y cambios en el proporción de ácidos grasos saturados como una respuesta a largo plazo, consecuencia de la exposición a solventes y modificaciones de temperatura (Ramos et al. 2002).
- Aumento en la cantidad de carotenoides polares y disminución de los no polares en organismos cultivados a baja temperatura, en comparación con su perfil de producción obtenido en el crecimiento a temperatura ambiente (Chattopadhyay 2006).
- Incremento en el contenido de proteínas, acompañado de una disminución en el contenido de polisacáridos, en células que pasan de fase exponencial a fase estacionaria, durante el crecimiento en medio LB (Dufrene and Rouxhet 1996).
- Incremento excesivo de polisacáridos extracelulares cuando el medio de cultivo presenta exceso de carbono y baja concentración de nitrógeno (Brown 1977).

A su vez, se han observado que la composición química de la superficie celular presenta una correlación directa con ciertas propiedades superficiales (Dufrene and Rouxhet 1996).

Debido a que estudios previos han sugerido que la capacidad de adherirse a hidrocarburos es una característica de los microorganismos degradadores (Rosenberg et al. 1980), es interesante analizar qué características de la superficie celular están contribuyendo a tal adherencia. Un ejemplo de esto, es que las características hidróbicas celulares contribuyen a diversos fenómenos de adhesión microbiana (Rosenberg 2006).

2.1.3. Mecanismos de resistencia al estrés ambiental

2.1.3.1. Los Polihidroxicanoatos

Las bacterias en ambientes naturales están sometidas a diversos factores de estrés, tales como el estrés oxidativo, la alta o baja concentración de iones, la alta radiación ultravioleta (UV) y cambios de temperatura que afectan su estado fisiológico. Por lo tanto su supervivencia está determinada por la capacidad de adaptación que involucra la búsqueda de fuentes de energía y nutrientes, así como el desarrollo de mecanismos que permitan enfrentar condiciones desfavorables. Una estrategia utilizada por las bacterias para resistir las diferentes situaciones de estrés es la utilización de polímeros de reserva tales como los polihidroxicanoatos (PHA), que se almacenan en el interior celular en forma de gránulos (Figura I.10). Cuando la fuente de carbono externa se agota, el PHA es depolimerizado para ser utilizado como fuente de carbono y energía durante periodos de ayuno (Tal and Okon 1985) confiriendo una ventaja adaptativa a aquellas bacterias capaces de acumularlo.

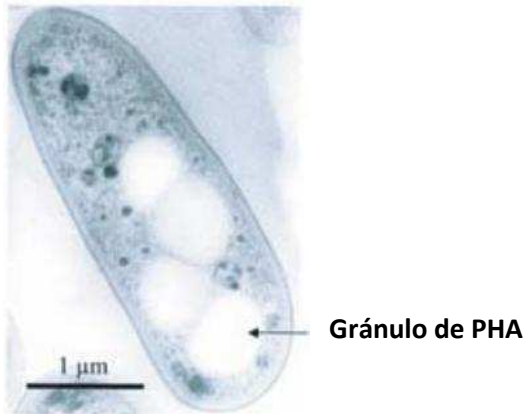


Figura I.10. Microscopía electrónica de gránulos de PHA en una célula de *P. aeruginosa*, modificado a partir de (Rehm 2003).

La influencia del PHA en la supervivencia bacteriana en ambientes naturales se ha estudiado en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana-FCEyN UBA utilizando mutantes. Comparando cepas salvajes y mutantes incapaces de producir el polímero en microcosmos diseñados en el laboratorio, se demostró que la presencia de genes *pha* favorece la supervivencia bacteriana en agua de río, de pozo y en suelo (López et al. 1995, 1998). Los trabajos se continuaron utilizando mutantes deficientes en la degradación de PHA de *Pseudomonas putida* GPo1. Estas mutantes constituyen un modelo adecuado para este tipo de estudios dado que permiten controlar la acumulación del polímero. En estos trabajos se demostró que la capacidad para degradar el PHA acumulado constituía una ventaja para la supervivencia en fase estacionaria y para el desarrollo de mecanismos de resistencia a distintos agentes de estrés (Ruiz et al. 1999, 2004). En bacterias fijadoras de nitrógeno, el PHA actúa como regulador del contenido de oxígeno y también como dador de electrones (Anderson and Dawes 1990). Estudios realizados en *Azospirillum brasilense*, capaz de acumular PHB a partir de diversas fuentes de carbono, y sus mutantes para la síntesis o la depolimerización de PHB (*phbC*-, o *phbZ* respectivamente) mostraron una mayor resistencia de la cepa salvaje, en comparación con las mutantes, frente a diferentes tipos de estrés: térmico, por radiación UV, osmótico, hambreado y oxidativo (Kadouri et al. 2002, 2003, 2005).

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros producidos por una gran variedad de bacterias como compuestos intracelulares de reserva de carbono y energía. Estos compuestos se acumulan bajo condiciones limitantes de nutrientes en presencia de exceso de fuente de carbono, a niveles que pueden alcanzar hasta el 90% del peso seco de la célula (Madison and Huisman 1999). Desde el descubrimiento del polihidroxi butirato (PHB) en *Bacillus megaterium* en 1926 por Legmoine, se han encontrado más de 90 géneros bacterianos capaces de producir una gran variedad de PHA, compuestos por diferentes monómeros que le otorgan distintas propiedades físicas y químicas. Los PHA están constituidos por cadenas lineales de unidades de 3-hidroxicanoato donde el grupo carboxilo forma una unión éster con el grupo hidroxilo vecino. Todos los monómeros tienen un centro quiral (*) en la posición R. En el polihidroxi butirato el R= CH₃; polihidroxi valerato R= C₂H₅ y en los PHA compuestos por monómeros de longitud de cadena media (PHAcm) R= C₃H₇ – C₁₁H₂₅; con un N que va desde 100-30000 monómeros (Zinn et al. 2001) (Figura I.11).

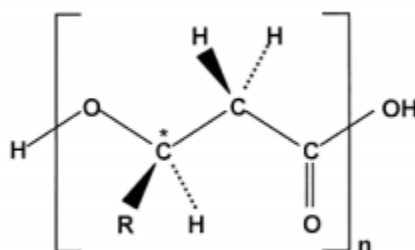


Figura I.11. Estructura química de los PHA (Zinn et al. 2001).

Existen distintos polímeros según su composición monomérica: PHA de cadena media, los PHAcm (cuyos monómeros están compuestos desde 6 a 15 carbonos) y los denominados PHA de cadena corta (PHAcc), cuyo monómeros poseen de 3 a 5 carbonos.

Entre estos últimos se clasifica el PHB (que posee 4 carbonos en sus monómeros). Los genes involucrados en la biosíntesis de PHB han sido estudiados en un amplio rango de especies (Steinbüchel and Valentin 1995). El camino biosintético más ampliamente distribuido, para la síntesis de PHB, incluye 3 enzimas: una β -cetotiolasa (codificada por el gen *phaA*), que condensa 2 moléculas de acetil-CoA en acetoacetil-CoA, una reductasa

dependiente de NADPH o NADH (codificada por el gen *phaB*), encargada de reducir este compuesto para dar D(-)-3-hidroxiacil-CoA y una PHB sintasa o polimerasa (codificada por el gen *phaC*), que utiliza este compuesto como sustrato para la polimerización (Steinbüchel and Hein 2001). Entre las bacterias productoras de PHA de cadena corta se encuentra *Cupriavidus necator* (anteriormente denominada *Ralstonia eutropha*) y entre las productoras de cadena media la mayoría de las especies de *Pseudomonas* (Rehm 2003). Los genes involucrados en la biosíntesis de este tipo de polímeros incluyen 2 genes que codifican polimerasas de clase II (*phaC1* y *phaC2*), que están separados por un gen que codifica una depolimerasa (*phaZ*). El gen *phaD* (el cual codifica un regulador transcripcional) está ubicado inmediatamente río abajo de *phaC2* y río arriba de los genes *phaF* y *phaI*, los cuales se transcriben en dirección opuesta. *PhaI* y *PhaF* son consideradas proteínas estructurales y regulatorias del tipo *fasina* (Hoffmann and Rehm 2004), ver Figura I.12.



Figura I.12. Esquema del típico *cluster* asociados a la síntesis de PHAcM en *Pseudomonas*.

En *Pseudomonas* los genes *phaG* y *phaJ* que codifican las enzimas (R)-3-hidroxiacil ACP:CoA y (R)-enoil-CoA hidratasa, respectivamente, están normalmente ubicados en otro sitio del genoma con respecto al grupo de genes que contiene polimerasas y depolimerasas (Rehm et al. 1998) y son las encargadas de proveer de sustrato a la PHA polimerasa a partir de metabolitos intermediarios de la síntesis de novo y β -oxidación de ácidos grasos, respectivamente.

La síntesis del polímero está relacionada con vías metabólicas esenciales para la célula (Figura I.13) debido a que los precursores necesarios pueden derivar de distintas rutas metabólicas como el ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA), la β oxidación de ácidos grasos y la síntesis *de novo* de ácidos grasos, e involucra metabolitos centrales como el acetil-CoA y cofactores como el NADPH (Aldor and Keasling 2003).

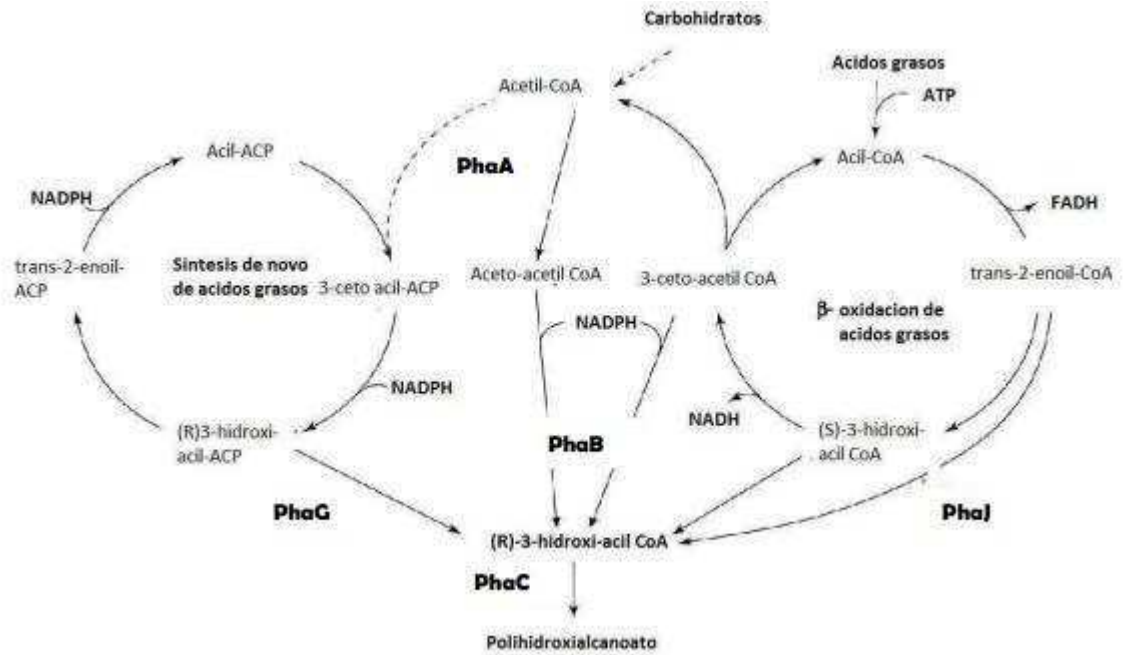


Figura I.13. Esquema general de las distintas vías metabólicas involucradas en la síntesis de PHA. Modificado de (Aldor and Keasling 2003).

2.2. Co-contaminación con hidrocarburos y metales

Si bien los metales están naturalmente presentes en los suelos, debido a la actividad humana su concentración va en aumento. Algunas áreas presentan tan altas concentraciones de metales pesados y metaloides que están afectando los ecosistemas naturales. Se ha observado que los ambientes contaminados con hidrocarburos, co-contaminados con metales pesados son difíciles de biorremediar. La razón de esto, es que los metales pesados y metaloides restringen la actividad microbiana haciéndola incapaz de degradar hidrocarburos o reduciendo su eficiencia (Abha and Singh 2012).

2.2.1. Metales: Cobre

Teniendo en cuenta a todos los metales presentes en nuestro planeta, podemos clasificarlos en tres grandes grupos: 1. esenciales para procesos biológicos y a su vez no tóxicos a concentraciones altas (Clase A Ej: Ca y K) 2. Esenciales pero tóxicos más allá de una concentración límite (“*Borderline*” Ej: Cr y Mn) y 3. Netamente tóxicos (Clase B Ej: Cd, Hg y Pb) (Duffus 2002). Numerosos efluentes industriales presentan concentraciones relativamente altas de muchos metales, entre los cuales se encuentran tanto aquellos pertenecientes a los grupos 2 y 3.

El cobre es un metal traza que se halla en varios minerales y rocas (Bowen 1985). Se lo considera como metal traza ya que se encuentra en concentraciones menores a $0,1\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ en la corteza terrestre. Posee tres estados de oxidación posibles: cero (Cu^0 , metal sólido); uno (Cu(I) , ión cuproso); y dos (Cu(II) , ión cúprico). Además, es un micronutriente esencial necesario para el metabolismo de organismos tanto eucariotas como procariotas. Según su densidad, se lo clasifica dentro del grupo de los metales pesados (Forstner and Wittmann 1979). El cobre es un nutriente esencial, que juega roles estructurales y funcionales en enzimas oxidativas, incluyendo super óxido dismutasa (SOD); citocromo oxidasa; ascorbato oxidasa; polifenol oxidasa y en proteínas de transporte de electrones. Los procesos fisiológicos en los que están involucradas estas enzimas y proteínas dependientes de cobre comprende un abanico muy variado, como la fotosíntesis; el metabolismo de carbohidratos; la respiración; el metabolismo de proteínas; la lignificación de las paredes celulares; la formación de polen; esencial para el sistema inmune; el sistema nervioso; la formación de glóbulos rojos, entre otros. (Kabata-Pendias 2010). Si se superan los umbrales fisiológicos del cobre (10^{-18} - 10^{-13} M) (Turnlund 1989), éste puede resultar tóxico gracias a su capacidad de producir radicales hidroperóxidos (Rodríguez Montelongo 1993) y su interacción con la membrana celular (Suwalsky 1998).

Es importante destacar que la toxicidad depende de la forma adoptada por el metal (iónica, complejada o precipitada) ya que esto afecta su biodisponibilidad. Los factores ambientales tales como el pH, el potencial redox, el tipo del suelo, la dureza del agua y el contenido de material orgánico presente varían según el ambiente, posibilitando la deficiencia o toxicidad del cobre (Flemming 1989).

Por estos motivos, es necesaria la puesta en práctica de metodologías de remediación para sanear los sitios contaminados con este metal.

En ambientes terrestres el cobre puede proceder de numerosas fuentes, entre ellas: prácticas agrarias (fertilizantes, fungicidas), conservantes de la madera; actividades industriales (hornos de fundición, actividad minera); tránsito de vehículos; entre otras y en ambientes acuáticos una de las mayores causas es el uso de pinturas anti-incrustación en los cascos de los barcos (Schiff 2004).

Las industrias asociadas a tales actividades efectúan ciertos tratamientos de efluentes basados en la precipitación química. Sin embargo dicha precipitación puede no ser suficiente cuando el metal se encuentra complejado y en co-existencia con material orgánico. En tales situaciones es necesaria la implementación de un tratamiento biológico mediante el desarrollo de biorreactores adecuados de acuerdo al metal a remover del sistema. Las estrategias microbianas de supervivencia frente a metales Clase *Borderline* y B se encuentran ampliamente estudiadas. Aprovecharlas en beneficio del ambiente es una posibilidad a tener en cuenta en el momento del correcto diseño de un sistema de biorremediación que asegure la eficiencia del proceso. La supervivencia experimentada por los microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos (Figura I.14).

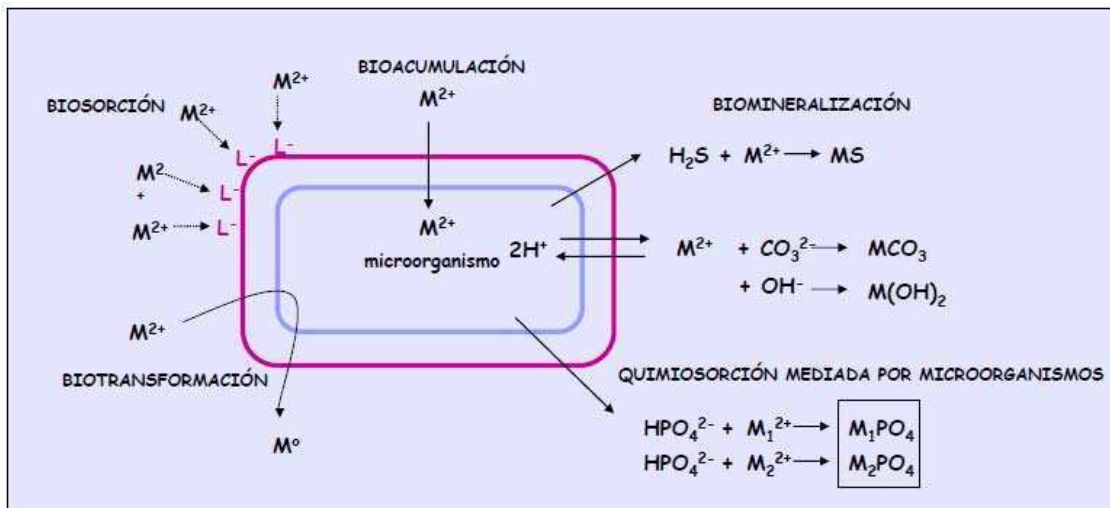


Figura I.14. Esquema de las distintas estrategias utilizadas por los microorganismos para tolerar y/o resistir los metales. Estos fenómenos son: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción. (Vullo 2003).

Una de dichas estrategias se basa en la adsorción superficial microbiana del metal de interés, mecanismo denominado biosorción, útil en el caso de contaminaciones con Cu(II), Cd(II) y Zn(II).

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado que consiste en la utilización de microorganismos para adsorber metales u otros iones en solución acuosa. Una de las ventajas de este método es que al no requerir un metabolismo microbiano activo, no es necesario el agregado de nutrientes o fuentes de aireación y por consiguiente, se minimizan los costos de remediación.

Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción físico-química del metal con grupos funcionales de polisacáridos, lípidos y proteínas pertenecientes a la pared celular expuestos hacia el exterior celular. Dado que es un mecanismo que no muestra alta dependencia con la temperatura, en muchos casos puede estudiarse en detalle mediante los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich.

2.2.2. Modelos de adsorción de metales

El modelo de Langmuir (Muhammad et al. 1998) es uno de los más utilizados para describir el fenómeno de biosorción. Este modelo describe la dinámica de adsorción en un sistema líquido donde el equilibrio involucra el equilibrio termodinámico dependiendo de la concentración de un soluto en solución.

Dicho modelo asume que la adsorción ocurre en una monocapa, que la superficie contiene un número fijo de sitios de adsorción, que todos los sitios de adsorción son iguales, que la superficie contiene un número fijo de sitios de adsorción, que todas las especies adsorbidas interactúan con un sitio y no entre sí, que adsorción es limitada, reversible y que la energía de adsorción de todos los sitios es idéntica e independiente de la presencia de especies adsorbidas en los sitios vecinos. De acuerdo a esto, cuando la adsorción se ajusta al modelo de Langmuir, el número de sitios ocupados, q , está dado por:

$$q = q_{\text{máx}} \cdot C_f / (K_d + C_f)$$

Siendo $q = V (C_i - C_f) / M$, donde V es el volumen de solución, C_i es la concentración inicial de metal en la solución (mM), C_f es la concentración final del metal en la solución (mM) y M es la cantidad de biomasa usada en los experimentos expresada en gramos de peso seco; $q_{\text{máx}}$ es la captación máxima alcanzada: C_f es la concentración final alcanzada una vez llegado al equilibrio y K_d es la constante de Langmuir relacionada con la energía de adsorción y es la inversa de la constante de afinidad. Siendo así, los buenos adsorbentes son aquellos que poseen un alto valor de $q_{\text{máx}}$ y un bajo valor de K_d . Se puede linealizar la ecuación anterior, llegando a una expresión:

$$C_f/q = K_d / q_{\text{máx}} + C_f / q_{\text{máx}}, \text{ y representando gráficamente } C_f / q \text{ vs. } C_f.$$

Otro modelo de adsorción sencillo es el modelo de Freundlich (Freundlich 1906; Muhammad et al. 1998) que, contrario al modelo de Langmuir, nunca alcanza la saturación de los puntos de sorción. El modelo propone que existe una adsorción en monocapa pero la distribución de la energía de adsorción es heterogénea en los distintos sitios activos. Este modelo postula las interacciones entre las moléculas adsorbidas, y asume que existe un número infinito de sitios de reacción desocupados, por lo tanto no muestra una máxima capacidad de adsorción.

3. Generalidades de las especies del género *Pseudomonas*

Las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos, consideradas tradicionalmente como organismos no fermentadores con respiración aeróbica (Stanier et al. 1966), que se encuentran distribuidas en diversos ambientes naturales, como por ejemplo, en agua y suelo. Poseen una gran versatilidad metabólica que les permite sobrevivir y colonizar nichos ecológicos con condiciones poco favorables. Se las ha aislado de ambientes extremos donde predominan bajas temperaturas o altas salinidades, entre otros, y también en aquellos contaminados con hidrocarburos. Además, son capaces de producir diversos compuestos de interés como pigmentos con propiedades antibióticas (O'Sullivan and O'Gara 1992) y polímeros de importancia biotecnológica como los alginatos y los polihidroxicanoatos. Por estas características, así como por su relativamente fácil manipulación en el laboratorio, las especies de *Pseudomonas* son de gran interés en microbiología, no solo básica sino también aplicada.

3.1. Microorganismos con potencial biorremediador

Las *Pseudomonas* son capaces de crecer utilizando una amplia variedad de compuestos como fuente de carbono, entre ellos los compuestos alifáticos, alicíclicos y aromáticos presentes en el petróleo (Lageveen et al. 1988; Ward et al. 2005; Whyte et al. 1997). También ha sido señalado que las *Pseudomonas*, pueden ser capaces de acumular PHA a partir de hidrocarburos (Prieto 2007). En ese caso, además de transformar parte de los contaminantes en biopolímeros, el producto de esta transformación le conferiría al microorganismo ventajas adaptativas, como mayor tolerancia a estrés y mayor supervivencia. Hasta el momento, no hay trabajos que utilicen la alta adaptabilidad al ambiente de los microorganismos capaces de producir PHA en procesos de biorremediación.

Como se mencionó anteriormente, otra característica relevante de los microorganismos a ser utilizados en biorremediación de hidrocarburos es la capacidad de producir biosurfactantes, favoreciendo su biodisponibilidad y de esa manera su degradación. Las bacterias del género *Pseudomonas* también son capaces de producir dichos compuestos. Los principales

surfactantes producidos por cepas del género *Pseudomonas* son los rhamnolípidos (Rosenberg 2006), aunque también se ha descrito la producción de surfactantes de características lipopeptídicas, como putisolvin I y II y viscosin (Al-Araji et al. 2007; Kuiper et al. 2004) así como compuestos de alto peso molecular formados por polímeros de lípidos, pépticos e hidratos de carbono (Al-Araji et al. 2007).

Un aspecto interesante de los dos compuestos mencionados (PHA y biosurfactantes) es que sus metabolismos están relacionados ya que ambos utilizan los 3-hidroxiácidos como sustrato de síntesis. Por otro lado, la capacidad de degradar PHA ya acumulados le podría conferir a las cepas utilizadas como inoculantes en ambientes contaminados los precursores necesarios para la síntesis de surfactantes, favoreciendo la biodisponibilidad del hidrocarburo y disminuyendo el tiempo de degradación.

3.1.1. *Pseudomonas extremaustralis*

P. extremaustralis ha sido aislada, caracterizada y descrita como nueva especie (López et al. 2009) en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana-FCEyN UBA, donde se desarrolló esta Tesis. El aislamiento fue realizado a partir de muestras obtenidas de una charca temporal del Continente Antártico, un ambiente desfavorable caracterizado por alta radiación UV, bajas temperaturas, variaciones extremas de luminosidad, y escasez de nutrientes. Sus características más importantes, que la hacen de interés para su estudio, son la alta producción de PHB, más del 80% de su peso seco (Ayub et al. 2004) y su alta resistencia al estrés tanto oxidativo, calor o frío (Ayub et al. 2004, 2009). La producción de PHB resultó una característica sumamente interesante debido a que las especies del género *Pseudomonas* producen normalmente PHA de cadena media y no de cadena corta, como el PHB. Algunos de los genes involucrados en la síntesis de este polímero mostraron similitud con especies del género *Burkholderia* (Ayub et al. 2007). La síntesis de PHB en *P. extremaustralis* se produce a partir de ácidos grasos y glucosa.

Las características particulares de esta especie, como la producción de PHB y la alta resistencia al estrés, así como otras generalizables a otras especies de *Pseudomonas* no patógenas hacen de *P. extremaustralis* una especie de gran interés para su estudio como agente de biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos complejos.

3.1.2. *Pseudomonas* sp KA-08 y *Pseudomonas* sp KB-08

En el laboratorio de Biotecnología Ambiental y Ecología Bacteriana, se obtuvieron, también, aislamientos del género *Pseudomonas* procedentes de barros activados pertenecientes a una planta de tratamiento de aguas residuales de la industria del refinamiento de aceite, denominados KA-8 y KB-08. Dichos aislamientos fueron seleccionados por su capacidad de crecer en cultivos líquidos con kerosén o diesel como única fuente de carbono, acumular PHAcM y de emulsionar kerosén (Di Martino et al. 2012).

4. Desarrollo de la hipótesis de trabajo y objetivos

En las últimas décadas del siglo XX y primeros años del siglo XXI, se comenzaron a utilizar organismos capaces remediar sitios contaminados. La biorremediación de tales ambientes solo puede ser realizada por aquellos organismos que tengan el potencial (enzimas, mecanismos, estructuras celulares u otros) que les permitan retener, metabolizar o transformar los contaminantes. Por consiguiente es necesario realizar una valoración adaptativa de los organismos seleccionados y analizar características tales como su capacidad degradativa, accesibilidad al contaminante y la tolerancia al mismo debido a que si el contaminante a depurar supera los límites tolerables estos serán inhibidos o eliminados.

En base a esto, la hipótesis de este trabajo es que *Pseudomonas extremaustralis*, *Pseudomonas* sp. KA-08 y *Pseudomonas* sp. KB-08, capaces de sintetizar PHA presentan características apropiadas para ser consideradas como probables agentes remediadores de sitios contaminados con hidrocarburos.

Objetivo general

En base a la hipótesis planteada, el objetivo general de esta tesis consiste en evaluar si los aislamientos naturales *P. extremaustralis*, *Pseudomonas* sp. KA y *Pseudomonas* sp. KB poseen las características necesarias para ser considerados como potenciales agentes biorremediadores y determinar si los polihidroxicanoatos favorecen la manifestación de dichas características.

Objetivos específicos:

- Buscar los genes involucrados en el catabolismo de alcanos e hidrocarburos monoaromáticos.
- Analizar la tolerancia y la degradación de hidrocarburos.

- Analizar la producción de agentes biosurfactantes.
- Análisis del efecto del PHA sobre diversas variables involucradas en la capacidad biorremediadora de bacterias: Degradación de hidrocarburos, Producción de biosurfactantes, modificación de la superficie celular.

Materiales y Métodos

1. Cepas y plásmidos utilizados

Las cepas bacterianas así como los plásmidos utilizados para realizar los distintos ensayos se detallan a continuación en la tabla M.1.

Tabla M.1. Cepas y plásmidos utilizados en esta Tesis.

Cepas y plásmidos	Características relevantes	Fuentes y Referencia
Cepas		
<i>Pseudomonas</i> sp. KA-08 (KA-08)	Salvaje, productora de PHA	Di Martino et al. 2012
<i>Pseudomonas</i> sp. KA-mut (KA-mut)	Mutante (Km ^R) de <i>Pseudomonas</i> sp. KA-08 incapaz de producir PHA	Este trabajo
<i>Pseudomonas</i> sp. KB-08 (KB-08)	Salvaje, productora de PHA	Di Martino et al. 2012
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> DSM 1783	Salvaje, productora de PHB	López et al. 2009
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Productora natural de mclPHA	Franklin et al. 1981
<i>Pseudomonas extremaustralis</i> /pGEc47	<i>P. extremaustralis</i> complementada con los gens <i>alk</i>	Tribelli et al. 2012
<i>Pseudomonas putida</i> GPp104	Mutante de KT2442 incapaz de producir PHA	Huisman et al. 1991
<i>Pseudomonas putida</i> GPp-PHA	Mutante PHA de KT2442/ pBBR1MCS5 con gen <i>phaC1</i>	Catone 2013
<i>E. coli</i> S17-1 λpir	(F-) RP4-2-Tc::Mu <i>aphA</i> ::Tn7 <i>recA</i> λ <i>pir</i> isogen; Sm ^r Tp ^f	Simon et al. 1983
<i>E. coli</i> TOP 10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> nupG <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ ⁻	Invitrogen
Plásmidos		
pGEM-T easy	Vector de clonado para productos de PCR	Promega

pUCK4	Km para la construcción de mutantes	Pharmacia, California
pEX18Tc	Tet ^R ; <i>oriT</i> ⁺ <i>sacB</i> ⁺	Hoang et al. 1998
pEXΔphaC1ZC2	Tet ^R ; <i>oriT</i> ⁺ <i>sacB</i> ⁺ Δ <i>phaC1ZC2</i> ::km ^r	Este trabajo

2. Condiciones de cultivo

2.1. Conservación de las cepas mediante glicerolados

Para la conservación de las cepas, 5 ml de cultivos crecidos durante 18 hs en medio LB (con el agregado de antibiótico de ser necesario) se centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en 500 μl de medio LB, y 400 μl de glicerol 50 %. Las cepas se conservaron a a -70°C hasta ser utilizadas.

2.2. Pre inóculos: Condiciones de acumulación y no acumulación de PHA

Previo a cada ensayo se realizó un cultivo a partir de colonias aisladas o de un stock de glicerolado, con el cual se inocularía la condición de estudio. Para la condición de acumulación de PHA, los cultivos fueron realizados en erlenmeyer de 100 ml con 10 ml del medio E modificado (Lageveen et al. 1988; Vogel and Bonner 1956) y 0.25% m/v de octanoato de sodio (Sigma). Para la condición de no acumulación de PHA, se utilizó medio Luria-Bertani (LB). De ser necesario, se agregó antibiótico. Todas las cepas *Pseudomonas* se incubaron a 32°C, en agitación a 300 rpm durante 24 horas.

2.3. *P. extremaustralis*

Los cultivos en biofilms se desarrollaron en placas multipocillo de polietileno (Gibco), como se describe en O'Toole and Kolter (1998). Se colocaron 200 μl de medio mínimo E2 (Lageveen et al. 1988) suplementado con KNO₃ 0,08% y diesel 5% (Petrobras) en un pocillo de la placa a una DO_{600nm} inicial de 0.025 y se cultivó durante 7 días, a 30°C sin agitación, en una cámara húmeda para evitar la evaporación.

Los ensayos en frascos agitados se realizaron en botellas de 500 ml conteniendo 25 ml de medio mínimo E2 (Lageveen et al. 1988) suplementado con KNO₃ 0,08% y diesel 5%

(Petrobras) a una DO_{600nm} inicial de 0.025, los cuales se incubaron durante 7 días, a 30°C y 300 rpm (selladas).

En ambos casos, se emplearon cultivos de *P. extremaustralis* y *P. extremaustralis*/pGEc47 en condiciones de acumulación y no acumulación de PHA como inóculos iniciales. En el caso que fuese necesario se agregó 10 µg/ml de tetraciclina para el mantenimiento del plásmido pGEc47. El crecimiento en ambas condiciones fue monitoreado mediante la medición de la OD_{600nm} . En la condición de biofilms, se resuspendieron las bacterias totales (incluyendo las adheridas a la superficie y las planctónicas) y se midió la DO_{600nm} .

2.4. KA-08, KA-mut y KB-08

2.4.1. Degradación de hidrocarburos complejos

El ensayo realizado para la determinación del porcentaje de degradación de kerosén y diesel se llevó a cabo en botellas de 500 ml conteniendo 50 ml de medio E2 (Lageveen et al. 1988) suplementado con kerosén o diesel al 10%. En ambos casos, se utilizó como inóculo inicial cultivos de KA-08 y KB-08 provenientes de medio LB, a una DO_{600nm} inicial de 0.05. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 30°C y 300 rpm.

2.4.2. Crecimiento y tolerancia a hidrocarburos

Los ensayos en frascos agitados se realizaron en botellas de 50 ml conteniendo 5 ml de medio E2 (Lageveen et al. 1988) suplementado con diferentes hidrocarburos (petróleo, kerosén, diesel, octano, naftaleno, ciclohexano, fenol, benceno, tolueno y xileno) a una DO_{600nm} inicial de 0.05. Los cultivos fueron incubados a 30°C y 300 rpm. Los ensayos de tolerancia fueron realizados en medio LB suplementado con los distintos hidrocarburos puros detallados anteriormente. El crecimiento y la tolerancia fueron analizados mediante la presencia de turbidez luego de un máximo de 7 días de incubación.

Según fuese el ensayo a realizar, se emplearon cultivos de KA-08, KA-mut y KB-08 en condiciones de acumulación y no acumulación de PHA como inóculos iniciales. En los cultivos pertenecientes a KA-mut se agregó 25 µg/ml de kanamicina.

2.4.3. Determinación de acumulación de PHA en función a la fuente de carbono

Los ensayos de determinación de acumulación de PHA se realizaron en frascos agitados en botellas de 100 ml conteniendo 10 ml de medio mínimo E2 (Lageveen et al. 1988) suplementado con las distintas fuentes de carbono detalladas de la tabla R.3, utilizando como inóculo inicial cultivos de KA-08 provenientes de medio LB. Los cultivos fueron incubados a 32°C y 300 rpm. La determinación de PHA se realizó mediante Tinción con Azul de Nilo (como se describe en 7.2.1 de esta sección) a partir de una muestra de 10 µl los cultivos crecidos.

2.4.4. Cuantificación de la producción de PHA

Para la cuantificación del polímero, se realizaron pre inóculos en condiciones de acumulación de PHA, los cuales se utilizaron para inocular botellas de 100 con 10 ml de medio E modificado (Vogel and Bonner 1956) suplementado con 0.25% m/v de octanoato de sodio (Sigma), incubándose durante 24 horas a 32°C y 300 rpm.

2.4.5. Curvas de Crecimiento

A fin de analizar el crecimiento de KA-08 y su mutante PHA⁻, se realizaron curvas de crecimiento en erlenmeyer de 1 L con 100 ml de medio E modificado (Vogel and Bonner 1956) suplementado con 0.25% m/v de octanoato de la sodio (Sigma) y, erlenmeyer de 1 L con 100 ml de medio LB. En ambos casos, se utilizó como inóculo inicial cultivos de KA-08 y KA-mut provenientes de medio LB, a una DO_{600nm} inicial de 0.05. Los cultivos se incubaron durante 30-35 horas a 30°C y 300 rpm. A tiempos regulares, se tomaron muestras de la fase acuosa para realizar el seguimiento del crecimiento bacteriano mediante la medición de la DO_{600nm} y la técnica de recuento en placa.

2.4.6. Degradación de hidrocarburos monoaromáticos

A fin de determinar la tasa de degradación de xileno por parte de KA-08 y KA-mut, se utilizaron pre cultivos desarrollados en condición de acumulación de PHA, con los cuales se inocularon botellas de 130 ml conteniendo 13 ml de medio E2 (Lageveen et al. 1988) suplementado con 0.02% (200 ppm) o 0.05% (430 ppm) de xileno, a una DO_{600nm} inicial de 0.075. Es importante aclarar que el inóculo inicial fue previamente cosechado por centrifugación y lavado dos veces con solución fisiológica para eliminar restos de nutrientes,

previo a ser inoculado. Las botellas fueron selladas con tapa de silicona y anillo de aluminio para evitar la evaporación del solvente. Los cultivos se incubaron durante 20 horas a 30°C y 300 rpm.

2.4.7. Producción de surfactantes

Para la medición de la tensión superficial, KA-08 y KB-08 fueron cultivadas en botellas de 500 ml con 50 ml de medio E2 (Lageveen et al. 1988) suplementado con glucosa 2% o xileno 1% como única fuente de carbono. En ambos casos, se utilizó como inóculo inicial cultivos de KA-08 y KB-08 provenientes de medio LB, a una DO_{600nm} inicial de 0.05. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 30°C y 300 rpm.

Para analizar la implicancia del PHA en la producción de estos compuestos, los cultivos se desarrollaron en botellas de 100 ml con 10 ml del medio E modificado (Vogel and Bonner 1956) suplementado con 0.25% m/v de octanoato de sodio (Sigma) o botellas de 100 ml con 10 ml del medio LB, utilizándose como inóculos iniciales cultivos provenientes de medio de acumulación y no acumulación de PHA, respectivamente. La DO_{600nm} inicial fue 0.05. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 30°C y 300 rpm. En los cultivos pertenecientes a KA-mut se agregó 25 µg/ml de kanamicina.

Los cultivos a partir de los cuales se realizó la extracción de surfactantes que posteriormente serían caracterizados por TLC, fueron desarrollados en botellas de 500 ml con 50 ml de medio E2 (Lageveen et al. 1988) suplementado con glucosa 2%. Se utilizaron como inóculos iniciales cultivos de provenientes de medio LB, a una DO_{600nm} inicial de 0.05. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 30°C y 300 rpm.

2.4.8. Ensayo MATH

El análisis de la adherencia microbiana a hidrocarburos se realizó en erlenmeyers de 100 mL con 10 mL del medio E modificado (Vogel and Bonner 1956) suplementado con 0.25% m/v de octanoato de sodio (Sigma) o botellas de 100 ml con 10 ml del medio LB, utilizándose como inóculos iniciales cultivos provenientes de medio de acumulación y no acumulación de PHA, respectivamente. La DO_{600nm} inicial fue 0.05. Los cultivos se incubaron durante 24 h a 32°C y 300 rpm. En los cultivos pertenecientes a KA-mut se agregó 25 µg/ml de kanamicina.

2.4.9. Extracción de membranas

Los cultivos a partir de los cuales se realizó la extracción de membranas se realizaron en erlenmeyers de 1 L con 100 mL del medio E modificado (Vogel and Bonner 1956) suplementado con 0.25% m/v de octanoato de sodio (Sigma) utilizándose como inóculos iniciales cultivos provenientes de medio de acumulación de PHA. La DO_{600nm} inicial fue 0.05. Los cultivos se incubaron durante 15-18 h a 32°C y 300 rpm. En los cultivos pertenecientes a KA-mut se agregó 25 µg/ml de kanamicina.

2.4.10. Biosorción de cobre

Para ensayar la capacidad de adsorber cobre en medio acuoso, se realizaron cultivos en 150 ml medio E modificado (Vogel and Bonner 1956) suplementado con 0.25% m/v de octanoato de sodio (Sigma), utilizándose como inóculos iniciales cultivos provenientes de medios de acumulación de PHA. La DO_{600nm} inicial fue 0.05. Los cultivos se incubaron durante 15-18 h a 32°C y 300 rpm. En los cultivos pertenecientes a KA-mut se agregó 25 µg/ml de kanamicina.

3. Técnicas de biología molecular

3.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos y programas empleados se muestran en las tablas M.2 y M.3., respectivamente.

Tabla M.2. Oligonucleótidos empleados en las distintas reacciones de PCR

Primers	Función/ubicación	Secuencia	Referencia
xyIA	Monooxigenasa de xileno (via TOL)	F- 5'-CCAGGTGGAATTTTCAGTGGTTGG-3' R- 5'-AATTAACCTCGAAGCGCCACCCCA-3'	Hendrickx et al. 2006
xyIE	Catecol extradiol diooxigenasa	F- 5'-CCGCCGACCTGATC(A/T)(C/G)CATG-3' R- 5'-TCAGGTCA(G/T)CACGGTCA(G/T)GA-3'	Hendrickx et al. 2006
todC1	Subunidad mayor de la diooxigenasa de	F- 5'-CAGTGCCGCCA(C/T)CGTGG(C/T)ATG-3' R- 5'-GCCACTTCCATG(C/T)CC(A/G)CCCCA-3'	Hendrickx et al. 2006

	aromaticos (via TOD)		
alkB	Monooxigenasa de n-alcanos	F- 5'-AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAYAA- 3' R- 5'-GCRTGRTGRTCNGARTGNCGYTG- 3'	Kloos et al. 2006
Fmut	Secuencia de gen hipotético rio arriba del gen <i>phaC1</i>	F- 5'-TGCACCCACCACAGCAACCG-3'	Este trabajo
RmutKm	Secuencia dentro del gen de kanamicina	R- 5'-CGCAGACCGTTCGGTGGCAA-3'	Este trabajo
hipo248up	Secuencia de gen hipotético rio arriba del gen <i>phaC1</i>	5'-TGTTACACYTGGGAVTACC-3'	Catone, 2013
C11536low	Secuencia gen <i>phaC1</i>	5'-CACCAGGAATCGGTGTGCTTG-3'	Catone, 2013
Z720up	Secuencia gen <i>phaZ</i>	5'-TGATCAACATGCGCMTGCT-3'	Catone, 2013
D526low	Secuencia gen <i>phaD</i>	5'-GCYACCAGCATCATSACTGRTA-3'	Catone, 2013
C1	Para la generación de KA-mut	CAGTGAAGGCGCGGTGGTGT	Este trabajo
C1rec	Para la generación de KA-mut	TCAGCTTGGGGGATCCCCAGCAGGGTCAGGGC GTTG	Este trabajo
C2rec	Para la generación de KA-mut	ACCCTGCTGGGGATCCCCAAGCTGAGCAGCGA CCC	Este trabajo
D1	Para la generación de KA-mut	ATCCCCACATCCCCCTCGCG	Este trabajo

Primers utilizados para ensayos de PCR cuyos resultados fueron negativos:

Primers	Función/ubicación	Secuencia	Referencia
tbmD	Subunidad mayor de la monooxigenasa de tolueno/benceno	F- 5'-GCCTGACCATGGATGC(C/G)TACTGG-3' R- 5'-CGCCAGAACCACTTGTC(A/G)(A/G)TCCA-3'	Hendrickx et al., 2006
tmoA	Subunidad mayor alfa de la monooxigenasa de tolueno	F- 5'-CGAAACCGGCTT(C/T)ACCAA(C/T)ATG-3' R- 5'-ACCGGGATATTT(C/T)TCTTC(C/G)AGCCA-3'	Hendrickx et al., 2006
bedC1	Subunidad alfa de la diooxigenasa de benceno	F- 5'- TCGTCGTGACACTACGTA-3' R- 5'-AATCTGATGCTTGCCATCATGG-3'	Wang et al., 2008
rhIA	<i>Primers</i> degenerado	F- 5'-ACSAAGGACGACGARGTG-3' R- 3'-YTCCAGSTRSAGSAARTGSCC-3'	Este trabajo
rhIB	<i>Primers</i> degenerados	F- 5'-GCSATCGGSTCGGCSGGBGAC-3' R- 5'-TGYGCMGAMARCARSSTSGAYGG-3'	Este trabajo

Tabla M. 3. Detalle de los programas utilizado para las distintas amplificaciones por PCR.

Producto	Desnaturalización (94°C)	Annealing	Extensión (72°)
<i>alkB</i>	30 seg.	55°C, 30 seg	60 seg.
<i>xylA</i>			
KA-08	45 seg.	64°C, 30 seg.	60 seg.
KB-08	45 seg.	60°C, 30 seg.	60 seg.
<i>xylE</i>	45 seg.	64°C, 30 seg.	60 seg.
<i>todC1</i>	45 seg.	64°C, 30 seg.	60 seg.
Amplificación de los genes <i>pha</i> , KA-08	60 seg.	50°-60°C, 30 seg.	60 seg.
Construcción KA-mut			
PCR1	45 seg.	63°C, 30 seg.	60 seg.
PCR2	45 seg.	62°C, 30 seg.	60 seg.
PCR3	45 seg.	62°C, 30 seg	1 min, 30 seg.
Verificación KA-mut	45 seg.	57°C, 30 seg.	60 seg.

Los genes involucrados en la degradación de hidrocarburos monoaromáticos seleccionados para el análisis por amplificación por PCR se detallan en la figura M.1

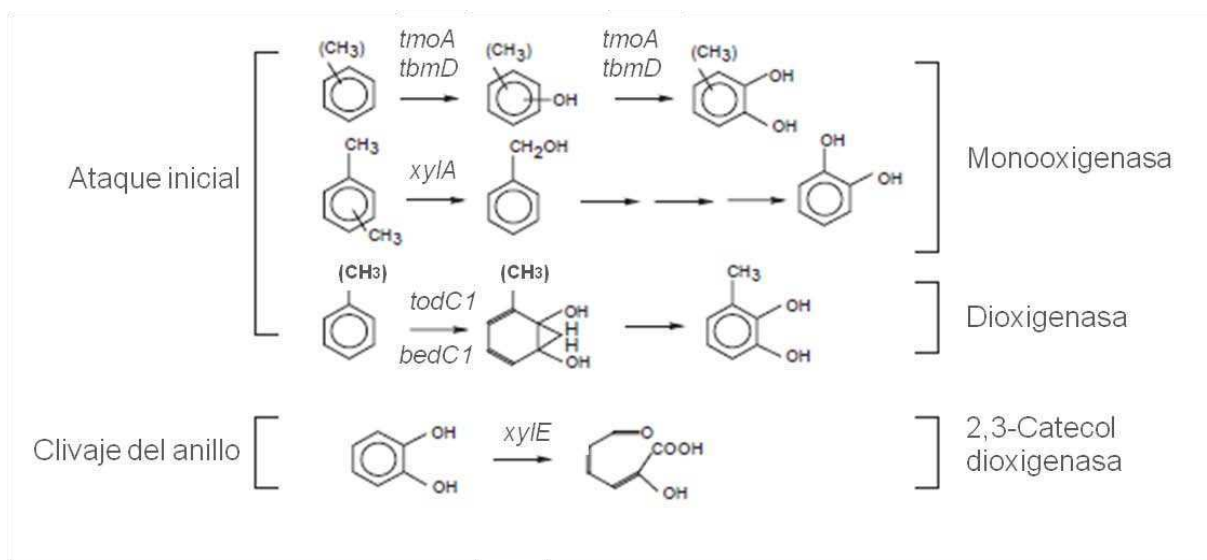


Figura M.1. Representación esquemática del catabolismo de los BTEX por las enzimas analizadas mediante los sets de *primers* utilizados en este trabajo, modificado a partir de (Hendrickx et al. 2006).

3.2. Extracción de DNA plasmídico

La extracción se realizó a partir de 1,5 ml de cultivo bacterianos, incubados *overnight* en LB (con el antibiótico correspondiente adicionado), centrifugados a 12000 rpm durante 1 minuto. A partir del precipitado (*pellet*) obtenido, se extrajeron los plásmidos utilizando un kit de extracción plasmídica mini-PREP (*BIONEER*[®]) siguiendo especificaciones del fabricante. Alternativamente se realizó una extracción plasmídica con precipitación con etanol tal como se describe a continuación:

Sobre el precipitado celular se agregaron 100 µL del Buffer 1. Las células se resuspendieron completamente por agitación con vortex. Posteriormente se agregaron 150 µL del Buffer 2 y se mezcló por inversión hasta obtener una solución transparente. Luego se agregaron 200 µl del Buffer 3 y se mezcló cuidadosamente por inversión tres veces. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm. Se transfirió el sobrenadante con micropipeta a un tubo eppendorf limpio y se descartó el *pellet*.

A continuación se agregaron al sobrenadante 400 µl de isopropanol. Se centrifugó el tubo durante 10 minutos a 12000 rpm. Luego se descartó el sobrenadante y se agregaron sobre el precipitado 200 µl de etanol 100% v/v. Se mezcló por inversión suavemente.

Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm, se descartó el sobrenadante, y sobre el precipitado se agregaron 200 µl de etanol 70% v/v. Se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se secó el pellet a temperatura ambiente hasta eliminar por completo el etanol. Finalmente se resuspendió el precipitado en 50 µl de agua miliq estéril.

Buffers empleados para la extracción de DNA plasmídico:

- Buffer 1: 50 mM Tris-HCl, pH=8, 10 mM EDTA. Debe agregarse RNAsa en el momento de usar.
- Buffer 2: 200 mM NaOH, 1% SDS. Para 1 ml de Buffer 2, agregar los componentes en el orden especificado: 1°) 400 µl H₂O, 2°) 100 µl SDS 1%, y 3°) 500 µl NaOH 200mM.
- Buffer 3: Acetato de sodio o potasio 3M, pH=5.5

3.3. Digestión con enzimas de restricción

La digestión con enzimas de restricción (marca New England Biolabs o Promega) se realizó siguiendo protocolos estándares (Sambrook et al. 1988) y las instrucciones de los fabricantes.

3.4. Purificación de DNA

Para la purificación de fragmentos a ser clonados o secuenciados se utilizó un kit comercial GenCatch Advanced Gel Extraction kit de Epoch, según especificaciones del fabricante.

3.5. Reacciones de ligado

El sistema pGEMT-easy (Promega) se empleó para el clonado directo de fragmentos de PCR, realizado según las instrucciones del fabricante. La reacción se llevó a cabo por un periodo de 16 a 18 h a 4°C.

Para el clonado de fragmentos que no provenían de PCR, se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de Promega, siguiendo las especificaciones del fabricante. La relación DNA inserto/DNA vector fue de 3:1 o 1:1 según las concentraciones obtenidas. La reacción se llevó a cabo por un periodo de 16 a 18 h a 4°C.

3.6. Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización y la posterior purificación de fragmentos de DNA obtenidos de reacciones de PCR o ensayos de restricción enzimática con rangos de tamaño de 3000 a 500 pb se utilizó una concentración de agarosa de 0,8 a 1 % en buffer TAE. Para la separación de fragmentos menores de 500 pb se aumentó el porcentaje de agarosa utilizado para facilitar su visualización. Las electroforesis se realizaron utilizando buffer TAE a 100 volts en cubas de Sigma (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA). Como marcadores de peso molecular se utilizaron el DNA del fago λ digerido con HindIII (NEB), y el marcador de peso molecular 1 kb de Promega.

Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante 15 min. El DNA se visualizó con un transiluminador de luz UV y los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak Digital Science CD120.

3.7. Cuantificación de DNA en geles de agarosa

El DNA presente en los geles de agarosa se cuantificó utilizando el analizador digital 1D Image Analysis Software (Kodak Digital Science), utilizando como patrón 100 ng de λ HindIII o utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) con su correspondiente *softward*.

3.8. Obtención de *E. coli* competentes

Para llevar adelante la transformación de *E. coli* primeramente se obtuvieron células competentes usando el siguiente protocolo:

- Se incubo 2 ml de cultivo *o.n.* a 37 °C en PSIB o LBMg.
- A partir del cultivo, tomar 0,5 ml e inocularlo en 50 ml en PSIB o LBMg, incubando a 37 °C 2 o 3 horas hasta $DO=0,6$.
- Luego, incubar el cultivo durante 5 minutos a 4°C.
- Centrifugar el cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C
- El *pellet* resultante resuspenderlo en 16 ml de TFBII a 4°C.
- Luego, incubarlo 5 minutos 4°C.
- Centrifugar el cultivo a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- El *pellet* resultante resuspenderlo en 2 ml de TFBII 4°C.
- Incubar por última vez durante 10 minutos 4°C.
- Finalmente, alicuotar 100 μl de células en tubos Eppendorf de 1,5 ml y guardar a -80°C.

La composición del medio así como los buffers empleados se encuentra detallada en el anexo al final de esta sección.

3.9. Transformación de *E. coli*

Para la transformación de *E. coli* se empleó el protocolo descrito a continuación:

- Se tomó un tubo con 100 μ l de *E. coli* competentes en hielo, y se le agregó el DNA.
- Se incubó en hielo 30 minutos.
- Luego, se lo incubó a 42°C 1 minuto.
- Rápidamente se pasó a hielo (shock térmico).
- Luego se incubó en hielo 5 minutos.
- Finalmente. Se agregó 0,5 ml de solución SOB y se incubó 1 hora en baño a 37°C.

Luego se siembra en placa en el medio adecuado según el caso.

4. Análisis bioinformáticos

4.1. Análisis filogenético

A partir de estudios realizados anteriormente (Di Martino et al. 2012), se obtuvieron las secuencias nucleotídicas parciales del gen rRNA 16S de los aislamientos KA-08 y KB-08, las cuales fueron depositadas en el *EMBL Nucleotide Sequence Database*, bajo el No. de Acceso: FN421340 y FN421341. Las relaciones filogenéticas se analizaron a partir de la construcción de un árbol con el software MEGA 4.0 (Tamura et al. 2007).

La amplificación por PCR del gen de la alcano monooxigenasa *alkB*, se realizó utilizando los *primers* degenerados AlkB-1F y AlkB-1R diseñados por Kloos et al. (2006). El fragmento obtenido se secuenció (Macrogen Inc., Corea), y analizó utilizando la herramienta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul et al. 1997). La misma fue depositada en el *EMBL Nucleotide Sequence Database*, bajo el No. de Acceso: FR745429. Las relaciones

filogenéticas se analizaron a partir de la construcción de un árbol con el software MEGA 3 (Kumar et al. 2004).

En ambos casos, se utilizó el método del vecino más cercano (*Neighbor Joining-NJ*). La validez de las relaciones filogenéticas representadas en los árboles obtenidos fue analizada estadísticamente utilizando el método del *Bootstrap* con 1000 repeticiones.

4.2. Análisis *in silico* del genoma de *P. extremaustralis*

La secuencia completa del genoma de *P. extremaustralis* se obtuvo a través del servicio de pirosecuenciación del Instituto de Agrobiotecnología de Rosario (INDEAR). El genoma fue anotado siguiendo los procedimientos para anotación de genomas procariotas incluidos en el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology). Las secuencias se analizaron utilizando el servidor SeedViewer (<http://rast.nmpdr.org/seedviewer.cgi>), incluido en el RAST, que cuenta con herramientas, como BLAST, para realizar búsquedas dentro del genoma. Con estas herramientas se analizó la presencia de los genes relacionados con el metabolismo de hidrocarburos, alcanos y monoaromáticos. Cada secuencia obtenida fue analizada (como secuencia aminoacídica deducida de la nucleotídica) utilizando el programa BLAST protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), y de cada comparación se eligieron las secuencias con mayor *score*. Luego empleando el programa CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) se determinaron los porcentajes de identidad (tomando en cuenta los aminoácidos idénticos entre ambas secuencias).

4.3. Análisis del *cluster phaC1ZC2D*

Se realizó la búsqueda de los genes responsables de la producción de PHAcM (polihidroxicanoatos de cadena media) en KA-08 mediante PCR. Los *primers* utilizados (Tabla M.2) fueron diseñados en base a regiones conservadas de las secuencias de los genes de PHAcM de varias especies de *Pseudomonas* disponibles en banco de datos. Los productos amplificados fueron secuenciados por Macrogen Inc. (Corea). Las secuencias

fueron alineadas, ensambladas y analizadas utilizando los siguientes programas disponibles *on line*: BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), CAP3 sequence assembly program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>), y el ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>). La misma fue depositada en el *EMBL Nucleotide Sequence Database*, bajo el No. de Acceso: FR691074.

5. Construcción de KA-mut

La mutante PHA⁻ de KA-08, KA-mut, se realizó utilizando la técnica de delección por PCR (PCR-crossover deletion) que consta de dos pasos (Link et al., 1997) (Figura M.2). En un primer paso, se realizaron dos reacciones de PCR independientes utilizando como templado el DNA cromosómico de KA-08 y dos pares de *primers*: C1 y C1Rec para amplificar un fragmento de 404 pb del gen *phaC1* (PCR1), y los *primers* C2Rec y D1 para amplificar un fragmento de 719 pb de los genes *phaC2D* (PCR2) (Tabla M.2). Para obtener estos fragmentos se llevaron a cabo reacciones de PCR siguiendo el programa referido en la tabla M.3. Estos fragmentos se purificaron y se emplearon como templado para el segundo paso, en la que se utilizaron los *primers* C1 y D1 en una reacción de PCR (PCR 3). En este paso los templados se superponen gracias a la región complementaria de los *primers* generando entonces un fragmento único como producto. Se obtuvo un fragmento de 1200 pb que posee el sitio de restricción BamHI. El fragmento fue clonado empleando el sistema pGEMT-Easy (Promega), en las cepas *E coli* TopTen (Invitrogen). Una vez obtenidos los clones con el fragmento deseado, se extrajo el mismo y se digirió con BamHI. Además se obtuvo un cassette de Kanamicina (Km) fragmento BamHI/BamHI del plásmido pUCK4. El gen de resistencia a kanamicina fue clonado en el sitio BamHI generado en el amplicón de la PCR 3. Luego, la construcción fue subclonada en el vector pEX18Tc obteniéndose el vector pEXΔ*phaC1ZC2*. Esta construcción fue transferida a KA-08 mediante conjugación utilizando a *E. coli* S17-1 λ*pir*. Las cepas transconjugantes fueron seleccionadas mediante la siembra en medio agar LB suplementado con Km y 5% de sacarosa. Las colonias Km^R que perdieron el plásmido fueron seleccionadas en placas de agar LB conteniendo sacarosa. Las colonias Km^R-Sac^R fueron crecidas en medio E suplementado con 0.25% de octanoato de sodio para

ser testeadas en su capacidad de acumulación de PHA. Se seleccionaron los clones incapaces de acumular PHA.

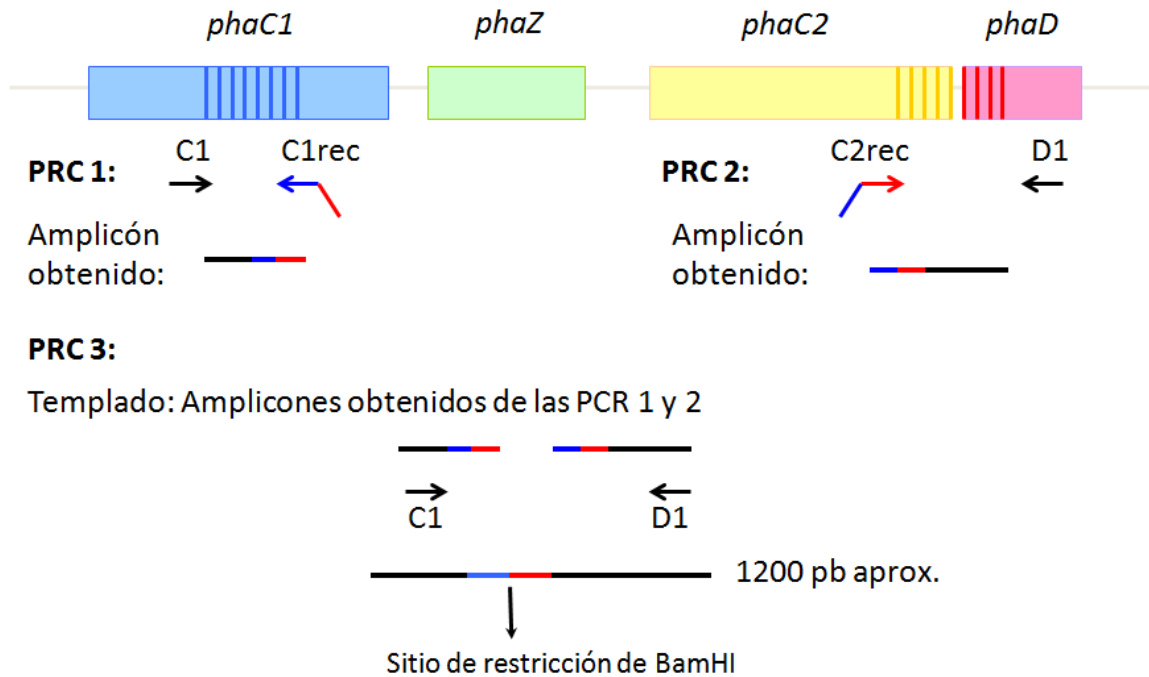


Figura M.2. Esquema del protocolo de mutación por delección por PCR para los genes del *cluster pha*.

6. Determinaciones analíticas

6.1. Análisis de la formación de biofilms

Se procedió a evaluar la adherencia luego de 7 días de crecimiento, utilizando la técnica de tinción con cristal violeta. Brevemente, se tomó el sobrenadante de cada pocillo para determinar la DO_{600nm} de las células planctónicas (APL), luego se agregaron 200 μ l de Cristal violeta (0,1% en etanol 70%) a cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los pocillos se lavaron suavemente con agua destilada para retirar el cristal violeta

remanente, se agregaron 200 μ l de etanol absoluto y se incubó por 20 minutos hasta la solubilización del colorante. Luego se tomó el volumen completo y se lo trasladó a una placa de fondo plano y se midió la absorbancia a 550 nm en el lector de Elisa Tasoh Corp MPR Ai4 utilizando un filtro I 550/700 (ACV). Se determinó el índice de adherencia como la relación ACV/APL.

6.2. Análisis de la producción de polihidroxialcanoatos

6.2.1. Tinción con Azul del Nilo

La presencia de gránulos de PHA fue determinada cualitativamente mediante tinción con el colorante Azul del Nilo y la posterior observación al microscopio de fluorescencia (Ostle and Holt 1982).

Se colocaron 10 μ l de una muestra líquida, sobre la superficie de un portaobjetos. Se dejó secar y se fijó las muestras mediante calor. La tinción de los extendidos de células se realizó en un jarrito “*coplin*”. El colorante se precalentó a 55°C para luego sumergir los extendidos de los cultivos en el colorante durante 10 min. Se lavó con agua y se eliminó el exceso de colorante mediante el lavado con ácido acético 8% durante un minuto. Se dejó secar y se observó al microscopio bajo una longitud de onda de 460 nm. En estas condiciones, los gránulos del polímero fluorescen de color naranja.

6.2.2. Cuantificación de la producción de PHA

- Preparación de las muestras

Los cultivos se realizaron como se describe en 2.4.4. Luego de verificar la producción de PHA mediante tinción con Azul del Nilo se cosecharon las células por centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos. Los *pellets* de las muestras a analizar fueron sometidos a liofilización.

- Metanólisis

Los *pellets* liofilizados fueron pesados en una balanza de precisión Mettler y se transfirieron aproximadamente 4 mg de cada uno a tubos Pirex.

Para el proceso de metanólisis, se agregó 1 ml de ácido sulfúrico 15% (v/v) en metanol y 1 ml de cloroformo. La mezcla se incubó durante 140 minutos a 100°C en baño de glicerina. Transcurrido el tiempo de incubación se retiraron los tubos del baño y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Luego se agregaron 0.5 ml de agua destilada y se mezcló vigorosamente por 20 segundos y dejando reposar para obtener la separación de fases. Se transfirió la fase orgánica a un tubo de vidrio limpio. Para eliminar los restos de agua que pudieran quedar en la fase orgánica, se agregó una punta de espátula de CaCl₂. Una pequeña fracción fue nuevamente transferida a un vial de vidrio limpio para su análisis por cromatografía.

- Análisis por cromatografía gaseosa

Los productos de la metanólisis fueron analizadas utilizando una columna de 30 m de longitud, ID: 0,35 mm y 0.50 µm de espesor de film. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: detector FID 250°C, inyector split 30°C. Se inyectó 1 µl. El programa de temperaturas fue: T inicial 80°C durante 9 minutos, 70°C/min hasta 220°C, mantenidos durante 5 minutos. La cuantificación se realizó por comparación de las áreas de los picos obtenidos en las muestras con la solución patrón de PHA.

6.3. Ensayos de degradación de hidrocarburos

6.3.1. Extracción de hidrocarburos complejos y análisis por cromatografía gaseosa

El análisis de degradación del diesel y kerosén remanentes fue realizado mediante la técnica EPA 8015M modificada (US EPA 2001). Brevemente, una unidad experimental^{7/88} fue acidificada a pH=2 y luego extraída con n-hexano 20% v/v. Se utilizó 2-Fluorobifenilo como estándar interno. La fase orgánica fue recolectada y deshidratada mediante su pasaje por una columna con sulfato de sodio anhidro. Las muestras fueron analizadas mediante GC/MS utilizando un cromatógrafo Shimadzu GC-17A acoplado a un detector espectrométrico de masas Shimadzu GCMS-QP5050A. Las muestras fueron analizadas por separación isotérmica en columna Tracsil TBR-1 de 60 m de longitud, de 0,5 micrones de espesor de

film y 0,32 mm de diámetro (Teknkroma S. Corp. C. Ltda). Como gas transportador se empleó nitrógeno a un flujo de 0.7 ml/min. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: temperatura de inyector 250 °C, temperatura interface-detector 280°C. Rampa de temperaturas de la columna: 10 minutos a 60°C: rampa de 5°C/min hasta 155°C; 155°C 1 minuto; rampa 10°C/minuto hasta 250°C; 148°C 50 min. El porcentaje de hidrocarburo residual se calculó comparando el área de los picos obtenidos en el GC de los cultivos con los de los controles sin inocular.

* Unidad experimental en condición de biofilms: 8 pocillos de la placa multipocillos.

**Unidad experimental en la condición de frascos agitados: 1 botella sellada.

Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.3.2. Análisis de la degradación de hidrocarburos monoaromáticos por Head Space-GC

Los compuestos monoaromáticos residuales presentes en los cultivos celulares realizados como se describen en 2.4.6 se analizaron según el método EPA SW 846 M 8015B/C/D CG-FID mediante inyección automática por la empresa “C & D Laboratorio S.R.L”, de La Plata.

Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.4. Análisis de la producción de biosurfactantes

6.4.1. Tensión superficial

En el caso de *P. extremaustralis*, se recolectó un pool de 30 pocillos para la condición de biofilms. En las condiciones de frascos agitados, tanto para *P. extremaustralis* como para KA-08 y KA-mut, se tomaron 5 ml de la fase acuosa. Las muestras recolectadas fueron centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm para obtener los sobrenadantes libres de células. La tensión superficial de estos sobrenadantes fue determinada mediante la utilización de un tensiómetro de Du Nouy (Cenco DuNOUy 70545).

Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.4.2. Actividad Emulsificante

La actividad emulsificante fue analizada según (Cooper and Goldenberg 1987). Brevemente, 5 ml de hexano fueron añadidos a 5 ml de un sobrenadante libre de células y luego agitado con vortex durante 2 minutos. Se dejó reposar la mezcla durante 24 horas (EA24) antes de su medición. La actividad emulsificante fue definida como la altura de la capa emulsionada sobre la altura total, expresada en porcentaje.

Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.4.3. Extracción de surfactantes

El sobrenadante libre células de los diferentes cultivos detallados en 2.4.7, fue acidificado a pH 2.0 con 6 M HCl durante 24 horas a 4°C. Se agregaron 30 ml de Acetato de etilo y se agitó vigorosamente durante 5 minutos. La fase orgánica se extrajo con pipeta de vidrio y se deshidrató mediante el pasaje de dicha fase por una pipeta pasteur que presentaba 1 cm de Na₂SO₄. El solvente orgánico fue evaporado al vacío en ROTAVAPOR BÜCHI RE 111 (Büchi 461 Water Bath) a 45°C durante el tiempo necesario. El extracto crudo fue utilizado para análisis posteriores.

6.4.4. Cromatografía en capa delgada, TLC

El extracto crudo fue disuelto en solvente de corrida. Se sembró 30 µl de cada muestra en placas de silica gel TLC Silica gel 60/ Kieselguhr F254 (MERCK) dejando una distancia al borde inferior de 1,5 cm aproximadamente. Como fase móvil se utilizó cloroformo: metanol: agua (70: 10: 0.5). La mezcla de solventes se introdujo en la cámara una hora antes del desarrollo, para permitir la saturación de la atmósfera.

Revelado de los cromatogramas:

- Para la visualización de lípidos en general se utilizó una atmósfera de iodo.
- Para detectar carbohidratos se utilizó Antrona (Yin et al., 2009).
- Para detectar grupos amino y amino azúcares se utilizó Ninhidrina 0.5% en acetona

6.4.5. Placas CTAB

La naturaleza aniónica de los surfactantes producidos fue determinado mediante la siembra de 10 µl de cultivos bacterianos realizados en medio LB (con el agregado de antibiótico de ser necesario), en placas de azul de metileno CTAB según Siegmund et al. (1991).

6.5. Análisis de la superficie celular

6.5.1. Afinidad celular a un hidrocarburo (test de MATH)

El estudio de la adherencia bacteriana a hidrocarburos fue utilizado como una medida de la hidrofobicidad de la superficie celular, de acuerdo a Rosenberg et al. (1980). Las células provenientes de cultivos realizados según se describe en 2.4.8 fueron cosechadas por centrifugación, lavadas con agua destilada estéril y finalmente resuspendidas en *buffer* PUM (ver anexo). A continuación se midió la OD_{600nm} y se procedió a ajustarla a OD_{600nm}=1. Se agregaron 0,2 ml de xileno a las suspensiones celulares y se dejó reposar durante 10 minutos a 30°C. Luego de esto, la mezcla fue agitada fuertemente mediante un vortex durante 2 minutos y posteriormente se dejó en reposo por 15 minutos para permitir una correcta separación entre las fases.

La fase acuosa fue tomada cuidadosamente y se midió su OD_{600nm}. El porcentaje de adhesión a la fase hidrófoba se calculó como:

$$[(1-OD_{600nm} \text{ después de la mezcla}) / OD_{600nm} \text{ antes de la mezcla}] \times 100$$

Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.5.2. Purificación de membranas celulares.

Los cultivos detallados en 2.4.9, se centrifugaron a 4000 rpm a 4°C durante 20 minutos y el *pellet* resultante se resuspendió en 15 ml de *buffer* de lisis (Tris-HCl 50mM pH=8; 1 mM PMSF). A continuación, se sonicó durante 60 segundos en intervalos de 20 segundos. Para eliminar las células que no se hubiesen lisado, se centrifugó el producto de sonicación

durante 20 minutos a 4000 rpm a 4°C. El sobrenadante se colocó sobre una colchón de sacarosa 10 o 50% p/v (en Tris-HCl 20 mM pH=8) y se centrifugó a 22000 rpm a 4°C durante 2 horas. El colchón de sacarosa 50% p/v permite separar los gránulos de PHA, el citoplasma celular y las membranas celulares tal como se ve en el esquema representado en la figura M.3.

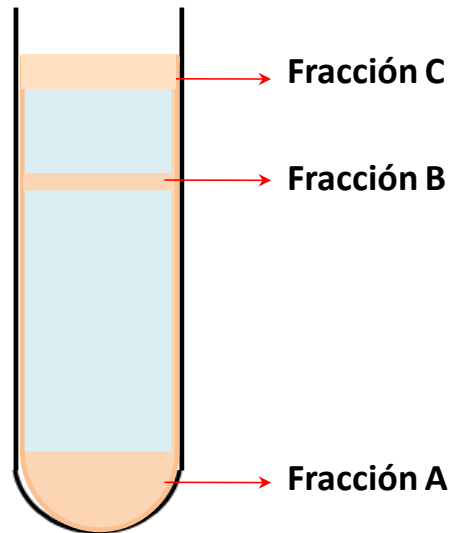


Figura M.3. Esquema de las fracciones resultantes luego de la centrifugación a 22000 rpm durante 2 horas. Fracción A: membranas celulares, fracción B: PHA y fracción C: citoplasma.

Las fracciones A y B se colectaron individualmente. La fracción B se diluyó con *buffer* Tris-HCl 20 mM (pH=8) y se centrifugó nuevamente a 22000 rpm a 4°C durante 2 horas. Todos los *pellets* producto de las distintas centrifugaciones, se resuspendieron en 200 μ l de *buffer* Tris-HCl 50 mM (pH=8). Se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

6.5.3. Cuantificación de proteínas mediante el Método de Bradford.

La determinación de las proteínas totales presentes en las muestras de membrana celular se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976).

La curva de calibración se realizó utilizando albúmina sérica bovina, abarcando un rango de 2 μ g-20 μ g.

6.5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Las proteínas de membrana celular se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 12% (T%). Los extractos se calentaron durante 1 minuto a 100°C con *buffer* de siembra (*craking buffer*). Se sembraron aproximadamente 30 µg de proteínas de cada muestra. Para estimar el peso molecular se sembraron además 8 µl de marcador de peso molecular (PageRuler™).

La composición del gel de acrilamida y los *buffers* usados para su preparación se muestra en la tabla M. 4.

Tabla M.4. Composición del gel de acrilamida.

Gel separador 12%	
Buffer separador	10,4 ml
Acrilamida 30%	16 ml
Agua deionizada	13,4 ml
APS 10%	250 µl
Temed	30 µl
Gel concentrador 4,5%	
Buffer concentrador	3,9 ml
Acrilamida 30%	1,95 ml
Agua deionizada	9,15 ml
APS 10%	200 µl
Temed	25 µl

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente a 30mA constantes hasta que las muestras ingresaron al gel separador, y luego se disminuyó a 12 mA constantes, en una cuba electroforética PROTEAN II, BIO-RAD. Para el revelado de las proteínas, se tiñó el gel con una solución 0,2% de Coomassie Brilliant Blue R-250 en 45% de metanol, 10% ácido acético. Para ello, se sumergió el gel en esta solución durante 1 hora. Luego, para remover el colorante en exceso, se dejó durante toda la noche en una solución de metanol 45%, ácido acético 10%.

6.5.5. Identificación de las proteínas de membrana por MALDI-TOF-TOF

Para la identificación de las proteínas de interés se realizó un gel de poliacrilamida 12% tal como se detalla previamente, teniendo los recaudos necesarios para evitar la contaminación con queratina. Previo a la tinción, el gel se dejó inmerso en una solución fijadora de etanol 30%, ácido fosfórico 2% durante toda la noche. Pasado este tiempo se realizaron tres lavados de 30 minutos con agua deionizada y luego se dejó sumergido durante una hora en agitación en la solución de tinción (metanol 18%, sulfato de amonio 17%, ácido fosfórico 2%). A continuación, se agregaron 0,5g/L de Coomassie Blue G-250 y se agitó suavemente durante un día. Las bandas de interés se cortaron con un bisturí y se colocaron en *eppendorfs* limpios y estériles.

Las muestras se analizaron en el CEQUIBIEM (FCEN-UBA) mediante un espectrómetro MALDI-TOF-TOF Ultraflex II (Bruker) y luego se analizaron mediante el programa bioinformático MASCOT.

6.6. Ensayos realizados con cobre

6.6.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de CuSO_4 .

Para estimar la MIC se ensayaron los medios LB, LB 0.5X suplementados con concentraciones crecientes de CuSO_4 (0,3mM-5mM), inoculados a partir de un pre cultivo desarrollado en medio LB a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.05. Se incubaron durante 48 horas a 30°C y se observó la presencia de turbidez. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.6.2. Ensayo de biosorción.

Los cultivos detallados en 2.4.10, se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos y el *pellet* resultante se resuspendió en agua MilliQ. El peso seco de biomasa, se estimó por duplicado a partir de 5 ml de esta suspensión mediante la balanza de precisión Metler.

Para la preparación de las mezclas de la suspensión bacteriana con cobre se siguieron los volúmenes que se detallan en la tabla M.5. Estas mezclas se incubaron durante 24 horas con agitación constante (300rpm) a 30°C. Transcurrido este tiempo, 1 ml de la suspensión se centrifugó a 13000 rpm durante 2 minutos para decantar las células. Las concentraciones de cobre remanente en el sobrenadante se calcularon mediante la técnica colorimétrica del ácido bicinconínico (BCA) (Brenner 1995).

Tabla M.5. Volúmenes utilizados en el ensayo de biosorción de Cu (II).

Concentración mM Cu(II)	Susp. Bact. (ml)	Buffer MES (ml)	H ₂ O MilliQ (ml)
0	5	0,075	A volumen final 10 ml.
0.25	5	0,075	
0.5	5	0,075	
0,75	5	0,075	
1	5	0,075	
1,5	5	0,075	
2	5	0,075	

A continuación, se graficaron q /Concentración final de cobre (Cu_{eq}) vs Cu_{eq} y $\ln(q)$ vs $\ln(Cu_{eq})$ para determinar si los patrones de biosorción se ajustaban a los modelos de isoterma Langmuir o Freundlich, respectivamente.

Anexo medios y buffers

Medio Lysogeny Broth (LB)

Extracto de levadura.....	5 g/L
Triptona.....	10g/lL
NaCl.....	5g/L st
Agar (para el medio sólido).....	15 g/L
H ₂ O destilada c.s.p.....	1 L

Medio E (modificado)

Acido cítrico.....	2 g/L
K ₂ HPO ₄ anhidro.....	10 g/L
NaH ₂ NH ₄ PO ₄ .4 H ₂ O.....	3,5 g/L
H ₂ O destilada c.s.p.....	1 L

Suplementado con 1% de microelementos MT y 1 mM MgSO₄.7H₂O

Medio E2

NaNH ₅ PO ₄ . 4 H ₂ O.....	3,5 g/L
K ₂ HPO ₄ anhidro.....	5,7 g/L
KH ₂ PO ₄	3,7 g/L
H ₂ O destilada c.s.p.....	1 L

Suplementado con 1% de microelementos MT y 1 mM MgSO₄.7H₂O

Solución SOB

Triptona..... 20 g/L

Extracto de levadura.....0,5 g/L

NaCl.....0,5 g/L

H₂O destilada c.s.p.....1 L

Una vez esterilizado por autoclave, agregar en frío:

MgCl₂ 1M.....10 ml

MgSO₄ 1M.....10 ml

PSIB

Extracto de levadura.....5 g/L

Triptona..... 20 g/L

MgSO₄.....5 g/L

H₂O destilada c.s.p.....1 L

TFBI (pH 5,8)

Acetato de K.....30 mM pH=5.5

KCl.....100 mM

CaCl₂.....10 mM

MnCl₂.....50 mM

Glicerol.....15 %

TFBII (pH 6,5)

MOPS (o PIPES).....10 mM pH=7

CaCl₂.....75 mM

KCl.....10 mM

Glicerol.....15 %

Buffer PUM

K₂HPO₄·3H₂O.....22,2 g/L

KH₂PO₄.....7,26 g/L

Urea.....1,8 g/L

MgSO₄·7H₂O.....0,2 g/L

H₂O destilada c.s.p.....1 L

Buffer de siembra para SDS PAGE (4x, para 10 ml)

Tris 0.25 M pH= 6.8.....5 ml

SDS.....0.6 g

Sacarosa.....4 g

Azul de bromofenol.....0.004 g

2-mercaptoetanol.....2 ml

Buffer de corrida electroforética 1x (*Running*) pH=8.3 para SDS PAGE

Tris.....25 mM

Glicerina.....192 mM

SDS.....0.1%

TAE 50X (por litro)

Tris base.....242 g

Acido acético glacial..... 57,1 ml

EDTA 0,5 M pH 8,0.....100 ml

Buffer MES

Se utilizó 1M pH=5.5

$C_6H_{13}NO_4S$ PM: 195.2

Colorante Azul del Nilo (AnedraR)

El colorante se utilizó al 1%. (p/v) en agua destilada

$C_{20}H_{21}N_3O_5S$ PM: 415.47

Resultados

1. Análisis filogenético de *Pseudomonas* sp. KA-08 y *Pseudomonas* sp. KB-08

El trabajo de esta Tesis está basado en el estudio de tres aislamientos obtenidos del ambiente: *P. extremaustralis*, *Pseudomonas* sp. KA-08 (KA-08) y *Pseudomonas* sp. KB-08 (KB-08). Mientras que *P. extremaustralis* fue seleccionada por su capacidad de crecer en ambientes extremos, KA-08 y KB-08 fueron seleccionadas por su crecimiento en altas concentraciones de hidrocarburos complejos. Otra característica relevante en el momento de su elección fue que las tres cepas eran capaces de sintetizar el polímero PHA.

Debido a que *P. extremaustralis* ha sido previamente caracterizada como nueva especie, se decidió realizar un análisis filogenético de las cepas KA-08 y KB-08, con el fin de profundizar la caracterización de todos los aislamientos que fueron estudiados en este trabajo.

Se realizó el análisis filogenético de las cepas KA-08 y KB-08 basándose en la secuencia completa del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S. Para dicho análisis se utilizaron las secuencias de distintas especies de *Pseudomonas* entre las cuales se seleccionaron especies tipo y cepas de *P. putida* aisladas de sitios contaminados con hidrocarburos. Los estudios filogenéticos indican que estarían cercanamente relacionadas al grupo de *Pseudomonas putida*. La secuencia con mayor identidad nucleotídica fue del 100% para KA-08 y 99% para KB-08, con las cepas *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp.PD1, respectivamente.

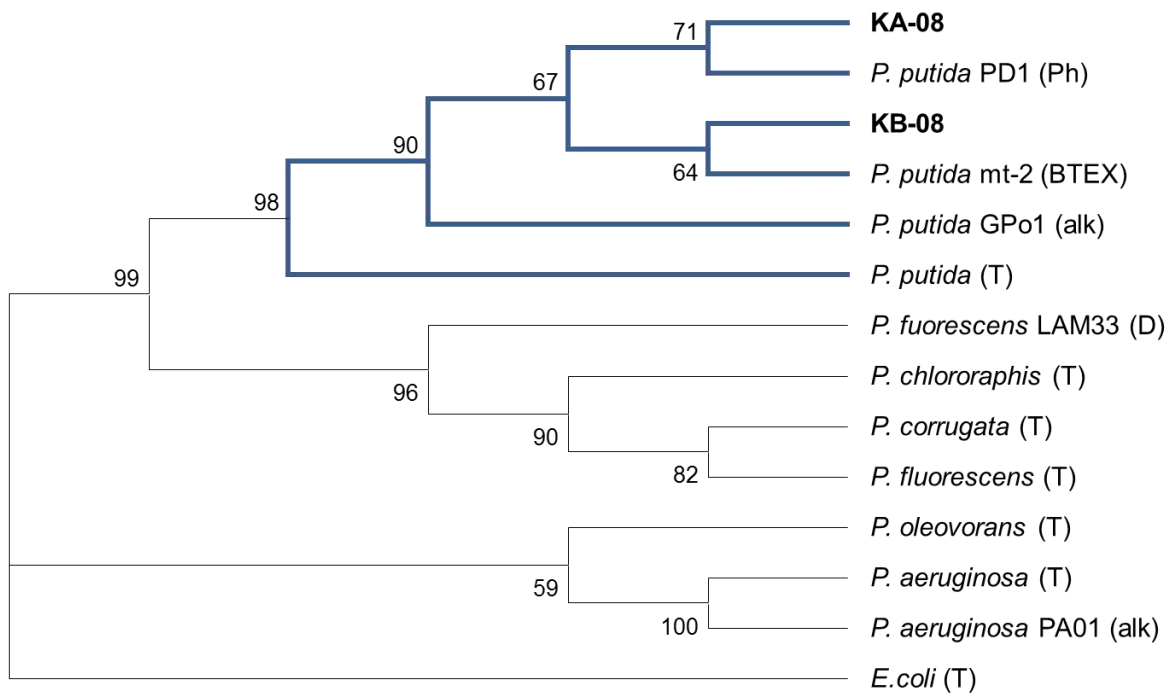


Figura R.1. Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S utilizando el método *Neighbor-joining*. Los valores de *bootstrap* (%) están indicados en los nodos. La cepa *E. coli* (número de acceso: X80725) fue utilizada como grupo externo. (T): Cepa tipo, (Ph): fenol, (BTEX): BTEX, (D): diesel, (*alk*): alcanos. Se resalta el *cluster* correspondiente a *Pseudomonas putida*.

La cercanía filogenética observada en KA-08 y KB-08 con varias *Pseudomonas* degradadoras de hidrocarburos (Figura R.1), estaría en concordancia con estudios previos (Di Martino et al. 2012) que demostraron la capacidad que presentaron ambos aislamientos en crecer en hidrocarburos complejos como única fuente de carbono.

2. Búsqueda de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos

En las cepas ensayadas se analizaron los genes responsables de las vías de degradación de distintos hidrocarburos presentes como alcanos y BTEX en el diesel y/o kerosene.

2.1. Alcanos

En trabajos anteriores (Di Martino 2010) se enfrentó a la cepa *P. extremaustralis* a una gran variedad de hidrocarburos, sin embargo no se observó crecimiento o el mismo fue muy limitado. Por esta razón, esta cepa fue transformada con el plásmido pGEc47 (ver Tabla M.1), de manera de proveer los genes necesarios para la degradación de alcanos (*alkBAC* y *alkR*). *P. extremaustralis*/pGEc47 fue capaz de crecer en los distintos hidrocarburos ensayados. La falta de crecimiento en medios suplementados con derivados de petróleo como única fuente de carbono y la capacidad de revertir ese fenotipo al ser complementada con los genes heterólogos, hizo suponer que *P. extremaustralis* no disponía de los genes necesarios para la degradación de los mismos. Sin embargo, se propuso profundizar el análisis buscando secuencias codificantes para las enzimas relacionadas con la degradación de alcanos.

Para ello se analizó la presencia del gen *alkB* –codificante para una n-alcano monooxigenasa- por medio de la técnica de PCR tal como se describe en Materiales y Métodos. Se obtuvo un amplicón de 392 pb que presentó más de un 80% de similitud nucleotídica con el gen *alkB* de varios aislamientos de *Pseudomonas* (Figura R.2).

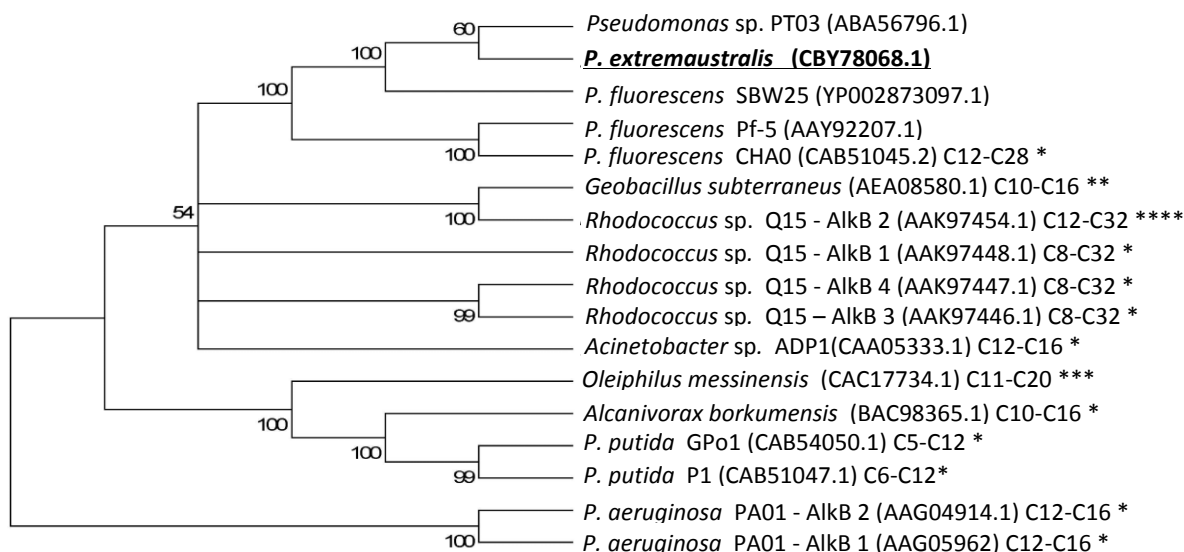


Figura R.2. Árbol filogenético correspondiente a AlkB de *P. extremaustralis* y especies relacionadas obtenido mediante el método de *Neighbor-joining*. Los valores de *bootstrap* (%) están indicados en los nodos. Los números de accesos están indicados entre paréntesis luego del nombre de cada cepa. El largo del hidrocarburo degradado por cada cepa esta detallado luego del número de acceso. *(van Beilen et al. 2003), ** Logan et al. (2009), *** (Golyshin et al. 2002) **** (Whyte et al. 2002).

Se demostró mediante estudios filogenéticos una clara similitud entre la secuencia aminoacídica de AlkB de *P. extremaustralis* con monooxigenasas de alcanos de cadena larga, ejemplo: monooxigenasa 1 de n-alcanos perteneciente a *Pseudomonas fluorescens* CHA0 y *Rhodococcus* sp. Q15, resultando en una similitud del 82% y 63%, respectivamente.

Posteriormente, al contar con la secuencia del genoma de *P. extremaustralis*, se realizó el análisis bioinformático de los genes implicados en la degradación de alcanos. Los resultados obtenidos muestran la presencia del gen *alkB* seguido rio abajo por los genes codificantes para las proteínas activadoras de la oxidación de alcanos *praA* y *praB*. La Figura R.3 muestra la ubicación de dichos genes en el genoma de *P. extremaustralis* y la comparación con genes homólogos de otras *Pseudomonas*.

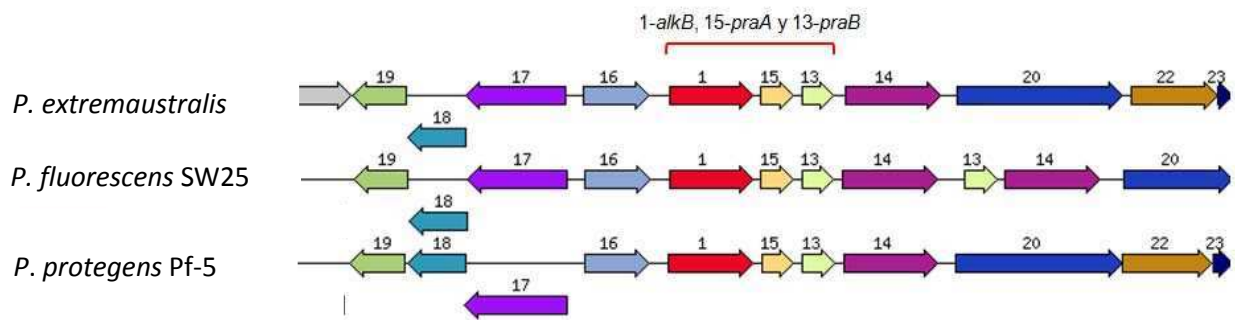


Figura R.3. Esquema del entorno genómico de los genes *alkB*, *praA* y *praB* del genoma de *P. extremaustralis* y comparación con los genomas con mayor similitud realizado con el programa Seedviewer. La flecha roja corresponde al gen *alkB*. Los números sobre las flechas corresponden a: 19) proteína hipotética, 18) Deshidrogenasa con diferentes especificidades, 17) Ciclohexano monooxigenasa, 16) β -cetoacido enol-lactona hidrolasa, 1) **Alcano monooxigenasa**, 15) **Proteína activadora de la oxidación de alcanos PraA**, 13) **Proteína activadora de la oxidación de alcanos PraB**, 14) proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga, 20) butiril-Coa deshidrogenasa y 22) 3-oxoacil reductasa.

La comparación entre la secuencias aminoacídicas de AlkB de *P. extremaustralis* y *P. putida* GPo1 (la cepa modelo para el estudio de la degradación de alcanos) mostró solamente una identidad del 39%. La mayor identidad nucleotídica (99%) se correspondió con el gen *alkB* de *Pseudomonas* sp. PT03 (No de acceso: DQ182286), bacteria aislada de ambientes contaminados con diesel, mientras que la mayor identidad aminoacídica (93%) se obtuvo con la enzima alcano 1-monooxigenasa de *Pseudomonas fluorescens* (WP_034106168.1). El análisis de la estructura primaria de la proteína, realizado tal como se describe en Materiales y Métodos, mostró la presencia de motivos HXXXH, HXXXHH, y HXXHH, asociado la unión de dos átomos de hierro correspondientes al sitio activo de la enzima. Estos se encuentran conservados en varias monooxigenasas de hidrocarburos tal como se muestra en la figura R.4.

P. extremaustralis
P. putida GPo1

```

---MNQTLAAPRVWTDGKRHLWNLGILPLATPLLSGVLAITTTGIQQLMMVGLVIFGLIP 57
MLEKHRVLD SAPEYVDK KKYLWILSTLWPATPMIGIWLANETGNGIFYGLVLLWYGALP 60

LIDGLLGEDVSNPPESAVSHLESQRYYRWIITYTGVLVIA SFVMTGWLAAGGIDWIIGGG 117
LLDAMFGEDFNPPPEEVPKLEKERYRVLTYLTVPMHYAALIVSAMWVG----- 110

LLRAAANLEPSSLSHVASYITARTQLHGEPGWFTYLGMA MSTGAATGIAINTAHELGHK 177
-----TQPMSE-----WLEIGALALSLGIVWGLALNTGHELGHK 143

PSPLEVF LAKVTLAPTFYGHFYTHNRGHHYRVATPEDPASSRLGESFWAFLPRSWWFS A 237
KETFDRWMAKIVLAVVGYGHFFIHNKGGHSDVATPMDPATSRMGESIYKFSIREIPGAF 203

RSAWNLERERLRKLG LPAHWNKNGVLSAWLYSVVLWGAMIAWLGA AVIPFLIIQGIYGF S 297
IRAWGLEEQRLSRRGQSVW SFDNEILQPMIITVILYAVLLALFGPKMLVFLPIQMAFGW W 263

LLEVNVYVEHYGLKREKLPNGRYERCSPRHSWNSNRIVTNIFL FQLQRHSDHHAHPTRSY 357
QLTSANYIEHYGLLRQK MEDGRYEHQKPHHSWNSNHIVSNLVL FHLQRHSDHHAHPTRSY 323

QSLRHFDESPQLPYGYASMI VWAYVPYLWRRRMDHRVLKHYAGNITLTNLHPSQR LKYLE 417
QSLRDFPGLPALPTGYPGAF LMAMIPQWFRSVMDPKVV DWAGGDLNKIQIDDSMRETYLK 383

KYSGTTQSF----- 426
KFGTSSAGHSSSTS AVAS 401

```

Figura R.4. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondiente a AlkB de *P. extremaustralis* y *P. putida* GPo1. Los dominios ricos en histidina se encuentran enmarcados en rojo. Las flechas indican la ubicación de las histidinas (H) pertenecientes a los correspondientes motivos.

Los otros genes pertenecientes la familia *alk*: rubredoxina (*alkG*) y rubredoxina reductasa (*alkT*) fueron detectadas en un locus diferente. (Figura R.5).

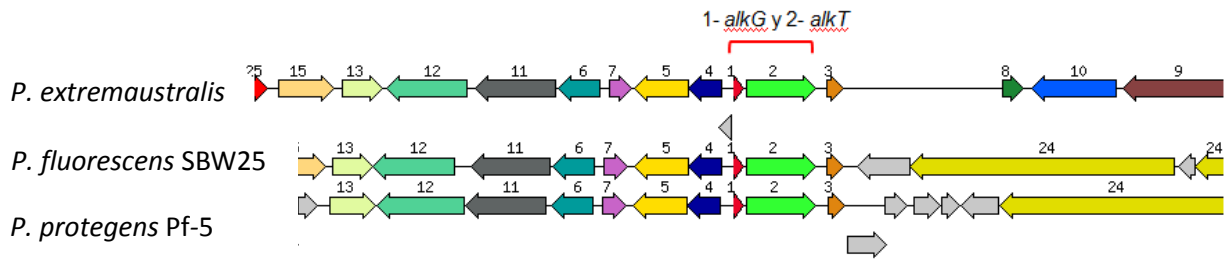


Figura R.5. Esquema del entorno genómico de los genes *alkG* y *alkT* del genoma de *P. extremaustralis* y comparación con los genomas con mayor similitud realizado con el programa Seedviewer. Los números sobre las flechas corresponden a genes que codifican: 15) Regulador de respuesta, 13) Peptidasa de la familia M23/M37, 12) Transportador de metales, 11) proteína sensora PhoR, 6) Regulador transcripcional PhoB, 7) Lipoproteína putativa, 5) 4-hidroxibenzoato polipreniltransferasa, 4) Corismato-piruvato liasa, 1) **Rubredoxina**, 2) **Rubredoxina reductasa**, 3) proteína de unión al ADN HU-alfa, 8) proteína hipotética, 10) proteína señal de la transducción y 9) ADN helicasa RecG.

La comparación entre la secuencias aminoacídicas de AlkG y AlkT de *P. extremaustralis* y *P. putida* GPo1 (la cepa modelo para el estudio de la degradación de alcanos) mostró solamente una identidad del 55% y del 29%, respectivamente. La mayor identidad aminoacídica obtenida para AlkG (91%) se correspondió con la enzima rubredoxina perteneciente a *Pseudomonas fluorescens* (WP_017528588.1). En la misma, se detectó el dominio de unión a hierro, conservado en esta pequeña ferrosulfo proteína con actividad rédox. El átomo de hierro estaría coordinado por 4 residuos de cisteínas (Fe(S-Cys)₄) (Figura R.6).

```

P. extremaustralis -----
P. putida GPo1  MASYKCPDCNYVYDESAGNVHEGFSPGTPWHLIPEDWCCPDCAVRDKLDLFMLIESGVGK 60

-----MK 2
GVTSTHTSPNLSEVSGTSLTAEAVWAPTSLEKLP SADVKGQDLYKTQPPRSDAQGGKAYL 120

KWQCWCGLIYDEKDGW PDDGILPGTRWEDVPADWLCPCG VGVKMD FEMIELG 55
KWICITCGHIYDEALGDEAE GFTRGTRFEDIPDDWCCPCG GATKEDYVLYEEK 173

```

Figura R.6. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondiente a AlkG de *P. extremaustralis* y *P. putida* GPo1. Los residuos de cisteína conservados se encuentran enmarcados en rojo.

Así mismo, la mayor identidad aminoacídica obtenida para AlkT (91%) se correspondió con la enzima rubredoxina reductasa de múltiples aislamientos de *Pseudomonas*. En la misma, se detectó el pequeño dominio de unión de NADH y el gran dominio de unión a FAD.

Estos resultados mostrarían la presencia de la vía de degradación de alcanos en el genoma de *P. extremaustralis*.

Como se mencionó en la Introducción, existen múltiples vías metabólicas para la degradación de alcanos. Si bien la más estudiada, es la relacionada con la vía de la enzima alcano hidroxilasa AlkB, existe una segunda vía que está siendo ampliamente analizada, la perteneciente a la proteína citocromo P450 familia CYP153. Debido a esto, se decidió investigar la presencia de este gen en el genoma de *Pseudomonas extremaustralis* mediante análisis bioinformático.

La búsqueda realizada en la plataforma RAST dio como resultado la presencia de un gen citocromo P450 alcano hidroxilasa codificante para una proteína de 404 aminoácidos, longitud concordante con los citocromos P450 bacterianos. El análisis de la secuencia aminoacídica mostró un 88% de identidad con la proteína citocromo P450 de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* y de *Pseudomonas resinovorans*. En la secuencia obtenida se encontraron los motivos propios de las citocromo P450 (Figura R.7).

P. extremaustralis

Acinetobacter sp. EB104

```
-----MSSSLPTTLEAAPYLDVANPSFSMRSKEVLDAREKS--- 36
MNSVAEIFEKITQTVTSTAADVATTVDKVKSNQEQFTGKQFLHGQVTRFVPLHTQVRGI 60

-WFARTPY-----GIAVLRVDEVNALIRDQR-----LRQGSYAMP 70
QMMQKAKFRVFNVQEFPAFIEQPIPEVATLALAEIDVSNPFLYKQKKWQSYFKRLRDEAP 120

AHNKATGSFADWIR-----MLLSREGADHS 96
VHYQANSPPGAFWSVTRVDDIVVYVDKNHEIFSAEPVIAIGNTPPGDAEMFIANDPPKHD 180

RLRRLANPAFAPKLVLRKLTVPVQEMANEIIDGFSKKGTCFVADFSSEPYATQVICVLLGL 156
VQRQAVQDWWAPKNLKELEGLIRLRVQGVLDQLPTDQPFQWQNVSIELTARMLATLDFD 240

PRSEWRGLAQLAVDMG---LALGVTFKQDEEKINAATDKLFGYAAMAVEALKKN----GL 209
PYEKRHKLVEVSDLMAGTAEATGGTVTNLDEIFDAAVDAAKHFAELWHRKAAQK SAGAEM 300

GDDFLSLLVKANAEDKAALSDQELYDMIVLAIFGGIDTTINQIALAVDMFVQHPDQWLL 269
GYDLISLMQSNQATKDLIYRPMFVGNLVLLIVGGNDITRNSMTGGVYALNLPNEFVKL 360

GDDFELARAAVEEYMRV RPTVTWVTRAELEDFNQGLDIKKGTTVHLFSQAAGTDPVFE 329
KNNP SLIPWVSEIIRNQ TPLAYMRIAQQDVELNGQTIKKGDKVVMWYVSGNRDERVIE 420

NPGFDITAKR--QAHFGFGAGAHHCIGHFIARGDMTEALALLAQRIKNPRFNQGEVQWLPD 387
RPDELIIDRKGARNHLSFGFGVHRCMGRLAEMQLRILWEELLQRFENIEVLGPEPIVQS 480

SGNTGPIAMPMAFDPEV 404
NFVIRGYAKMVKLTAKA 497
```

Figura R.7. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la proteína citocromo P450 de *P. extremaustralis* y la proteína citocromo P450 familia CYP153 de *Acinetobacter* sp. EB104. Los recuadros rojos enmarcan las secuencias conservadas: 1) la secuencia más características de las P450, FxxGxRxCxG, la cual presenta una cisteína altamente conservada implicada en la ligación al hierro; 2) el motivo ExxR, y 3) A/GGxN/ETT/S.

Debido a que las proteínas citocromos P450 relacionados con la oxidación de alcanos de cadena media son los pertenecientes a la subfamilia CYP153, se utilizó la secuencia aminoacídica de la proteína citocromo P450 CYP153 de *Acinetobacter* sp. EB104 (cepa modelo para este sistema de degradación). La comparación de dicha secuencia con la presente en *P. extremaustralis* mostró una identidad de solamente un 24%. El análisis de las probables estructuras secundarias realizado mediante el modelado bioinformático (programa Phyre2.0) mostró la presencia de los dominios característicos de las proteínas citocromo

P450 monooxigenasa AurH correspondiente a la subfamilia CYP151A, perteneciente *Streptomyces thioluteus*.

Finalmente, se estudió la presencia del gen *alkB* en los aislamientos KA-08 y KB-08, mediante amplificación por PCR, sin embargo no se logró producto de amplificación en ninguno de los dos aislamientos. Al no disponer de los genomas secuenciados, no pudo realizarse el análisis bioinformático de los mismos.

2.2. Monoaromáticos

La ausencia del gen *alkB* promovió la búsqueda de más genes que estuvieran relacionados en la degradación de hidrocarburos que fueran los responsables del crecimiento de KA-08 y KB-08 en hidrocarburos complejos, por lo tanto, se propuso estudiar los genes involucrados en la degradación de hidrocarburos monoaromáticos, componentes de las mezclas complejas como el diesel y el kerosén.

Los genes analizados fueron: *xyIA* (codificante para la enzima xileno monooxigenasa, involucrada en el primer paso de la vía TOL), *todC1* (codificante para la enzima tolueno dioxigenasa perteneciente a la vía TOD) y *xyIE* (codificante para la enzima 2,3-catecol dioxigenasa, primer enzima de la vía baja de degradación de aromáticos (ver esquema en la figura M.1).

Mientras que en KA-08 y KB-08 la búsqueda fue realizada mediante amplificación por PCR en la cepa *P. extremaustralis* se realizó mediante el análisis bioinformático del genoma.

KA-08 y KB-08 presentaron amplicones positivos para los genes *xyIA* y *xyIE*. El análisis de la secuencias nucleotídicas de dichos amplicones mostró una similitud superior al 97% con los genes homólogos presentes en el plásmido pWWO de *P. putida* mt-2. Por otra parte, KA-08 fue la única en mostrar producto de amplificación para *todC1*, con una similitud nucleotídica del 100% con los genes homólogos presentes en *P. putida* F1. También se analizaron otros genes de mono y dioxigenasa involucrados en la degradación de BTEX, como *tbdD*, *tmoA* y *bedC1* (ver esquema en la figura M.1), sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos para ninguna de las dos cepas.

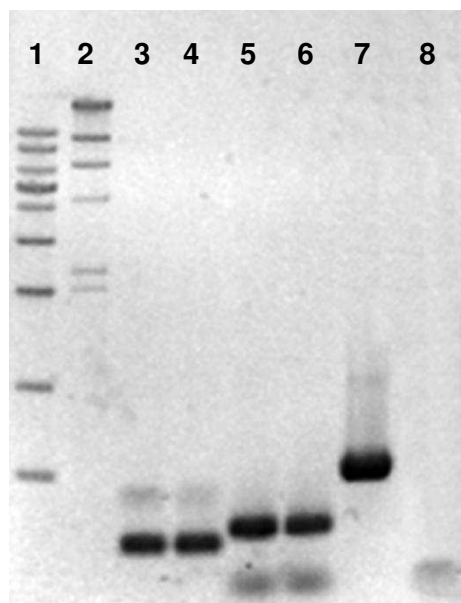


Figura R.8. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones correspondientes a: 3) *xyIE* KA-08, 4) *xyIE* KB-08, 5) *xyIA* KA-08, 6) *xyIA* KB-08, 7) *todC1* KA-08 y 8) *todC1* KB-08. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron: 1) 1 kb (RBC, Real Biotech Corporation), 2) Lamda-Hind (Promega).

Como resultado de la búsqueda de los genes mencionados anteriormente en el genoma de *P. extremaustralis* solo se detectó el gen *xyIE* (Figura R.9). La comparación entre la secuencias aminoacídicas de XylE de *P. extremaustralis* y *P. putida* mt-2 (la cepa modelo para el estudio de la degradación de hidrocarburos monoaromaticos) mostró una identidad del 68%. La mayor identidad nucleotídica (98%) se correspondió con el gen *xyIE* de *Pseudomonas sp. 2B31*, mientras que la mayor identidad aminoacídica (71%) se obtuvo con la enzima catecol -2,3 dioxigenasa de *Pseudomonas putida* (No. de acceso: NP_863103.1).

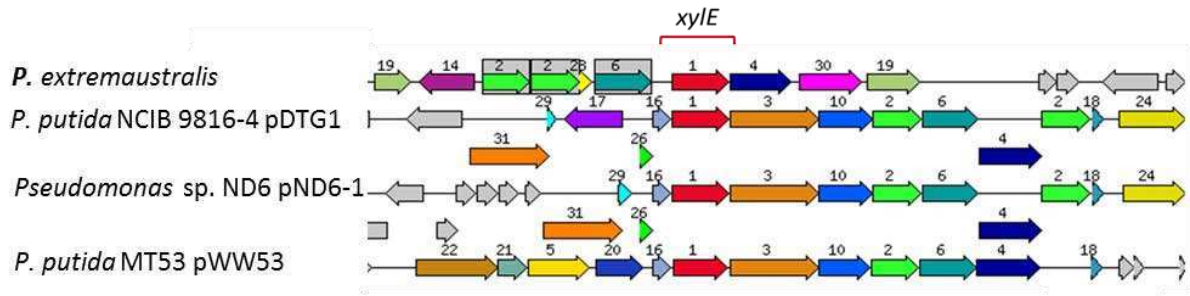


Figura R.9. Esquema del entorno genómico del gen *xylE* del genoma de *P. extremaustralis* y su comparación con los genomas con mayor similitud realizado con el programa Seedviewer. Los números sobre las flechas corresponden a genes que codifican: 19) Proteína de la vía Met-A, degradación de fenol, 14) Regulador transcripcional CatR, 2) 4-oxalocrotonato decarboxilasa, 6) Acetaldehído deshidrogenasa, 1) **Catecol-2,3 dioxigenasa**, 4) 4-hidroxi-2-oxovalerato aldolasa, 30) proteína hipotética, y 19) Proteína de la vía Met-A, degradación de fenol.

El resto de los genes buscados (*xylA*, *todC1*, *tbdD*, *tmoA* y *bedC1*) no fueron detectados en el genoma.

La detección parcial de los genes relacionados con la degradación de hidrocarburos monoaromáticos presentes en KA-08 y KB-08 (Figura R.8), permitiría proponer que posiblemente estos aislamientos presenten, por lo menos, una de las vías metabólicas implicadas en la degradación de estos.

3. Análisis de la tolerancia y la degradación de hidrocarburos

Como se describió anteriormente, *P. extremaustralis* no fue capaz de crecer en cultivos realizados en frascos agitados y con diesel como única fuente de carbono, sin embargo los genes *alkB*, *alkG* y *alkT* fueron detectados en su genoma. Para determinar si estas secuencias eran funcionales, se decidió analizar si la condición de cultivo podría ser un factor determinante en la utilización alcanos.

Para ello se ensayaron dos condiciones de crecimiento con diesel como única fuente de carbono: biofilms estáticos y frascos agitados. El crecimiento se analizó mediante la medición de DO_{600nm} . En la condición de cultivo en biofilms se observó un incremento de 11 veces con respecto a la OD_{600nm} inicial, mientras que en los cultivos de frascos agitados el incremento fue solamente de 1,4 veces (Figura R.10).

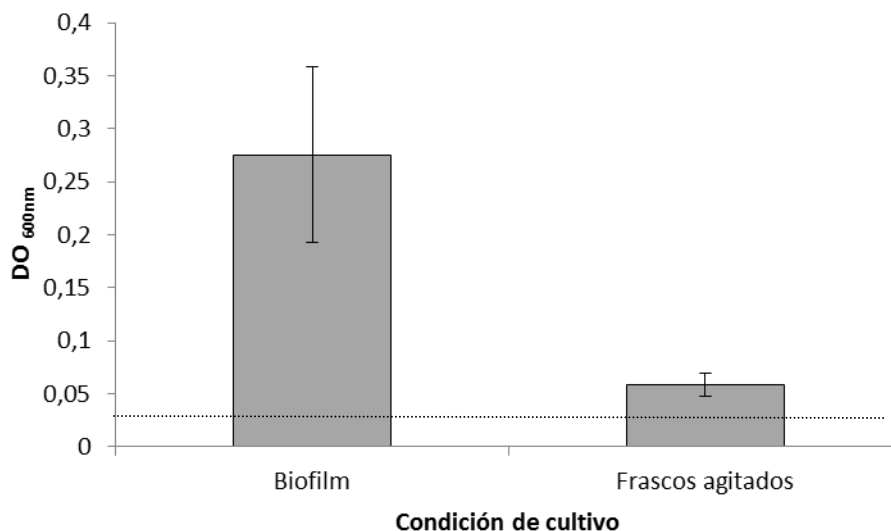


Figura R.10. Crecimiento de *P. extremaustralis* en frascos agitados y biofilms con diesel 5% durante 7 días. La línea punteada indica la DO_{600nm} del inoculo inicial.

Debido a que *P. extremaustralis* complementada con los genes *alk* pertenecientes a *P. putida* GPo1 (*P. extremaustralis*/pGEc47) sí presentó crecimiento en frascos agitados, se decidió analizar si la presencia de los genes heterólogos incrementaría aún más el crecimiento observado en la condición de biofilms. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre la cepa salvaje y la recombinante.

Al observar que la condición de cultivo afecta notablemente la tasa de crecimiento, se decidió analizar si el grado de degradación del diesel estaba siendo igualmente afectado.

Para tal fin, se midió el contenido de hidrocarburo residual en ambas condiciones, realizando controles en las mismas condiciones sin bacterias inoculadas. En la condición de biofilms, se obtuvo una degradación del 20% en comparación con el control sin inocular, notándose

afectada la degradación de alcanos de cadena larga (C14 en adelante), incluyendo a alcanos recalcitrantes ramificados como el pristano y fitano presentando una degradación de $27,3 \pm 6.0\%$ y $29,7 \pm 10.0\%$ respectivamente con respecto al total de hidrocarburos degradados (Figura R.11). Es importante remarcar que la cepa salvaje y la complementada mostraron un patrón de degradación similar en esta condición (Figura R.11).

En frascos agitados la cepa salvaje no presentó diferencias significativas en cuanto a la degradación del diesel con respecto al control sin inocular, mientras que *P. extremaustralis*/pGEc47, degradó un 5%. Es importante destacar que se observó una degradación significativa de n-octano, n-nonano y n-decano pero no así con los alcanos de cadena larga. (Figura R.11).

Debido al diseño experimental, en el caso de los biofilms se obtuvo una evaporación adicional de los alcanos más volátiles. El alcano de cadena más corta resuelto fue decano, mientras que en los frascos agitados fue octano.

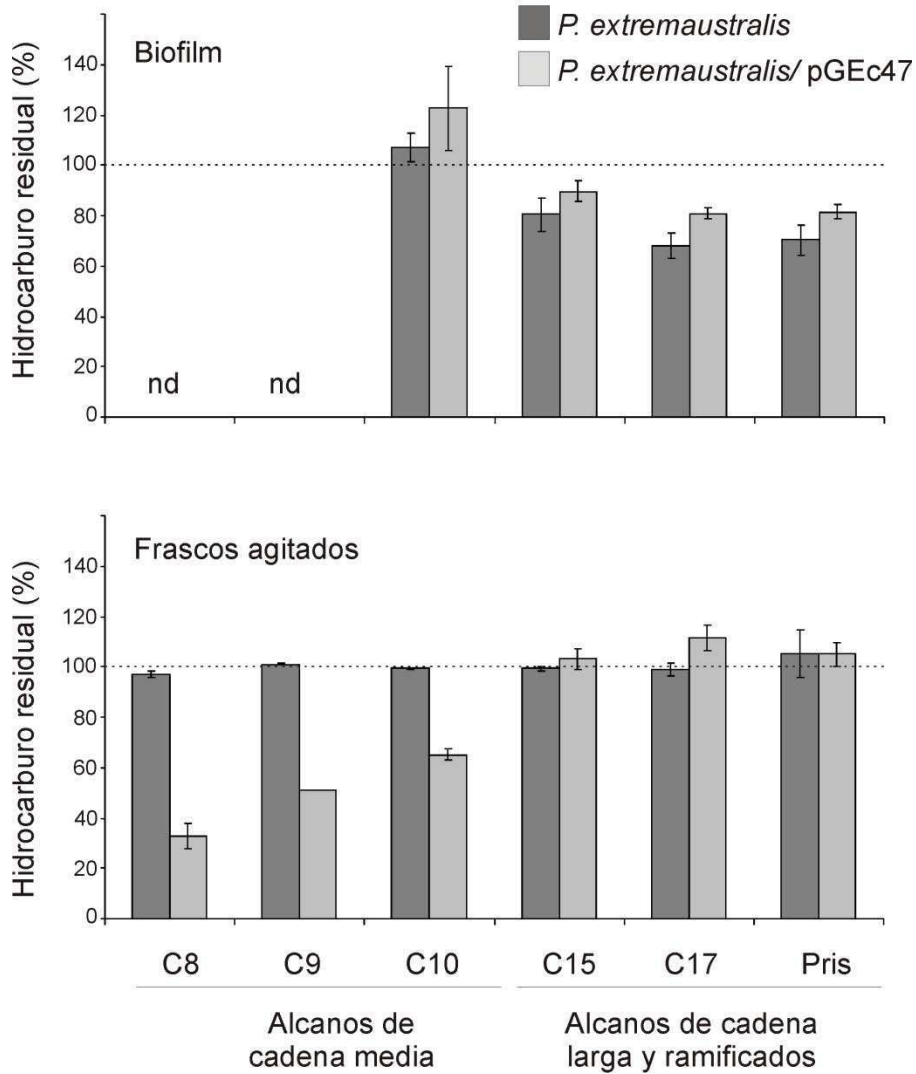


Figura R.11. Comparación de la degradación de alcanos por parte de *P. extremaustralis* y *P. extremaustralis/pGEc47* en cultivos de frascos agitados y biofilms. El control sin inoculo fue considerado el 100% (línea de puntos). Las barras representan el desvío estándar de los ensayos realizados por triplicado.

Por otra parte, KA-08 y KB-08 presentaron crecimiento en frascos agitados, cuando se utilizó diesel y kerosén como única fuente de carbono. Al analizar el grado de degradación de ambos compuestos luego de 7 días de incubación, se obtuvo que la degradación de kerosén fue del 18% y 12%, por parte de KA-08 y KB-08, respectivamente. La degradación de diesel fue no significativa.

A fin de determinar cuáles de los diversos grupos de hidrocarburos presentes en el kerosén (n-alcanos, isoalcanos, cicloalcanos e hidrocarburos poli y monoaromáticos) podrían ser utilizados como fuente de carbono, se realizaron cultivos con hidrocarburos puros. Se utilizó n-octano como representante de los n-alcanos, naftaleno y ciclohexano como ejemplares de poliaromáticos y cicloalcanos, respectivamente y, por último, benceno, tolueno y xileno (BTX), como representantes de compuestos monoaromáticos.

No se detectó crecimiento con n-octano, en concordancia con la falta de la detección del gen *alkB* –codificante para una n-alcano monooxigenasa- en las dos cepas. Del mismo modo, tampoco fueron capaces de crecer cuando la única fuente de carbono fue naftaleno y ciclohexano. La cepa KA-08 se destacó por su capacidad de crecer en por lo menos una de las concentraciones ensayadas de benceno, y en tolerar altas concentraciones de todos los compuestos analizados. Por otro lado, KB-08 fue capaz de crecer en fenol (Tabla R.1). Finalmente, ambas cepas mostraron tolerancia a compuestos fenólicos, una característica deseable para agentes biorremediadores debido a que estos compuestos, que suelen estar presentes en sitios contaminados con BTX, podrían afectar la viabilidad y la consecuente actividad degradativa.

Tabla R.1. Crecimiento y tolerancia bacteriana a distintos hidrocarburos

Hidrocarburo (%v/v)	KA-08		KB-08	
	Crecimiento	Tolerancia	Crecimiento	Tolerancia
Petróleo 5%	Pobre	+	Pobre	+
Diesel 10%	+	+	+	+
Kerosén 10%	+	+	+	+
Octano (hasta 10%)	-	+	-	+
Ciclohexano 5%	-	-	-	-
Naftaleno 1% m/v	-	-	-	-
Fenol 0,01%	-	+	+	+
Fenol 0,1%	-	+	-	+
Benceno 0,1%	+	+	-	+
Benceno 0,5%	-	+	-	-
Benceno 1%	-	-	-	-

Tolueno 0,1%	+	+	+	+
Tolueno 0,5%	-	+	-	-
Tolueno 10%	-	+	-	-
Xileno (0,1-5%)	+	+	+	+

(+): Presencia de turbidez, (-) ausencia de turbidez

4. Análisis de la producción de compuestos biosurfactantes

La naturaleza hidrofóbica de los derivados de petróleo hace que estos sean poco accesibles para ser utilizados como fuente de carbono. Una manera de mejorar su disponibilidad y, por lo tanto, su degradación, es la aplicación de surfactantes. Una característica relevante de los microorganismos a ser utilizados en biorremediación de hidrocarburos es la capacidad de producir estos compuestos.

A fin de determinar si los aislamientos estudiados eran capaces de producir compuestos surfactantes, se analizó el cambio en la tensión superficial (TS), tal como se describe en Materiales y Métodos.

Se observó una reducción pequeña pero significativa ($p = 0.001$) de la TS en los cultivos realizados en la condición de biofilms en comparación con el control. Como era esperado, *P. extremaustralis* cultivada en la condición de frascos agitados, no produjo reducción de la TS con respecto al control (Tabla R.2).

Tabla R.2. Tensión superficial en dina/cm de sobrenadantes libres de células

Tensión Superficial (dina/cm)		
	Biofilms	Frascos agitados
Control	67.67 ± 2.6	67.8 ± 1.64
<i>P. extremaustralis</i>	61.37 ± 0.90	64.73 ± 2.13

Cultivos crecidos en medio mínimo E2 con 5% de diesel como única fuente de carbono.

El control no fue inoculado con bacterias.

Debido a que la producción de compuestos surfactantes depende de la fuente de carbono ensayada, se utilizaron dos sustratos con distintas accesibilidad para el estudio de la reducción en la TS producida por KA-08 y KB-08.

Los sobrenadantes libres de células de los cultivos realizados para ambas cepas mostraron una reducción significativa ($p < 0.0001$) de la TS comparada con el control no inoculado en ambos medios analizados. Dicha reducción fue mayor en KA-08 comparada con KB-08 cuando la fuente de carbono fue xileno (Figura R.12).

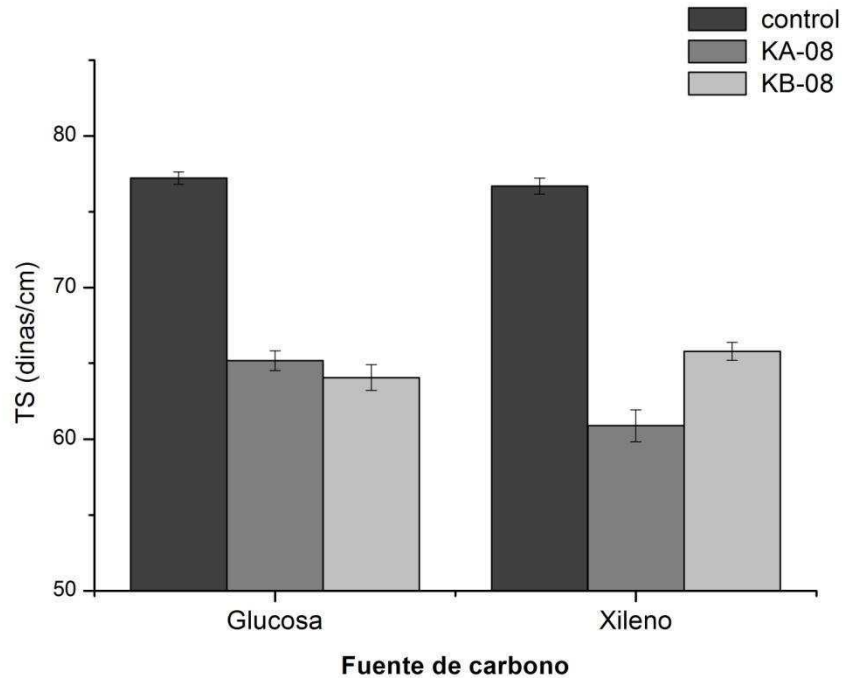


Figura R.12. Medición de la Tensión Superficial (TS) de sobrenadantes libres de células cultivados en glucosa y xileno como única fuente de carbono.

Al observar una disminución en la TS por parte de las cepas KA-08 y KB-08, se decidió realizar una caracterización bioquímica de los compuestos presentes en los extractos crudos de surfactantes mediante cromatografía en capa delgada, TLC (Figura R.13). Los patrones obtenidos se compararon con extractos realizados de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, productora natural de ramnolípidos.



Figura R.13. TLC realizada a partir de los extractos purificados de las cepas KA-08, KB-08, y *P. aeruginosa* PAO1, crecidas en glucosa como única fuente de carbono. A) Revelado con atmosfera de lodo, y B) revelado con antrona.

La visualización de las especies separadas se llevó a cabo utilizando los reactivos detallados en Materiales y Métodos. La cromatografía realizada en estas condiciones permitió la obtención de manchas bien definidas en las distintas calles. La atmósfera de lodo permite revelar cualquier mancha con carácter lipídico que se haya podido separar en la cromatografía. Las manchas, al estar con contacto con la atmósfera de lodo adquieren un color amarillento intenso que desaparece al retirar la cromatografía de dicho ambiente (por este motivo los cromatogramas correspondientes a este revelado se encuentran remarcadas en donde se encontraban las manchas) (Figura R.13).

Se obtuvieron manchas positivas al revelar con antrona (revelador de carbohidratos) (Figura R.13). Los resultados obtenidos demostraron que ambas cepas son capaces de sintetizar

biosurfactantes de naturaleza glicolipídica junto otros surfactantes de naturaleza lipídica detectados en los extractos crudos.

Si bien se utilizaron extractos pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 como controles de producción de surfactantes glicolipídicos (ramnolipídicos), no puede confirmarse que las manchas detectadas sean ramnolipidos debido a que al realizar la búsqueda de los genes *rhIA* y *rhIB*, responsable de su síntesis, estos no fueron detectados.

Por último, se realizaron ensayos de producción de surfactantes en placas de agar de azul de metileno CTAB (Figura R.14).

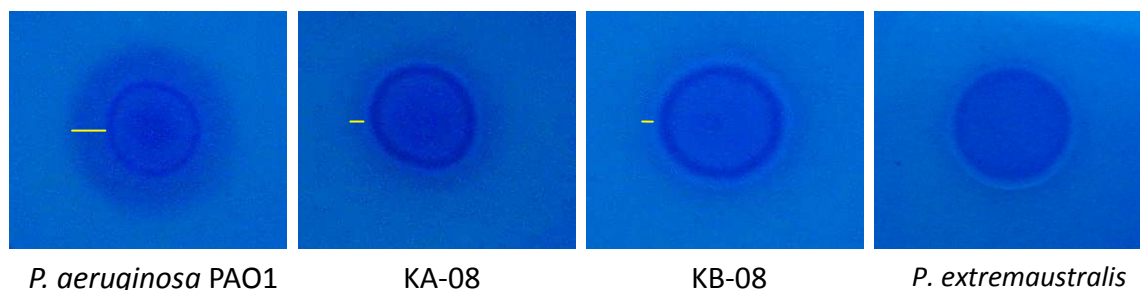


Figura R.14. Vista inferior de las placas de agar de azul de metileno CTAB, que permiten determinar la producción de surfactantes aniónicos. La línea amarilla resalta el grosor del halo de precipitación

P. aeruginosa PAO1, fue utilizada como control de producción de surfactantes aniónicos. Si bien el halo observado alrededor de las colonias de KA-08 y KB-08, es de una intensidad mucho menor al del control positivo, puede visualizarse producción de surfactantes de carácter aniónico. La ausencia total de un halo alrededor de la colonia, permitiría determinar que *P. extremaustralis*, no produciría surfactantes aniónicos. Estudios previos (Di Martino 2010) demostraron que esta cepa produciría surfactantes de naturaleza lipopeptídica.

Por otra parte, las colonias pertenecientes a KA-08 y KB-08, presentaron una coloración azulada y un halo azul oscuro rodeando a las mismas, revelando la presencia de surfactantes de carácter aniónico adheridos a las células o directamente una superficie celular predominantemente aniónica (Figura R.14). La colonia de *Pseudomonas*

extremaustralis fue blanca. La coloración levemente celeste observada es debido al azul de metileno presente en la placa.

5. Análisis del efecto del PHA sobre diversas variables involucradas en la capacidad biorremediadora de bacterias

En la primera parte de este trabajo se realizó el análisis de los aislamientos KA-08, KB-08 y *P. extremaustralis* en relación a su capacidad para tolerar y/o degradar distintos hidrocarburos. Debido a que el aislamiento KA-08 presentó un nivel de tolerancia superior a distintos hidrocarburos y una mayor producción de compuestos tensioactivos al utilizar xileno como única fuente de carbono, en comparación con la cepa KB-08, los ensayos presentados a continuación fueron realizados únicamente con los aislamientos KA-08 y *P. extremaustralis*. Los mismos fueron originalmente seleccionados por su capacidad de desarrollarse en ambientes extremos y acumular PHA. Se utilizaron dos estrategias experimentales diferentes para desarrollar este análisis. Por un lado, en los ensayos correspondientes a *P. extremaustralis* se utilizaron inóculos con o sin presencia de PHA mientras que en KA-08 se construyó una mutante PHA⁻ para analizar el efecto de la presencia del polímero sobre la degradación hidrocarburos y la síntesis de biosurfactantes.

5.1. Análisis de la síntesis de PHA en relación a la fuente de carbono

Debido a que las fuentes de carbono a partir de las cuales *P. extremaustralis* puede acumular PHA han sido previamente caracterizadas, se decidió analizar en qué condiciones nutricionales la cepa KA-08 era capaz de acumular PHA, mediante el cultivo en medio mínimo suplementado con distintos carbohidratos e hidrocarburos como única fuente de carbono. La acumulación del polímero se determinó mediante la coloración con Azul del Nilo.

Se obtuvo acumulación de PHA cuando la relación C:N fue igual o mayor a 11, utilizando octanoato de sodio, glucosa o ácido cítrico como única fuente de carbono. No se detectó acumulación con kerosén (10% v/v), quizás porque el carbono disponible (la fracción correspondiente a los BTX de este compuesto) fue suficiente para sustentar el crecimiento celular pero no para permitir la observación del polímero mediante la técnica elegida sin embargo, sí fue capaz de acumular PHA cuando se utilizó xileno al 5%, como única fuente de carbono (Tabla R.3).

Tabla R.3. Acumulación de PHA en diferentes fuentes de carbono

Fuente de carbono	C:N	KA-08
Ácido cítrico	4	-
Ácido cítrico	11	+
Octanoato de sodio	7	Pobre
Octanoato de sodio	11	+
Octanoato de sodio + Ac. cítrico	11	+
Glucosa	5	-
Glucosa	11	+
Diesel 10%	nd	-
Kerosén 10%	nd	-
Xileno 0.1%	4.5	-
Xileno 0.5%	22	-
Xileno 1%	44	-
Xileno 5%	220	+

(+): Fluorescencia en más del 50% de las células observadas, (-): ausencia de fluorescencia, (escasa): fluorescencia en menos del 50% de las células observadas.

5.1. Análisis de los genes involucrados en la síntesis de PHA en la cepa KA-08

Dado que no se cuenta con la secuencia completa del genoma de KA-08, se decidió realizar el análisis del *cluster pha* mediante la amplificación de los genes utilizando estrategias de PCR y secuenciación, tal como se describe en Materiales y Métodos.

A partir del ensamblado de los fragmentos se pudo obtener una región de 4884 pb (No. de Acceso: FR691074). El análisis del *contig* correspondiente mostró la presencia de 4 ORF que codifican los genes *phaC1ZC2D*. Los análisis bioinformáticos mostraron que PhaC1, PhaZ y PhaC2 presentan un 99, 95 y un 95% de identidad aminoacídica con *Pseudomonas putida* F1, respectivamente, mientras que el regulador PhaD presenta un 100% de identidad con *P. putida* DOT-T1E.

La actividad de este *cluster* fue analizada mediante la medición de la producción de PHA. La cuantificación del polímero demostró que KA-08 produce un total de 18,25% de PHAcM (en peso seco celular), siendo un $1,4 \pm 0.15\%$ de PHAcM (en peso seco celular) de monómeros de C6 y $16.85 \pm 1.70\%$ de PHAcM (en peso seco celular) de monómeros de C8 cuando crece en octanoato de sodio como fuente de carbono.

Los análisis *in silico* de las secuencias aminoacídicas de las proteínas involucradas en la síntesis y degradación de los PHA mostraron que PhaC1 presenta aminoácidos conservados necesarios para la actividad catalítica de las sintasas de clase II (Cys 296, Asp 452, y His 480) y otros aminoácidos como el Trp 398, que participa en la dimerización de la sintasa y la Cys 431, involucrada en la reacción de transesterificación (Tabla R.4). La secuencia correspondiente a PhaC2 presenta una mutación sin sentido en el aminoácido 203, lo que sugeriría que esta proteína estaría inactiva. La depolimerasa PhaZ presentó el motivo lipasa box (la Ser está localizada en un motivo GxSxG) y descrito en el sitio activo catalítico en la mayoría de las PHA depolimerasas (Figura R.15).

Tabla R.4. Localización de los aminoácidos conservados en las sintasas de clase II en KA-08

Aminoácidos conservados	Ubicación
C 296	296
W 398	397
C 431	430
H 480	479
D 452	451

A ATGAAAGACAAACCGGCCAAAGGATCGACAACGCTCCCCGCCACCCGCATGAACGTGCAGAAGCCATCCTCGGCCTGC
 GCGGCCGCGACCTGCTTTCCACGCTGCGCAACGTGGCCGCCACGGTCTGCGCCACCCGCTGCATACCGCGCATCTCTG
 CTGGCGCTTGGCGGGCAGTTGGGGCGGGTGATGCTGGGGGACACGCCCTACCAGCCGAACCCGCTGACGCACGCTTCA
 GTGACCCGACCTGGAGCCAGAACCCGTTCTACCGCCGCGCCTGCAGGCCTACCTGGCCTGGCAGAAGCAGACACGCCA
 GTGGATCGATGAAAGCCACTTGAACGACGATGATCGAGCCCGGCCACTTCTGTTCAACCTGATCAACGATGCGCTGG
 CGCCAGCAACTACTGCTCAATCCGCTGGCGGTCAAAGAGCTGTTCAACACCGCGGCCAGAGCCTGGTGCAGCGCGT
 GGCCACCTGCTCGACGACCTGCGTCACAACGATGGGCTGCCGCTCAGGTGGACGAGCGCGCCTTGAAGTAGCGCCA
 ACCTGGCGGCGACCCCTGGCGCAGTGGTATTTGCAACGAGCTGCTGGAGC**TGA**TCCAGTACTCGCCGATGAGCGAAAA
 GCAGCAGCAGCCCACTGCTGGTCTGCGCCCTCAGATCAACAAGTTCTACATCTTCGACCTCAGCGCTACCAACAGCTT
 TGTCAGTACATGCTAAAAGCGGCTTGCAGGTGTTATGCTCAGCTGGCGCAACCCGACCCACGCCACCGTGAATGGG
 GCCTTTCCAGCTACGTGAAGCCCTGGAGGAAGCGCTTAATGCCTGCCGAGTATCAGCGGCAACCGCGACCCCAACCTG
 ATGGGCGCCTGTGCCGTTGCCCTGACCATGGCCGACTGCAAGGCCACCTGCAAGCCAAGCAGCAATTGCGCGGGTAC
 GCAGTGCCACCTATCTGGTCTGCTGGACAGCAAGTTGAAAGCCCGGCCAGCCTGTTCCGGATGAGCAGACCATC
 GAAGCGGCCAAGCGCCGCTTTATCAGCGCGCGTGTGGACGGTGGCGAAGTGGCGGGATCTTCGCCTGGATGCGGC
 CCAACGACCTGATCTGGAATACTGGGTCAACAACCTGCTCGCAAGACCGCCGCGCTTCGACATCCTGACTGG
 AATGCCGACAGCAGCGCCTGCCCGCGCTGCATGGCGACCTGCTGGAGTTTTTCAAGCTCAACCCCTGACCTACGC
 GTCGGGCTGGAGGTGTGCGGTACACCGATTGACCTGCAGCAGGTCAATATCGACAGCTTTACCGTGGCCGCGAGCAAC
 GACCACATCACGCCATGGGACGCGGTGTACCGCTCGCCTTGTGCTGGGTGGCGAGCGCGCTTCGTGCTGGCCAACA
 GCGGGCATATCCAGAGCATCATCAACCCGCCAGGCAACCCCAAGGCCTACTACCTGGCCAACCCCAAGCTGAGCAGCGAC
 CCACGCGCCTGGTTCCACGACGCCAAGCGCAGTGAAGGCAGCTGGTGGCCGTTGTGCTGGAGTGGATCACCGCACGCT
 CCGGCTGCTCAAGGCGCCGCGCACTGAACTGGGCAACGCCACTTACCACCGCTAGGCCCGCGCCAGGCACCTACGTG
 CTGACCCGATGA

B MPQPYIFRTVELDHSIRTAVRPGKPHLTPLLIFNGIGANLELVFPFIDALDPDLEVIADFVPGVGSSTPRHPYRFPGLAKLTAR
 MLDYLDYGQVNV**LSW**GALAAQQFAHDYPERCKKLVLAATAAGAVMVPGKPKVLWMMASPRRYVQPSHVIRIAPMIYGG
 GFRRPDLAMHHAAKVRSGLGYWQLFAGLWTSIHWHLHKIQQPTLDGRDEGPVXXXINMRLLAWRIPNAQLHIIDDG
 HFLITRAEAVAPIIMKFLQQRQRAVMHPRPASGG*

Figura R.15. A.1) Secuencia nucleotídica del gen *phaC2* y, secuencia aminoacídica de la proteína PhaC2, en ambas, se encuentra destacada en rojo la secuencia STOP detectada. B) Secuencia aminoacídica de la proteína PhaZ, se encuentra destacado el sitio Lipasa Box.

5.3. Construcción de KA-mut, mutante PHA-

A fin de analizar el efecto que ejerce la acumulación de PHA sobre diversas variables involucradas en su capacidad biorremediadora, se construyó una mutante de KA-08 incapaz de acumular PHA, denominada KA-mut,. Esta cepa contiene una inserción de un casete de resistencia a kanamicina (Km) en el *cluster pha* interrumpiendo el gen *phaC1*, realizado a partir de la técnica de recombinación y deleción por PCR (CrossOver PCR deletion).

Con motivo de determinar la localización del sitio de recombinación que generó la mutación deseada, se realizaron múltiples ensayos de PCR para amplificar el posible escenario genómico en que se encuentra el casete de km. Todas las PCRs fueron realizadas en la cepa salvaje y mutante.

El único set de *primers* con el que se obtuvo amplificación en la cepa mutante y no en la salvaje mostraría que el evento de recombinación pudo ser simple en el gen *phaC1* (Figura R.16.D). La doble recombinación fue descartada al comprobar que la cepa mutante es resistente a tetraciclina, debido a la inserción completa del vector pEX18Tc.

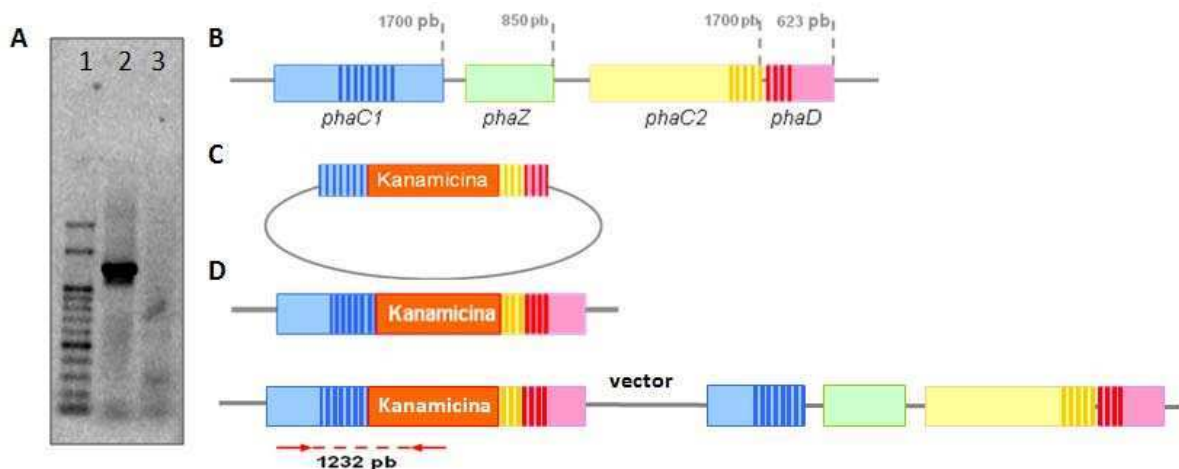


Figura R.16. A) Electroforesis en gel de agarosa mostrando el amplicón que describe el evento de recombinación en el gen *phaC1*. Calle 1) Marcador de peso molecular 100 pb (RBC, Real Biotech Corporation), calle 2) KA-mut, calle 3) KA-08. B) Esquema del *cluster pha*. C) Esquema del vector pEX Δ *phaC1ZC2*. D) Esquema de los posibles eventos de recombinación ocurridos en el *cluster pha*. Se utilizaron los primers: Fmut (el cual presenta como sitio de unión la secuencia de *phaC1* sobre la que no ocurre recombinación con el vector) y PmutKm (el cual tiene como sitio de unión la secuencia a kanamicina).

El análisis por metanólisis seguida por GC mostró que KA-mut fue incapaz de acumular PHA en condiciones tradicionales de acumulación. No se detectaron monómeros de C6 y solo 0.061 ± 0.006 % de monómeros de C8 (en peso seco celular). De esta manera, se pudo adjudicar el fenotipo PHA⁻ a la interrupción del gen *phaC1*. Por otra parte, estos resultados refuerzan la predicción de que la mutación sin sentido detectada en la secuencia de *PhaC2*, haría a esta enzima inactiva.

Para demostrar que la mutación en el cluster *pha* no tiene efecto sobre el crecimiento celular cuando el cultivo se desarrolla en condiciones de no acumulación, se cultivaron ambas cepas en medio LB, midiéndose la DO_{600nm} a intervalos regulares. Ambas curvas de crecimiento resultaron idénticas (Figura R.17). Por otra parte, cuando las cepas fueron crecidas en medio de acumulación (medio modificado E suplementado con 0.25% m/v octanoato de sodio), las curvas de crecimiento mostraron una mayor OD_{600nm} en la cepa salvaje. Dicha diferencia es debida a la acumulación de PHA por parte de la cepa salvaje en comparación con la cepa mutante. Sin embargo, el recuento de células viables en función del tiempo, mostró que luego de las 8 horas de cultivo, momento a partir del cual la cepa salvaje comienza a acumular PHA, KA-mut presenta un ligero incremento en el número de UFC/ml en comparación con KA-08 (Figura R.17). Esta diferencia podría deberse a que el flujo de carbono fue diferente en ambas cepas.

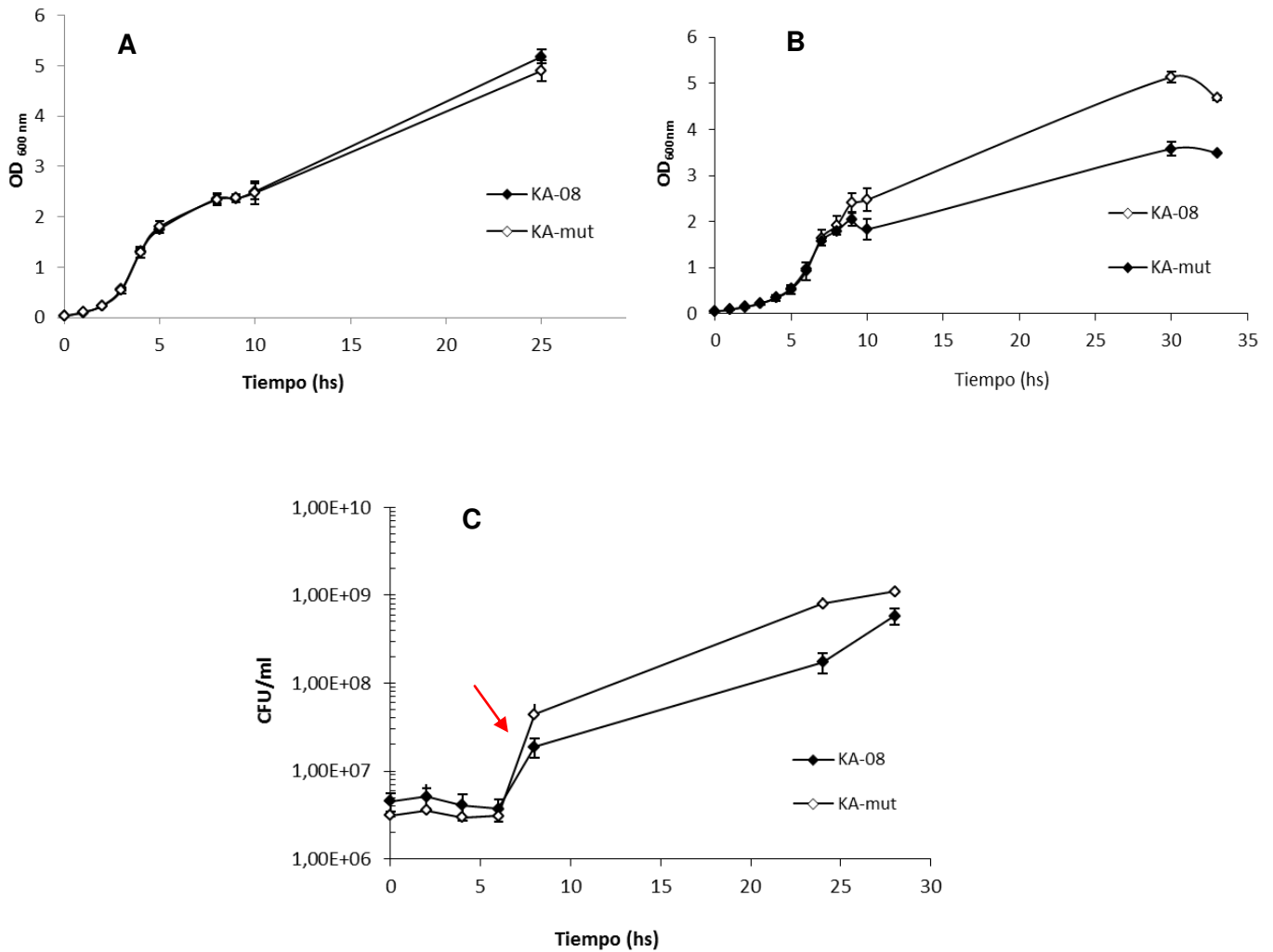


Figura R.17. Curvas de crecimiento de las cepas KA-08 y su mutante PHA⁻. A) Densidad óptica (OD_{600nm}) en medio LB, B) Densidad óptica (OD_{600nm}) en medio E suplementado con octanoato de sodio 0.25%, C) Recuento de células viables (UFC/ml) en el medio E suplementado con octanoato de sodio 0.25%. La flecha indica el momento en que comienza a ser detectado el PHA mediante coloración con Azul del Nilo.

5.4. Análisis de la tolerancia y la degradación de hidrocarburos

Se decidió analizar si la presencia de PHA en el inóculo inicial modificaría la capacidad de crecimiento de la cepa *P. extremaustralis* en la condición de biofilms o frascos agitados, cuando se utilizó diesel como única fuente de carbono.

La presencia de PHA en los inóculos produjo un ligero pero no significativo incremento en el crecimiento en ambas condiciones. No se observó crecimiento en los controles que no presentaban diesel. Tampoco fue detectado polímero (mediante coloración con Azul del Nilo) luego de 24 horas de incubación con diesel como única fuente de carbono, lo que indicaría que el PHA presente en los inóculos fue metabolizado. El análisis del índice de adherencia ACV/APL, mostró diferencias significativas ($p = 0.044$) cuando se utilizaron inóculos conteniendo PHA (1.95 ± 0.495) en comparación con inóculos que no presentaban PHA (3.48 ± 0.77). Este resultado sugeriría que la presencia del polímero favorecería a una condición planctónica de crecimiento.

A fin de determinar si la presencia o ausencia de PHA afecta la degradación de diesel, se inocularon cultivos en condiciones de biofilm (*P. extremaustralis*) o de frascos agitados (*P. extremaustralis*/pGEc47) con pre inóculos realizados en condiciones de acumulación o no acumulación de PHA. En ninguno de los casos se observaron diferencias significativas mostrando que la presencia de PHA acumulado en el inóculo no afecta a la capacidad de degradar hidrocarburos.

En cuanto a la cepa KA-08 y su mutante PHA⁻, se decidió analizar si la capacidad de producir PHA modificaría el crecimiento y la tolerancia de ambas cepas a distintos hidrocarburos. No se obtuvieron diferencias a las observadas en la Tabla R.1 por parte de la KA-mut, cuando los pre inóculos provenían de condiciones de acumulación y no acumulación de PHA.

Si bien este resultado estaría indicando que la capacidad de acumular PHA no modificaría el crecimiento y la tolerancia a distintos hidrocarburos, se decidió analizar si la mutación en el *cluster pha* modificaría la tasa de degradación del xileno, hidrocarburo para el cual ambas cepas son altamente tolerantes.

Se realizó el análisis del porcentaje y la tasa de degradación de xileno en dos concentraciones. Con concentraciones de 200 ppm (0.02% v/v) el cual es el límite de

máxima solubilidad en agua y, 430 ppm (0.05% v/v) concentración que supera los límites de solubilidad en agua (Tabla R.5).

Tabla R.5. Degradación de xileno

Xileno	KA-08		KA-mut	
	Degradación	Tasa	Degradación	Tasa
200 ppm	99,43%	9,94 mg/L/h	99,03%	9,9 mg/L/h
430 ppm	99,31%	21,35 mg/L/h	97,90%	21,05 mg/L/h

Al aumentar la concentración de xileno, se observó un ligero pero significativo ($P < 0,0001$) aumento del porcentaje de degradación por parte de la cepa salvaje.

Al analizar el cromatograma correspondiente al control sin inocular, se puede observar la presencia de múltiples picos derivados de la mezcla de orto-xileno, meta-xileno y para-xileno, así como también etilbenceno y tolueno (Figura R.18). Como resultado de la degradación bacteriana, se produjo la reducción a niveles casi indetectables de todos los compuestos que formaban parte del inóculo inicial de hidrocarburos, exceptuando los niveles de orto-xileno (Figura R.18 - ampliación). El o-xileno constituía aproximadamente el 4% del porcentaje total de hidrocarburos inoculados. La cepa salvaje logró degradar un $63,2 \pm 1,98\%$, mientras que la cepa mutante solamente un $33,85 \pm 2,42\%$ del mismo.

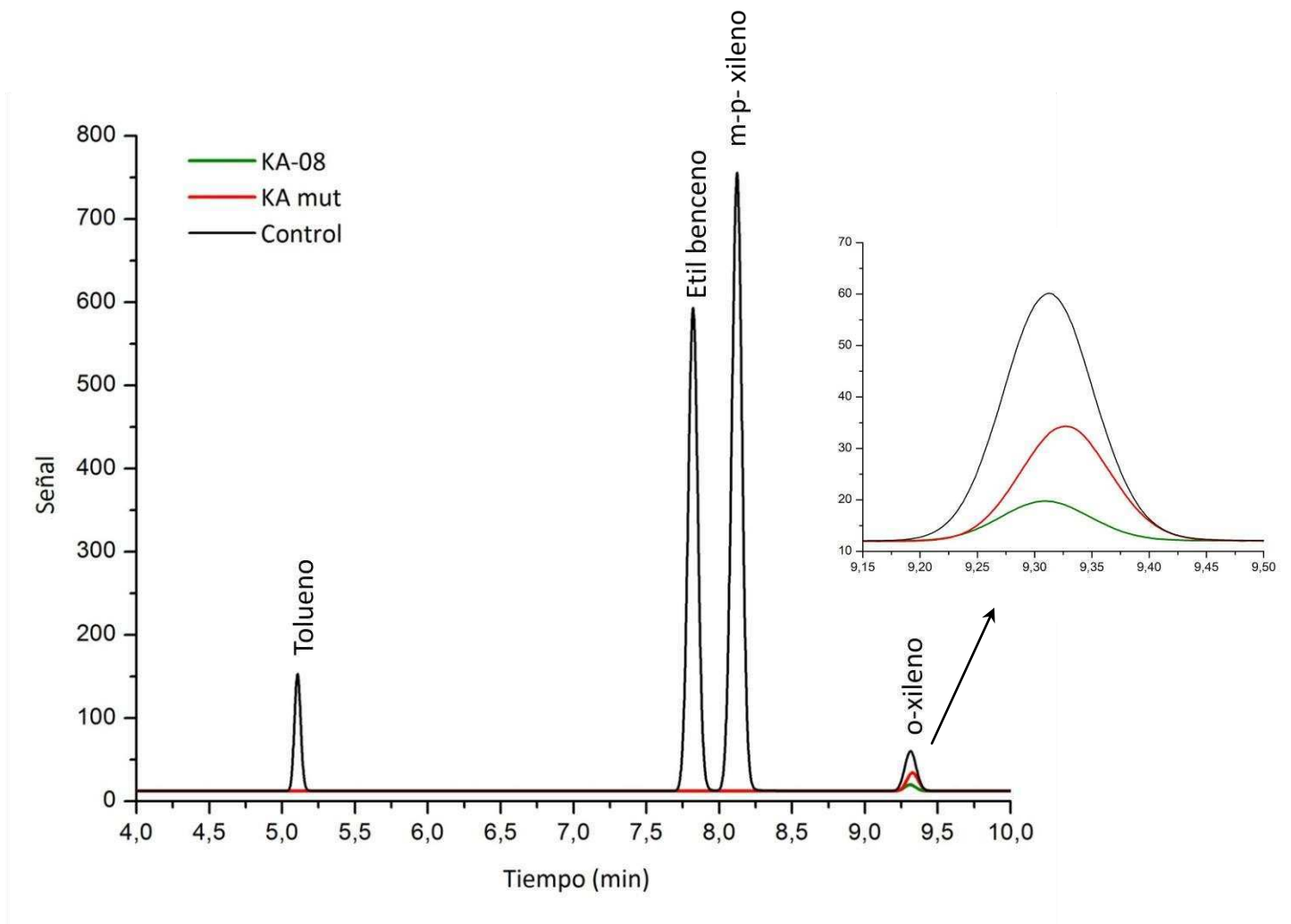


Figura R.18. Cromatogramas correspondientes a la concentración de 430 ppm (0.05% v/v) xileno. Control, sin inocular (línea negra), cromatograma resultante de la degradación por parte de KA-mut (línea roja) y cromatograma resultante de la degradación por parte de KA-08 (línea verde).

Estos resultados demostrarían que la capacidad de producir PHA por la cepa salvaje favorecería la degradación de o-xileno. Resultado que se correlaciona con la disminución observada en la degradación total.

5.5. Análisis de la producción de compuestos biosurfactantes

Un aspecto interesante de los dos compuestos mencionados (PHA y biosurfactantes) es que sus metabolismos están relacionados ya que ambos utilizan los 3-hidroxiácidos como sustrato de síntesis, lo que podría llevar a una asociación entre los dos metabolismos.

Con la finalidad de analizar si la capacidad de degradar PHA ya acumulados le podría conferir a las cepas utilizadas como inoculantes, los precursores necesarios para la síntesis de surfactantes, se analizó la TS de sobrenadantes libres de células de cultivos de *P. extremaustralis* con diesel como única fuente de carbono. Se observó que los inóculos que presentaban PHA estimularon la producción de biosurfactantes en la condición de biofilms, produciendo una reducción del 5% ($p = 0.029$) en la tensión superficial en comparación con los cultivos que fueron inoculados con bacterias sin el polímero (Tabla R.2).

Los biosurfactantes son compuestos que presentan diversas propiedades. La propiedad más destacada es su capacidad para disminuir la tensión superficial del agua, pero otra función de los surfactantes microbianos es su habilidad para formar emulsiones estables. Aquellos compuestos con actividad emulsificante se denominan bioemulsificantes. Debido a esto, es importante analizar ambos parámetros. Se analizó la tensión superficial (TS) y la actividad emulsificante (E24), en KA-08 y KA-mut.

Cuando las cepas KA-08 y KA-mut fueron crecidas en condiciones de acumulación de PHA, la cepa salvaje mostró una reducción en la TS mayor que la cepa mutante, mientras que cuando fueron crecidas en medio LB (medio de no acumulación de PHA), ambas cepas presentaron una TS similar, siendo esta última igual al control (Figura R.19). Estos resultados evidencian que la cepa salvaje fue capaz de secretar compuestos que reducen la TS cuando es crecida en medio de acumulación, mientras que KA-mut, no fue capaz de producir dicho compuesto (Figura R.19).

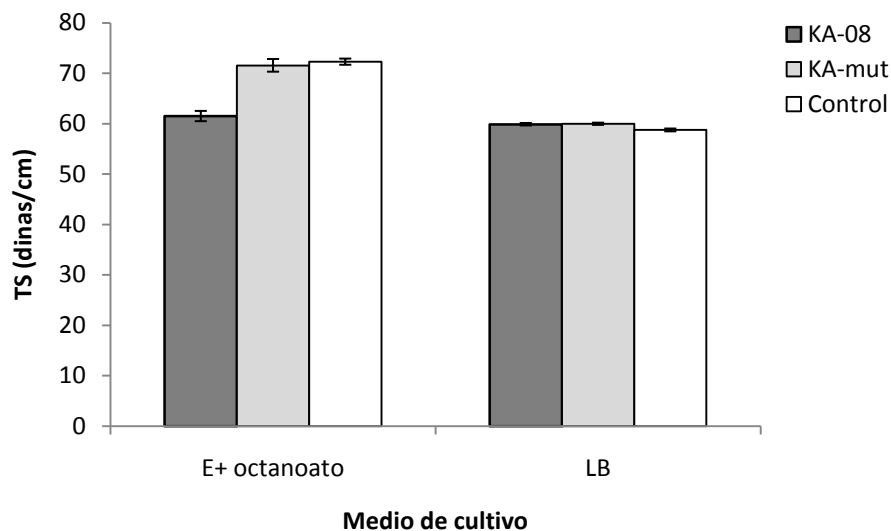


Figura R.19. Análisis de la producción de surfactantes, mediante la medición de la Tensión Superficial en sobrenadantes libres de células de cultivos realizados en condiciones de acumulación y no acumulación de PHA.

Estos resultados indicarían que además de la fuente de carbono, la capacidad de acumular PHA afectaría la producción de compuestos tensioactivos.

Por otra parte, el ensayo E24 reveló que ambas cepas producen biosurfactantes con una alta actividad emulsificante, cercana al 60% cuando son crecidas en medio de acumulación de PHA, y cercana a 20% cuando son crecidas en medio LB. Este resultado muestra que solo la fuente de carbono estaría afectando la producción de biosurfactantes con capacidad emulsificante y no así, la capacidad de acumular PHA (Figura R.20).

Finalmente, se realizaron ensayos de TLC y placas CTAB para la cepa KA-mut, obteniéndose resultados similares a los presentados para KA-08.

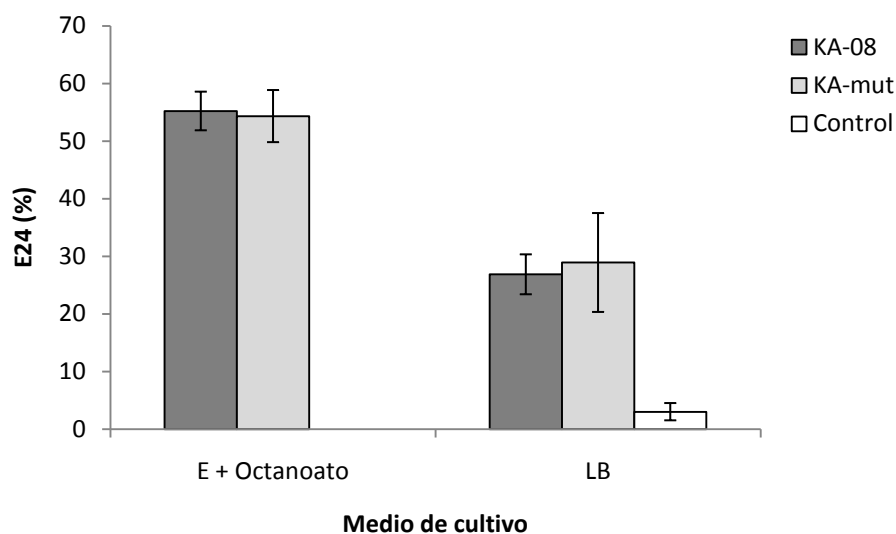


Figura R.20. Índice de emulsificación ensayado en sobrenadantes libres de células de cultivos crecidos en condiciones de acumulación y no acumulación de PHA.

5.6. Determinación de la afinidad celular a un hidrocarburo

Los microorganismos a ser utilizados en remediación de ambientes contaminados deben presentar ciertas características que les permitan sobrevivir en estos ambientes. Debido a que se ha sugerido que la capacidad de adherirse a hidrocarburos es una característica de los microorganismos degradadores, se analizó dicha capacidad en KA-08 y KA-mut, mediante el análisis de MATH, utilizando xileno como hidrocarburo de ensayo tal como se detalla en Materiales y Métodos.

Cuando las cepas KA-08 y KA-mut fueron crecidas en medio LB, no se obtuvo diferencia significativa en su adherencia a xileno (Figura R.21.A). Por el contrario, en condiciones de acumulación de PHA, la cepa salvaje presentó una afinidad significativamente menor a xileno que la cepa mutante ($P < 0,0001$). Así mismo, KA-08 mostró una afinidad significativamente menor cuando fue crecida bajo condiciones de acumulación de PHA en comparación de cuando fue crecida en medio LB ($P = 0,0049$).

Para determinar si el efecto observado era cepa dependiente, el mismo análisis de MATH fue realizado en *P. putida* KT2440 y su mutante PHA⁻, *P. putida* GPp104, mostrando resultados similares bajo condiciones de acumulación de PHA, donde la afinidad por el xileno

fue significativamente menor en la cepa salvaje en comparación con la cepa mutante. Cuando la capacidad de acumular PHA fue restaurada en la cepa *P. putida* GPp104 mediante la complementación con un plásmido que contenía a una enzima PHA polimerasa de clase II, su afinidad a xileno fue similar a la de la cepa salvaje (Figura R.21.B).

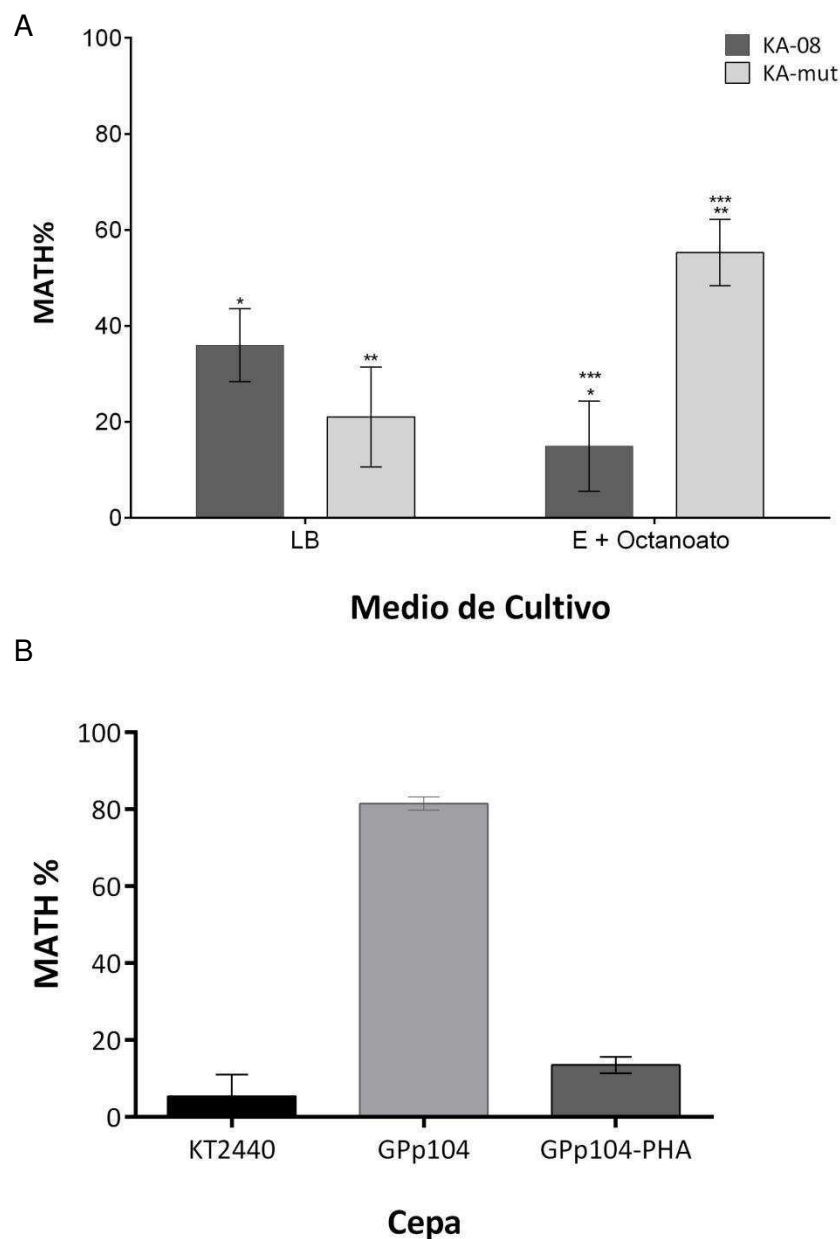


Figura R.21. Ensayo de adherencia microbiana a hidrocarburos (MATH) realizado en, A) KA-08 y KA-mut en condiciones de acumulación y no acumulación de PHA y, B) *P. putida* KT2440, Gpp104, y GPp-PHA crecidas en condiciones de acumulación de PHA.

Estos resultados demuestran que la condición de cultivo y la capacidad de acumular PHA modulan la hidrofobicidad de la superficie celular.

5.7. Perfil proteico de la superficie celular

Dado que, con los resultados obtenidos del análisis de MATH se evidencian propiedades diferentes en las superficies celulares de KA-08 y su mutante PHA⁻, se decidió analizar un posible origen de tal disparidad. Se realizó el estudio de las proteínas de la superficie celular a fin de dilucidar si la capacidad/incapacidad de acumular PHA presenta algún efecto sobre el perfil proteico.

Para analizar las proteínas asociadas a la membrana celular se realizaron cultivos en condiciones de acumulación de PHA, tanto para la cepa salvaje como la mutante PHA⁻. Se analizaron las células luego de 24 horas de crecimiento. Las membranas celulares fueron separadas de los extractos celulares solubles y/o gránulos de PHA (en la cepa KA-08), utilizando un colchón de sacarosa 50% p/v (Figura R.22) y sembradas en geles SDS-PAGE. El gel resultante permitió observar un patrón de bandas proteicas distintivo para cada cepa (Figura R.23).

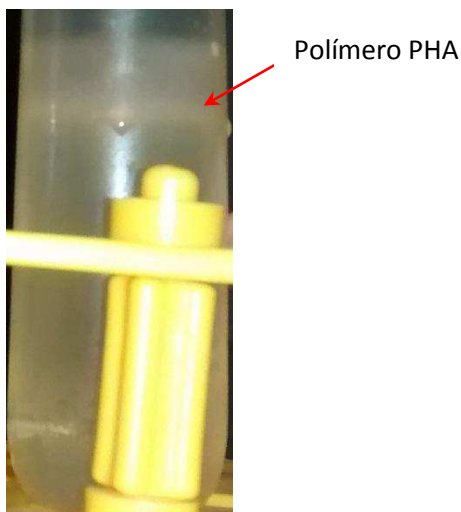


Figura R.22. Fotografía de la banda correspondiente a PHA resultante luego de la centrifugación a 22000 rpm durante 2 h.

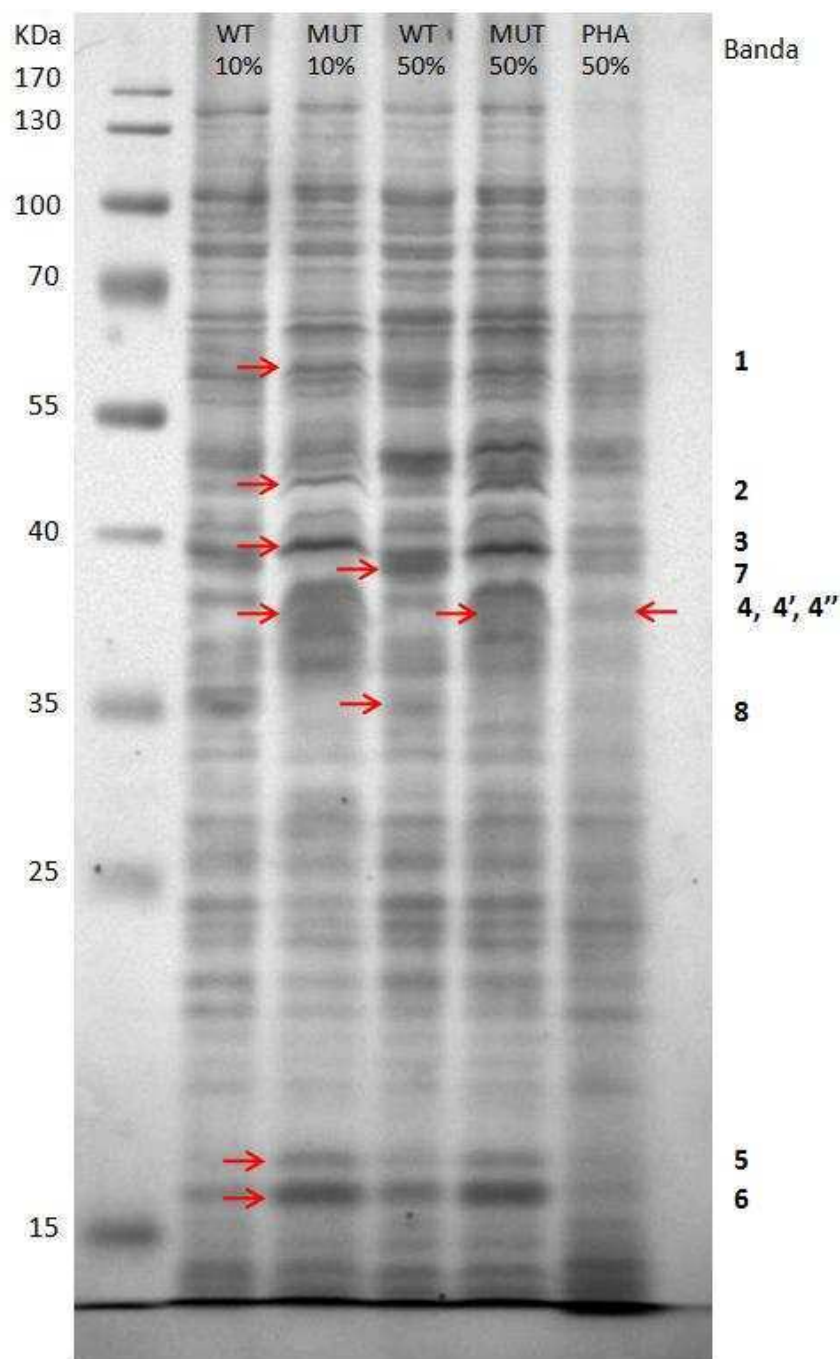


Figura R.23. Perfil electroforéticos de las proteínas asociadas a las membranas celulares de KA-08 y KA-mut, por medio de SDS-PAGE teñido con Coomassie Brilliant Blue. Calle 1: marcador de peso molecular, calle 2: membranas de KA-08 realizado en colchón de sacarosa 10%, calle 3 membranas de KA-mut realizado en colchón de sacarosa 10%, calle 4: membranas de KA-08 realizado en colchón de sacarosa 50%, calle 5: membranas de KA-mut realizado en colchón de sacarosa 50%, y calle 6: gránulos de PHA obtenido en el colchón de sacarosa 50% perteneciente KA-08.

Las proteínas presentes en las membranas celulares fueron analizadas por espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF/TOF. Se seleccionaron 8 bandas para su identificación por estar presentes diferencialmente en las cepas analizadas (Figura R.22). Mientras que las bandas 1, 2 y 3 fueron encontradas únicamente en la cepa mutante, la banda 7 fue hallada solamente en la cepa salvaje. Si bien las bandas 5 y 6 fueron detectadas en ambas, la presencia en KA-mut fue notablemente superior. Por último, se decidió analizar la banda 4 por presentarse tanto en la cepa mutante como en los gránulos de PHA, y estar ausente en la cepa salvaje. Esta banda en particular fue ensayada por espectrometría tres veces, tomando la muestra de los lugares señalizados como 4, 4' y 4''. En las tablas R.6 y R.7, se detallan los resultados obtenidos del análisis de los espectros pertenecientes a cada banda determinado por el programa MASCOT. La banda 8 no pudo ser caracterizada debido a que los espectros obtenidos no fueron lo suficientemente contundentes para poder desarrollar un análisis.

Tabla R.6. Bandas proteicas analizadas en KA-mut

Banda	Referencia	Función asociada
1	<i>Pseudomonas putida</i> : McpT-1	Quimiotaxis positiva hacia hidrocarburos mono y di-aromáticos
2	<i>Pseudomonas putida</i> : TolC1, familia 1	Porina de secreción de antibióticos e hidrocarburos
3	<i>Pseudomonas putida</i> : proteína de membrana	Posible porina
4 y 4'	<i>Pseudomonas putida</i> : OprF	Porina estructural. Multifunción.
5	<i>Pseudomonas</i> sp. TJI-51: H1, OprH	Porina catiónica divalente. Estabilizar la membrana.
6	<i>Pseudomonas</i> : OprL	Lipoproteína asociada a peptidoglicano. Mantenimiento de la envoltura celular.

Tabla R.7. Bandas proteicas analizadas en KA-08

Banda	Referencia	Función asociada
4''	<i>Pseudomonas putida</i> : OprF	Porina estructural. Multifunción.
5	<i>Pseudomonas</i> sp. TJI-51: H1, OprH	Porina catiónica divalente. Estabilizar la membrana.
6	<i>Pseudomonas</i> : OprL	Lipoproteína asociada a peptidoglicano. Mantenimiento de la envoltura celular.

La proteína detectadas en KA-08, ausente en KA-mut, (banda 7), se identificó como el factor de elongación Tu, proteína Tuf-1 (EF-Tu / Elongation Factor Tu). Debido que esta descrita como una proteína de 43 kDa, y la banda en la cual fue detectada es menor a 40 kDa, no se prosiguió con su análisis.

5.8. Biosorción de cobre

Al observar que la superficie celular se ve modificada (en su hidrofobidad y perfil proteico) dependiendo de la presencia o ausencia de gránulos internos de polihidroxicanoatos, se decidió investigar si tal alteración podría presentar algún efecto sobre fenómenos de remediación donde la superficie celular sea protagonista. Los metales, son algunos contaminantes que pueden co-existir con distintos hidrocarburos y a su vez, puede ser depurados ambientalmente mediante su adherencia a la superficie celular. Se decidió analizar la biosorción, como estrategia basada en la adsorción del metal de interés a la superficie microbiana.

En una primera instancia, se estimó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las cepas KA-08 y KA-mut a CuSO₄. Estos estudios mostraron que ambas cepas exhibían una alta resistencia al metal en medio LB. Como dicho medio presenta compuestos complejantes de Cu(II), se analizó la MIC en medio LB diluido al medio (LBx0.5). Al realizar en ensayo con LB diluido la biodisponibilidad del Cu(II) será mayor, lo que evidencia la verdadera tolerancia a dicho metal. Los resultados obtenidos en LBx0.5 muestran una MIC cercana a 4 mM para ambas cepas.

A fin de poder determinar el momento de medición de los ensayos de biosorción, se realizó la cinética de adsorción siguiendo la retención de Cu(II) en función del tiempo (Figura R.24). A partir de la hora de iniciado el ensayo, el porcentaje de biosorción se mantuvo prácticamente constante, cercana al 50% para la cepa KA-08 y 60% para la cepa KA-mut, cuando la concentración ensayada de Cu(II) fue 1mM. Al no observar amplias modificaciones en la cinética de absorción, se decidió realizar el estudio de biosorción de las distintas concentraciones de Cu(II), a las 24 h de exposición al metal.

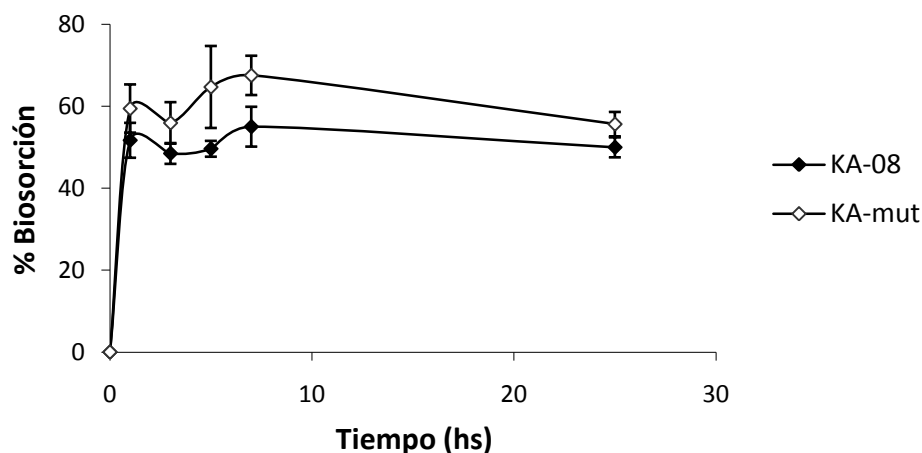


Figura R.24. Curvas de la cinética de biosorción de Cu(II) pertenecientes a KA-08 y KA-mut. Total del cobre biosorbido como % de la concentración inicial en función del tiempo de incubación, utilizando inóculos provenientes de condiciones de acumulación de PHA.

Los parámetros de adsorción obtenidos luego de la linealización de las isothermas obtenidas de los ensayos de biosorción de Cu(II) (Figura R.25), mostraron que la biosorción mediada por KA-08 y KA-mut se ajustan a el modelo de Langmuir ($R^2_{wt} = 0.9638$ y $R^2_{mut} = 0.9821$) (Figura R.25.B). Dicho modelo asume que la adsorción ocurre en una monocapa, que todos los sitios de adsorción son iguales y que la energía de adsorción de todos los sitios es idéntica e independiente de la presencia de especies adsorbidas en los sitios vecinos.

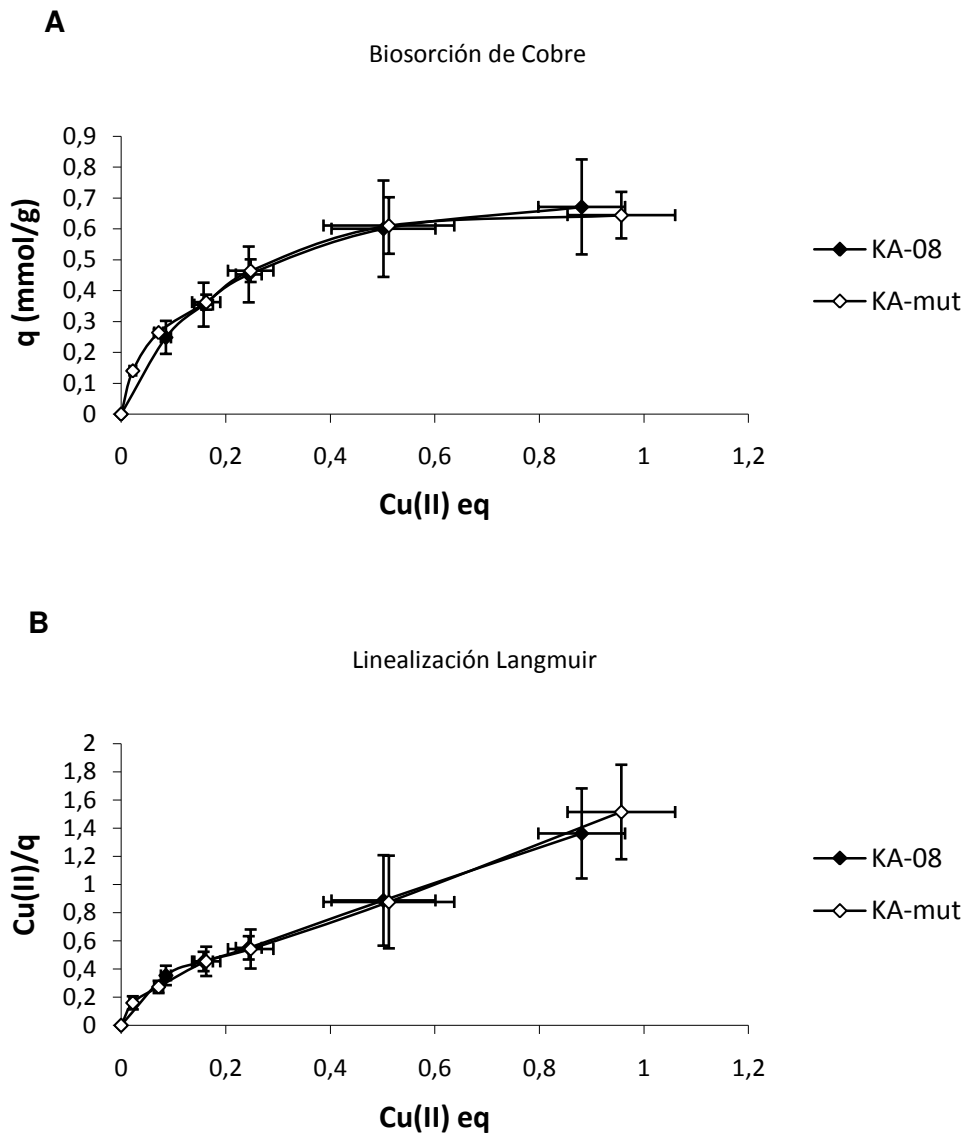


Figura R.25. A) Isotherma de biosorción de cobre pertenecientes a KA-08 y KA-mut, siendo, q (número de sitios ocupados en mmoles por gramo de peso seco celular) vs. Concentración de cobre en el equilibrio y B) Linealización por el modelo de Langmuir. Se utilizaron inóculos provenientes de condiciones de acumulación de PHA.

Se obtuvieron los parámetros $K_d = 0,12 \pm 0,01$ mM y $q_{m\acute{a}x} = 0.74 \pm 0.18$ mmol/g ($47,02 \pm 11,4$ mg/g) de peso seco para la cepa KA-08 y, un $K_d = 0,09 \pm 0,02$ mM y $q_{m\acute{a}x} = 0,70 \pm 0,10$ mmol/g ($44,5 \pm 6,3$ mg/g) de peso seco para la cepa KA-mut. Mientras que la constante de disociación (K_d) es la inversa de la constante de afinidad de los sitios de unión ($K_a = 8,33$

mM^{-1} para KA-08 y $K_a = 11,11 \text{ mM}^{-1}$ para KA-mut), el $q_{\text{máx}}$ representa la máxima cantidad de cobre que forma una monocapa en la superficie celular por unidad de peso seco (capacidad de saturación teórica).

Los resultados obtenidos muestran una alta adsorción de Cu(II) por parte de ambas cepas y evidencian que la capacidad de producir PHA no modifica dicha adsorción.

Conclusiones y Discusión

***Pseudomonas extremaustralis* presenta una enzima alcano monooxigenasa, que sería capaz de oxidar alcanos de cadena larga y se activaría preferentemente en la condición de biofilms.**

Los alcanos son ubicuos en el medio ambiente debido a su origen natural y a la contaminación por hidrocarburos, y muchos microorganismos aeróbicos son capaces a utilizar estos compuestos altamente reducidos como fuentes de carbono y energía (van Beilen et al. 2003). Esto explica por qué es relativamente común encontrar cepas degradadoras de alcanos en ambientes prístinos, acuíferos y agua de mar contaminados con petróleo.

Los genes involucrados en la oxidación de alcanos han sido descritos principalmente en *Pseudomonas putida* GPo1, hallándose codificados en el plásmido OCT (van Beilen et al. 2003). Uno de estos genes es el que codifica para una n-alcano monooxigenasa (*alkB*), para la cual se han detectado genes homólogos en un gran número de especies bacterianas, como es el caso de *P. extremaustralis*. El análisis bioinformático realizado sobre su genoma reveló la presencia de los genes *alkB*, *alkG* y *alkT*, perteneciente al sistema de degradación *alk*. En condiciones de biofilms, *P. extremaustralis* fue capaz de crecer degradando alcanos de cadena larga. Estos resultados son consistentes con la alta similitud encontrada entre la secuencia de la enzima AlkB de *P. extremaustralis* y las secuencias AlkB pertenecientes a *P. fluorescens* CHA0 y *Rhodococcus* sp. Q15, que son capaces de degradar sólo alcanos de más de C12 (van Beilen et al 2003; Whyte et al., 2002).

Al analizar el crecimiento *P. extremaustralis* cuando se utilizó diesel como única fuente de carbono, se observó un crecimiento diferencial en cultivos realizados en condiciones de biofilms o de frascos agitados. También se observó que la presencia de PHA en los inóculos produjo un ligero incremento en el crecimiento en ambas condiciones, el cual podría estar relacionado con la utilización del polímero como fuente de carbono y energía de fácil acceso, adicional al diesel agregado. Si bien en frascos agitados, *P. extremaustralis* apenas incrementó su biomasa, fue capaz de desarrollarse cuando se complementó con los genes *alk* de *P. putida* GPo1 codificados en el plásmido pGEc47. Es interesante observar que la degradación de los alcanos presentes en el diesel en los cultivos de frascos agitados, cuando se utilizó *P. extremaustralis*/pGEc47 como inóculo, mostró que sólo fueron

degradados alcanos menores a C12. Estos resultados concuerdan con la actividad de la alcano monooxigenasa de *P. putida* GPo1, cuyo principal sustrato son los alcanos de cadena corta (C5-C12). Sin embargo, en condiciones de biofilm, no se observó la degradación de los alcanos de cadena corta. Por el contrario, la capacidad de degradación de *P. extremaustralis* / pGEc47 cuando se desarrolló en la condición de biofilms fue similar a la cepa salvaje, ya que fue sólo capaz de degradar alcanos de cadena larga y ramificados.

Las diferencias en la longitud de los alcanos degradados en la condición biofilms y en los cultivos de frascos agitados pueden atribuirse a la enzima AlkB. En la condición de biofilms, estaría actuando únicamente la alcano monooxigenasa de cadena larga AlkB propia de *P. extremaustralis*, y no estaría siendo activa la alcano monooxigenasa de cadena corta AlkB codificada en el plásmido pGEc47. En la condición de frascos agitados, ocurriría la situación inversa. Una probable explicación sería que la proteína AlkB perteneciente a *P. extremaustralis* podría ser expresada preferentemente en condiciones de alta densidad celular o que presentara una mayor afinidad por el oxígeno, haciéndola más activa en la condición de biofilms (ambiente microaeróbico). Se ha descrito que las diferentes enzimas alcano hidroxilasas pueden tener propiedades distintas o puede ser inducidas bajo condiciones diferentes. La alcano monooxigenasa AlkB2 de *P. aeruginosa* PAO1, se expresa en la fase exponencial temprana y es reprimida cuando disminuye la tasa de crecimiento, mientras que la enzima AlkB1 se expresa a altas densidades celulares y tiene una mayor afinidad por el oxígeno (Marín et al. 2003).

Estudios recientes realizados por la técnica de RNAseq, han demostrado que el gen *alkB* perteneciente a *P. extremaustralis*, presenta su mayor capacidad de activación en condiciones de microaerobiosis, resultados que concuerdan con lo expuesto anteriormente (Tribelli comunicación personal).

También se ha informado de que varios contaminantes orgánicos tienen efectos tóxicos sobre las comunidades microbianas mediante la activación del estrés oxidativo (Shao et al. 2010). Por lo tanto, es probable que la condición de biofilm permita a las bacterias hacer frente al estrés causado por la presencia del contaminante. En ambientes microaeróbicos contaminados con hidrocarburos, el oxígeno podría estar siendo utilizado principalmente para la oxidación inicial de dichos compuestos mientras que como aceptor de electrones en la cadena respiratoria se utilizarían NO_3^- o SO_4^{2-} de estar presentes (Chayabutra and Ju 2000).

Por otro lado, varios informes indican que un ambiente estresante aumenta la adhesión celular a diferentes sustratos (Costerton et al. 2003; Pumbwe et al. 2007). Por lo tanto, un alto índice de adherencia podría estar indicando que en una condición dada, las células estarían más estresadas que las que presentan un índice de adherencia menor. La adherencia más baja detectada cuando los inóculos provenían de condiciones de acumulación de PHA, podría sugerir que el polímero confiere una ventaja en el medio ambiente estresante causada por la presencia de los hidrocarburos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los ensayos de estrés por frío, donde *P. extremaustralis* con acumulación PHA fue capaz de liberarse del biofilm y adquirir un estilo de vida planctónico (Tribelli and López 2011).

Otra vía involucrada en la degradación de alcanos está relacionada con la superfamilia del citocromo P450, especialmente la subfamilia CYP153. A pesar de que el genoma de *P. extremaustralis* presenta una secuencia con similitud a los citocromos P450 (No. de Acceso: PE143B_0106965), al ser comparada con la secuencias aminoacídica de CYP153 de *Acinetobacter* sp. EB104 (cepa modelo para este sistema), mostró una identidad de solamente un 24%. Según Maier (2001), los miembros de una misma familia de proteínas citocromo P450, deben tener más de 40% de identidad de secuencia. Por otro lado, el estudio de la estructura secundaria de dicha proteína mostró la presencia de los dominios característicos de la familia CYP151A perteneciente *Streptomyces thioluteus*, el cual está involucrado en la formación del antibiótico aureotín (Zocher et al. 2011). De esta forma, la baja identidad obtenida, junto a los resultados de la comparación de la estructura secundaria, permitirían descartar la presencia de esta vía metabólica en *P. extremaustralis*.

Finalmente, la presencia del gen *xyIE* detectado mediante el análisis bioinformático del genoma de *P. extremaustralis*, podría estar relacionada con la detoxificación de otros sustratos que son metabolizados a catecol o metilcatecol, como por ejemplo los compuestos fenólicos.

***Pseudomonas* sp. KA-08 es altamente eficiente en la degradación de hidrocarburos monoaromáticos.**

Debido a que el aislamiento KA-08 presentó un mejor desempeño general en comparación con la cepa KB-08, los ensayos realizados para analizar el efecto de la presencia de PHA sobre la degradación hidrocarburos monoaromáticos, la síntesis de biosurfactantes y características de la superficie celular solo fueron desarrolladas con KA-08 y su mutante PHA⁻.

El análisis de las secuencias nucleotídicas de los amplicones obtenidos de los genes claves en la degradación de hidrocarburos monoaromáticos, mostró que KA-08 presenta una gran similitud con los genes homólogos presentes en el plásmido pWWO de *P. putida* mt-2. Debido a esto, se decidió analizar si era posible aislar un plásmido semejante a pWWO a partir de KA-08. Aunque se implementaron varias estrategias para realizar su extracción, la misma no pudo lograrse, sin embargo, la existencia de un plásmido tipo pWWO en KA-08 no puede descartarse. Por otra parte, KA-08 fue la única en mostrar producto de amplificación para el gen *todC1*, con una similitud nucleotídica del 100% con los genes homólogos presentes en *P. putida* F1, revelando que esta cepa comparte información genética catabólica similar con dos de las *Pseudomonas* más competentes en la degradación del tolueno (Brim et al. 2006).

Debido a que la presencia de ambas vías catabólicas es de gran importancia para la elección de agentes de bioremediación, se han implementado varias estrategias para la construcción de cepas recombinantes que logren la degradación eficiente de los diferentes compuestos BTEX (Brim et al. 2006; Mroziak and Piotrowska-Seget 2010).

- Haro y de Lorenzo (2001), han reportado la construcción de una cepa recombinante mediante la introducción del sistema de TOD de *P. putida* F1 y toda la vía superior TOL del plásmido pWWO de *P. putida* mt-2, en el cromosoma de una cepa *Pseudomonas* degradadora de 2-clorobenzoato. Esta cepa no fue capaz de expresar estos genes catabólicos debido a que su maquinaria transcripcional fue redirigida a la activación de los genes de respuesta a estrés (de Lorenzo 2009).

- También se ha informado de que algunos de los problemas asociados con los microorganismos modificados genéticamente (GEMs - Genetically Engineered Microorganisms) para fines de biorremediación, es su reducida capacidad de adaptación en comparación con las comunidades microbiana indígenas del ambiente contaminado (Skerker et al. 2009).

La capacidad de KA-08 para degradar-BTEX, podría ser la responsable de la mayor parte de la degradación detectada en el kerósen, dado que estos hidrocarburos monoaromáticos representan alrededor del 13,7% de los hidrocarburos presentes en el mismo (Coleman et al. 1984).

El análisis de la degradación de hidrocarburos monoaromáticos, no solo evidencia la excelente tasa de degradación de xileno (entre los BTEX restantes) por parte de KA-08, en comparación con otros organismos remediadores, si no que demuestra que, la velocidad de degradación aumenta al exponerla a concentraciones mayores del contaminante (Tabla C.1). Es interesante mencionar, que pudo observarse la degradación de los tres isómeros de xileno, debido a que, en términos generales, la capacidad de mineralizar los tres hidrocarburos simultáneamente por el mismo organismo es un evento poco frecuente (Colombo 2004).

Tabla C.1. Comparación de la tasa de degradación con distintos estudios de biorremediación realizados.

Organismo	Compuesto	Tasa (mg/L/h)	Referencia
KA-08	Mezcla isómeros de xileno	9.94 y 21.35	Este trabajo
KA-mut	Mezcla isómeros de xileno	9.9 y 21.05	Este trabajo
<i>P. putida</i> CCM1 852	xileno	2.55	Otenio et al. 2005
Consorcio (Bioreactor)	m-xileno	14	Gardin et al. 1999
<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC 55595 (Bioreactor)	p-xileno en presencia de tolueno	18	Collins and Daugulis 1999

Consorcio (Bioreactor)	p-xileno en presencia de naftaleno	15	Kermanshashi pour et al. 2005
Co-cultivo <i>P. fluorescens</i> y <i>P. putida</i> (Botellas)	o-xileno	0.8	Shim et al. 1999
Co-cultivo <i>P. fluorescens</i> y <i>P. putida</i> (Inmovilizadas)	o-xileno	12.8	Shim et al. 1999

La degradación específica de o-xileno se vio favorecida en un 50%, cuando la cepa presentó PHA acumulado en su interior. El metabolismo de los PHA, en conjunto con la degradación de los otros BTEX presentes, estaría favoreciendo, en el corto plazo, la degradación de este compuesto recalcitrante. Se ha reportado que el o-xileno puede no ser degradado por sí solo, pero sí co-metabolizado en presencia de otros compuestos (Attaway et al. 2002; Jeong et al. 2008). También, se ha informado que la exposición previa (Shimp et al. 1985), así como la exposición simultánea (Law and Button 1977) a fuentes de carbono más accesibles, favorecería la degradación de distintos compuestos. Demostrando que el metabolismo de un sustrato particular puede tener efecto sobre la degradación de otro compuesto aparentemente no relacionado, como fue la degradación de o-xileno en presencia de PHA.

La transformación microbiana de los BTX en productos de valor agregado, tales como los PHA ya se ha descrito anteriormente (Nikodinovic et al. 2008). Aparte de la importancia económica debido a sus propiedades termoplásticas, la acumulación de PHA confiere una alta resistencia al estrés (Ayub et al. 2009; López et al. 1995; Pham et al. 2004; Ruiz et al. 2004).

Los polihidroxicanoatos favorecen la producción de compuestos tensioactivos

En una primer instancia se hipotetizó que la presencia de los PHA no sólo podría mejorar la resistencia al estrés, sino también proporcionaría precursores para la síntesis de compuestos implicados en la degradación de hidrocarburos.

En los ensayos realizados en biofilms de *P. extremaustralis* y en los cultivos de frascos agitados de KA-08, la presencia de PHA en los inóculos y la capacidad de acumularlo,

respectivamente, tuvo una influencia positiva en la producción de surfactante. Una probable explicación de este evento, es que la degradación de los PHA liberaría 3-hidroxiacil-CoA que podrían ser utilizado para la producción de biosurfactantes (Soberón-Chávez et al. 2005). La relación entre los PHA y la producción de tensioactivos (ramnolípidos) ha sido descrita previamente en *P. aeruginosa* donde ambas vías metabólicas están relacionadas por los precursores de 3-hidroxiácidos (Rehm et al. 2001; Soberón-Chávez 2005). Es importante mencionar, que otros biosurfactantes con diferente naturaleza química, tales como otros glicolípidos o lipopéptidos, también utilizan precursores de 3-hidroxiácidos para su biosíntesis (Lang 2002; Youssef et al. 2005).

Si bien los PHA producidos por *P. extremaustralis* y KA-08, favorecerían la producción de estos compuestos, los mismos no presentarían gran poder tensioactivo debido a que se considera un buen surfactante a aquel que puede reducir la tensión superficial del agua de 72 a 35 dina/cm (aproximadamente una reducción del 50%) (Mulligan 2005). Por el contrario, la emulsión producida por los surfactantes derivados de KA-08, es comparable con la de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa*, la cual presenta un excelente poder emulsionante en una variedad de hidrocarburos, compuestos aromáticos y aceites vegetales (Lovaglio et al. 2011; Patel et al. 1997).

Tal como describe Fracchia y col. (2012), los compuestos surfactantes de diferente peso molecular y composición química presentan propiedades tensioactivas y emulsificantes diferentes.

El efecto de la capacidad de acumular PHA sobre el o los compuestos responsables de disminuir la TS, en contraposición de los resultados que muestran que el índice de emulsificación no varía con la capacidad de acumular el polímero, podría indicar que más de un compuesto biosurfactante estaría siendo secretado por KA-08. En concordancia en esto, los ensayos de TLC, revelarían la producción de múltiples biosurfactantes de naturaleza glicolípidica y lipídica, que concuerda con dicha hipótesis.

La acumulación de polihidroxicanoatos modifica la hidrofobicidad de la superficie celular

Se ha reportado que las propiedades hidrofóbicas contribuyen a diversos fenómenos de adhesión microbiana (Rosenberg 2006), tales como las interacciones entre las bacterias y los fagocitos, la unión de las bacterias al tejido huésped, la adhesión de las bacterias a superficies sólidas, y a la capacidad de las células microbianas de crecer en hidrocarburos a través del contacto directo con el sustrato inmiscible (Rosenberg et al. 1980).

Si bien se ha sugerido que la capacidad de adherirse a hidrocarburos líquidos es una característica de los organismos degradadores, una mayor adhesión a estos no implica necesariamente una mayor capacidad para degradarlos (Rosenberg et al. 1980). Premisa que concuerda con nuestros resultados.

La mayor afinidad por el xileno que presentó la cepa mutante PHA⁻ podría estar relacionada a la presencia de una composición química diferencial en su superficie celular, en comparación a la que presenta KA-08. Se han informado diferentes características de la superficie celular, que afectan las propiedades hidrofóbicas de las mismas:

-Chang et al. 2009, ha descrito que una mayor acumulación de ácidos grasos está relacionada con una mayor hidrofobicidad en la superficie celular. Debido a que KA-mut es incapaz de utilizar acil-CoA para sintetizar PHA, podría estar ocurriendo un redireccionamiento de los flujos de carbono, por lo que este precursor podría estar siendo dirigido a la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

-McEldowney et al. 1986, ha informado que la composición particular de proteínas y exopolisacaridos de ciertas bacterias favorecería la adhesión a superficies con distinto grado de hidrofobicidad.

-También se ha correlacionado un aumento de la hidrofobicidad de la superficie y adhesividad celular con el aumento del contenido de proteínas de la superficie durante el crecimiento (Dufrêne and Rouxhet 1996).

Por otra parte, se ha informado que las condiciones nutricionales modifican la hidrofobicidad y la consecuente adherencia superficial (Brown et al. 1977; Dawson et al. 1981; McEldowney

et al. 1986). La presencia de PHA en KA-08, y la ausencia del mismo en KA-mut, constituye una deficiencia de una fuente de carbono y energía de fácil acceso en la cepa mutante, lo que podría ser censado como una condición nutricional diferencial entre ambas bacterias.

La acumulación de polihidroxicanoatos modifica el perfil proteico de la superficie celular

Los PHA se organizan como gránulos intracelulares rodeados de una capa de fosfolípidos con proteínas embebidas (Knoll et al. 2009), tales como PHA polimerasas y depolimerasas, y varias proteínas estructurales (no enzimáticas). Se ha informado que estas últimas, parecerían ser estructuralmente similares a proteínas encontradas en la superficie celular de muchas especies bacterianas de *Pseudomonas* (Stuart et al. 1998). Stuart et al. (1995), ha reportado en *P. oleovorans* (actualmente *P. putida*), la detección de una proteína de 43 kDa, normalmente asociada a la superficie de los gránulos de PHA, en el citoplasma de la misma bacteria en condiciones de no acumulación del polímero. Por lo tanto, describe que una proteína, generalmente asociada con la superficie externa, también puede estar presente en el citoplasma bacteriano e involucrada en la generación de complejos de inclusión de poliésteres.

En concordancia con lo mencionado anteriormente, nuestros resultados podrían sugerir que, aquellas proteínas que se encuentran sobre expresadas en la superficie de la cepa PHA⁻, podrían ser aquellas que se encuentran tanto en la superficie del granulo como en la superficie celular, las cuales podrían estar siendo redistribuidas a la superficie celular en la cepa KA-mut, dada su imposibilidad de sintetizar PHA. Además, es importante mencionar que la superficie de granulo es hidrofóbica (Jendrossek and Pfeiffer 2014), por lo que, de existir un redireccionamiento de algunas de las proteínas que están sobre la superficie de granulo, a la superficie celular, estas podrían estar favoreciendo la adhesión a compuestos de naturaleza hidrofóbica.

Por otra parte, el mecanismo por el cual se comienza a formar el granulo de PHA en la célula bacteriana podría tener cierta relación con las proteínas presentes en la membrana celular. En la actualidad, existen tres modelos que tratan de dar una explicación de cómo se origina

la síntesis y la localización intracelular de los mismos. El Modelo de Micelas, asume que si el sustrato inicial es suficiente, la PHA sintasa soluble comienza a sintetizar la molécula de PHA. Debido al carácter hidrofóbico y la baja solubilidad en agua, el PHA se agregaría y formaría una estructura tipo micelar. Luego, las proteínas propias del granulo se unirían al mismo. En función al Modelo de Micelas, el inicio de la formación y la localización final de los gránulos, podría suceder en cualquier localización del citoplasma. El segundo modelo, el Modelo *Scaffold*, supone que la PHA sintasa de un gránulo de PHA naciente, se une a una molécula *scaffold* aún desconocida dentro de la célula. En este caso, la localización subcelular de los gránulos de PHA dependerá de la naturaleza y la localización de esta molécula. Por último, el tercer modelo, el Modelo de Gemación (Figura C.1) asume que la PHA sintasa se encuentra conectada directa o indirectamente a la membrana citoplasmática y que el crecimiento de la cadena hidrofóbica de PHA se libera dentro de la bicapa lipídica, dando lugar a la formación de un gránulo dentro de la membrana citoplasmática. Una vez que el gránulo ha alcanzado un tamaño determinado, se libera y las proteínas se pegan al gránulo. Si este modelo está en lo correcto, al menos en la primera etapa de la formación de los gránulos, ciertas proteínas asociadas al granulo podrían localizarse dentro de la membrana citoplasmática (Jendrossek and Pfeiffer 2014).

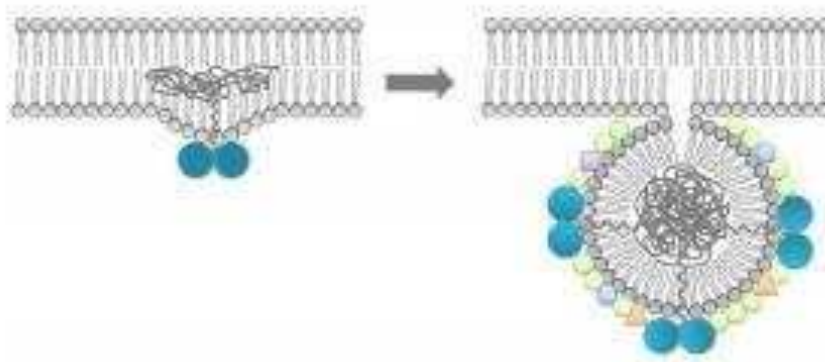


Figura C.1. Modelo de Gemación mostrando la formación de gránulos en la membrana citoplasmática (Jendrossek and Pfeiffer 2014).

Una de las proteínas que fue detectada en la superficie celular de la cepa KA-mut y en el granulo PHA (banda 4), se analizó por MALDI TOF/TOF. La misma, se correspondió con la porina OprF. Esta proteína de 38 kDA (valor que concuerda con el peso de la banda 4), que

se une al peptidoglicano subyacente, se ha descrito como multifuncional. Entre las funciones a las que se encuentra asociada, se describe como necesaria para el mantenimiento de la integridad celular y como un canal de difusión poco específico, por el cual puede atravesar compuestos hidrofóbicos como el tolueno (Li et al. 1995; Volkers et al. 2006). Jendrosseck y Pfeiffer (2014), han reportado el análisis de las proteínas asociadas a gránulos de PHB, en el cual, describen la presencia de una gran cantidad de proteínas de la membrana externa, entre ellas diferentes porinas.

El último modelo descrito para la formación de gránulos de PHA, en conjunto con lo mencionado anteriormente, permitiría explicar la existencia compartida de proteínas en la superficie del gránulo y la superficie celular.

Una de las proteínas detectadas en KA-mut, ausente en KA-08, se identificó como una proteína implicada en la quimiotaxis, denominada McpT-1 (Methyl-accepting Chemotaxis Proteins). Las moléculas MCP suelen presentar un dominio de unión al ligando periplásmico, dos hélices transmembrana, un dominio de señalización citoplasmática muy conservado, y un peso molecular de entre 56-74 KDa (Meier et al. 2007), que concuerda con el peso en la cual fue detectada la banda 1. En particular, McpT-1 fue descrita como una proteína relacionada en la quimiotaxis hacia el tolueno, benceno, y etilbenceno entre otros hidrocarburos mono y di-aromáticos (Krell et al. 2013; Molina et al. 2011). Esta proteína estaría implicada en una hiperquimiotaxis, que permitiría a las células unirse a la superficie del compuesto attractante (Krell et al. 2013). Otra de las proteínas encontradas en KA-mut, ausente en KA-08, se identificó como una porina de secreción, denominada TolC familia tipo 1. La misma, es una proteína de la membrana externa, perteneciente a un sistema de transporte que involucra dos proteínas más, una proteína periplasmática (MFP- Membrane Fusion Protein) y otra presente en la membrana interna (esta última pudiendo ser del sistema de transporte RND, ABC, MFS, entre otros). TolC puede interactuar con distintas proteínas MFP, lo que le permite transportar diferentes sustratos. (Paulsen et al. 1997). Si bien forma parte del sistema descrito en *E. coli*, AcrAB-TolC, presenta homología con el sistema de secreción, MexAB-OprM, presente en algunas *Pseudomonas* (Aono et al. 1998; Lomovskaya et al. 2000). TolC presenta un peso molecular de 53 KDa (Aono et al. 1998), valor que concuerda con el peso en la cual fue detectada la banda 2. Se ha descrito que esta proteína está implicada en la tolerancia a antibióticos hidrofóbicos y compuestos hidrocarburos (Aono et al. 1998; Mosqueda et al. 2000).

Por lo tanto, la mayor adherencia observada en la cepa KA-mut al xileno (Ensayo de MATH), podría también relacionarse a la presencia de la proteína receptora McpT-1, y la porina de secreción TolC, que presentan una clara interacción con compuestos hidrofóbicos.

Si bien las siguientes proteínas fueron detectadas en KA-08 y su mutante PHA, la presencia en KA-mut fue notablemente superior. La proteína de la banda 5 fue identificada como la porina H1, OprH. Se ha descrito que esta proteína es sobreexpresada en condiciones de deficiencia de cationes divalentes en el medio de cultivo. La misma, se uniría al lipopolisacárido (LPS) en los sitios donde normalmente se unen cationes divalentes (como el Mg^{2+}), y de esta manera seguiría manteniendo la estabilidad superficial. La sobreexpresión de esta proteína en *Pseudomonas aeruginosa* se asocia con la resistencia a antibióticos policationicos y al EDTA (Bell and Hancock 1989; Nicas and Hancock 1980; Volkers et al. 2006). Por otra parte, la segunda proteína marcadamente sobre-expresada en KA-mut, fue la correspondiente a la banda 6. La misma se identificó como OprL, proteína de 18 kDa, valor que concuerda con la banda analizada. La proteína OprL, lipoproteína asociada a péptidoglicano (PAL-Peptidoglycan-Associated Lipoprotein) está anclada a la membrana externa de bacterias Gram-negativas e interactúa con el peptidoglicano, condicionando su estabilidad. OprL, constituye parte del sistema Tol-Pal, el cual, no solo estaría implicado en el mantenimiento de la estructura y función de la envoltura celular (Godlewska et al. 2009; Rodríguez-Herva et al. 1996; Rodríguez-Herva et al. 1996 b), si no también estaría involucrado en el transporte transmembrana de distintas fuentes de carbono (Llamas et al. 2003).

Las diferentes condiciones metabólicas que condujeron a la sobreexpresión de ambas proteínas sobre la superficie de la cepa KA-mut, deben ser investigadas con mayor profundidad.

La acumulación de polihidroxicanoatos no generaría cambios en la superficie celular implicados en la adsorción a metales pesados

La capacidad de absorción de los metales por distintos organismos (conocido como biosorción o bioacumulación) ha cobrado una gran atención debido a su potencial para proporcionar un medio eficaz y económico para el saneamiento de las aguas residuales contaminadas. La absorción de metales es, por lo general, clasificada en tres categorías: 1) la unión a la superficie celular, 2) acumulación intracelular y 3) la acumulación extracelular. Mientras que la unión a la superficie celular puede ocurrir en microorganismos vivos o inactivados, la acumulación intracelular y extracelular de metales, son procesos generalmente impulsados energéticamente, y por lo tanto sólo puede tener lugar en las células vivas (Chang et al. 1997).

Se han descrito distintas estrategias (estructuras celulares y/o mecanismos activos) que pueden estar involucradas en la adsorción de metales. Los grupos funcionales de polisacáridos, lípidos y proteínas pertenecientes a la pared celular expuestos hacia el exterior celular, podrían retener el metal mediante una interacción físico-química. Algunos ejemplos de estas estructuras son:

-Las bacterias Gram-negativas poseen LPS en su membrana externa, el cual posee una estructura compleja; el lipido A, el oligosacarido *Core*, y el antígeno O, que contiene azúcares. Esta última, se proyecta hacia el exterior, presentando diferentes grupos funcionales que pueden unir metales. Los grupos fosfato del LPS, en conjunto con los fosfolípidos son los sitios electronegativos más abundantes para la unión de metales (Ford et al. 1995).

-Bitton y Freihofner 1978, han reportaron que cepas de *Klebsiella aerogenes* que producen una cápsula de polisacáridos presentaron mayor tolerancia al cobre que las cepas no capsuladas, y a su vez, que las capsulas por si solas unían cobre eficientemente.

Por otra parte, las proteínas Cop (CopA y CopC presentes en el periplasma, y CopB en la membrana externa) aparentemente median el secuestro activo de cobre fuera de la citoplasma como un mecanismo de resistencia. Estas proteínas serían inducidas por cobre (Cha and Cooksey 1991).

Aunque el análisis llevado a cabo se focalizó en las propiedades físico-químicas de la superficie celular para dar explicación al mecanismo de sorción, es importante mencionar que otras estrategias de adsorción también podrían estar ocurriendo (Ej: acumulación energéticamente activa).

Si bien deben realizarse varios estudios para determinar todos los cambios superficiales que genera la presencia de PHA en las células, estos resultados serían un indicio de que la presencia del polímero no estaría afectando considerablemente los posibles sitios de unión del metal, debido a que la adsorción observada en las cepas KA-08 y KA-mut fue prácticamente la misma.

Estos resultados no son los esperados, debido a que, se ha informado que cepas de *Pseudomonas aeruginosa* PHA⁻, evidenciaron sobreproducción de exopolisacáridos alginatos (Pham et al. 2004), los cuales demostraron estar implicados en la mayor tolerancia al cobre observada en distintas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Kazy et al. 2002). Si bien no se ha realizado la caracterización de este exopolisacárido, si la producción de alginatos hubiese sido notablemente afectada, esto debería verse reflejado en la capacidad de unión a metales por parte de KA-mut.

Independientemente de que la presencia de PHA parecería no afectar la captación de cobre en KA-08 y su mutante PHA⁻, ambas cepas mostraron una notable capacidad de adsorción, al comparar el $q_{máx}$ obtenido de los parámetros de Langmuir con los de otros sorbentes bióticos y abióticos (Tabla C.2).

Tabla C.2. Comparación del parámetro de Langmuir $q_{m\acute{a}x}$ entre varios adsorbentes detalladas en la literatura y, KA-08 y KA- mut.

Adsorbente	$Q_{m\acute{a}x}$ (mmol/g peso seco)	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,29	Chang et al. 1997
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0,25	Volesky 1990
<i>Aspergillus niger</i>	0,07	Jonglertjunya 2008
Carbón granulado activado, F-400	0,03	Muraleedharan et al. 1995
KA-08	0,74 ± 0,18	Este trabajo
KA-mut	0,70 ± 0,10	Este trabajo

Por último, la propuesta de este trabajo fue investigar sobre las características que puedan poseer KB-08, y en mayor medida *P. extremaustralis* y KA-08 para ser utilizados en procesos de biorremediación. Independientemente a la estrategia utilizada (remediación *in situ* o *ex situ*), es necesario realizar una valoración de los organismos a ser implementados.

Los organismos a ser utilizados en procesos de bioaumentación deben ser seleccionados en una primera instancia en base a su viabilidad, potencial metabólico, y a la presencia de características esenciales que permitan a las células ser funcionalmente activas y persistentes en las condiciones ambientales deseadas (Tyagi et al. 2011). Por ejemplo, en los sitios co-contaminados, la degradación de contaminantes orgánicos puede verse negativamente afectada en presencia de altas concentraciones de compuestos metálicos (Abha and Singh 2012). En estos casos, la estrategia propuesta involucraría la utilización de organismos multi-resistentes o consorcios microbianos que puedan hacer frente a las condiciones ambientales poco favorables (Tyagi et al. 2011).

Si bien la bioaumentación es utilizada en la actualidad (Salanitro et al. 2000; Tyagi et al. 2011), presenta la dificultad de que muchas veces, estudios a escala de laboratorio exitosos no conducen necesariamente a ser reproducibles cuando son aplicados *in situ*. Esto es debido a que la población introducida se ve afectada debido a varios tipos de estrés presentes, tanto abiótico como biótico. Por lo tanto, realizar únicamente la siembra no es suficiente, y deber ser acompañada de condiciones ambientales adecuadas. A menudo, el

uso de materiales de soporte (la inmovilización o el encapsulado celular) proporciona un contexto “protector” bajo condiciones ambientales estresantes, por lo que permite una degradación más rápida y eficiente en comparación a la generada por la liberación directa de microorganismos (Cunningham et al. 2004; Tyagi et al. 2011).

Por otro lado, la remediación *ex situ* incluye técnicas tales como landfarming, biopiling y el procesamiento de las muestras en biorreactores, junto con procesos térmicos, químicos y físicos (Koning et al. 2000). Si bien, estas técnicas en su conjunto permitirían un mayor control de las variables en las cuales se lleva cabo el proceso de remediación, los costos económicos para desarrollarlas son superiores a la remediación *in situ*.

Conclusión general

Este trabajo permitió profundizar sobre la relevancia de las condiciones de cultivo (planctónica vs. biofilms) para que exista degradación de compuestos hidrocarburos, así como también ahondar en la caracterización de los aislamientos *P. extremaustralis* y KA-08, en relación a su capacidad degradativa.

Los estudios desarrollados en *P. extremaustralis*, KA-8 y KA-mut, han puesto en evidencia que la acumulación de PHA afecta la producción de compuestos tensioactivos, genera cambios significativos en características de la superficie celular modulando propiedades de la superficie implicadas en la adhesión celular, y favorece la degradación de compuestos altamente recalcitrantes como el o-xileno.

Los conocimientos adquiridos en esta tesis permiten plantear que ciertos cambios metabólicos, como la producción de PHA, podrían ser tomados en consideración en el momento de desarrollar estrategias de saneamiento.

Finalmente, la excelente tasa de degradación de hidrocarburos monoaromáticos, en conjunto con la alta tolerancia y tasa de biosorción de cobre obtenida muestran que, KA-08 podría ser evaluada para ser incorporada en procesos de remediación de sitios contaminados con hidrocarburos o metales tales como cobre.

Perspectivas futuras

En un futuro se espera poder realizar distintos estudios que permitan profundizar nuestros conocimientos en relación a las características que deben presentar los organismos, así como las condiciones de cultivo, que maximicen el saneamiento de ambientes contaminados. Los estudios propuestos son:

- Realizar ensayos de degradación de BTEX en función a la concentración y el tiempo de exposición, por parte de KA-08 y su mutante PHA⁻, a fin de dilucidar si la diferencia observada en la degradación de o-xileno (u otros compuestos) puede verse incrementada en presencia de PHA.
- Realizar ensayos de biofilms con las cepas KA-08 y KA-mut, para analizar si las condiciones de cultivo modulan la degradación de hidrocarburos, tal como fue en el caso de *P. extremaustralis*.
- Realizar ensayos de co-contaminación de hidrocarburos y metales, a fin de analizar si la presencia de ambos contaminantes modula la remediación observada individualmente.
- Realizar ensayos en microcosmos, que permitan enriquecer nuestros conocimientos sobre la capacidad remediadora de estos organismos en condiciones ambientales más cercanas a la realidad.

Bibliografía

- Abha S and Singh CS. 2012. "Hydrocarbon Pollution: Effects on Living Organisms, Remediation of Contaminated Environments, and Effects of Heavy Metals Co-Contamination on Bioremediation". *Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil Contaminated Sites*, Dr. Laura Romero-Zerón (Ed.).
- Al-Araji L, Raja Noor Zaliha Raja Abd. Rahman, Mahiran Basri and Abu Baker Salleh. 2007. "Minireview Microbial Surfactant." *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 15(3):99–105.
- Aldor IS and Jay DK. 2003. "Process Design for Microbial Plastic Factories: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoates." *Current Opinion in Biotechnology* 14(5):475–83.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Research* 25(17):3389–3402.
- Anderson AJ and Dawes EA. 1990. "Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates." *Microbiological reviews* 54(4):450–72.
- Aono R, Tsukagoshi N and Yamamoto M. 1998. "Involvement of Outer Membrane Protein TolC, a Possible Member of the *mar-sox* Regulon, in Maintenance and Improvement of Organic Solvent Tolerance of *Escherichia coli* K-12". *Journal of Bacteriology* 180(4): 938-944.
- Arutchevi J and Doble M. 2010. "Characterization of Glycolipid Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* CPCL Isolated from Petroleum-Contaminated Soil." *Letters in Applied Microbiology* 51(1):75–82.
- Atlas RM. 1981. "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective". *Microbiological Review* 45(1): 180–209.
- Atlas RM and Bartha R. 1992. "Hydrocarbon biodegradation and oil-spill bioremediation. In: Marshall, K.C". (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*, vol. 12, Plenum Press, New York, pp. 287–338.
- Atlas RM and Bartha R. 1993. "Ecological aspects of biodeterioration control: soil, waste and water management". *Microbiology Ecology. Fundamentals and Applications*. 3 th Edition. Benjamin Publishing Company, Menlo Park, California. 349-382.
- Atlas RM and Bartha R. 2002. "Interacciones microbianas con contaminantes xenobióticos e inorgánicos". *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. 4ta edición . Pearson's educación SA, Madrid. Pp 509-552.

- Atlas RM and Bartha R. 2002. (b) "Ecología microbiana y Microbiología ambiental". 4^o Edición. PEARSON EDUCACIÓN, S A., Madrid. Capítulo 14, 553-586
- Attaway HH and Schmidt MG. 2002. "Tandem Biodegradation of BTEX Components by Two *Pseudomonas* sp.". *Current Microbiology* 45: 30–36.
- Ayub ND, Pettinari MJ, Ruiz JA and López NI. 2004. "A polyhydroxybutyrate-producing *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance". *Current Microbiology* 49: 170-174.
- Ayub ND, Pettinari MJ, Méndez BS and López NI. 2007. "The Polyhydroxyalkanoate Genes of a Stress Resistant Antarctic *Pseudomonas* Are Situated within a Genomic Island." *Plasmid* 58(3):240–48.
- Ayub ND, Tribelli PM and López NI. 2009. "Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14–3 during low temperature adaptation". *Extremophiles* 13: 59–66.
- Bell A and Hancock REW. 1989. "Outer Membrane Protein Hi of *Pseudomonas aeruginosa*: Purification of the Protein and Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene". *Journal of Bacteriology* 171(6): 3211-3217.
- Bitton G and Freihof V. 1978. "Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*". *Microbial Ecology* 4: 119-125.
- Bossert I and Bartha R. 1984. "The fate of petroleum in soil ecosystems". In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*, New York, pp. 435–473
- Bowen HJM. 1985. The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 1, Part D: *The natural environment and the biogeochemical cycles*, D. Hutzinger (ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 1–26
- Bradford MM. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical biochemistry* 72:248–54.
- Brenner AJ and Harris ED. 1995. "A quantitative test for copper using bicinchoninic acid". *Analytical biochemistry* 226(1): 80-84.
- Brim H, Osborne JP, Kostandarithes HM, Fredrickson JK, Wackett LP and Daly MJ. 2006. "*Deinococcus radiodurans* engineered for complete toluene degradation facilitates Cr(VI) reduction". *Microbiology* 152:2469-2477.

- Brown CM. 1977. "D.C. ELLWOOD and J.R. HUNTER." 1:163–66.
- Burlage RS, Hooper SW and Saylor GS. 1989. "The TOL (pWW0) Catabolic Plasmid." *Applied and Environmental Microbiology* 55(6):1323–28.
- Catone MV. 2013. Identificación y análisis de los genes asociados al metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas extremaustralis*. Dissertation, PhD Thesis, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Cha JS and Cooksey D. 1991. "Copper Resistance in *Pseudomonas syringae* Mediated by Periplasmic and Outer Membrane Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(20):8915–19.
- Chang JS, Law R and Chang CC. 1997. "Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21". *War. Res.* 31(7): 1651-1658.
- Chang WN, Liu CW and Liu HS. 2009. "Hydrophobic cell surface and bioflocculation behavior of *Rhodococcus erythropolis*". *Process Biochem* 44:955–962.
- Chattopadhyay MK. 2006. "Mechanism of Bacterial Adaptation to Low Temperature." *Journal of Biosciences* 31(1):157–65.
- Chayabutra C and Ju L. 2000. "Degradation of *n*-Hexadecane and Its Metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under Microaerobic and Anaerobic Denitrifying Conditions". *Applied and Environmental Microbiology* 66(2): 493-498.
- Christofi N and Ivshina IB. 2002. "Microbial Surfactants and Their Use in Field Studies of Soil Remediation." *Journal of Applied Microbiology* 93(6):915–29.
- Coleman WE, Munch JW, Streicher RP, Ringhand P and Kopfler F. 1984. "The identification and measurement of components in gasoline, kerosene, and no. 2 fuel oil that partition into the aqueous phase after mixing". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13: 171-174.
- Collins L and Daugulis A. 1999. "Simultaneous Biodegradation of Benzene, Toluene, and *p*-Xylene in a Two-Phase Partitioning Bioreactor: Concept Demonstration and Practical Application". *Biotechnology Progress* 15 (1): 74–80.
- Colombo M, Dell'Amico E, Cavalca L and Andreoni V. 2004. "Biodegradation of a BTX Mixture by *Pseudomonas* Strains: Monitoring of Two Co-Cultured Strains by Polymerase Chain Reaction of Catabolic Genes." *Annals of Microbiology* 54(4):381–92.
- Cooper DG and Goldenberg BG. 1987. "Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species." *Applied and Environmental Microbiology* 53(2):224–29.
- Costerton W, Veeh R, Shirliff M, Pasmore M, Post C and Ehrlich G. 2003. "The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections". *J. Clin. Invest.* 112:1466–1477.

- Coulon F, Pelletier E, Gourhant L and Delille D. 2005. "Effects of Nutrient and Temperature on Degradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Sub-Antarctic Soil." *Chemosphere* 58(10):1439–48.
- Cunningham CJ, Ivshina IB, Lozinsky VI, Kuyukina MS and Philp JC. 2004. "Bioremediation of Diesel-Contaminated Soil by Microorganisms Immobilised in Polyvinyl Alcohol." *International Biodeterioration and Biodegradation* 54(2-3):167–74.
- Dawson MP, Humphrey BA and Marshall C. 1981. "Adhesion: A tactic in the survival strategy of a marine *Vibrio* during starvation". *Curr. Microbiol* 6: 195–199.
- de Lorenzo V. 2009. "Recombinant bacteria for environmental release: what went wrong and what we have learnt from it". *Clinical Microbiology and Infection* 5 (1):63-65.
- Di Martino C. 2010. Bacterias productoras de polihidroxicanoatos capaces de utilizar hidrocarburos como potenciales agentes de biorremediación de ambientes contaminados. Tesis de Licenciatura. Universidad de Buenos Aires.
- Di Martino C, López NI and Raiger lustman LJ. 2012. "Isolation and Characterization of Benzene, Toluene and Xylene Degrading *Pseudomonas* sp. Selected as Candidates for Bioremediation." *International Biodeterioration and Biodegradation* 67:15–20.
- Duffus JH. 2002. "'Heavy Metals' a Meaningless Term? (IUPAC Technical Report)." *Pure and Applied Chemistry* 74(5):793–807.
- Dufrene YF and Rouxhet PG. 1996. "Surface Composition, Surface Properties, and Adhesiveness of *Azospirillum Brasilense* - Variation during Growth." *Canadian Journal of Microbiology* 42(6):548–56.
- Espeche ME, MacCormack WP and Fraile ER. 1994. "Factors affecting growth of n-hexadecane degrader *Acinetobacter* species isolated from a highly polluted urban river". *International Biodeterioration and Biodegradation* 33: 187-196.
- Flemming CA and Trevors JT. 1989. "Copper toxicity and chemistry in the environment: a review". *Water, Air, and Soil Pollution*, 44(1-2): 143-158.
- Ford T, Maki J and Mitchell R. 1995. "Metal-microbe interactions". *Bioextraction and Biodeterioration of Metals* p 8-10.
- Forstner U and Wittmann GTW. 1979. "Metal pollution in the aquatic environment" .
- Fracchia L, Cavallo M, Martinotti MG and Banat IM. 2012. "Biosurfactants and Bioemulsifiers Biomedical and Related Applications – Present Status and Future Potentials." *Biomedical Science, Engineering and Technology* 325–73.
- Franklin FC, Bagdasarian M, Bagdasarian MM and Timmis KN. 1981. "Molecular and Functional Analysis of the TOL Plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and Cloning of Genes for the Entire Regulated Aromatic Ring Meta Cleavage Pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(12):7458–62.

- Freundlich HMF. (1906). "Over the adsorption in solution". *J. Phys. Chem* 57(385): 385-470.
- Gardin H, Lebeault JM and Pauss A. 1999. "Biodegradation of xylene and butyl acetate using an aqueous-silicon oil two-phase system". *Biodegradation* 10: 193–200.
- Godlewska R, Wisniewska K, Pietras Z and Jagusztyn-Krynicka EK. 2009. "Peptidoglycan-associated lipoprotein(Pal)of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis". *FEMS Microbiol Lett.* 1-11.
- Golyshin PN, Chernikova TN, Abraham WR, Lünsdorf H, Timmis KN and Yakimov MM. 2002. "Oleiphilaceae Fam. Nov., to Include Oleiphilus Messinensis Gen. Nov., Sp. Nov., a Novel Marine Bacterium That Obligately Utilizes Hydrocarbons." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52(3):901–11.
- Haro MA and de Lorenzo V. 2001. "Metabolic engineering of bacteria for environmental applications: construction of *Pseudomonas* strains for biodegradation of 2-chlorotoluene". *Journal of Biotechnology* 85: 103-113.
- Harwell JH, Sabatini DA and Knox RC. 1999. "Surfactants for Ground Water Remediation." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 151(1-2):255–68.
- Head IM and Swannell RPJ. 1999. "Bioremediation of Petroleum Contaminants in Marine Habitats." *Curr Opinion Biotechnol* 10:234–39.
- Hendrickx B, Junca H, Vosahlova J, Lindner A, Rüegg I, Bucheli-Witschel M, Faber F, Egli T, Mau M, Schlömann M, Brennerova M, Brenner V, Pieper DH, Top EM, Dejonghe W, Bastiaens L and Springael D. 2006. "Alternative Primer Sets for PCR Detection of Genotypes Involved in Bacterial Aerobic BTEX Degradation: Distribution of the Genes in BTEX Degrading Isolates and in Subsurface Soils of a BTEX Contaminated Industrial Site." *Journal of Microbiological Methods* 64(2):250–65.
- Hoffmann N and Rehm BHA. 2004. "Regulation of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*." *FEMS Microbiology Letters* 237(1):1–7.
- Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RAR, Kutchma AJ and Schweizer HP. 1998. " A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants". *Gene* 212:77–86
- Huisman GW, Wonink E, Meima R, Kazemier B, Terpstra P and Witholt B. 1991. "Metabolism of poly(3-Hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas Oleovorans*: Identification and Sequences of Genes and Function of the Encoded Proteins in the Synthesis and Degradation of PHA." *Journal of Biological Chemistry* 266(4):2191–98.
- Hyne NJ. 2001. *Nontechnical Guide to Petroleum Geology, Exploration, Drilling, and Production*. 3° Edición. PennWell, p1-4.

- Jendrossek D and Pfeiffer D. 2014. "New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate)". *Environmental Microbiology* 16(8): 2357–2373.
- Jeong E, Hirai M and Shoda M. 2008. "Removal of *o*-xylene using biofilter inoculated with *Rhodococcus* sp. BTO62". *Journal of Hazardous Materials* 152: 140–147.
- Jonglertjunya W. 2008. "Biosorption of Lead (II) and Copper (II) from Aqueous." *Chiang Mai J. Sci.* 35(1):69–81.
- Kabata-Pendias A. 2010. *Trace elements in soils and plants*. CRC press.
- Kadouri D, Burdman S, Jurkevitch E and Okon Y. 2002. "Identification and Isolation of Genes Involved in Poly(β -Hydroxybutyrate) Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and Characterization of a *phbC* Mutant." *Microbiology* 68(6):2943–49.
- Kadouri D, Jurkevitch E and Okon Y. 2003. "Involvement of the Reserve Material Poly-Hydroxybutyrate in *Azospirillum brasilense* Stress Endurance and Root Colonization." *Applied and Environmental Microbiology* 69(6):3244–50.
- Kadouri D, Castro-Sowinski S, Jurkevitch E and Okon Y. 2005. "Ecological and agricultural significance of bacterial Polyhydroxyalkanoates". *Crit. Rev. Microbiol.* 31: 55-67.
- Kazy SK, Sar P, Singh SP, Sen AK and D'Souza SF. 2002. "Extracellular Polysaccharides of a Copper-Sensitive and a Copper-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain: Synthesis, Chemical Nature and Copper Binding." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(6):583–88.
- Kermanshahi pour A, Karamanev D and Margaritis A. 2005. "Biodegradation of petroleum hydrocarbons in an immobilized cell airlift bioreactor". *Water Research* 39: 3704–3714.
- Kim D, Kim YS, Kim SK, Kim SW, Zylstra GJ, Kim YM and Kim E 2002. "Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus* sp. strain." *Applied and environmental microbiology* 68(7):3270–78.
- Kloos K, Munch JC and Schlöter M. 2006. "A New Method for the Detection of Alkane-Monooxygenase Homologous Genes (*alkB*) in Soils Based on PCR-Hybridization." *Journal of Microbiological Methods* 66(3):486–96.
- Knoll M, Hamm TM, Wagner F, Martinez V and Pleiss J. 2009. "The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases". *BMC Bioinformatics* 10:89.
- Koning M, Hupe K and Stegmann R. 2000. "Thermal Processes, Scrubbing/Extraction, Bioremediation and Disposal". *Biotechnology* 11:306-317.
- Krell T, Lacal J, Reyes-Darias JA, Jimenez-Sanchez C, Sungthong R and Ortega-Calvo JJ. 2013. "Bioavailability of pollutants and chemotaxis". *Current Opinion in Biotechnology* 24 (3): 451–456.

- Kuiper I, Legendijk EL, Pickford R, Derrick JP, Lamers GE, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJ and Bloemberg GV. 2004. "Characterization of Two *Pseudomonas putida* Lipopeptide Biosurfactants, Putisolvin I and II, Which Inhibit Biofilm Formation and Break down Existing Biofilms." *Molecular Microbiology* 51(1):97–113.
- Kumar S, Tamura K and Nei M. 2004. "MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment." *Brief.Bioinform.* 5(2):150–63. Retrieved (PM:15260895).
- Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G and Witholt B. 1988. "Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates." *Applied and environmental microbiology* 54(12):2924–32.
- Lang S. 2002. "Biological amphiphiles (microbial biosurfactants)". *Curr Opin Colloid Interface Sci* 7:12–20
- Law AT and Button DK. 1977. "Multiple-Carbon-Source-Limited Growth Kinetics of a Marine *Coryneform bacterium*". *Journal of Bacteriology* 129 (1):115-123
- Lemoigne, M. 1926. "Produits de deshydratation et de polymerization de l'acide β - oxybutyrique". *Bull. soc. chim. biol.* 8:770-782.
- Li L, Komatsu T, Inoue A and Horikoshi K. 1995. "A Toluene-tolerant Mutant of *Pseudomonas aeruginosa* Lacking the Outer Membrane Protein F". *Biosci. Biotech. Biochem* 59(12): 2358-2359.
- Liang F, Lu M, Keener TC, Liu Z and Khang SJ. 2005. "The Organic Composition of Diesel Particulate Matter, Diesel Fuel and Engine Oil of a Non-Road Diesel Generator." *Journal of environmental monitoring : JEM* 7(10):983–88.
- Llamas MA, Rodríguez-Herva JJ, Hancock REW, Bitter W, Tommassen J and Ramos JL. 2003. "Role of *Pseudomonas putida tol-oprL* Gene Products in Uptake of Solutes through the Cytoplasmic Membrane". *Journal of Bacteriology* 185(16): 4707-4716.
- Logan NA, DeVos P and Dinsdale A. 2009. *Geobacillus*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FR, Schleifer K-H, WhitmanWB(eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol 3, 2nd edn. Springer, New York, pp 144–160.
- Lomovskaya O, Warren M, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J, Cho D, Chamberland S, Renau T, Leger R, Hecker S, Watkins W, Hoshino K, Ishida H and Lee VJ. 2000. "Identification and Characterization of Inhibitors of Multidrug Resistance Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Agents for Combination Therapy". *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 45(1): 105-116.
- López NI, Floccari ME, Steinbüchel A, García AF and Méndez BS. 1995. "Effect of poly(3-hydroxybutyrate) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters". *FEMS Microbiology Ecology* 16: 95-102

- López NI, Ruiz JA and Méndez BS. 1998. "Survival of poly-3-hydroxybutyrate producing bacteria in soils microcosms". *World J. of Microbiol. and Biotechnol* 14: 681-684.
- López NI, Pettinari MJ, Stackebrandt E, Tribelli PM, Póttter M, Steinbüchel A and Méndez BS. 2009. "*Pseudomonas extremaustralis* sp. nov., a Poly(3-hydroxybutyrate) Producer Isolated from an Antarctic Environment". *Curr Microbiol* 59:514–519.
- Lovaglio RB, dos Santos FJ, Jafelicci Junior M and Contiero J. 2011. "Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85: 301–305.
- Madison LL and Huisman GW. 1999. "Metabolic Engineering of poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic." *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR* 63(1):21–53.
- Maier T, Förster HH, Asperger O and Hahn U. 2001. "Molecular Characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104." *Biochemical and biophysical research communications* 286(3):652–58.
- Marín MM, Yuste L and Rojo F. 2003. "Differential Expression of the Components of the Two Alkane Hydroxylases from *Pseudomonas aeruginosa*". *Journal of Bacteriology* 185(10): 3232-3237.
- Margesin R and Schinner F. 2001. "Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area." *Applied and Environmental Microbiology* 67(7):3127–33.
- Margesin R and Schinner F. 1999. "Biological Decontamination of Oil Spills in Cold Environments." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74(5):381–89.
- Martínez-Lavanchy PM, Müller C, Nijenhuis I, Kappelmeyer U, Buffing M, McPherson K and Heipieper HJ. 2010. "High Stability and Fast Recovery of Expression of the TOL Plasmid-Carried Toluene Catabolism Genes of *Pseudomonas putida* Mt-2 under Conditions of Oxygen Limitation and Oscillation." *Applied and Environmental Microbiology* 76(20):6715–23.
- McEldowney S and Fletcher M. 1986. "Effect of Growth Conditions and Surface Characteristics of Aquatic Bacteria on Their Attachment to Solid Surfaces". *Journal of General Microbiology*. 132, 5 13-523.
- Meier MV, Muschler P and Scharf BE. 2007. "Functional Analysis of Nine Putative Chemoreceptor Proteins in *Sinorhizobium meliloti*". *Journal of Bacteriology* 189(5): 1816–1826.
- Molina L, Duque E, Gómez MJ, Krell T, Lacal J, García-Puente A, García V, Matilla MA, Ramos JL, Segura A. 2001. "The pGRT1 plasmid of *Pseudomonas putida* DOT-T1E encodes functions relevant for survival under harsh conditions in the environment". *Environ Microbiol.* 13(8):2315-27.

- Mosqueda G and Ramos JL. 2000. "A Set of Genes Encoding a Second Toluene Efflux System in *Pseudomonas putida* DOT-T1E Is Linked to the *tod* Genes for Toluene Metabolism". *Journal of Bacteriology* 182(4): 937-943.
- Mrozik A and Piotrowska-Seget Z. 2010. "Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds". *Microbiological Research* 165: 363-375.
- Muhammad N, Parr J, Smith MD and Wheatley AD. 1998. "Adsorption of Heavy Metals in Slow Sand Filters Method Used for Batch Adsorption Tests." *24th WEDC conference Sanitation and Water for all* 346-49.
- Mulligan CN. 2005. "Environmental Applications for Biosurfactants." *Environmental Pollution* 133(2):183-98.
- Muraleedharan TR, Iyengar L and Venkobachar C. 1995. "Screening of Tropical Wood-Rotting Mushrooms for Copper Biosorption." *Applied and Environmental Microbiology* 61(9):3507-8.
- Nicas TI and Hancock REW. 1980. "Outer Membrane Protein Hi of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement in Adaptive and Mutational Resistance to Ethylenediaminetetraacetate, Polymyxin B, and Gentamicin". *Journal of Bacteriology* 143(2):872-878.
- Nikodinovic J, Kenny ST, Babu RP, Woods T, Blau WJ and O'Connor KE. 2008. "The conversion of BTEX compounds by single and defined mixed cultures to medium-chain-length polyhydroxyalkanoate". *Appl Microbiol Biotechnol* 80:665-673.
- O'Sullivan DJ and O'Gara F. 1992. "Traits of Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Involved in Suppression of Plant Root Pathogens." *Microbiological reviews* 56(4):662-76.
- Ostle AG and Holt JG. 1982. "Fluorescent Stain for Poly-3- Hydroxybutyrate." *Applied and Environmental Microbiology* 44(1):238-41.
- Otenio MH, Lopes da Silva MT, Oliveira Marques ML, Roseiro JC and Bidoia ED. 2005. "Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852." *Brazilian Journal of Microbiology* 36:258-261.
- O'Toole GA and Kolter R. 1998. "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development". *Mol Microbiol* 30:295-304.
- Patel RM and Desai AJ. 1997. "Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses". *Applied Microbiology* 25: 91-94.
- Paulsen IT, Park JH, Choi PS, Saier MH Jr. 1997. "A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria". *FEMS Microbiol Lett.*156(1):1-8.
- Pham TH, Webb JS and Rehm BHA. 2004. "The Role of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in Rhamnolipid and Alginate Production as Well as Stress Tolerance and Biofilm Formation." *Microbiology* 150(10):3405-13.

- Prieto MA. 2007. "From Oil to Bioplastics, a Dream Come True?" *Journal of Bacteriology* 189(2):289–90.
- Pumbwe L, Skilbeck C, Nakano V, Avila-Campos M, Piazza R and Wexler H. 2007. "Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*". *Microb Pathog* 43:78–87
- Raiger lustman LJ y López NI. 2009. "Los biosurfactantes y la industria petrolera". *Química Viva*. 8 (3).
- Ramos JL, Duque E, Gallegos MT, Godoy P, Ramos-Gonzalez MI, Rojas A, Teran W and Segura A. 2002. "Mechanisms of Solvent Tolerance in Gram-Negative Bacteria." *Annual review of microbiology* 56:743–68.
- Rehm BH, Krüger N and Steinbüchel A. 1998. "A New Metabolic Link between Fatty Acid de NovoSynthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis. The PHAG gene from *Pseudomonas putida* KT2440." *Journal of Biological Chemistry* 273(11):24044–51.
- Rehm BH, Mitsky TA and Steinbuchel A. 2001. "Role of Fatty Acid De Novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by *Pseudomonads*: Establishment of the Transacylase (PhaG)-Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*". *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7): 3102–3109.
- Rehm BH. 2003. "Polyester Synthases: Natural Catalysts for Plastics." *The Biochemical journal* 376 (Pt 1):15–33.
- Rodriguez-Herva JJ, Ramos Gonzales MI and Ramos J. 1996. "The *Pseudomonas putida* Peptidoglycan-Associated Outer Membrane Lipoprotein Is Involved in Maintenance of the Integrity of the Cell Envelope". *Journal of Bacteriology* 178(6): 1699-1706.
- Rodriguez-Herva JJ and Ramos J. 1996. b. "Characterization of an OprL Null Mutant of *Pseudomonas putida*". *Journal of Bacteriology* 178(19): 5836-5840.
- Rodriguez-Montelongo L, de la Cruz-Rodriguez LC, Farías RN and Massa EM. 1993. "Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1144(1), 77-84.
- Rojo F. 2010. "Enzymes for aerobic degradation of alkanes". *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. K. N. Timmis (ed.)
- Rosenberg M, Gutnick D and Rosenberg E. 1980. "Adherence of Bacteria." 9:29–33.
- Rosenberg M. 2006. "Microbial Adhesion to Hydrocarbons: Twenty-Five Years of Doing MATH." *FEMS Microbiology Letters* 262(2):129–34.
- Ruiz JA, López NI and Méndez BS. 1999. "Polyhydroxyalkanoates degradation affects survival of *Pseudomonas oleovorans* in river water microcosms". *Rev. Arg. Microbiol* 31 (3): 201-204.

- Ruiz JA, López NI and Méndez BS. 2004. "*rpoS* gene expression in carbonstarved cultures of the polyhydroxyalkanoate accumulating species *Pseudomonas oleovorans*". *Current Microbiology* 48(6): 395-400.
- Salanitro JP, Johnson PC, Spinnler GE, Maner PM, Wisniewski HL and Bruce C. 2000. "Field-Scale Demonstration of Enhanced MTBE Bioremediation through Aquifer Bioaugmentation and Oxygenation." *Environmental Science and Technology* 34(19):4152–62.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. 1988. "Molecular Cloning A laboratory manual", 2nd edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York.
- Sarkhoh NA, Ghannoum MA, Ibrahim AS, Stretton RJ and Radwan SS. 1990. "Crude oil and hydrocarbon degrading strains of *Rhodococcus*: *Rhodococcus* strains isolated from soil microbial community structure". *Applied & Environmental Microbiology* 59: 1520-1525.
- Schiff K, Diehl D and Valkirs A. 2004. "Copper emissions from antifouling paint on recreational vessels". *Marine Pollution Bulletin* 48(3): 371-377.
- Shao T, Yang G, Wang M, Lu Z, Min H and Zhao L. 2010. "Reduction of oxidative stress by bioaugmented strain *Pseudomonas* sp. HF-1 and selection of potential biomarkers in sequencing batch reactor treating tobacco wastewater". *Ecotoxicology* 19:1117–11.
- Shim H and Yang SH. 1999. "Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and *o*-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor". *Journal of Biotechnology* 67: 99–112
- Shimp RJ and Pfaender FK. 1985. "Influence of Easily Degradable Naturally Occurring Carbon Substrates on Biodegradation of Monosubstituted Phenols by Aquatic Bacteria". *Applied and Environmental Microbiology* 49(2):394-401.
- Siegmund I and Wagner F. 1991. "New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar". *Biotechnol Tech* 5:265–268.
- Simon R, Prierer U and Puhler A. 1983. "A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria". *Nat Biotechnol* 1: 784–791.
- Skerker JM, Lucks JB and Arkin AP. 2009. "Evolution, ecology and the engineered organism: lessons for synthetic biology". *Genome Biology*. 10:114.
- Soberón-Chávez G, Aguirre-Ramirez M, Sánchez R. 2005. "The *Pseudomonas aeruginosa* RhIA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production". *J Ind Microbiol Biotechnol* 32:675–677.
- Stallwood B, Shears J, Williams PA and Hughes KA. 2005. "Low Temperature Bioremediation of Oil-Contaminated Soil Using Biostimulation and Bioaugmentation with a *Pseudomonas* Sp. from Maritime Antarctica." *Journal of Applied Microbiology* 99(4):794–802.

- Stanier RY, Palleroni NJ and Doudoroff M. 1966. "The Aerobic *Pseudomonads*: A Taxonomic Study." *Journal of general microbiology* 43(2):159–271.
- Steinbuechel A and Valentin HE. 1995. "Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids". *FEMS Microbiol Lett.* 128: 219–228.
- Steinbuechel A and Hein S. 2001. "Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms". *Adv Biochem Eng Biotechnol* 71:81–123.
- Straube WL, Nestlers CC, Hamsen LD, Ringleberrg D, Pritchard PH and Jones-Meehan J. 2003. "Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through lanfarming with biostimulation and bioaugmentation". *Acta Biotechnologica* 23,179-196.
- Stuart ES, Lenz RW and Fuller RC. 1995. "The ordered macromolecular surface of polyester inclusion bodies in *Pseudomonas oleovorans*". *Can. J. Microbiol* 41(1) : 84-9.
- Stuart ES, Tehrani A, Valentin HE, Dennis D, Lenz RW and Fuller RC. 1998. "Protein organization on the PHA inclusion cytoplasmic boundary". *Journal of Biotechnology.* 64: 137–144.
- Suwalsky M, Ungerer B, Quevedo L, Aguilar F and Sotomayor CP. 1998. "Cu²⁺ ions interact with cell membranes". *Journal of Inorganic Biochemistry* 70(3), 233-238.
- Tal S and Okon Y. 1985. "Production of the reserve material poly-β- hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense*". *Can. J. Microbiol* 31: 608-613.
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0." *Molecular Biology and Evolution* 24(8):1596–99.
- Tribelli PM and López NI. 2011. "Poly(3-hydroxybutyrate) influences biofilm formation and motility in the Antarctic novel species *Pseudomonas extremaustralis* under cold conditions". *Extremophiles* 15:541-7
- Tribelli PM, Di Martino C, López NI and Raiger lustman LJ. 2012. "Biofilm Lifestyle Enhances Diesel Bioremediation and Biosurfactant Production in the Antarctic Polyhydroxyalkanoate Producer *Pseudomonas extremaustralis*." *Biodegradation* 23(5):645–51.
- Tsao CW, Song HG and Bartha R. 1998. "Metabolism of Benzene, Toluene, and Xylene Hydrocarbons in Soil". *Applied and Environmental Microbiology* 64(12): 4924-4929.
- Turnlund JR, Keyes WR, Anderson HL and Acord LL. 1989. "Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu". *The American journal of clinical nutrition* 49(5): 870-878.
- Tyagi M, da Fonseca MMR and de Carvalho CCCR. 2011. "Bioaugmentation and Biostimulation Strategies to Improve the Effectiveness of Bioremediation Processes." *Biodegradation* 22(2):231–41.
- US EPA 2010: <http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/kerjetfc/c15020ad2.pdf>

- Van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM and Witholt B. 2003. "Diversity of Alkane Hydroxylase Systems in the Environment." *Oil & Gas Science and Technology* 58(4):427–40.
- Vogel HJ and Bonner DM. 1956. "Acetylorithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties". *The Journal of Biological Chemistry* 218: 97-106.
- Volesky B.1990. "Biosorption of Heavy Metals". CRC Press, Boca. Raton, USA.
- Volkers RJM, de Jong AL, Hulst AG, van Baar BLM, de Bont JAM and Wery J. 2006. "Chemostat-based proteomic analysis of tolueneaffected *Pseudomonas putida* S12". *Environmental Microbiology*.8(9): 1674–1679
- Vullo DL. 2003. "Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente". *Química Viva* 2 (3).
- Wang Z and Stout SA . 2006. "Oil spill environmental forensics". Elsevier Inc, Oxford, p22
- Ward PG, De Roo G and O'Connor KE. 2005. "Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phenylacetic Acid by *Pseudomonas putida* CA-3." *Applied and Environmental Microbiology* 71(4):2046–52.
- Wasmund K, Burns KA, Kurtböke DI and Bourne DG. 2009. "Novel Alkane Hydroxylase Gene (alkB) Diversity in Sediments Associated with Hydrocarbon Seeps in the Timor Sea, Australia." *Applied and Environmental Microbiology* 75(23):7391–98.
- Whyte LG, Smits TH, Labbé D, Witholt B, Greer CW and van Beilen JB. 2002. "Gene Cloning and Characterization of Multiple Alkane Hydroxylase Systems in Rhodococcus Strains Q15 and NRRL B-16531." *Applied and Environmental Microbiology* 68(12):5933–42.
- Whyte LG, Bourbonnière L and Greer CW. 1997. "Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Both Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways?" *Applied and Environmental Microbiology* 63(9):3719–23.
- Yin H, Qiang J, Jia Y, Ye J, Peng H, Qin H, Zhang N and He B. 2009. "Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oilcontaining wastewater". *Process Biochemistry* 44, 302-308.
- Youssef NY, Duncan KE and McInerney MJ. 2005. "Importance of 3-Hydroxy Fatty Acid Composition of Lipopeptides for Biosurfactant Activity". *Applied and Environmental Microbiology* 71(12): 7690–7695.
- Zinn M, Witholt B and Egli T. 2001. "Occurrence, Synthesis and Medical Application of Bacterial Polyhydroxyalkanoate." *Advanced Drug Delivery Reviews* 53(1):5–21.
- Zocher G, Richter ME, Mueller U and Hertweck CJ. 2011. "Structural fine-tuning of a multifunctional cytochrome p450 monooxygenase". *Am.Chem.Soc.* 133 p.2292.

