

Polihidroxicanoatos en actinomicetos nativos de suelos colombianos

Polyhydroxyalkanoate of Actinomycetes native from Colombian soils

Marcela Franco-Correa¹, David Gómez-Méndez², Nicolás Castro-Medina¹ y
Marcela Rendón-Ruiz¹

¹ Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. E-mail Marcela Franco: franco@javeriana.edu.co

² Laboratorio de Biotecnología Aplicada, UNIDIA, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Resumen

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros considerados como fuente de materiales biorenovables, biodegradables y plásticos con amplios usos industriales, pero los altos costos de producción detienen su aplicación a gran escala. En el presente trabajo, fueron aisladas 10 cepas de Actinomicetos de 60 muestras de suelo rizosférico proveniente de diferentes zonas de la región de Boyacá, Colombia. Observaciones preliminares utilizando el colorante azul de Nilo permitió identificar en tres cepas la presencia de gránulos intracelulares fluorescentes del tipo PHA. Las tres cepas fueron cultivadas en dos medios para obtener cantidades significativas de PHA, encontrándose que la cepa 7F era la que presentaba una producción importante. Después de la purificación, cuantificación e identificación se determinó un rendimiento del 27,48% en peso seco, lo que significa una buena productividad. Mediante pruebas bioquímicas y análisis molecular la cepa 7F fue identificada como *Streptomyces subutilis*.

Palabras claves: Actinomicetos, Polihidroxicanoatos, *Streptomyces subutilis*, azul de Nilo, biopolímero.

Abstract

The polyhydroxyalkanoates (PHA) are considered as source of renewable-resource-based, biodegradable materials and plastics of a wide range industrial uses, but high production costs impede large-scale implementation. In this paper, we induced the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in actinomycetes isolated from Colombian soil, the microorganism with highest production and accumulation of biopolymer was isolated and identified. With Nile blue dye, we determined in three of the ten strains isolated, the presence of intracellular fluorescent granules type polyhydroxyalkanoate. The three strains were cultured for obtained significant amounts of PHA. The strain named 7F had the highest production. After purification, identification and quantification we determined a yield of 27.48% in dry weight, which means a good productivity. This strain was identified as *Streptomyces subutilis*, though biochemical's reactions and Gene Bank.

Keywords: Actinomycetes, Polyhydroxyalkanoates, *Streptomyces subutilis*, Nile blue, biopolymer.

Introducción

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros de hidroxicanoatos que se acumulan como material de reserva de carbono y energía en diferentes microorganismos, normalmente bajo condiciones de carencia nutricional de elementos como nitrógeno, fósforo, sulfuro o magnesio, en presencia de un exceso de fuente de carbono (Wang y Bakken 1998, Macarrón-Gómez 1998). Desde el descubrimiento del poli-3-hidroxibutirato, P(3HB), detectado en *Bacillus megaterium* en 1926, una larga variedad de PHA con diferentes longitudes de cadena de carbonos y grupos R-dependientes han sido estudiados. Entre los diferentes polímeros de PHA se ha centrado un interés por sus propiedades como material termoplástico y su biodegradabilidad, pero sólo unos pocos han sido destinados a la producción de bioplásticos a gran escala como el polihidroxibutirato P(3HB), polihidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (P(3HB-co-3HV)) y PHA de cadena media (mcl-PHA) (Williams et al. 1984, Lara et al. 1999, Macarrón-Gómez 1998).

Sólo algunas de las bacterias capaces de sintetizar PHA han sido usadas en la producción industrial como son *Ralstonia eutrophus*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, algunos metilotrofos, *Pseudomonas oleovorans* y *Escherichia coli* recombinante (Slater et al. 1988, Schubert et al. 1991). Cada bacteria requiere condiciones de crecimiento específico para la síntesis de PHA, pero pueden ser subdivididas en dos grupos. Uno que requiere de las condiciones limitantes de algunos nutrientes esenciales, como carbono o nitrógeno, para poder incrementar la eficiencia de la producción del PHA, por ejemplo *A. eutrophus*, *P. oleovorans* y algunos metilotrofos, entre otros, y un segundo grupo conformado por los que no requieren esas condiciones (de *E. coli* recombinante, *A. vinelandii*, *A. latus*) (Macarrón-Gómez 1998).

Por su parte, las investigaciones de PHA en actinomicetos, grupo de bacterias filamentosas Gram positivas (Stainer et al. 1996) cuyo crecimiento es análogo al micelio de los hongos filamentosos (Williams et al. 1984) y que presentan gran interés ecológico, no han sido muy estudiados (Hayakawa et al. 1994). Hay gran interés en el tipo de crecimiento que presenta este grupo bacteriano, tal como la composición de su pared con respecto a la acumulación de los biopolímeros. No obstante y a pesar de ser bacterias, en los actinomicetos las condiciones limitantes de nitrógeno no favorecen el crecimiento y la producción de PHA, por tal razón estos microorganismos requieren un manejo diferente de los factores nutricionales con respecto a los establecidos para la producción de PHA en otras bacterias (Manna et al. 1999). Actualmente se conoce una gran variedad de bacterias y algunas levaduras con capacidad para producir PHA como reserva de carbono y energía (Lara et al. 1999). La mayoría de las investigaciones arrojan resultados contrarios con respecto a la composición del medio de cultivo para inducir la producción del biopolímero en comparación con los utilizados para otro tipo de bacterias no filamentosas (Manna et al. 1999).

En el presente trabajo se aislaron y estudiaron actinomicetos provenientes de suelos colombianos con capacidad de acumular intracelularmente PHA.

Material y métodos

Aislamiento y recuperación de los actinomicetos

Se tomó de forma aleatoria y de diferentes puntos, un kilo de suelo rizosférico (muestra compuesta) de un cultivo de vid de la región de Boyacá-Colombia. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la

Pontificia Universidad Javeriana, realizando diluciones seriadas en agua peptonada al 0,1% (p/v) y sembrando en superficie en agar avena suplementado con nistatina (Franco-Correa 2008). A continuación se llevaron a incubar a 25 °C durante 10 días.

Igualmente se tomaron tres cepas de actinomicetos del cepario del laboratorio de Microbiología Ambiental y de Suelos de la Pontificia Universidad Javeriana obtenidos de trabajos experimentales anteriores, aislados de la misma región geográfica, pero de cultivos diferentes. Estos microorganismos, que se encontraban liofilizados, fueron resuspendidos en agua peptonada al 0,1% (p/v) y sembrados en caldo avena (avena 30 g·L⁻¹ y glucosa 20 g·L⁻¹), llevaron a incubar a 25 °C durante 10 días, en agitación (150 rpm). Una vez reconstituidos, se realizaron pases sucesivos en el mismo medio de cultivo agarizado.

Condiciones de crecimiento y observación microscópica

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento durante siete días, con agitación a 150 rpm y 25 °C, en medio ISP2 (peptona 5 g·L⁻¹, extracto de levadura 3 g·L⁻¹, glucosa 5 g·L⁻¹), y medio R5M (peptona 3 g·L⁻¹, glucosa 10 g·L⁻¹) con cada uno de los actinomicetos aislados del suelo y los resuspendidos de los liofilizados, inoculados por triplicado en erlenmeyers de 250 mL conservando la relación 1/5 con respecto al medio de cultivo, con el fin de favorecer la distribución homogénea del aire dentro de los erlenmeyers. Se tomaron muestras cada 12 horas y se montaron láminas con coloración de azul de Nilo (Ostle y Holt 1982) y Gram con el fin de observar gránulos intracelulares, típicos de PHA.

Condiciones de crecimiento de las cepas para la cuantificación del polímero

Se preparó un preinóculo con cada una de las cepas de actinomicetos que presentaron una coloración positiva con el azul de Nilo. Este se dejó crecer en caldo inductor de polímero ISP2 y RM5. Se colocó en agitación a 250 rpm, durante 24 horas a 25 °C. Posteriormente, se inoculó un volumen de 10 mL de cada cepa de actinomicetos en erlenmeyers de 500 mL con 90 mL de ISP2 y RM5 llevándolos a agitación a 250 rpm, 25 °C durante 8 días, tomándose muestras a las 24, 96, 144 y 192 horas. Cada muestra fue preparada para el análisis en cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y para la medición de masa seca celular. Después se liofilizaron para su conservación.

Cuantificación del biopolímero

A las cepas que dieron positivas con Azul de Nilo se les realizó una propanólisis con el fin de separar el polímero de la masa micelial y cuantificar las muestras. Para ello, se tomaron 12 mg de células liofilizadas que fueron tratadas con 2 mL de una solución de ácido clorhídrico preparado en propanol (1:4 v/v), a continuación se adicionaron 2 mL de 1,1-dicloroetano y 200 µL de una solución de 40 g·L⁻¹ de ácido benzoico en propanol y la mezcla fue llevada a agitación (150 rpm) durante 3 horas a 100 °C. Después del enfriamiento fueron adicionados 4 mL de agua destilada, agitados vigorosamente por 3 minutos y se centrifugó por 3 minutos a 7000 x g. La fase acuosa fue descartada y la orgánica sometida a HPLC (Williamson y Wilkinson 1958). Los ésteres propílicos fueron analizados en un cromatógrafo equipado con una columna capilar Varian modelo DB-5 (5% fenilmetilsilicona; diámetro 0,25 mm; presión 30 atm, grosor de la capa 0,25 µm), P(3HB-co-3HV).

Identificación molecular de las cepas productoras de PHA

Una vez caracterizados bioquímica y morfológicamente los actinomicetos que resultaron positivos tanto para la coloración como para la cromatografía de gases, se llevó a cabo la extracción del DNA genómico de la cepa que presentó mayor acumulación de polihidroxialcanoato utilizando la misma metodología de Franco-Correa (2008). La amplificación del rDNA 16S se realizó por la técnica de PCR utilizando como molde el DNA genómico extraído directamente de las células del actinomiceto. Los *primers* utilizados para la reacción de PCR fueron p27f y p1401r, homólogos a los extremos conservados del gen rDNA 16S de bacterias. El programa utilizado fue (Cook y Meyers 2003): denaturación inicial de 95 °C por 2 min, 30 ciclos de denaturación (94 °C por 1 min), anillamiento (55 °C por 1 min), extensión (72 °C por 3 min), extensión final (72 °C por 3 min).

El volumen total de cada uno de los productos de PCR obtenido se separó en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X con bromuro de etidio en concentración 1 µg·mL⁻¹. La electroforesis se llevó a cabo en cámara de electroforesis a 90 voltios, 200 miliamperios. Las bandas correspondientes al tamaño del ADN r 16S, 1500 a 1540 pb se cortaron y se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL. Se utilizó el Kit de limpieza para productos de PCR a partir de geles de agarosa Wizard (Promega). Para verificar el tamaño de las bandas de los productos de PCR se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb.

A partir de los productos de PCR purificado de cada una de las muestras se tomaron alícuotas de 5 µL con 2 µL del tampón de carga Blue/Orange 6X y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X y bromuro de etidio en concentración 1 µg·mL⁻¹ en las mismas condiciones que las usadas en la verificación de la calidad.

Resultados y discusión

Aislamiento y recuperación de actinomicetos

A partir de 60 muestras de los suelos rizosféricos de Boyacá-Colombia, se logró aislar diez cepas caracterizadas como actinomicetos según sus características microscópicas (bacterias Gram-positivas, formadoras de racimos de filamentos estables o fragmentados y propágulos solos, en parejas o formando cadenas cortas o largas) (Williams et al. 1984) y macroscópicas (textura pulverulenta, olor a suelo húmedo, presencia de endo y exo pigmentación). Con respecto a los liofilizados, se recuperaron tres cepas que ya habían sido previamente identificadas como *Streptomyces laurentii*, *Nocardia asteroides* y *Streptomyces mauve-color* (Marquez et al. 2003).

Crecimiento y observación de láminas

En el medio ISP2 se observó abundante crecimiento en tres de las diez cepas aisladas (2F, 6M y 7F). Con la coloración azul de Nilo, estas mismas cepas mostraron gránulos fluorescentes a lo largo del micelio y se tomaron como posibles productoras de PHA. Ninguna de las cepas liofilizadas, dio resultados positivos con la coloración.

Curva de crecimiento de las cepas en medio inductor de polímero

Se realizó la cuantificación de masa seca celular en medio inductor de polímero tomando únicamente muestras de las cepas de los actinomicetos a las 24, 96, 144 y 192 horas en los

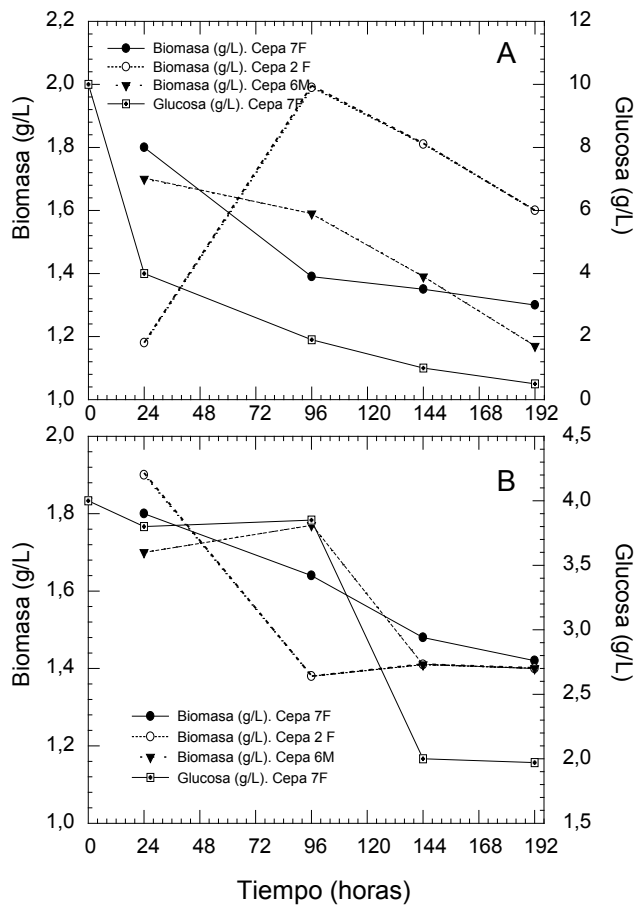


Figura 1. Crecimiento de las cepas de *Streptomyces subbrutillus* 7F, 2F y 6M en medio ISP2 (A) y en medio R5M (B) durante 192 horas. Se muestra únicamente el consumo de sustrato de la cepa 7F.

medios ISP2 y R5M (Kieser y Hopwood 1992), obteniéndose los resultados que se observan en la figuras 1A y B, donde se observa el crecimiento de las cepa 7F, 2F y 6M. A partir de la hora 24 (primer punto que se muestreó) se observó una disminución en el crecimiento del aislamiento 7F (*S. subbrutillus*) en los dos medios utilizados, mientras que la cepa 6M crece lentamente hasta la hora 92 en el medio ISP2 pero no el medio R5M. La cepa 2F crece bien inclusive hasta la hora 144 en el medio ISP2 y mejor en el medio R5M hasta la hora 92. Estas diferencias pueden deberse a exigencias nutricionales de las cepas al crecer en condiciones diferentes de nutrientes. Los medios inductores buscan dar condiciones nutricionales adversas (por lo general altas concentraciones de carbono y bajas de nitrógeno para unos organismos y concentraciones inversas para otros) a los microorganismos para que estos produzcan intracelularmente el polímero (Manna et al. 1999).

Producción de PHA

Se sometieron a propanólisis las masas secas celulares de las tres cepas, analizándose los propilésteres mediante cromatografía de gases, observándose los resultados en la figura 2. Claramente se ve que únicamente la cepa 7F (*S. subbrutillus*) presenta producción de biopolímero tipo PHA en los dos medios de cultivo utilizados, pero el mayor porcentaje lo logra en el medio ISP2 con un 44,78% en peso seco a la hora 192. Sin embargo cabe destacar que en el medio R5M, la cepa 7F no acumula polímero sino que, por el contrario, disminuye su porcentaje a través del tiempo partiendo de 23,33% a la hora

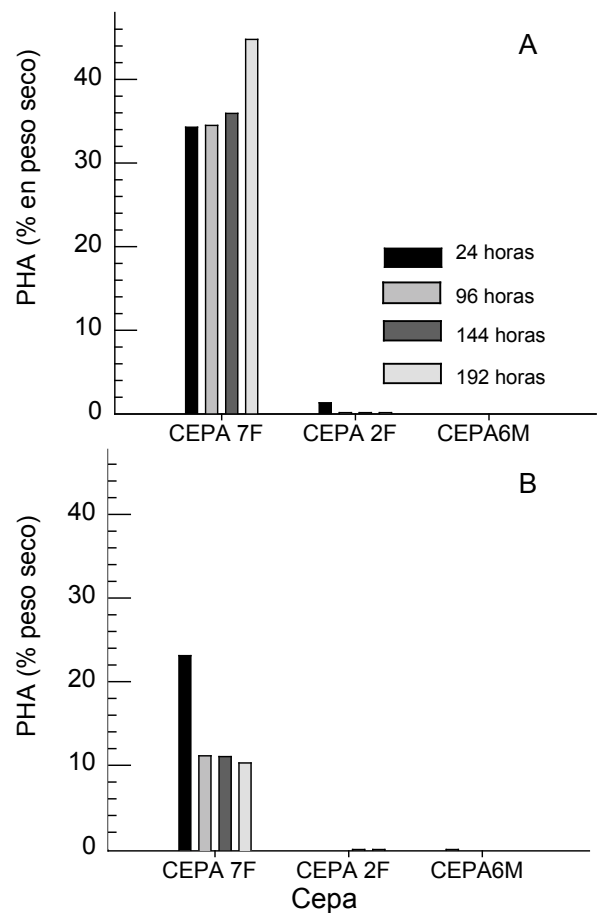


Figura 2. Producción de PHA por las cepas *Streptomyces subbrutillus* 7F, 2F y 6M en los medios ISP2 (A) e R5M (B).

24 y terminando en 10,5% a la hora 192, lo que puede indicar que si bien lo producen en las primeras horas, posiblemente lo puede estar consumiendo para abastecer sus necesidades energéticas.

Otro aspecto a considerar es la composición de los medios ya que ISP2 tiene la mitad de la contracción de glucosa que el medio R5M y esas diferencias pueden estimular o no la acumulación de PHA ya que según la necesidad del microorganismo o acumula polímero como reserva energética o lo utiliza como fuente orgánica para su crecimiento.

Por su parte las cepas 2F y 6M presentaron porcentajes bajos para ser tenidos en cuenta. Comparando la producción de PHA con la coloración de azul de Nilo, parece haber una relación directa, ya que estas últimas dos cepas, presentaron una fluorescencia más baja que *S. subbrutillus* 7F.

Debido a la posibilidad que en la propanólisis hayan quedado ciertos residuos de la pared celular de los actinomicetos como ácidos grasos insaturados los cuales puede alterar los análisis cromatográficos (Lechevalier et al. 1977), se llevó a cabo una segunda propanólisis al cultivo de *S. subbrutillus* 7F, con el fin de extraer el polímero de las células. Por medio de un tratamiento con cloroformo y etanol se purificó el polímero extraído, obteniéndose un 4,12% de residuos intracelulares y de la pared del actinomiceto (Fig. 3). Lo anterior permite anotar que en realidad un 27,48% del polímero es producido por esta cepa con ésta técnica.

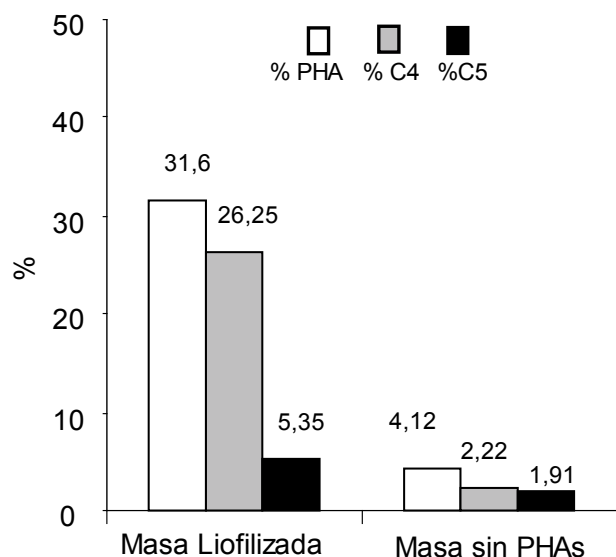


Figura 3. Segunda propanólisis efectuada a la cepa 7F. Se puede observar que un 27,4% corresponde realmente a PHA de tipo copolímero (de 4 y 5 carbonos)

Identificación de los Actinomicetos

La identificación macroscópica de la cepa 7F mostró colonias pequeñas irregulares, color gris claro con borde blanco y pigmento difusible al medio de color café. Microscópicamente, con la coloración de Gram se observaron filamentos delgados ramificados, y presencia abundante de micelio. De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas (BD BBL Crystal™ para la identificación de bacterias Gram positivas) y a la caracterización macroscópica y microscópica se identificó a la cepa 7F como perteneciente al género *Streptomyces*. Con respecto a la identificación molecular de *Streptomyces* sp. 7F, se encontró un 99% de similitud en secuencia a *Streptomyces subrutilis* según GenBank (No. de acceso: EU570663.1), y un 98% de cercanía a *S. lavendulae*, *S. virginiae*, *S. ornatus*, *S. griseus*, *S. argenteolus* y *S. caviscabies*, según RPD (Ribosomal Database Project) (0/37644/5812).

Lo anterior confirma lo estudiado por Manna et al. en 1999 cuando demostró que el 18% de las cepas de *Streptomyces* acumulaban PHB en un rango entre 1,9 y 7,8% de la biomasa seca; dato que es notablemente inferior al encontrado en *S. subrutilis* 7F, permitiendo inferir que la capacidad de esta cepa como productora de PHA supera a lo reportado en la literatura, lo que permite considerar a *Streptomyces subrutilis* sp. 7F, proveniente de suelos colombianos, como una posible opción de ser considerada cepa productora de polihidroxialcanoatos de cadena corta (cadenas carbonadas de 4 y 5 carbonos) con una concentración aceptable, utilizando como medio inductor a ISP2.

Agradecimientos

Al instituto de Pesquisas Tecnológicas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil, por la orientación en los análisis químicos de los biopolímeros obtenidos. Al laboratorio de Microbiología ambiental y de suelos de la Pontificia Universidad Javeriana, por facilitarnos cepas liofilizadas para este estudio.

Literatura citada

- Cook A. & P. Meyers. 2003. Rapid identification of filamentous Actinomycetes to the genus level using genus specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int. J. System. Evol. Microb.* 53: 1907-1915.
- Franco-Correa M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorriza. Tesis Doctoral. Doctorado en Biología Agraria. Director: Dr. José Miguel Barea Navarro. Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 266 pp.
- Hayakawa M., K. Ishizawa & B.J. Nonomura. 1994. Distribution of rare Actinomycetes in Japanese soils. *J. Ferm. Tech.* 66: 367-373.
- Kieser T. & D.A. Hopwood. 1992. A combined genetic and physical map the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bact.* 174: 5496-5507.
- Lara L., G. Madison & W. Huisman. 1999. Metabolic Engineering of poly (3 hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 63: 21-53.
- Lechevalier M.P., C.D. Bievre & H.A. Lechevalier. 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* 5: 249-260.
- Macarrón-Gómez B. 1998. Utilización de marcadores lipídicos en el estudio de la biomasa, la estructura y el estado nutricional de las comunidades de los tapices microbianos del Delta del Ebro. Tesis doctoral - Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències. 278 p. ISBN 8448013348
- Manna A., R. Banerjee & A.K. Paul. 1999. Accumulation of poly (3 hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*. *Curr. Microbiol.* 39: 153-158.
- Márquez M., M.M. Martínez & M. Franco-Correa. 2003. Aislamiento de *Trichoderma* sp. y actinomicetos a partir de suelos de clavel (*Dianthus caryophyllus*) y evaluación de su capacidad antagónica in vitro sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Rev. Agr. Col.* 1-2: 81-88.
- Ostle A.G. & J.G. Holt. 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-β-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microb.* 44: 238-241.
- Schubert P., N. Kruger & A. Steinbuchel. 1991. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly (3-hydroxybutyrate) synthase and the identification of the promoter. *J. Bacter.* 173: 168-175.
- Slater S.C., W.H. Voige & D.E. Dennis. 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacter.* 170: 4431-4436.
- Stanier R., J.R. Villanueva, R. Guerrero et al. 1996. Microbiología. Barcelona. Ed Reverte. Cap IV. 235 pp.
- Wang J.G. & L.R. Bakken. 1998. Screening of soil bacteria for poly β hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. *Microb. Ecol.* 35: 94-101.
- Williams T., M. Stanley, E. Sharpe, et al. 1984. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology USA*. Ed. Williams & Williams. 1285 pp.
- Williamson D.H. & J.F. Wilkinson. 1958. The isolation and estimation of poly hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. *J. Gen. Microbiol.* 19: 198-209.