

## **Bioplásticos: una alternativa ecológica.**

Alejandra de Almeida, Jimena A. Ruiz, Nancy I. López y M. Julia Pettinari\*

Laboratorio de Ecología y Genética Bacteriana, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

Recibido 13 de julio de 2004  
Aceptado 20 de agosto de 2004

### **Resumen**

Los polihidroxicanoatos (PHA) son sintetizados por muchas especies de distintos géneros bacterianos en condiciones de crecimiento caracterizadas por exceso en la fuente carbonada y limitación de otros nutrientes como nitrógeno o fósforo. Estos polímeros se acumulan en gránulos intracitoplasmáticos y son utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez nutricional. Resultados obtenidos en el laboratorio nos permitieron demostrar que la degradación de PHA cumple un papel muy importante en la supervivencia bacteriana y en los mecanismos de resistencia al estrés, en condiciones de baja concentración de nutrientes.

A su vez, estos biopolímeros son termoplásticos y poseen propiedades similares a las de los plásticos derivados del petróleo. Pueden ser totalmente degradados por las bacterias que los producen, y por otras bacterias, hongos y algas. A pesar de las evidentes ventajas de los PHA frente a los plásticos derivados del petróleo, su uso está muy limitado debido a su alto costo de producción. Por este motivo, gran parte de las investigaciones realizadas sobre los PHA en los últimos años se han concentrado en reducir los costos de producción y aumentar la productividad utilizando diversas estrategias. Entre ellas se encuentran el rastreo de nuevas cepas productoras, la optimización de las estrategias de cultivo y la producción de PHA utilizando cepas de *E. coli* recombinantes. Todas ellas se están llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio.

*Palabras clave: polihidroxicanoatos, bioplásticos, bacterias, estrés, supervivencia.*

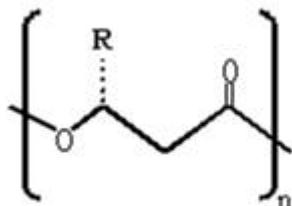
### **Abstract**

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are synthesized by many species of bacteria belonging to different genera, in growth conditions characterized by an excess of carbon source and a limitation in other nutrients such as nitrogen or phosphorus. These polymers are accumulated in intracytoplasmatic granules, and are used as a source of carbon and energy when nutrients are scarce. Results obtained in our laboratory allowed us to demonstrate that PHA play a very important role in bacterial survival and in stress resistance mechanisms in poor nutrient conditions.

These biopolymers are thermoplastics and their properties are similar to those of petroleum-derived plastics. They can be completely degraded by bacteria that produce them, and also by other bacteria, fungi and algae. In spite of the obvious advantages that PHA compared with petroleum-derived plastics, their use is currently limited due to their high production costs. For this reason, most research done on PHA in the last years is focused on reducing production costs and increasing productivity by means of several strategies. Among these strategies are screening for new PHA-producing strains, the optimization of fermentation conditions and the production of PHA using recombinant *E. coli* strains, all of which are currently being studied in our laboratory.

*Key words: polyhydroxyalkanoates, biopolymers, bacteria, stress, survival.*

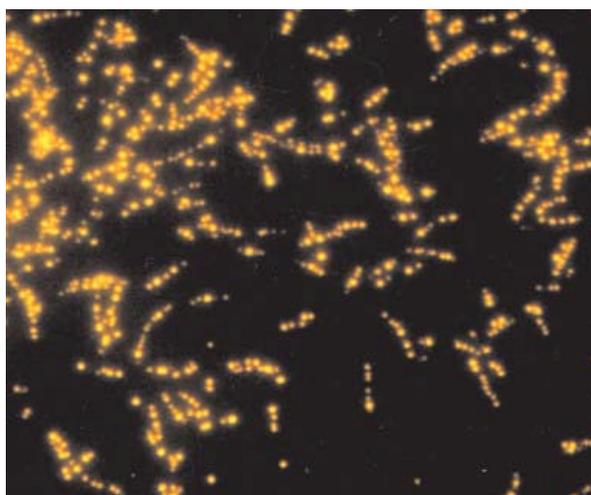
## Introducción



**Figura 1.** Estructura general de los polihidroxicanoatos

Los PHA son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (**Figura 1**).

Los PHA se depositan intracelularmente en formas de cuerpos de inclusión y pueden llegar a representar más del 90% del peso seco celular (**Fig 2**).



**Figura 2.** Células de *P. putida* GPO1 con gránulos de PHA . Fotografía de una microscopía de fluorescencia. Los extendidos de células se muestran teñidos con un colorante específico para PHA que fluoresce de color naranja brillante a una longitud de onda de 460 nm.

El primer PHA descubierto fue el poli(3-D-hidroxi butirato) (PHB), un homopolímero que fue detectado en la especie *Bacillus megaterium* en el año 1925 (7). Posteriormente, se encontraron inclusiones de PHA en una extensa variedad de especies bacterianas. La progresiva acumulación de los desechos sólidos, a medida que aumenta la industrialización y el consumo, es un problema global que comenzó a advertirse en el siglo pasado y se hace cada vez más angustiante. Uno de los materiales de desecho más persistentes son los plásticos, que permanecen en la superficie terrestre prácticamente inalterables por miles de años.

Los PHA han cobrado una gran importancia durante los últimos años en el campo de la industria debido a sus propiedades termoplásticas. Por este motivo, han sido considerados como posibles sustitutos de los plásticos derivados del petróleo.

Además de sus propiedades termoplásticas, los PHA poseen otras características interesantes: su biodegradabilidad y el hecho de que pueden ser producidos a partir de recursos renovables. Su producción fermentativa utiliza productos derivados de la agricultura como fuente de carbono. En la naturaleza los microorganismos son capaces de degradar los PHA, mediante la acción

de PHA depolimerasas y PHA hidrolasas extracelulares, hasta CO<sub>2</sub> y agua. De esta manera, mientras que los plásticos derivados de hidrocarburos utilizan las escasas reservas petroquímicas del planeta, la producción de PHA se basa en la utilización de recursos renovables.

Ante estas ventajas tan evidentes, ¿por qué no utilizar los PHA en lugar de los plásticos tradicionales? La respuesta es muy simple: su costo es varias veces mayor.

En los años 70 hubo una crisis mundial de petróleo, en la que el precio del combustible fósil creció mucho. En ese contexto, las investigaciones alrededor de los PHA florecieron, y la empresa ICI desarrolló un proceso para producir a escala industrial un bioplástico que se comercializó bajo el nombre de "Biopol". Este polihidroxicanoato es un copolímero de monómeros de cuatro y cinco carbonos, denominados hidroxibutirato e hidroxivalerato, respectivamente. El "Biopol" se producía utilizando la bacteria *Ralstonia eutropha* cultivada en un medio con glucosa y propionato como fuentes de carbono. A pesar de su costo relativamente elevado, el "Biopol" fue utilizado en varias aplicaciones en algunos países como Alemania.

A fines del siglo XX el precio del petróleo disminuyó, y de la misma manera decayó el interés por los PHA. En los últimos años esta tendencia se ha revertido. Además de producirse un aumento en el precio del petróleo, se ha tomado mayor conciencia de que las reservas se están agotando de manera alarmante. Las estimaciones varían mucho, ya que la información que suministran los países que tienen reservas de petróleo no siempre es confiable, pero lo más probable es que comiencen a agotarse en las próximas décadas. Ante esta perspectiva, las investigaciones que involucran a los plásticos obtenidos de otras fuentes han tomado un nuevo impulso, y los polihidroxicanoatos aparecen como una alternativa altamente prometedora.

Por otro lado, los residuos plásticos se acumulan en grandes cantidades y su degradación es lenta. En un estudio reciente publicado en la revista "Science" se observó que hay partículas de plástico presentes en los mares de todo el mundo (24). El reciclado de los plásticos aliviaría un poco la situación, pero sólo en parte. Por este motivo, el reemplazo de los plásticos no degradables por biopolímeros totalmente degradables obtenidos a partir de fuentes de carbono renovables sería una solución mucho más completa para los diferentes aspectos de este problema. Sin embargo, el precio de los bioplásticos sigue siendo demasiado alto como para que puedan desplazar a los plásticos tradicionales. Debido a esto, es necesario diseñar estrategias para obtener polihidroxicanoatos a un costo similar.

El precio final de los biopolímeros depende de varios factores, entre ellos los costos de la producción, el rendimiento de polímero obtenido y los costos de procesamiento. Existen actualmente varios enfoques para lograr producir PHA a precios competitivos.

## **Producción de PHA en plantas**

Las plantas serían la alternativa ideal para la producción de biopolímeros, debido a la posibilidad de cultivarlas en grandes cantidades utilizando la fuente de energía más económica que existe: la luz solar. Se han logrado introducir y expresar los genes bacterianos necesarios para la síntesis de PHA en plantas de cultivo (18), lográndose obtener pequeñas cantidades de polímero.

Sin embargo, para poder utilizar plantas para la producción de PHA es necesario solucionar una serie de problemas. Por ejemplo, el metabolismo vegetal está altamente compartimentalizado, lo cual complica la tarea, ya que es necesario que los genes *pha* se expresen en el compartimiento celular que contiene la mayor concentración de acetil-CoA, y al mismo tiempo impedir que se vea afectado el crecimiento de la planta (10).

## **Producción de PHA en microorganismos**

Para poder desarrollar un proceso de producción de PHAs mediante fermentación utilizando microorganismos es necesario optimizar el rendimiento y la facilidad de purificación del polímero, y fundamentalmente abaratar el costo de los sustratos utilizados para su obtención.

Los primeros procesos desarrollados para la producción de PHA en microorganismos se realizaron mediante fermentación utilizando a la bacteria *Ralstonia eutropha*, la cual es capaz de producir PHB a partir de glucosa, o polihidroxibutirato-valerato (PHBV) a partir de glucosa y propionato, sustratos cuyo alto costo incidía en el precio final del polímero obtenido.

Actualmente, existen varios procesos desarrollados para la producción de PHA por fermentación a partir de sustratos económicos: en Brasil se producen a partir de melaza de caña, y en Estados Unidos y Corea a partir de varios sustratos de origen vegetal.

## **Importancia de los PHA en la supervivencia bacteriana**

La gran mayoría de los seres vivos acumulan diferentes sustancias de reserva cuando existe un exceso de recursos en su entorno. Cuando los nutrientes se vuelven escasos, son utilizadas para poder sobrevivir.

Entre las sustancias de reserva acumuladas por los organismos procariotas se encuentran los polihidroxicanoatos (PHA). Estos polímeros son acumulados en gránulos intracelulares por numerosas especies de bacterias, en condiciones limitantes de nutrientes esenciales para el crecimiento (tales como nitrógeno combinado, azufre o fosfatos) y exceso en la fuente de carbono (23). Cuando la fuente de carbono externa se agota, o si el nutriente limitante es suministrado nuevamente, el PHA es depolimerizado y posteriormente metabolizado como fuente de carbono y energía (12).

La utilización de dicho polímero es considerada una estrategia desarrollada por las bacterias para incrementar su supervivencia en ambientes cambiantes. Los PHA son utilizados como fuente de carbono y energía en condiciones de escasez de nutrientes (11), como fuente de carbono y energía para el enquistamiento y la esporulación (1), para la degradación de compuestos tóxicos (4), y como fuente de poder reductor (5).

Las investigaciones realizadas sobre los PHA en los últimos años apuntan a reducir los costos de producción y aumentar la productividad utilizando diversas estrategias. Para lograr estos objetivos es fundamental optimizar el proceso de fermentación. Trabajos recientes han demostrado la importancia del estudio de la respuesta general a estrés para el desarrollo de estos procesos (3, 13), señalando la necesidad de realizar tanto estudios básicos como aplicados para el diseño de procesos biotecnológicos que involucran pasos de fermentación.

En nuestro laboratorio se llevan a cabo estudios orientados hacia estos objetivos, que incluyen el rastreo de nuevas cepas productoras, la optimización de las estrategias de cultivo y la producción de PHA utilizando cepas de *E. coli* recombinantes. Por otra parte, se realizan investigaciones relacionadas con la importancia del polímero en la supervivencia bacteriana y en los mecanismos de respuesta a estrés. Parte de estos estudios se presentan a continuación.

## **Resultados y Discusión**

### **Síntesis de PHA en *Azotobacter* sp. FA8**

*Azotobacter* sp. FA8 es una bacteria productora de PHB aislada de muestras de suelo. Esta cepa puede utilizar sacarosa o melazas de caña, un subproducto de la obtención de azúcar de caña muy barato en nuestro país y en los diferentes países de la región, para producir PHB. Otra característica importante de este microorganismo es que no forma cápsula, lo cual significa que no deriva la fuente carbonada para la síntesis de exopolisacáridos.

En esta bacteria el polímero se sintetiza mediante un camino metabólico que involucra tres enzimas: una  $\beta$ -cetotilasa, que condensa dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA, una acetoacetil-CoA reductasa, que convierte este compuesto en 3-hidroxiacetil-CoA, y una polimerasa, que polimeriza los monómeros. Este camino metabólico es el que utilizan la mayoría de las bacterias productoras de PHB, tales como *R. eutropha*. En *Azotobacter* sp. FA8 estas enzimas están codificadas por los genes *phaB*, *phaA* y *phaC*, que han sido clonados y caracterizados en nuestro laboratorio (16).

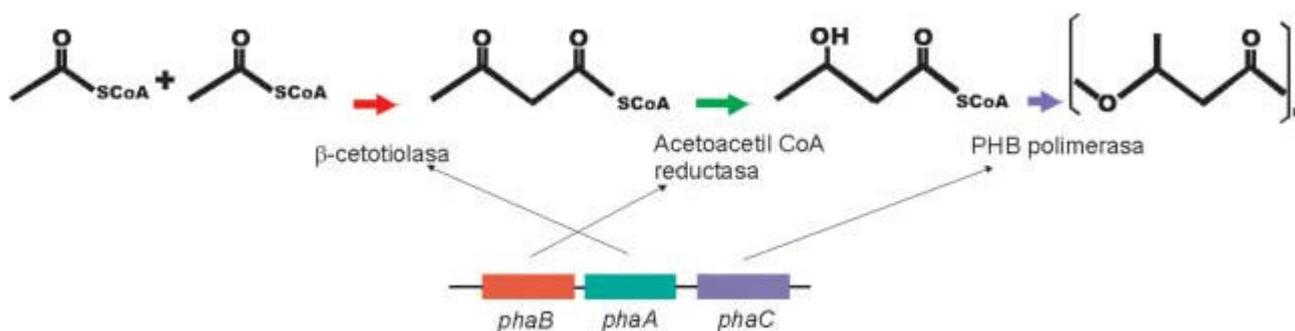
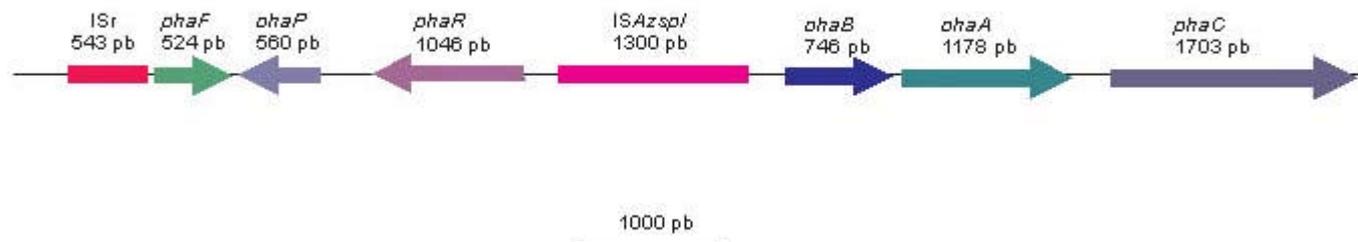


Figura 3. Esquema de la síntesis de PHB en *Azotobacter* sp. FA8.

Existen otras proteínas involucradas en la regulación de la biosíntesis del polímero y en la formación de los gránulos intracitoplasmáticos. Se han descrito varias proteínas estructurales. Una de ellas son las fasinias, que se encuentran asociadas a los gránulos de PHA. Estas proteínas podrían afectar el tamaño y la pureza de los gránulos, ya que son importantes para la forma que el gránulo adquiere intracelularmente e impiden que otras proteínas puedan asociarse inespecíficamente, lo cual simplifica la purificación del polímero. La interacción entre las proteínas asociadas a los gránulos es prácticamente desconocida en todas las especies estudiadas hasta ahora. Sin embargo, es probable que las proteínas no catalíticas interactúen con las proteínas enzimáticamente activas, como las sintetas y las depolimerasas, afectando la velocidad de producción de PHA.

Además de los genes estructurales, *phaB*, *phaA* y *phaC*, en la misma región del genoma de *Azotobacter* sp. FA8 se han encontrado otros genes asociados al metabolismo de los PHA. Entre ellos se encuentran, el gen *phaP*, el cual codifica para una proteína asociada a los gránulos de PHA, y los genes *phaF* y *phaR*, que poseen una posible función regulatoria de la síntesis y acumulación de PHA y son homólogos a genes involucrados en la producción de PHA en otros microorganismos (17). Por otro lado, también se ha identificado una secuencia de inserción completa (ISAzspI) y los restos de otra (ISr), situadas a ambos lados del grupo formado por los genes *phaF*, *phaP* y *phaR*. Esto sugiere la posibilidad de que estos genes hayan sido transferidos a *Azotobacter* a partir de otro microorganismo mediante un mecanismo que involucra secuencias de inserción, similar al observado en la transferencia de islas de patogenia.



**Figura 4. Organización genética de la región *pha* de *Azotobacter* sp. FA8.** Las flechas indican el sentido de la transcripción. La barra representa una longitud de 1000 pares de bases (pb).

### Producción de PHA en *Escherichia coli* recombinante

Los productores naturales de PHA, como *Azotobacter* sp. FA8, se han adaptado a la acumulación de estos polímeros durante la evolución, pero normalmente tienen un tiempo de generación largo y temperaturas de crecimiento relativamente bajas. Además, son difíciles de lisar y poseen enzimas que degradan el polímero acumulado. Estas características dificultan su uso en la producción industrial de los biopolímeros.

Entre las cepas bacterianas comúnmente utilizadas en procesos biotecnológicos, *E. coli* es el microorganismo mejor conocido, ya que su metabolismo ha sido extensivamente estudiado y caracterizado. Debido a esto, es un microorganismo modelo, ideal para su uso en fermentaciones. Además, debido al gran número de herramientas disponibles para realizar manipulaciones genéticas, es el organismo adecuado para realizar ensayos previos al traspaso de los genes a plantas. *E. coli* no posee la capacidad de sintetizar o degradar PHA pero crece rápido y es fácil de lisar. Se han expresado los genes *pha* de varias especies bacterianas en *E. coli*, obteniéndose buenos rendimientos del polímero. Asimismo, al no poseer enzimas que degraden a los PHA, permite la acumulación de polímero de alto peso molecular.

Los genes necesarios para la síntesis de PHB de *Azotobacter* sp. FA8, *phaB*, *phaA* y *phaC*, han sido clonados y caracterizados en el laboratorio y transferidos a una cepa de *E. coli* adecuada para la producción del polímero.

Para lograr una buena acumulación del polímero en *E. coli* recombinante es necesario utilizar vectores de expresión estables con un alto número de copias, pues uno de los mayores desafíos del sistema es la expresión estable y sostenida de los genes *pha*. Para esto, se construyó un plásmido recombinante introduciendo los genes *pha* de *Azotobacter* sp FA8 bajo la regulación del promotor lactosa en un vector de expresión de alto número de copias. Este plásmido se transfirió a *E. coli* y permitió la

obtención de PHB en la cepa recombinante a partir de glucosa. La cepa utilizada también degrada lactosa, por lo que se analizó la producción del polímero utilizando lactosa y también lactosuero en un medio salino, obteniéndose una buena cantidad de polímero en ambos casos. En este momento se están realizando las pruebas piloto para aumentar la escala del proceso, con el objeto de desarrollar un proceso económicamente atractivo de producción del polímero, ya que el medio de cultivo utilizado solamente contiene sales y lactosuero, un desecho de la industria lechera, como fuente de carbono. La utilización del lactosuero tiene una ventaja adicional, ya que se trata de un desecho contaminante cuya eliminación adecuada involucra un costo elevado. Su utilización como sustrato de una fermentación cuyo producto es una sustancia con un buen valor económico implica entonces un doble beneficio.



**Figura 5. Trozos de polihidroxibutirato (PHB) extraído de cultivos bacterianos.** . izq) *Azotobacter* sp FA8 crecida en medio mínimo con 3% de glucosa der) *E. coli* recombinante (contiene los genes estructurales *pha* de *Azotobacter* sp. FA8) crecida en medio mínimo con 2,5 % de lactosa

## **Papel de los PHA en la supervivencia y en la resistencia a factores de estrés**

Trabajos realizados en el laboratorio con cepas salvajes y deficientes en la síntesis de PHB de *Ralstonia eutropha* y *Bacillus megaterium*, demostraron que aquellas cepas capaces de sintetizar el polímero de reserva tenían mayor supervivencia en agua de río y mayor capacidad de competencia con las bacterias autóctonas, que sus correspondientes mutantes (8). Conclusiones similares se obtuvieron cuando se analizó la supervivencia de *B. megaterium* utilizando microcosmos de suelo (9). Estos experimentos sugirieron que la síntesis y utilización del polímero aumentaba la supervivencia y la capacidad de competencia bacteriana en ambientes naturales. A partir de estos resultados, se decidió analizar el efecto de la degradación de PHA en la supervivencia. Para esto, se comparó la supervivencia en agua de río de una cepa salvaje de *Pseudomonas putida*, con la supervivencia de una cepa mutante en la enzima PHA depolimerasa. Los resultados obtenidos con estas cepas demostraron que la incapacidad de degradación de PHA representaba una desventaja para la supervivencia, tanto en agua de río estéril, como en agua de río con la comunidad bacteriana natural (19). Además se comprobó que la deficiencia en la capacidad de degradación de PHA, tenía un

efecto negativo sobre el desarrollo de resistencia al estrés. Se observó que la mutante deficiente en la depolimerasa de PHA mostraba una menor supervivencia a la exposición al etanol y al estrés térmico luego de varios días de permanencia en agua de río. Dado que, tanto la entrada en la fase estacionaria como las condiciones de deficiencias nutricionales encontradas en el ambiente confieren resistencia a múltiples agentes de estrés, los resultados obtenidos con las cepas de *P. putida* indicaban que existiría una alteración en la respuesta al estrés ante la incapacidad de utilizar PHA.

## Relación entre la degradación de los PHA y los mecanismos de respuesta al estrés

Los resultados descritos anteriormente demuestran que los PHA juegan un papel importante en la supervivencia bacteriana ante condiciones de estrés. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos mediante los cuales la utilización de PHA favorece la supervivencia bacteriana en condiciones desfavorables. En un trabajo realizado con *R. eutropha* en 1967, se sugirió que existía una asociación entre la utilización de los PHA y la fosforilación oxidativa (6).

Se sabe que, ante condiciones adversas, las bacterias son capaces de responder con diversos mecanismos de control activos que les permiten hacer frente a dichas condiciones. Uno de estos mecanismos es la **respuesta general a estrés** que se induce en bacterias Gram-negativas ante distintas condiciones de estrés ambiental, tales como escasez en nutrientes, estrés osmótico, estrés oxidativo y cambios bruscos de temperatura. Los genes involucrados en la resistencia al estrés se encuentran bajo el control de una subunidad sigma alternativa de la RNA polimerasa denominada  $\sigma^S$ , codificada por el gen *rpoS*.

Otra respuesta desencadenada ante condiciones de estrés es la **respuesta estricta**, que se caracteriza por un aumento en el nivel intracelular de la molécula tetrafosfato de guanosina [ppGpp]. Dicha molécula modula la expresión de varios genes, entre ellos el *rpoS*.

Teniendo en cuenta que la degradación de PHA favorece la supervivencia y la resistencia a estrés de las bacterias en condiciones de escasez nutricional, en el laboratorio decidimos analizar si la degradación de PHA tenía algún efecto sobre los mecanismos de repuesta al estrés en la bacteria *P. putida*. Para esto se utilizó una cepa salvaje y una cepa con una mutación en la enzima PhaZ, encargada de degradar PHA, y se analizó el contenido intracelular de ppGpp en condiciones de depolimerización de PHA, así como también la resistencia a estrés térmico y oxidativo, y el contenido intracelular de  $\sigma^S$  durante ayuno de carbono.

Los resultados obtenidos mostraron que la degradación de PHA se encontraba relacionada con un aumento intracelular en el nivel de ppGpp (20), y que a su vez, la capacidad de degradación del polímero incrementaba el nivel intracelular de  $\sigma^S$  y la resistencia a estrés térmico y oxidativo

durante ayuno de carbono (21). Estos resultados sugirieron que existe una relación entre la depolimerización de PHA y la respuesta general a estrés controlada por RpoS, que tal vez se encuentre mediada por ppGpp.

Dado que el polihidroxicanoato es un reservorio de carbono, energía y equivalentes de reducción, tanto su síntesis como su degradación tienen un efecto importante sobre el metabolismo central de la célula procariota. Los resultados obtenidos en el laboratorio demuestran la influencia del PHA en los complejos mecanismos regulatorios involucrados en la respuesta al estrés, y abren el camino para investigar la conexión entre los factores que regulan la degradación de PHA y las redes regulatorias globales de adaptabilidad bacteriana al ambiente.

## **Materiales y Métodos**

### Condiciones de cultivo y determinación de PHA:

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo: para *Pseudomonas putida* medio E (25), para *Escherichia coli* recombinantes medio M9 (con glucosa, lactosa o lactosuero) (22) y para *Azotobacter* sp. FA8 medio de Burk (15). La acumulación de PHA se determinó cualitativamente mediante tinción con azul de Nilo (14) y cuantitativamente por cromatografía gaseosa (2).

### Experimentos de supervivencia y resistencia a estrés:

Se analizaron cultivos en distintas condiciones de crecimiento y acumulación de PHA. La concentración o dosis de los agentes estresantes se determinó de manera de lograr la rápida disminución de la sobrevivencia en cultivos en condiciones de crecimiento exponencial. Se ajustaron las condiciones del experimento (tiempo de exposición, medio de cultivo, fase de crecimiento, número de bacterias/ml) y a diferentes intervalos de tiempo, luego de la exposición al agente de estrés, se cuantificó el número de bacterias mediante recuento en placas de agar nutritivo.

### Manipulaciones genéticas

El clonado de los genes *pha* de *Azotobacter* sp. FA8 se realizó mediante la construcción de una biblioteca genómica (16), utilizando el cósmido pVK102 como vector y un *kit* de empaquetado de fago lambda para transducción. Los genes *pha* se identificaron por complementación de *Ralstonia eutropha* PHA-4 y por hibridización mediante sondas heterólogas utilizando reactivos luminiscentes. Los subclones obtenidos se secuenciaron por *primer walking* mediante un servicio de secuenciación. Para la purificación de plásmidos y fragmentos de DNA se recurrió a *kits* comerciales. Como vector de subclonado se utilizó el plásmido pBluescriptSK-, o el pGEMT-Easy en el caso de fragmentos de amplificación.

## Referencias

1. Anderson, A. J., and E. A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial use of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:450-472.
2. Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller, C. 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate for potential applications biodegradable polyesters. *Appl Environ Microbiol* 54: 1977-1982
3. Cserjan-Puschmann, M., Kramer, W., Duerrschmid, E., Striedner, G. y Bayer, K. 1999. Metabolic approaches for the optimisation of recombinant fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 43-50
4. Godoy, F. A., M. Bunster, V. Matus, C. Aranda, B. Gonzalez, and M. A. Martinez. 2003. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37. *Lett Appl Microbiol* 36:315-20.
5. Henrysson, T., and P. L. McCarty. 1993. Influence of the endogenous storage lipid poly- $\beta$ -hydroxybutyrate on the reducing power availability during cometabolism of trichloroethylene and naphthalene by resting methanotrophic mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1602-1606.
6. Hippe, H. 1967. Abbau und Wiederverwertung von Poly- $\beta$ -hydroxybuttersäure durch *Hydrogenomonas* H16. *Arch. Mikrobiol.* 56:248-277.
7. Lemoigne, M. 1926. Produits de déshydratation et de polymérisation de l'acide  $\beta$ -oxybutyrique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8:770-782.
8. López, N. I., M. E. Floccari, S. A., A. F. García, and M. B. S. 1995. Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 16:95-112.
9. López, N. I., Ruiz, J. A. y Méndez, B. S. 1998. Survival of poly-3-hydroxybutyrate-producing bacteria in soil microcosms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:681-684.
10. Madison, L. L., and G. W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:21-53.
11. Matin, A., C. Veldhuis, V. Stegeman, and M. Veenhuis. 1979. Selective advantage of a *Spirillum* sp. in a carbon-limited environment. Accumulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and its role in starvation. *J. Gen. Microbiol.* 112:349-355.
12. Merrick, J. M., and M. Doudoroff. 1964. Depolymerization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* 88:60-71.
13. Notley-McRobb, L.; King, T. y Ferenci, T. 2002. rpoS Mutations and Loss of General Stress Resistance in *Escherichia coli* Populations as a Consequence of Conflict between Competing Stress Responses. *J. Bacteriol.* 184: 806-811.
14. Ostle A, Holt GJ. 1982 Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* 44: 238-241
15. Page, W.J., Manchak, J., Rudy, B. 1992. Formation of poly(hydroxybutyrate-Co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2866-2873
16. Pettinari, M. J., G. J. Vazquez, D. Silberschmidt, B. Rehm, A. Steinbuchel, and B. S. Mendez. 2001. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. strain FA8. *Appl Environ Microbiol* 67:5331-4.
17. Pettinari, J. M., L. Chaneton, G. Vazquez, A. Steinbuchel, and B. S. Mendez. 2003. Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8. *Plasmid* 50:36-44.
18. Poirier, Y., C. Somerville, L. A. Schechtman, M. M. Satkowski, and I. Noda. 1995. Synthesis of high-molecular-weight poly([R]-(-)-3-hydroxybutyrate) in transgenic *Arabidopsis thaliana* plant cells. *Int J Biol Macromol* 17:7-12.
19. Ruiz, J. A., N. I. Lopez, and B. S. Mendez. 1999. Polyhydroxyalkanoates degradation affects survival of *Pseudomonas oleovorans* in river water microcosms. *Rev Argent Microbiol* 31:201-4.

20. Ruiz, J. A., N. I. Lopez, R. O. Fernandez, and B. S. Mendez. 2001. Polyhydroxyalkanoate degradation is associated with nucleotide accumulation and enhances stress resistance and survival of *Pseudomonas oleovorans* in natural water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 67:225-30.
21. Ruiz, J. A., N. I. Lopez, and B. S. Mendez. 2004. *rpoS* gene expression in carbon-starved cultures of the Polyhydroxyalkanoate-accumulating species *Pseudomonas oleovorans*. *Curr Microbiol* 48:396-400.
22. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor. N.Y.
23. Schlegel, H. J., G. Gottschalk, and R. von Bartha. 1961. Formation and utilization of poly-b-hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature* 191:463-465.
24. Thompson, R. C., Y. Olsen, R. P. Mitchell, A. Davis, S. J. Rowland, A. W. John, D. McGonigle, and A. E. Russell. 2004. Lost at sea: where is all the plastic? *Science* 304:838.
25. Vogel HJ, Bonner BN. 1956. Acetyl-ornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* 218:97-106

Alejandra de Almeida es estudiante de Ciencias Biológicas.

Jimena A. Ruiz es Doctora en Ciencias Biológicas y docente investigadora de la Universidad de Buenos Aires.

Nancy I. López es Doctora en Ciencias del Mar, docente investigadora de la Universidad de Buenos Aires e investigadora del CONICET

\*M. Julia Pettinari es Doctora en Ciencias Biológicas, docente investigadora de la Universidad de Buenos Aires e investigadora del CONICET. E-mail: [jul@qb.fcen.uba.ar](mailto:jul@qb.fcen.uba.ar)

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948

[www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)

*Revista Química Viva*  
Número 3, año 3, septiembre 2004  
[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)