

# Triacilglicéridos en bacterias *Rhodococcus*

Alvarez, Héctor M.<sup>1</sup>; Kalscheuer, Rainer <sup>2</sup>; Steinbüchel, Alexander<sup>2</sup>

Dpto. Bioquímica. Facultad de Ciencias Naturales  
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco  
Km 4, Ciudad Universitaria  
(9000) Comodoro Rivadavia (Chubut), Argentina  
Tel y FAX: 0297- 4550339. E-mail halvarez@unpata.edu.ar

**RESUMEN:** La síntesis y acumulación de triacilglicéridos no ser una propiedad habitual en bacterias, y sólo está restringida a ciertos géneros, como por ejemplo *Rhodococcus*.

En los últimos años se han realizado avances en el entendimiento de los procesos de síntesis, acumulación y movilización de triglicéridos en estas bacterias, así como sus relaciones con la biosíntesis de otros lípidos de reserva, como son los polihidroxicanoatos (PHA), y su función en la célula.

Este trabajo resume los principales resultados de las investigaciones desarrolladas en bacterias *Rhodococcus* y en géneros taxonómicamente relacionados, respecto de la fisiología, bioquímica y biología molecular de la acumulación de triacilglicéridos.

Palabras claves: Triacilglicéridos - Rodococcus

**SUMMARY:** Triacylglycerols in *Rhodococcus* bacteria. Alvarez, Héctor M. <sup>1</sup>, Kalscheuer, Rainer <sup>2</sup>, Steinbüchel, Alexander <sup>2</sup>. The biosynthesis and accumulation of triacylglycerols is an unusual feature for bacteria which has been described only for few genera, such as *Rhodococcus*.

Significant advances have been made lately in our understanding of the biosynthesis, accumulation and mobilisation of triacylglycerols by these bacteria, as well as on their relationship with the biosynthesis of other storage lipids, such as polyhydroxyalkanoates (PHA), and their role in the cells.

This work discusses the most important results of the research on the physiology, biochemistry and molecular biology of the triacylglycerols accumulation by *Rhodococcus* and taxonomic related bacteria.

Key words: Triacylglycerols - Rodococcus.

## Introducción

Tanto las células eucariotas como las procariontas poseen la capacidad de acumular lípidos como compuestos de reserva de carbono y energía. Los lípidos representan una forma conveniente de almacenamiento de energía en la célula por su alto valor calórico, en comparación con los carbohidratos y las proteínas. La mayoría de las bacterias acumulan lípidos especializados, como por ejemplo los polihidroxicanoatos (PHA), entre los cuales, el más común es el polihidroxibutirato (PHB) (1). Los

PHA son almacenados en forma de inclusiones insolubles en el citoplasma de la célula durante el cultivo en presencia de un exceso de la fuente de carbono y un déficit de un nutriente esencial que limite el crecimiento, como por ejemplo la fuente de nitrógeno o fósforo (1). Estos compuestos han generado en los últimos años un considerable interés en el ámbito científico e industrial debido a las numerosas aplicaciones potenciales de estos poliésteres termoplásticos biodegradables (2). Esto ha producido un gran avance en el conocimiento de aspectos básicos relacionados con la bioquímica, fisiología y biología molecular del proceso de acumulación de PHA en bacterias.

Otro tipo de compuestos de acumulación lipídicos hallados en ciertos géneros bacterianos son las ceras, que son ésteres de ácidos grasos y alcoholes de cadena larga. Estos compuestos

<sup>1</sup>Cátedra de Genética, Dpto. Bioquímica, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Km 4, 9000 Comodoro Rivadavia, Argentina. E-mail halvarez@unpata.edu.ar

<sup>2</sup>Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, Corrensstrasse 3, D-48149 Münster, Germany.

hidrofóbicos han sido descritos en bacterias del género *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Neisseria* (3, 4, 5, 6, 7) y en Actinomycetes (8, 9). Las ceras se acumulan en el interior de inclusiones citoplasmáticas, que contienen, además, fosfolípidos y proteínas como componentes menores (4, 7).

La acumulación de lípidos de mayor complejidad como son los triacilglicéridos no es una característica común en bacterias y sólo está restringida a unos pocos géneros bacterianos, como *Acinetobacter* (6, 7) y microorganismos pertenecientes al grupo de los Actinomycetes: *Mycobacterium* (10), *Streptomyces* (11), *Nocardia* y *Rhodococcus* (8, 9, 12). Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la bioquímica, genética y biología molecular de la acumulación de triglicéridos en plantas y semillas (13, 14, 15). Sin embargo, recientemente han comenzado estudios básicos relacionados con la biosíntesis y acumulación de triacilglicéridos en bacterias. Este trabajo tiende a resumir los resultados de las investigaciones de los últimos seis años realizadas en bacterias del género *Rhodococcus*.

#### *Acumulación de triacilglicéridos en bacterias Rhodococcus y en otros Actinomycetes*

Hace unos años atrás se aisló de una muestra de suelo una cepa bacteriana que fue identificada como *Rhodococcus opacus* PD630, con la capacidad de producir gran número de inclusiones celulares durante el crecimiento con diferentes fuentes de carbono, tales como azúcares, ácidos orgánicos y alcanos (12). Estas inclusiones estaban compuestas por lípidos neutros (98 %, p/p), fosfolípidos (1,2 %, p/p) y proteínas (0,8%, p/p). Los triacilglicéridos fueron los componentes mayoritarios de los lípidos neutros, además de cantidades menores de diacilglicéridos, monoacilglicéridos y ácidos grasos libres (12, 16). El contenido total de ácidos grasos en las células de *R. opacus* PD630 fue de 76 y 87 % del peso celular seco durante el cultivo con gluconato y aceite de oliva, respectivamente. Esta característica de la cepa PD630, llevó posteriormente a investigar otros representantes del género *Rhodococcus* y *Nocardia*, y más recientemente bacterias del grupo de los Actinomycetes autóctonas de suelos de la Patagonia Central, respecto a la acumulación de triacilglicéridos. En la tabla 1 se muestran las cepas bacterianas utilizadas para

el estudio mencionado. Todas las bacterias investigadas tuvieron la capacidad de sintetizar y acumular cantidades variables de triacilglicérols, además de cantidades menores de diacilglicéridos y ceras, a partir de diferentes fuentes de carbono bajo condiciones limitantes de nitrógeno (8, 9). Esto sugiere que la acumulación de los lípidos neutros es una propiedad usual en bacterias del grupo de los Actinomycetes.

Además de los lípidos neutros mencionados, todas las bacterias investigadas, excepto la cepa PD630, acumularon PHA compuesto por un copoliéster de ácido 3-hidroxi-butírico (C<sub>4</sub>) (3HB) y ácido 3-hidroxi-valérico (C<sub>5</sub>) (3HV) como monómeros, o un homopoliéster de 3HB; durante el crecimiento con sustratos no relacionados, tales como el gluconato o acetato (8, 9). Sin embargo, ninguno de estos microorganismos sintetizaron PHA a partir de alcanos u otros hidrocarburos, pero sí lípidos neutros.

Las mutantes de *R. ruber* incapaces de acumular PHA o con una producción disminuida de poliésteres investigadas, acumularon cantidades variables de triacilglicérols (8). En algunas de ellas, el contenido total de lípidos neutros fue mayor que en el tipo salvaje. Esto puede explicar el comportamiento diferente de las mutantes PHA-negativo de *R. ruber* y de *Ralstonia eutropha*, respecto de la excreción de piruvato al medio de cultivo durante el cultivo con gluconato o fructosa como fuentes de carbono. Mientras que la segunda excreta grandes cantidades de piruvato en las condiciones mencionadas (17), las mutantes PHA-negativo de *R. ruber* no lo hacen (18). En estas últimas, los intermediarios metabólicos son utilizados probablemente para la síntesis de los triacilglicéridos en ausencia de PHA.

#### *Fisiología de la acumulación de triacilglicéridos en bacterias Rhodococcus*

Se investigó el proceso de acumulación de triglicéridos y otros lípidos a lo largo del tiempo en las bacterias *R. opacus* PD630 y *R. ruber* cultivadas en presencia de un exceso de la fuente de carbono y un déficit de la fuente de nitrógeno. La síntesis y acumulación de triacilglicéridos en *R. opacus* PD630 se llevó a cabo durante la fase estacionaria de crecimiento, una vez se consumió la fuente de nitrógeno del medio (19). Los ácidos grasos sinte-

tizados durante la fase exponencial se utilizaron principalmente para la producción de fosfolípidos de la membrana celular. Una vez que se consumió el amonio del medio, se restringió la proliferación celular y las células ingresaron en la fase estacionaria. Durante este período, las células continuaron utilizando la fuente de carbono principalmente para la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, el flujo de ácidos grasos se dirigió predominantemente hacia la síntesis de triglicéridos, que fueron acumulados en forma de inclusiones insolubles. La composición de ácidos grasos se mantuvo constante durante el período de estudio, con el ácido hexadecanoico (ácido palmítico) ( $C_{16:0}$ ) y el ácido octadecenoico (ácido oleico) ( $C_{18:1\Delta^{9,cis}}$ ) como componentes predominantes de los triacilglicéridos (16).

La síntesis y acumulación del poliéster poli(3HB-co-3HV), y de los triacilglicéridos en *R. ruber* tuvieron lugar en diferentes fases de crecimiento. Esto sugiere que la biosíntesis de ambos lípidos de almacenamiento está regulada independientemente en esta bacteria. Durante la fase exponencial de crecimiento, las células utilizaron las fuentes de carbono y de nitrógeno no sólo para la producción de componentes esenciales para la proliferación celular, sino también para la síntesis de PHA. La acumulación de triacilglicéridos comenzó en la etapa tardía de la fase exponencial, cuando desapareció la fuente de nitrógeno del medio, y continuó durante la fase estacionaria. En la fase estacionaria temprana, el contenido de PHA en las células alcanzó el máximo. Durante este período se produjo la máxima competencia de las rutas biosintéticas de

PHA y triacilglicéridos por precursores comunes, como el acetyl-CoA y el propionil-CoA (8). En la fase estacionaria tardía, los precursores fueron utilizados preferentemente para la síntesis de ácidos grasos *de novo* para la acumulación de triglicéridos (19).

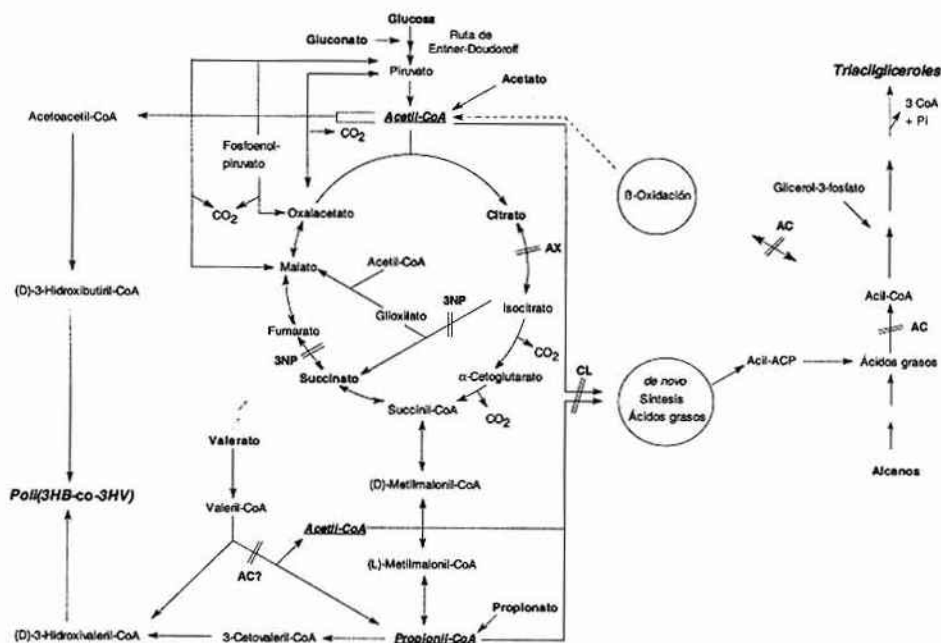
Estos resultados demuestran que la síntesis *de novo* de ácidos grasos en las bacterias *Rhodococcus* continúa durante la fase estacionaria de crecimiento, aunque cambia el destino de los ácidos grasos sintetizados en las diferentes etapas del crecimiento, adaptándose a las necesidades de la célula. Esto contrasta con otras bacterias, como por ejemplo *Escherichia coli*, quien bloquea la síntesis *de novo* de ácidos grasos al entrar en la fase estacionaria de crecimiento (20). Esto permite a las bacterias *Rhodococcus* aprovechar el exceso de la fuente de carbono y transformarlo en un compuesto endógeno de alto rendimiento energético.

#### *Bioquímica de la acumulación de triacilglicéridos en bacterias Rhodococcus*

En los lípidos producidos por las bacterias investigadas se encontraron ácidos grasos de cadena larga saturados e insaturados con un largo de cadena principalmente entre 13 y 19 átomos de carbono, con predominio de 16:0, 17:0, 17:1 y 18:1 (12, 16).

En la Fig. 1 se muestran las vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos y de las unidades monoméricas de los PHA propuestas para las bacterias *Rhodococcus* y *Nocardia* a partir de diferentes fuentes de carbono (8).

**Figura 1:** Rutas de biosíntesis de PHA y triacilglicéridos propuestas para las bacterias *Rhodococcus* y *Nocardia* investigadas.



Las reacciones involucradas en la síntesis de PHA mostradas en el lado izquierdo parecen estar ausentes en *R. opacus* PD630. Del lado derecho se observan las rutas metabólicas de la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos. En el centro se observan las reacciones de formación de los precursores acetil-CoA y propionil-CoA, que son compartidos por ambas rutas biosintéticas. Las fuentes de carbono están representadas en letra negra. Las doble barras representan los sitios de bloqueo de los inhibidores metabólicos utilizados para el estudio. Abreviaturas: AX, alloxan; 3NP, 3 nitropropionato; CL, cerulenina; AC, ácido acrílico; 3HB, 3-hidroxi-butarato; 3HV, 3-hidroxi-valerato. (Fuente: Alvarez et al. 1997 [8])

Los principales precursores de la síntesis *de novo* de ácidos grasos son el acetil-CoA y el propionil-CoA. Este último compuesto es producido en estas bacterias principalmente por la ruta del metil-malonil-CoA a partir del intermediario del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, succinil-CoA (8, 21). El propionil-CoA es posteriormente utilizado como precursor para la síntesis de los ácidos grasos de cadena impar y del monómero 3HV ( $C_3$ ) del copoliéster. En aquellas cepas que acumulan similares cantidades de PHA y triacilglicéridos, como *R. ruber* o *N. corallina*, las rutas biosintéticas de ambos lípidos de almacenamiento compiten por los precursores acetil-CoA y propionil-CoA (8). El flujo de estos intermediarios se vuelca hacia la síntesis de poliésteres en *R. ruber* cuando se bloquea la síntesis *de novo* de ácidos grasos por la presencia de cerulenina, un inhibidor de las enzimas cetoacil sintetasa I y II, de manera que aumenta el contenido total de copoliéster en la célula y varía la composición de monómeros del mismo, con mayor proporción del componente 3HB (8). En *R. opacus* PD630, que solo acumula lípidos neutros y no PHA, no hay competencia por los precursores de la síntesis de ácidos grasos, y por lo tanto, hay mayor contenido de la fracción de ácidos grasos impares en comparación con *R. ruber*. En estas bacterias, los substratos que se derivan directamente al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, como el acetato, citrato, o succinato, determinan un aumento de la proporción de ácidos grasos impares comparado con el obtenido a partir de gluconato o glucosa como única fuente de carbono (8).

Cuando se utilizan alcanos como únicas fuentes de carbono, como el pentadecano o hexadecano, los ácidos grasos derivados directamente del substrato y la ruta de la  $\beta$ -oxidación son las fuentes principales de ácidos grasos contenidos en los triacilglicéridos. Probablemente, la oxidación de los alcanos por estas bacterias en condiciones limitantes de nitrógeno no es completa, por lo que no habría en las células precursores disponibles para la síntesis de PHA. Esto podría explicar la ausencia de poliésteres en las células de este tipo de bacterias cultivadas con los hidrocarburos mencionados (12, 22).

Las enzimas de la síntesis de triacilglicéridos en *R. opacus* PD630 parecen ser altamente específicas y con un rango de substratos diferentes de las enzimas respectivas de plantas. La distribución de

ácidos grasos en las diferentes posiciones de la molécula de glicerol no es al azar. Los ácidos grasos saturados más cortos se encuentran preferentemente en la posición 2, mientras que los ácidos grasos insaturados en la posición 3 (16).

Los trabajos desarrollados han demostrado la importancia de la ruta de la  $\beta$ -oxidación en las bacterias del género *Rhodococcus*. El perfil de utilización de hidrocarburos realizado en estas bacterias ha revelado la gran afinidad por compuestos que son derivados a esta ruta catabólica para su degradación. Las cepas investigadas crecieron mejor con mezclas de hidrocarburos ricas en alifáticos, como el gas-oil y kerosene, con alcanos lineales o ramificados y con fenilalcanos (9, 12). Sin embargo, las células no crecieron o presentaron un crecimiento muy pobre con hidrocarburos aromáticos no sustituidos. El hidrocarburo fenildecano fue atacado enzimáticamente en la cadena alifática por *R. opacus* PD630 y derivado directamente a la ruta de la  $\beta$ -oxidación previa oxidación monoterminada (12). Los intermediarios derivados de la oxidación del fenildecano fueron almacenados en las inclusiones insolubles junto con los lípidos neutros producidos.

Otro de los hidrocarburos utilizados como fuente de carbono por varias de las cepas estudiadas fue el alcano ramificado 2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano (pristano). Este compuesto fue también derivado a la ruta de la  $\beta$ -oxidación en la bacteria *Nocardia globerula* 432 (datos no publicados). Los triacilglicéridos acumulados en este microorganismo durante el crecimiento con pristano, contenían una variedad de ácidos grasos ramificados derivados del hidrocarburo.

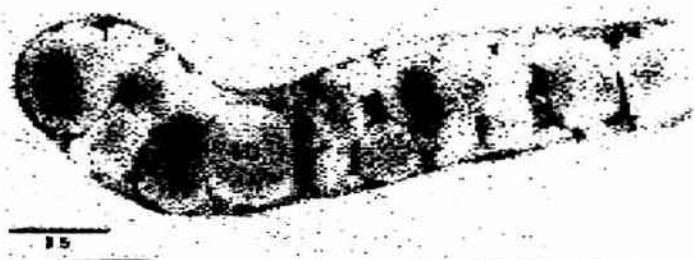
#### *Aislamiento de las inclusiones lipídicas y purificación de proteínas asociadas*

Los lípidos neutros sintetizados por las bacterias *Rhodococcus* fueron almacenados en forma de inclusiones insolubles en el citoplasma celular (9, 12). Estudios de la ultraestructura celular realizados en *R. opacus* PD630 revelaron la presencia de gran cantidad de gránulos citoplasmáticos en una misma célula y de límites totalmente definidos (Fig. 2). Esto sugirió que los gránulos debían poseer componentes que estabilicen los compuestos altamente hidrofóbicos acumulados en el medio acuoso del citoplasma. La presencia de una estructura de membrana separando el contenido de triacilglicéridos del

citoplasma ha sido también descrita en bacterias del género *Streptomyces* (23). Los gránulos lipídicos de *R. opacus* PD630, *R. ruber* y de otras bacterias del género fueron aislados por centrifugación en gradientes discontinuos de glicerol o sacarosa (12, 24). Las inclusiones purificadas de las bacterias

investigadas presentaron gran semejanza con los gránulos de triglicéridos de semillas vegetales, como su estabilidad en buffer, el material lipofílico en estado líquido, la presencia de una envoltura rodeando el contenido y de proteínas asociadas a su superficie (13, 14).

**Figura 2:** Microscopía electrónica de una célula de *Rhodococcus opacus* PD630 cultivada con gluconato en condiciones limitantes de nitrógeno



Se observa gran número de inclusiones transparentes a los electrones (ET1), esféricas, y con una fina envoltura rodeando el contenido hidrofóbico (B). El largo de la barra es en mm. (Fuente: Alvarez et al. 1996 [12]).

Mientras que en *R. opacus* PD630 se aisló un solo tipo de gránulos, en la bacteria *R. ruber* fue posible purificar dos tipos de inclusiones con diferente densidad específica y diferente perfil de proteínas asociadas en análisis de SDS-PAGE (24). Los gránulos de menor densidad específica presentaron un patrón de proteínas asociadas típico de inclusiones de PHA descritas en otras bacterias, con pocas proteínas asociadas, como la PHA-sintasa, la PHA-depolimerasa y las proteínas estructurales denominadas fasinas (25). En contraste, junto con los gránulos de mayor densidad específica de *R. ruber* se copurificaron numerosas proteínas, al igual que en las cepas *R. opacus* PD630 y MR22 y la mutante de *R. ruber* PHA-negativo RM8, quienes solo acumulan triacilglicéridos y no PHA y poseen un solo tipo de inclusiones. Esta característica es también típica de inclusiones lipídicas aisladas de semillas vegetales, que contienen siempre un alto nú-

mero de proteínas asociadas (14, 26). Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que *R. ruber* posee dos sistemas independientes de biosíntesis y acumulación de PHA y triacilglicéridos con diferentes sets de proteínas involucradas.

Estudios de solubilización con detergentes, agentes caotrópicos y otros compuestos permitieron clasificar a las proteínas asociadas a los gránulos de triacilglicéridos de las bacterias *Rhodococcus* en tres grupos: (i) proteínas inespecíficas unidas débilmente a las inclusiones probablemente mediante interacciones iónicas durante el proceso de ruptura de las células, (ii) proteínas unidas más firmemente a los gránulos que pueden ser solubilizadas por tratamientos fuertes con agentes caotrópicos como el cloruro de guanidina o urea, y (iii) proteínas fuertemente asociadas a los gránulos, que permanecen unidas después de tratamiento con dodecilsulfato de sodio (SDS) hasta una concen-

tración del 8 % (p/p) (24). Estas últimas proteínas se encuentran unidas probablemente mediante interacción directa con la matriz hidrofóbica del gránulo a través de un dominio hidrofóbico que se interna profundamente en el mismo. Se sugiere que estas proteínas tendrían un rol específico en el proceso de síntesis, acumulación y movilización de los triacilglicéridos en estas bacterias. Se posee la secuencia de aminoácidos N-terminal de 10 proteínas del segundo y tercer grupo, aunque aún no se conoce la función exacta de estas proteínas. Sin embargo, fue posible identificar una proteína de bajo peso molecular copurificada continuamente con los gránulos de triacilglicéridos de *R. opacus* PD630 y *R. ruber* por su gran homología con la proteína ribosomal L7 de diferentes Actinomycetes, lo cual indica que la síntesis de proteínas involucradas en el metabolismo de los lípidos serían sintetizadas *in situ* en la superficie de las inclusiones de lípidos (24).

Actualmente continúan los estudios tendientes a clarificar la biología molecular del proceso de acumulación de lípidos.

#### *Función de los triacilglicéridos en bacterias Rhodococcus*

Las bacterias del género *Rhodococcus* y de géneros relacionados son ubicuas de ambientes naturales, principalmente en suelo (27). Los microorganismos ambientales están sometidos constantemente a condiciones fluctuantes, como cambios de temperatura, humedad o en la disponibilidad de nutrientes. Por otro lado, se encuentran en contacto directo con el medio que los rodea y de esta manera están fuertemente influenciados por las condiciones del mismo. Debido a esto, los microorganismos deben desarrollar ciertos mecanismos que les permitan responder favorablemente a los cambios del ambiente y de esta manera sobrevivir en los períodos de condiciones no favorables. Una estrategia común es la acumulación intracelular de compuestos de reserva, que sirven de fuentes de carbono y energía en períodos de escasez de nutrientes externos. En este contexto, se demostró que los triacilglicéridos acumulados por las bacterias investigadas sirven con este propósito. Las bacterias *R. opacus* PD630 y *R. ruber* fueron capaces de movilizar los lípidos acumulados previamente, durante el cultivo en medio mineral en presencia de una fuente de nitrógeno y ausencia de

una fuente externa de carbono (19). *R. ruber* movilizó simultáneamente los triacilglicéridos y los PHA en las condiciones mencionadas. Esto demuestra que las cepas mencionadas poseen lipasas y PHA-depolimerasas intracelulares responsables de la movilización de los lípidos de reserva respectivos.

La presencia de triacilglicéridos como material de reserva en estas bacterias puede representar una ventaja selectiva en el ambiente, considerando que estos lípidos poseen un alto rendimiento energético en comparación con otros compuestos de almacenamiento. Estudios recientes de las comunidades bacterianas autóctonas de suelos semi-áridos de la Patagonia revelaron el predominio de bacterias Gram-positivas del grupo de los Actinomycetes (28). Se determinó también que estos microorganismos juegan un rol importante en los procesos de biorremediación de hidrocarburos en la Patagonia (28, 29). Los suelos de la Patagonia Central poseen características muy particulares, como son la aridez, las bajas temperaturas y el bajo contenido de materia orgánica. Trabajos realizados recientemente indican la gran capacidad de adaptación de las bacterias del género *Rhodococcus* y géneros relacionados a estas condiciones extremas. Las bacterias autóctonas aisladas fueron psicrótrofas, con un amplio rango de temperaturas de crecimiento, y con la capacidad de sobrevivir largos períodos de tiempo en condiciones de total sequedad y ausencia de nutrientes externos (9). La adaptación de estas bacterias a la desecación fue totalmente dependiente de los lípidos acumulados previamente. La energía necesaria para el proceso de adaptación y para mantener la viabilidad de las células proviene de la oxidación de los ácidos grasos esterificados en los lípidos neutros como se demostró en *R. opacus* PD630 (30). Cuando se bloqueó la ruta de la  $\beta$ -oxidación por adición del ácido acrílico, un inhibidor de la enzima  $\beta$ -cetotilasa, se produjo una rápida pérdida de la viabilidad de las células sometidas a desecación (30). Esto demuestra la importancia de los lípidos de reserva y de la ruta de la  $\beta$ -oxidación en estas bacterias ambientales.

#### **Discusión y Conclusiones**

Los estudios realizados en las bacterias del género *Rhodococcus* han permitido profundizar el conocimiento sobre un tema poco investigado hasta el momento, como es la acumulación de triacil-

glicéridos en bacterias. Los resultados muestran analogías con procesos biológicos de células eucariotas, como son la acumulación de triglicéridos como material de reserva y la estructura molecular de los gránulos lipídicos, entre otras.

La acumulación de triglicéridos parece ser una característica habitual de las bacterias *Rhodococcus* y de los géneros taxonómicamente relacionados. Varios representantes de estos microorganismos son capaces de acumular dos tipos de lípidos reserva diferentes en forma simultánea, ácidos hidroxicarboxílicos de cadena corta (PHA), típicos de procariotas, y ácidos carboxílicos de cadena larga en forma de triglicéridos, característicos de eucariotas. Cada lípido de reserva parece tener su propio sistema de genes y enzimas independientemente regulados. Las bacterias, como por ejemplo *R. ruber*, constituyeron un modelo de investigación adecuado para establecer las relaciones meta-bólicas entre ambos tipos de lípidos de reserva. El entendimiento de estas interrelaciones permitió dirigir el flujo de los metabolitos hacia la biosíntesis de alguno de los lípidos de almacenamiento con el fin de obtener un mayor contenido de PHA en la célula o un mayor contenido de algún monómero en el poliéster, lo cual es de importancia desde el punto de vista biotecnológico.

La presencia de los triacilglicéridos en estas bacterias podría ser uno de los factores que determina su amplia distribución en la naturaleza y su gran adaptación para ambientes adversos. En este contexto, los miembros de este grupo de bacterias constituyen buenos candidatos para procesos de biorremediación de hidrocarburos contaminantes en el ambiente. Los resultados de los estudios han demostrado que estos microorganismos continúan utilizando los hidrocarburos aún en condiciones desbalanceadas, que son las que predominan comúnmente en la naturaleza, y transforman estos contaminantes en compuestos celulares no tóxicos. Los hidrocarburos alifáticos son transformados rápidamente en ácidos grasos que son posteriormente esterificados en forma de triglicéridos.

Son necesarios más estudios para una mejor comprensión de los procesos básicos de la acumulación de triacilglicéridos en bacterias, así como el rol de estos en las células, lo que permitirá en el futuro diseñar estrategias adecuadas para la utilización de estos microorganismos en procesos de biorremediación de contaminantes en el ambiente o

en la producción de compuestos con interés biotecnológico.

## Agradecimientos

H.M. Alvarez agradece al Servicio de Intercambio Académico Alemán (DAAD) por la obtención de una beca de posgrado para realizar gran parte de este trabajo en el Instituto de Microbiología de la Universidad Georg-August Göttingen y en el Instituto de Microbiología de la Universidad Westfälischen Wilhelms Münster (Alemania), y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Secretaría de Ciencia y Técnica, por el financiamiento de parte del presente trabajo (Proyecto PICT97 N° 01-00000-01245-BID802/OC-AR).

## Bibliografía

- 1- Steinbüchel A. 1991. Polyhydroxyalkanoic acids. In: D. Byrom (ed.), "Biomaterials, Novel Materials from Biological Sources", Macmillan Publishers Ltd, Basingstoke, pp. 123-213.
- 2- Steinbüchel A., Wiczorek R., Alvarez H.M., Jossek R. 1997. Assembly of bacterial PHA granules and other aspects of PHA biosynthesis. In: G. Eggink, A. Steinbüchel, Y. Poirier, B. Witholt (ed.) 1996 Int. Symp. Bact. Polyhydroxyalkanoates. NRC Research Press, Ottawa, Canadá, pp. 36-47.
- 3- Makula R.A., Lockwood P.J., Finnerty W.R. 1975. Comparative analysis of lipids of *Acinetobacter species* grown on hexadecane. *J. Bacteriol.* **121**: 250-258.
- 4- Singer M.E., Tyler S.M., Finnerty W.R. 1985. Growth of *Acinetobacter sp.* strain HO1-N on *n*-hexadecanol: physiological and ultrastructural characteristics. *J. Bacteriol.* **162**: 162-169.
- 5- Fixter L.M., Nagi M., Mc Cormack J.G., Fewson C.A. 1986. Structure, distribution and function of wax esters in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3147-3157.
- 6- Reiser S.E. 1996 Genetic analysis of wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* strain BD413. PhD Thesis, Michigan State University, East Lansing, MI.
- 7- Alvarez H.M., Pucci O.H., Steinbüchel A. 1997. Lipid storage compounds in marine bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 132-139.
- 8- Alvarez H.M., Katscheuer R., Steinbüchel A. 1997. Accumulation of storage lipids in species of *Rhodococcus* and *Nocardia* and effect of inhibitors and polyethylene glycol. *Fett/Lipid* **99**: 239-246.
- 9- Alvarez H.M., Pucci O.H. 2000. Potential of autochthonous Actinomycetes bacteria for bioremediation of hydrocarbons in semi-arid soils. *Microb. Ecol.* (Enviado para Publicación).
- 10- Barksdale L., Kim K.S. 1977. *Mycobacterium*. *Bacteriol*



Rev 41: 217-372.

- 11- Olukoshi E.R., Packter N.M. 1994. Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* **140**: 931-943.
- 12- Alvarez H.M., Mayer F., Fabritius D., Steinbüchel A. 1996. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* PD630. *Arch.Microbiol.* **165**: 377-386.
- 13- Murphy D.J. 1993. Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog.Lipid.Res.* **32**: 247-280.
- 14- Huang A.H.C. 1992. Oil bodies and oleosins in seeds. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* **43**: 177-200.
- 15- Murphy D.J. 1990. Storage lipid bodies in plants and other organisms. *Prog.Lipid.Res.* **29**: 299-324.
- 16- Wältermann M., Luftmann H., Baumeister D., Kalscheuer R., Steinbüchel A. 2000. Isolation and characterization of triacylglycerols and other storage lipids of *Rhodococcus opacus* PD630. *Microbiology.* **146**: 1143-1149.
- 17- Schlegel H.G., Lafferty R., Krauss I. 1970. The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Arch.Microbiol.* **71**: 283-294.
- 18- Pieper U. 1993. Biosynthese eines Copolymers aus 3-Hydroxybuttersäure und 3-Hydroxyvaleriansäure in *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126: physiologische, molekulargenetische und biochemische Untersuchungen. Dissertation, Georg-August Universität Göttingen.
- 19- Alvarez H.M., Kalscheuer R., Steinbüchel A. 2000. Accumulation and mobilisation of storage lipids by *Rhodococcus opacus* PD630 and *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* (en prensa).
- 20- Cronan Jr. J.E., Rock C.O. 1996. Biosynthesis of membrane lipids. In: Neidhardt FC, Ingraham JL, Low KB, Magsanik B, Schaechter M, Umberger HE. (ed.), "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology", vol 2. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 21- Valentin H., Dennis D. 1996. Metabolic pathway for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) formation in *Nocardia coralina*: inactivation of *mutB* by chromosomal integration of a kanamycin resistance gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 372-379
- 22- Alvarez H.M., Kalscheuer R., Pucci O.H., Steinbüchel A. 1998. Hydrocarbon-utilizing bacteria: from hydrocarbons to lipids potentially applicable in biotechnology. Proc. Third Latin American Biodegradation and Biodeterioration Symposium (LABS 3). In: Gaylarde, C.C.; Barbosa, T.C.P.; and Gabilan, N.H. (ed.) British Phycological Society, Reino Unido, paper 02.
- 23- Packter N.M., Olukoshi E.R. 1995. Ultrastructural studies of neutral lipid localisation in *Streptomyces*. *Arch. Microbiol.* **164**: 420-427.
- 24- Kalscheuer R., Alvarez, H.M. y Steinbüchel A. 2000. Preparative isolation of lipid inclusions from *Rhodococcus opacus* and *Rhodococcus ruber* and identification of granule-associated proteins. *Arch.Microbiol.* (Enviado para publicación).
- 25- Steinbüchel A., Aerts K., Babel W., Föllner C., Liebergesell M., Madkour M.H., Mayer F., Pieper-Fürst U., Pries A., Valentin H., Wieczorek R. 1995. Consideration of the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acids inclusions. *Can. J. Microbiol.* (Supplement 1) **41**: 94-105.
- 26- Millichip M., Tatham A.S., Jackson F., Griffiths G., Shewry P.R., Stobart A.K. 1996. Purification and characterization of oil-bodies (oleosomes) and oil body boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem.J.* **314**: 333-337.
- 27- Warhurst A.M., Fewson C.A. 1994. Biotransformation catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Crit.Rev.Biotechnol.* **14**: 29-73.
- 28- Pucci O.H., Bak M.A., Peressutti S.R., Klein I., Härtig C., Alvarez H.M., Wünsche L. 2000. Influence of crude oil contamination on the bacterial community of semi-arid soils of Patagonia (Argentina). *Acta Biotechnol.* (Aceptado para publicación).
- 29- Peressutti S.R. 2000. Dinámica de las poblaciones bacterianas degradadoras de hidrocarburos en un ecosistema de suelo patagónico. PhD Tesis, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Comodoro Rivadavia, Argentina.
- 30- Alvarez H.M., Peressutti S.R. 1999. Efecto de los ácidos grasos y triglicéridos sobre la resistencia a la desecación en *Rhodococcus opacus* PD630. (Abstract) XXXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mendoza, Argentina. M278.
- 31- Anderson A.J., Williams D.R., Taidi B., Dawes E.A., Ewing D.F. 1992. Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacter extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 93-101.
- 32- Desomer J., Dhaese P., van Montagu M. 1990. Transformation of *Rhodococcus fascians* by high voltage electroporation and development of *R. fascians* cloning vectors. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2818-2825.

**Tabla 1:** Cepas bacterianas utilizadas en el estudio

Bacterias	Fuentes o referencias
<i>Rhodococcus opacus</i> PD630	DSMZ 44193, Alvarez et al. (12)
<i>Rhodococcus opacus</i> MR22	DSMZ 3346
Rhodococcus ruber	NCIMB 40126, Anderson et al. (31)
<i>Rhodococcus ruber</i> mutante RM8	Pieper (18)
<i>Rhodococcus fascians</i> D 188-5	Desomer et al. (32)
Rhodococcus erythropolis	DSMZ 43060
<i>Nocardia corallina</i> N° 724	Valentin and Dennis (21)
<i>Rhodococcus sp.</i> 20	Peressutti (29)
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 17	Peressutti (29)
<i>Rhodococcus fascians</i> 123	Alvarez and Pucci (9)
<i>Nocardia asteroides</i> 419	Alvarez and Pucci (9)
<i>Nocardia globerula</i> 432	Alvarez and Pucci (9)
<i>Nocardia restricta</i> 560	Alvarez and Pucci (9)
<i>Gordona amarae</i> 106	Alvarez and Pucci (9)
<i>Dietzia maris</i> 53	Peressutti (29)