

INFORME CIENTÍFICO-TECNOLÓGICO

Período 2014/2015

Personal de Apoyo

Betina Galarza

Categoría: Profesional Principal

INDICE

7. Exposición de la labor desarrollada	3
8.1 Publicaciones, comunicaciones	14
8.2 Cursos realizados	14
8.3 Asistencia a reuniones científico-tecnológicas	14
10 Otros elementos de juicio no contemplados en los títulos anteriores	15

7.- Exposición sintética de la labor desarrollada

1.-Mantenimiento de la cepa de *T. ajelloi*

Preparación y esterilización de Agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol en pico de flauta. Repiques para mantenimiento de la cepa e incubación durante 15 días en estufa a 28°C. Preparación de Agar Sabouraud en Erlenmeyer de 125 ml y repiques de la cepa para la preparación del inóculo fúngico para los sucesivos cultivos.

2.- Búsqueda de otros medios de mantenimiento de la cepa:

Se intentó repicar la cepa *Trichophyton ajelloi* en medios alternativos debido a que en medio Sabouraud pleomorfizaba a micelio afructífero. Se utilizó medio líquido con 1% de “residuo pelo” (RP) en H₂O destilada, se esterilizó el conjunto durante 15 min en autoclave a 120°C. Luego fue inoculado con la cepa.

3.- Preparación del Medio Mineral Mínimo (MMM)

Se utilizó para el cultivo un medio líquido base con la siguiente composición: 4 mM de NaH₂PO₄, 10 mM de K₂HPO₄; solución de sales: 16 mg de Cl₂Fe, 13 mg de Cl₂Zn, 110 mg de Cl₂Ca y 20 mg de Mg₂Cl.6H₂O, ajustado a pH 7,4; adicionado con cloranfenicol 500 mg/l. Se esterilizó en autoclave 15 min a 120°C. En el caso del cultivo líquido se esterilizó nuevamente junto al RP.

4.-Determinación de sulfatos en el sobrenadante de cultivos líquidos en distintas condiciones de medio mineral

Para determinar y poder comparar los rendimientos en la producción de sulfato en distintas condiciones (diferentes concentraciones de glucosa, adición de ácido tioglicólico) se realizaron cultivos líquidos en Erlenmeyers de 500 ml a los que se les agregó RP (lavado, secado a 45°C y molido) al 1% en MMM (medio mineral mínimo) + 0,5 g/l de cloranfenicol, el conjunto se esterilizó y se inoculó con 1 ml de suspensión de conidias de *Trichophyton ajelloi* (10⁴ UFC/ml) (preparado a partir de un cultivo sólido en Agar Sabouraud en Erlenmeyer de 1 semana de incubación a 28°C al que se agregó 10 ml de MMM + Tween 80).

La secuencia de las condiciones de cultivo fue la siguiente (por duplicado):

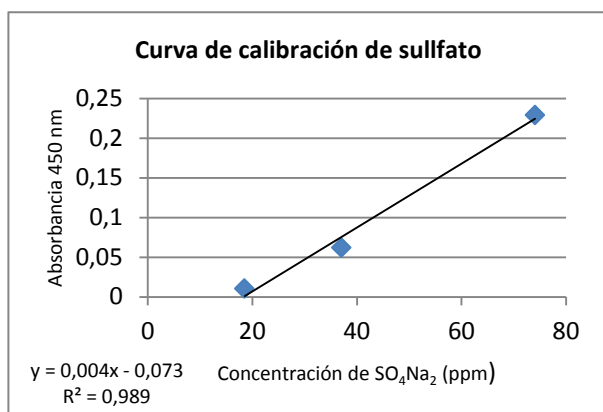
- 1- MMM ₁: medio mineral + 1 ml de inóculo (10⁴ UFC/ml).
- 2- MMM ₂: 2,5 g/l de glucosa en medio mineral + 1 ml de inóculo (10⁴ UFC/ml).
- 3- MMM ₃: 5 g/l de glucosa en medio mineral + 1 ml de inóculo (10⁴ UFC/ml).
- 4- MMM ₄: 10 g/l de glucosa en medio mineral + 1 ml de inóculo (10⁴ UFC/ml).
- 5- MMM ₅: medio mineral + 1 ml de inóculo (10⁴ UFC/ml)+ 5 mM de ácido tioglicólico.

De cada sistema se extrajeron cada 3 o 4 días (hasta un plazo de 28 días) muestras de 1 ml que fueron centrifugadas, separados los sobrenadantes y mantenidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

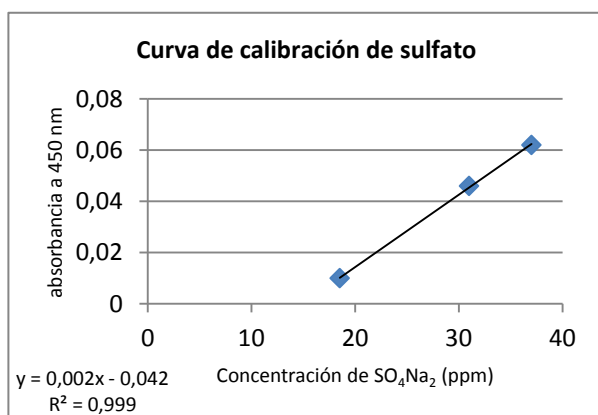
Técnica

Se utilizó la técnica turbidimétrica (ASTM Standard Method for Sulfate Ion in Water, Designation D 516-90). El método se basa en la precipitación cuantitativa de sulfato en presencia de Cl_2Ba , la turbidez resultante se mide a 450 nm. Se preparó una solución buffer conteniendo: 7,5 ml de glicerina, 4,5 ml de HCl, 45 ml de H_2O destilada, 15 ml de etanol 96°, 11,25 g de NaCl para estabilizar la solución y minimizar interferencias. A la muestra (previamente centrifugada a 5000 rpm, 20 min) y el patrón, diluidos en la solución buffer y H_2O , se les agrega una pizca de BaCl_2 , se agita en vortex durante 1 min y se lee a 450 nm durante 4 min a intervalos de 30 s. La mayor lectura es la que se toma como válida. La curva de calibración se prepara a partir de una solución patrón de SO_4Na_2 de 1000 ppm.

Para mayores concentraciones de sulfato



Para menores concentraciones de sulfato



Resultados de las muestras

	Día 0	Día 7	Día 14	Día 18	Día 21	Día 28
MMM ₁	ND	ND	ND	ND	25 ppm	24 ppm
MMM ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MMM ₃	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MMM ₄	ND	ND	ND	38 ppm	39 ppm	47 ppm
MMM ₅	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: no dosable.

Solo se puede cuantificar la presencia de sulfato en MMM₁: medio mineral + 1 ml de inóculo (10^4 UFC/ml) y MMM₄: 10 g/l de glucosa en medio mineral + 1 ml de inóculo (10^4 UFC/ml). La técnica es engorrosa por cuanto la medida turbidimétrica no tiene mucha sensibilidad (dosa niveles de sulfato mayores a 18 ppm).

Se puede concluir que en MMM sin glucosa o con alta concentración de glucosa se estaría produciendo mayor sulfitólisis.

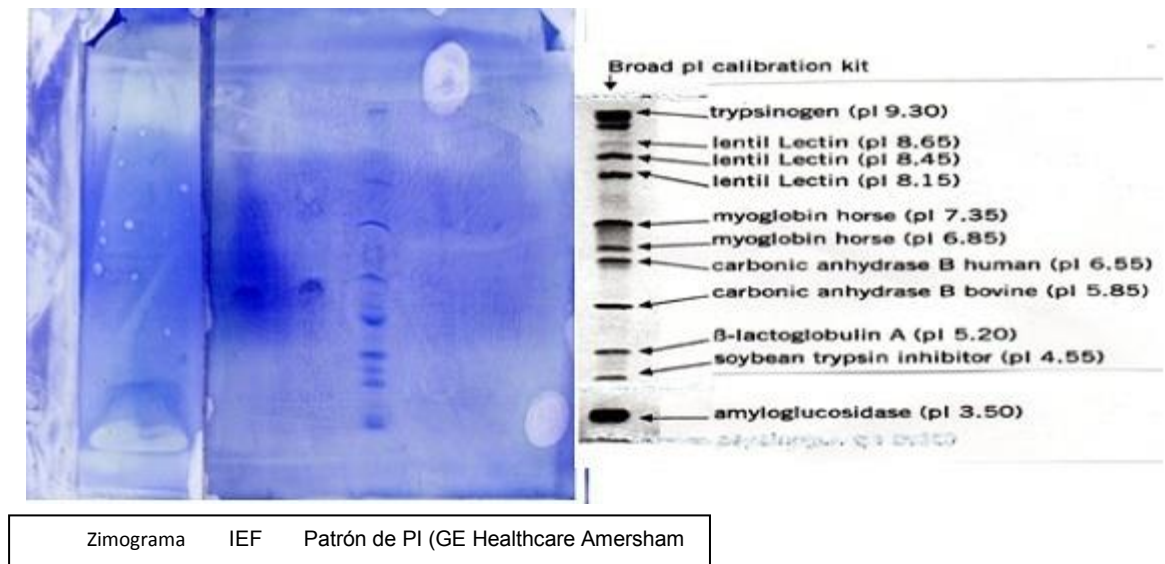
5.- Caracterización del extracto enzimático

I. Técnica de Isoelectroenfoque y zimograma.

Con el objetivo de caracterizar el extracto crudo se continuó con la realización de la técnica del isoelectroenfoque acoplado con zimograma que separa a las proteínas en función de sus distintos puntos isoeléctricos.

Esta técnica se basa en la separación de las distintas proteínas de acuerdo a sus diferentes puntos isoeléctricos cuando son sometidas a un potencial eléctrico variable en un gel donde se realizó previamente un gradiente de pH con una mezcla de anfolitos (polímeros pequeños con múltiple carga). La técnica fue la misma utilizada en el período anterior (Instituto LIPROVE, UNLP).

En la muestra utilizada se partió de un extracto crudo resuspendido a partir de un precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 85% con una concentración proteica de 0,857 mg/ml. Luego fue desalada por columna de exclusión molecular PD 10 (G 25), precipitación acetónica, resuspensión en agua destilada apirógena (20 μl) y posterior centrifugación. Se sembraron 3 μl de muestra, más arriba del punto de siembra del patrón de PM.



Los pls del extracto crudo determinados a partir de la curva resultaron ser: 6,25 y 6,5. La banda activa más visible del zimograma correspondió con la banda del PM marker 9.

II.-Electroforesis en SDS-PAGE

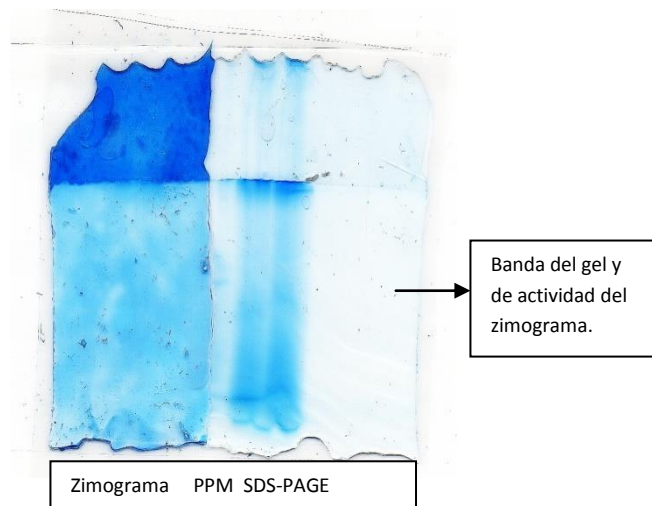
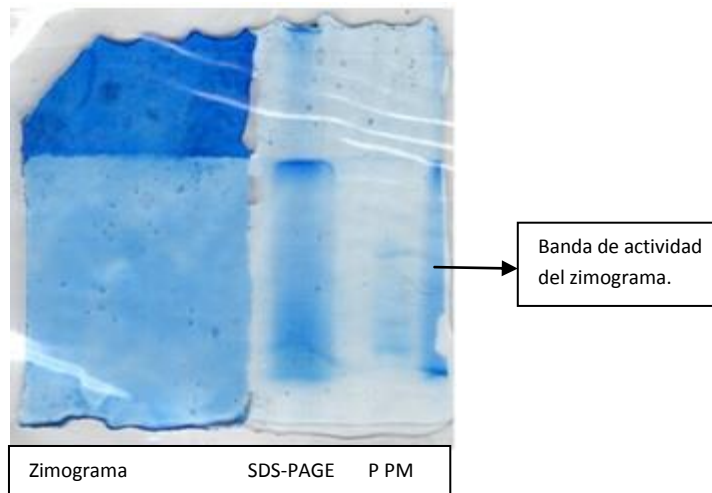
Se siguió la técnica de Laemmli con ciertas modificaciones. El problema que se encontró es que la muestra no avanza y queda en el comienzo del gel de separación. Para solucionar este problema se probó con distintas concentraciones del buffer de resolución y de stacking según la técnica de Lomonte para disminuir la fuerza iónica que pueden ser una causa de la migración anómala. También una causa puede ser la proteína altamente glicosilada o una proteína con PI muy alcalino que influencia en la migración. Se realizó la corrida con la proteína nativa en condiciones no reductoras (buffer de muestra sin β -mercaptoetanol y sin hervir) y en condiciones desnaturalizantes (β -mercaptoetanol 5% y hervida 10 min). Se probaron además colocar la muestra con inhibidores de proteasa para impedir la posible autólisis (iodoacetato 1 mM, PMSF 1 mM).

Se partió de muestras liofilizada que se disolvieron concentrando la muestra entre 10 y 20 veces. Luego se utilizaron distintas técnicas de desalado: I.- ultrafiltración mediante tubos Millipore cut-off 30.000; II.- exclusión molecular (columna PD 10, G 25); III.- precipitación acetónica. La recuperación de la proteína es baja después de estos procedimientos (si se usan consecutivos hay una disminución de hasta 17 veces).

III.- Zimograma

A partir de la muestra no reducida, se hace un lavado con Tritón-X 100 al 2,5% durante 1 h. Se lava y se incuba a 37°C durante 1 h como mínimo con una solución de caseína al 1% en buffer Tris-HCl (0,1 M, pH 9). Luego se

agrega directamente la solución 2 de la coloración de Coomassie coloidal para fijar proteínas con Coomassie G-250 al 2%. Se decolora con agua destilada.



6.- Proceso de depilado enzimático con enzima comercial a escala piloto

El objetivo fue observar los cambios histológicos producidos en la piel bovina cuando fue expuesta a un pretratamiento reductor-enzimático del lado epidermis. Al mismo tiempo observar los cambios si se utilizaba la piel en estado fresco o conservada en salmuera para el proceso de depilado.

Se llevó a cabo sobre trozos de piel bovina: 1.- fresca 2.- salada. Se colocaron en placas de Petri y se les agregó distintos pretratamientos sólo del lado epidermis a 1 y a 2 que consistió de: I.- SO_3Na_2 0,01 M en buffer NaCO_3H 0,035 M pH 8,5 durante 2 h; II.- tensioactivo Isogras AN 1%; III.- SO_3Na_2 0,01M en buffer NaCO_3H 0,035 M pH 8,5 durante 2 h, se removió y se agregó

preparado enzimático comercial (R2- 48582) disuelto en el mismo buffer 0,5 g/l, durante 3 h.

A continuación los trozos de piel fueron sumergidos en fulones pequeños de 5 l y fueron remojados mediante la aplicación de tensioactivo Azymol 6SE (Pellital SA, Argentina) y biocida durante 24 h. Luego fueron sometidos a un baño de pelambre de depilado convencional mediante el uso de cal y Na₂S.

A medida que transcurrió el proceso se fueron tomando pequeñas muestras de piel que se sumergieron en formol al 10 % y luego se las coloreó con hematoxilina-eosina previa inmersión en parafina. Por otro lado se caracterizó el preparado enzimático (R2-48582) disolviéndolo al 5 % (p/v) en buffer NaCO₃H 0,035 M (3 g/l) mediante la determinación de su concentración proteica (Método de Bradford) y su actividad caseinolítica utilizando sustrato azocaseína (sulphamide azocasein, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

El protocolo para la determinación fue el siguiente: 150 µl de solución enzimática se incubaron durante 30 min con 250 µl de una solución de azocaseína al 1 % en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 9 a 37 °C. La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA (ácido tricloroacético) al 10 % (p/v) y posterior centrifugación a 3000 g, 15 min. Luego a 0,9 ml del sobrenadante se le agregó 1 ml de NaOH, se agitó y se midió a 440 nm. Para el blanco de enzima, se la inactivó por calentamiento a 100 °C durante 5 min. Se definió la unidad de actividad enzimática (U_{azo}) como la cantidad de enzima que en las condiciones de reacción produjo un incremento de 0,1 Abs a 440 nm por min.

Los valores encontrados fueron: conc. prot.: 0,083 µg/ml; act. azocas.: 0,28 U_{azo}.

7.-Análisis del proceso de compostaje del “residuo pelo” proveniente de la curtiembre

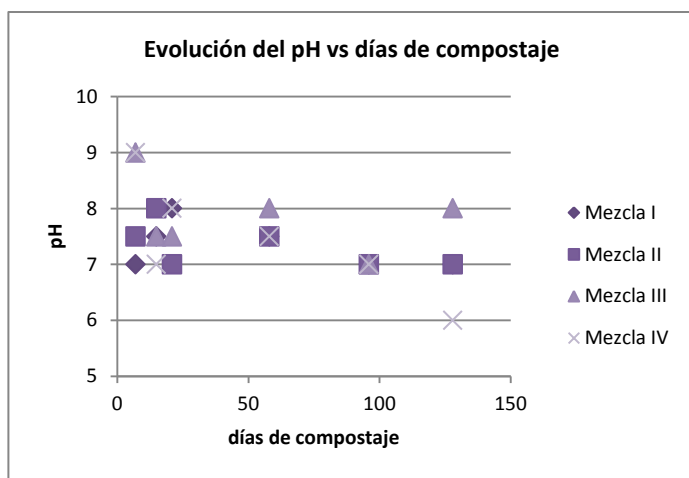
Se continuó con el análisis de parámetros en la evolución del proceso de compostaje. Las mezclas que se compostaron consistieron de “residuo pelo” vacuno lavado y secado a 45 °C (proveniente de un depilado conservador de curtiembre), hojas secas de roble (*Quercus robur*) y estiércol de conejo fresco provisto por la estación de cría de conejos de la Cátedra de Zootecnia General de la Facultad de Agronomía de la UNLP. Fueron hidratadas según la técnica del puño, volteadas en forma periódica, incubándolas en recipientes de madera de 30 cm x 30 cm x 50 cm. Se extrajeron muestras de estas mezclas a distintos intervalos de tiempo hasta los 130 días, en que se dio por finalizado el experimento.

Las proporciones utilizadas en las mezclas fueron las siguientes:

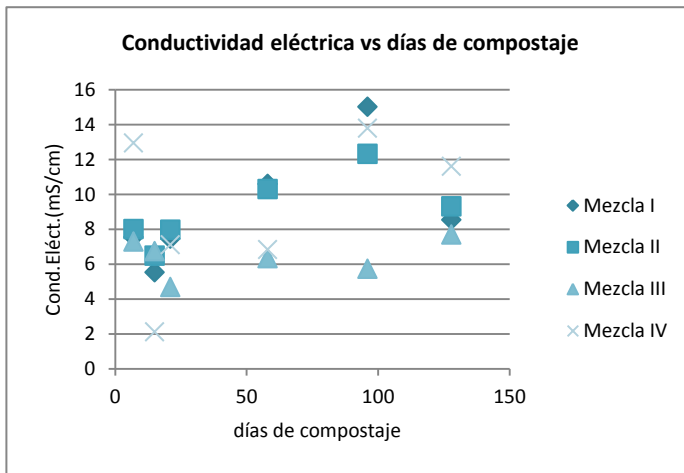
Mezcla	Residuo pelo	Estiércol de conejo	Hoja de roble
I	1/3	1/3	1/3
II	1/6	2/3	1/6
III	1/6	1/6	2/3
IV	2/3	1/6	1/6

Con las distintas muestras de las mezclas se realizó una emulsión tierra-agua bidestilada en la proporción 1:4 (g de tierra:ml de H₂O bidestilada), se filtró con prefiltro de fibra de vidrio por vacío. En el extracto acuoso obtenido se midieron: pH, conductividad eléctrica, concentración de amonio soluble (método de la urea modificado), concentración de proteína soluble (método de Bradford), porcentaje de materia orgánica (por calcinación en mufla a 430°C). Las técnicas utilizadas fueron descriptas en el informe anterior. Para la determinación de proteínas solubles y de ión amonio, se realizaron curvas de calibración con Seralbúmina bovina Fracción V (Sigma) y con una solución patrón de (NH₄)₂SO₄, respectivamente.

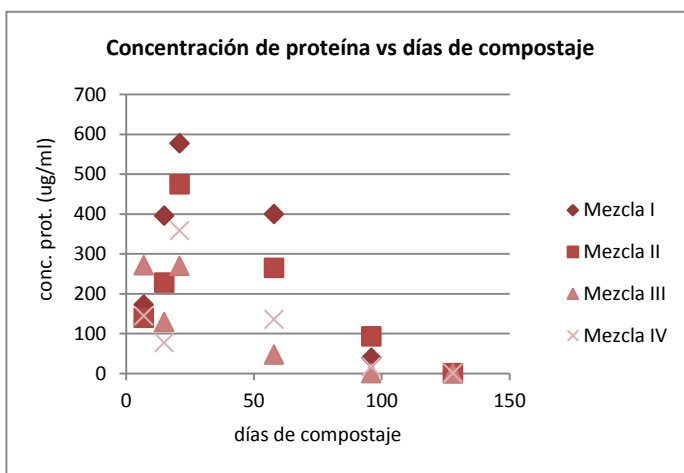
Parámetros evolutivos del compost



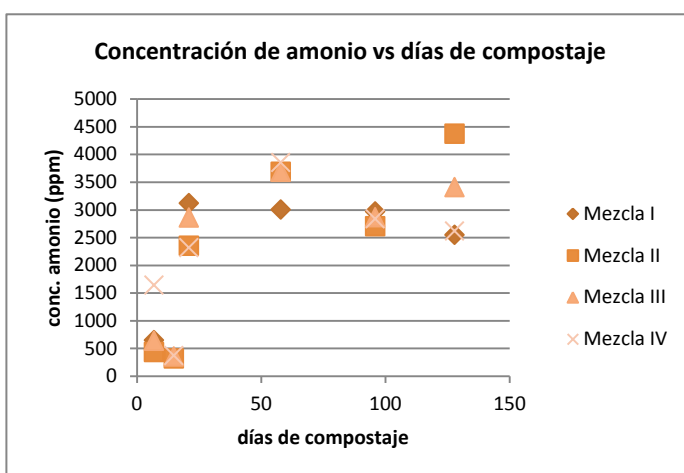
El rango de pH se mantuvo dentro del rango 6-8.



La conductividad eléctrica se mantuvo entre 4-15 mS/cm, por encima del valor estipulado por Senasa para el buen uso del compost de 4 mS/cm.



Para todas las mezclas, el pico máximo se da a los 15 días de iniciado el proceso.



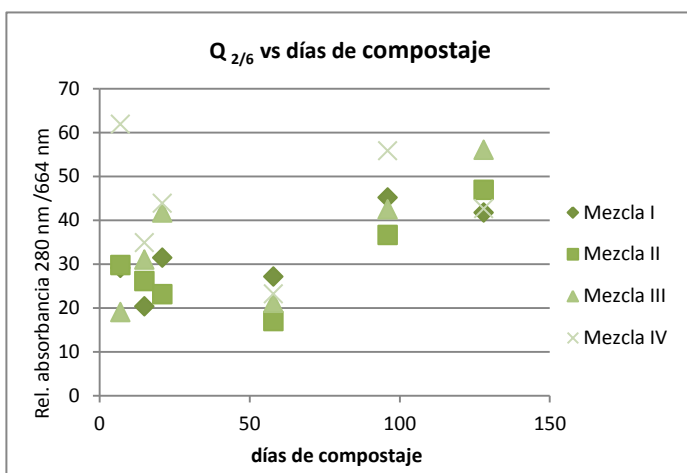
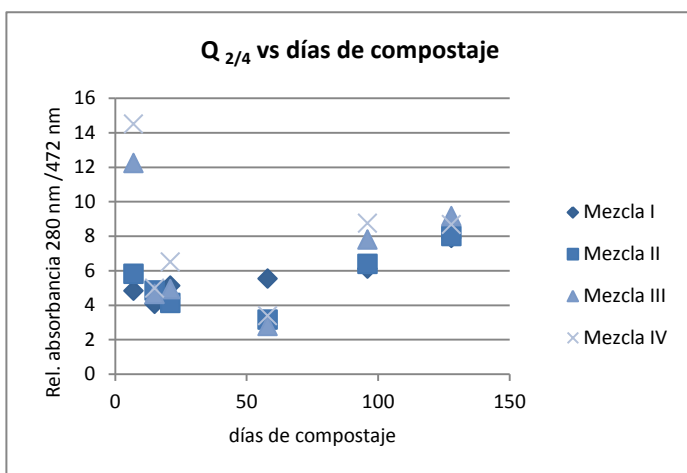
A 15 días de iniciado el proceso, la concentración de ión amonio supera las 2000 ppm y continua en aumento hacia el final en todas las mezclas

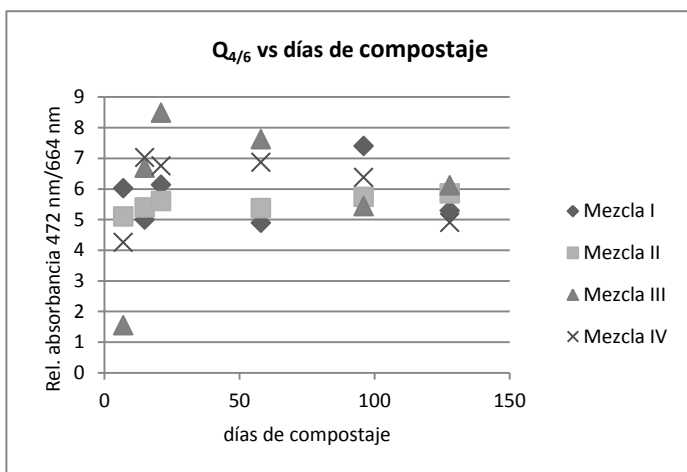
probablemente por la proteólisis del pelo que implica el desprendimiento de amonio debida a microorganismos queratinolíticos del estiércol de conejo.

Determinación de ácidos húmicos

La técnica de extracción se siguió por el procedimiento de Kononova con algunas modificaciones. Se procedió a eliminar carbonatos por tratamiento con 1 ml de HCl 1 M y luego HCl 0,1 M hasta una proporción 1:10 (g de muestra seca/ml de HCl) (pH 2). Se agitó durante 4 h, luego se dejó decantar y se centrifugó a 3000 rpm, 20 min. En esta primera extracción precipitaron los ácidos húmicos (AHs). En el precipitado se realiza la segunda extracción en medio alcalino donde se solubilizan aproximadamente el 80 % de los AHs. Se procedió a neutralizar a pH 7 con NaOH 1 M y luego se llevó a la relación 1:10 (g de muestra seca/ml de NaOH) con NaOH 0,1. Para impedir la neoformación de AHs por oxidación, se agregó 625 μ l de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (0,4 N) y se dejó agitando durante 24 h a 180 rpm. Se centrifugó a 3000 rpm 20 min. El sobrenadante se conservó y se midió la absorbancia a 280 nm, 472 nm y 664 nm.

Relación de absorbancias





Las relaciones de absorbancia $Q_{2/4}$ (A_{280}/A_{472}), $Q_{2/6}$ (A_{280}/A_{664}), $Q_{4/6}$ (A_{472}/A_{664}) son parámetros útiles que permiten determinar la calidad de la materia orgánica en el suelo, y el grado de humificación de los componentes orgánicos que pueden estar en los primeros estadios de conversión y transformarse en componentes de mayor grado de condensación. Según la bibliografía consultada, a λ 260-280 nm hay absorción de lignina y quinonas, significa que el material recién comienza su etapa de transformación; la absorbancia a λ 460-480 nm refleja que la materia orgánica se encuentra en el comienzo de la humificación mientras que a λ 600-670 nm indicaría la presencia de material altamente humificado con alto grado de grupos condensados y aromáticos.

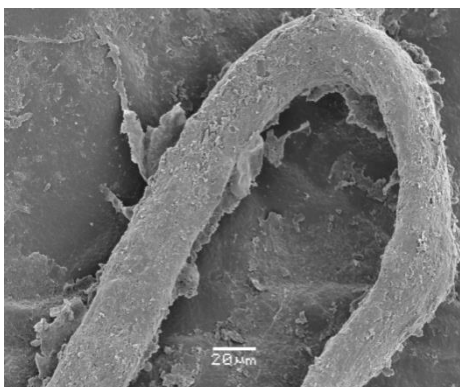
Para los AHs, valores de la relación $Q_{4/6}$ comprendidos entre “3 y 5,5” indican que en ellos predominan compuestos de PM elevados, de mayor grado de polimerización o de alto grado de aromaticidad.

En el caso analizado, una relación $Q_{4/6}$ en la mezcla IV (2/3 partes de RP, 1/6 parte estiércol de conejo, 1/6 parte vegetal) de “5” hacia el final del proceso daría cuenta de que el proceso de humificación ha sido satisfactorio, lo que coincide con sus características organolépticas.

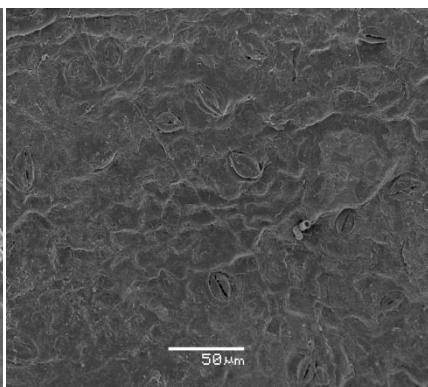
8.- Observación en Microscopio Electrónico de Barrido de los cambios en el RP durante el compostaje.

Durante el proceso en que se extrajeron muestras de las mezclas, se procedió a prepararlas para su observación en MEB colocándolas en Eppendorfs donde fueron sometidas a su deshidratación con baños de etanol 50° y 70° con tres cambios de 15 min y agitando. En el último pasaje de alcoholes se cambió a alcohol absoluto, se montó en el portaobjeto y se metalizó. La observación se llevó a cabo con el Microscopio Electrónico de Barrido Jeol 6360 LV del Servicio de Microscopía Electrónica del Museo de Ciencias Naturales de La Plata.

(1)



(2)



Observación en MEB: en la foto (1) se observa la biodegradación de la fibra del pelo adherido a la hoja y el desprendimiento de sus capas cuticulares (600 x). En la foto (2) se observa la hoja en descomposición con sus estomas y con microorganismos en su superficie (600 x).

9.- Redacción del trabajo de tesis doctoral: “Valorización de residuos sólidos de curtiembre. Biodegradación fúngica del residuo pelo vacuno”, Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP.

Se prosiguió con la redacción de la tesis, dando un marco teórico a los datos experimentales obtenidos.

8.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES

- Galarza, B.; Garro, L.; Gortari, C.; Martegani, J.; Hours R. (2014). “Tecnología limpia en la curtiembre; aplicación de enzimas fúngicas y su evaluación mediante Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)”. Biotecnología Moderna Avances. ISSN 1027-2860. Vol. 5. Elfos Scientiae, La Habana, Cuba.

- Gortari, MC.; Galarza, B.; Hours, R. (2014). “Producción de conidias de *Purpureocillium lilacinum* LPSC # 876 sobre diferentes sustratos”. Biotecnología Moderna Avances. ISSN 1027-2860. Vol. 5. Elfos Scientiae, La Habana, Cuba.

- Bonfranceschi Barros A., Ciciarelli M., Galarza B., Markán A., López L. (2014). “Fitorremediación de cromo empleando *Canna ascendens ciciarelli* en cultivo hidropónico”. The Journal of the Argentine Chemical Society, ISSN 1852-1207, Anales de la Asociación Química Argentina (AAQAE), vol. 101: (1-2), January-December 2014.

- Galarza B., Garro ML., Martegani J., Hours R. “Characterization and evaluation of a fungal enzymatic pool with unhairing activity”. En redacción para ser enviado al Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, ISSN 0144-0322, Ed. University of Northampton, UK.

8.2 CURSOS REALIZADOS

Asistencia al Seminario “El color en diferentes materiales”, dictado por la Cámara de la Industria del Calzado, Buenos Aires, 26 de mayo de 2015.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTIFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES

- XVI Congreso de Ciencias Morfológicas y 13° Jornadas de Educación en Veterinarias. Póster: “Preparación de muestras de piel bovina para su observación mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)”. Garro M.L., Galarza B., Hours R. Organizado por la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata, 18 y 19 de septiembre de 2014, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP).

- 30° Congreso Argentino de Química, “Fitorremediación de cromo empleando *Canna ascendens ciciarelli* en cultivo hidropónico”. Bonfranceschi Barros A., Ciciarelli M., Galarza B., Markán A., López L., Buenos Aires, Argentina, del 22 al 24 de octubre de 2014.

- Simposio Biotecnología Habana 2014, Agrobiotecnología por la sustentabilidad alimentaria. Póster: “Tecnología limpia en la curtiembre; aplicación de enzimas fúngicas y su evaluación mediante Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)”. Galarza B., Garro ML., Gortari C., Martegani J., Hours R.

Póster: “Producción de conidias de *Purpureocillium lilacinum* LPSC#876 sobre diferentes sustratos”. Gortari C., Galarza B., Hours R., realizado en La Habana, 1 al 4 de diciembre de 2014.

- II Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental; II Congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental. Póster aceptado: “Compostaje de un residuo sólido de curtiembre; The tannery solid waste as compost” Garro ML., Galarza B., Sarmiento P., Greco A., Hours R., a realizarse en Buenos Aires del 1 al 4 de diciembre de 2015.

- XVII Congreso de Ciencias Morfológicas y 14° Jornadas de Educación. Póster aceptado: “Proceso de transformación del “residuo pelo” de bovino en compost” Garro ML., Sarmiento P., Galarza B., Hours R., a realizarse en CCT-Conicet La Plata, el 10 y 11 de septiembre 2015.

- 33th Congress of International Union of Leather Technologists and Chemists Societies. Póster aceptado “Characterization and evaluation of fungal enzymatic pool with unhairing activity” Galarza B. Garro ML., Martegani J., Hours R. a realizarse en Novo Hamburgo-RS, Brasil, del 24 al 27 de noviembre de 2015.

10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES

Interacción con el Dr. Hugo Drago, Jefe del Banco de Tejidos del Hospital de Quemados, CABA, para el proyecto “Biomateriales para la producción de matrices para regeneración de piel”.

Interacción con la Dra. Eugenia Errasti del LIPROVE (Laboratorio de Investigación en Proteínas Vegetales) dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP sobre técnicas de caracterización de proteínas.

Asistencia técnica a la Lic. Alfonsina Bonfranceschi del Laboratorio de Investigación y Desarrollo, CITEC, sobre la caracterización de preparados enzimáticos utilizados en tecnología del cuero.

Asistencia técnica a la Dra. María Garro del Servicio de Microscopía, CITEC, sobre la aplicación de preparados enzimáticos sobre la piel vacuna en tecnología del cuero.

Participación en proyectos:

Integrante del Proyecto de Incentivos N° 11/X650. Director: Roque Hours. Acreditado y financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica, Universidad Nacional de La Plata.