



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Escuela de Biología

**Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
INSTITUTO DE CIENCIAS**

**Mutación del gen *phbZ* de
Azospirillum brasilense Sp 245**

Tesis
Que para obtener el título de:
BIÓLOGA

**PRESENTA:
ARACELI ROSALES CRUZ**

**Director:
D.C. Luis Javier Martínez Morales**

Abril 2015



Dedicatoria

DEDICATORIA

Al Gran Arquitecto del Universo...

*"Un poco de ciencia aleja de Dios,
pero mucha ciencia devuelve a Él."*

Louis Pasteur (1822-1895)

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

A mi amiga, compañera, cómplice, maestra, madre y hermana, que siempre has sido mi apoyo y ahora motivación.

A mis padres por ser mi impulso de seguir adelante, mi fuerza para no rendirme y mi sabiduría para elegir el camino.

A quien ha llegado a mi vida en tiempos tan precisos que no puedo dejar de agradecer tu compañía, apoyo y amor que me tienes, Ricardo Vidal.

A mi amiga que ha estado incondicionalmente en cada momento desde que inició nuestra amistad, Coral.

A mi tutor de Tesis que creyó en mí para realizar este proyecto, el cual hizo que encontrara lo apasionante que es la microbiología, Dr. Luis Javier Martínez Morales.

A la Dra. Lucia Soto, que me dio los consejos pertinentes en mi trabajo de laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio, primeramente a mi mentor Ramiro, con quien inicié el proyecto, Ángeles de quien aprendí mucho, a Luis, Gamaliel, Elena, Alma, Sandra, Anenski y los chicos de CETIS

Y a todos los que han aportado un granito de arena el cual ayudó a construir este peldaño en mi formación.

INDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	iii
LISTA DE ILUSTRACIONES.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICAS	viii
INTRODUCCIÓN	1
Generalidades de plásticos degradables y biodegradables	1
Polihidroxicanoatos	3
Poli- β -hidroxibutirato	4
Formación de PHB.....	6
Ciclo del PHB	7
Degradación de PHB por depolimerasas (<i>phaZ</i>).....	10
Organismos productores de PHB.....	10
Características generales del genero <i>Azospirillum</i>	11
<i>Azospirillum brasilense</i>	12
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN	15

Índice	
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	16
GENERAL	16
PARTICULARES.....	16
ESQUEMA DE TRABAJO	17
MATERIAL Y METODOS	18
Medios y condiciones de cultivo.....	19
Diseño de Oligonucleótidos para obtención de gen <i>phbZ</i>	21
Extracción de ADN Total.....	22
Amplificación por PCR	22
Clonación del inserto.....	23
Extracción de ADN plasmídico.....	24
Secuenciación y corroboración de sitios de corte.	24
Subclonación en el vector suicida pSUP 202.....	25
Obtención de la construcción del gen <i>phbZ::Km</i>	25
Conjugación de <i>E. coli</i> S17.1 <i>phbZ::km</i> con <i>A. brasilense</i> Sp.245.....	26
Extracción de PHB.....	27
Determinación de proteínas totales.....	27
Análisis estadísticos.....	27

Índice

RESULTADOS	28
Amplificación y Clonación del gen <i>phbZ</i>	28
Subclonación del gen <i>phbZ</i> en el vector suicida pSUP202.	29
Obtención de la construcción del gen <i>phbZ::Km</i>	30
Cuantificación de PHB	31
Análisis estadísticos.....	32
Discusión.....	34
Mutación del gen <i>phbZ</i>	34
Acumulación de PHB y actividad de la depolimerasa.	35
Conclusiones.....	37
Perspectivas.....	38
BIBLIOGRAFIA	39
ANEXOS	43
1. Medios de cultivo.....	43
2. Electroforesis en gel de agarosa.	46
3. Protocolo de extracción de ADN total.....	46
4. Protocolo lisis de ADN plasmídico de bajo número de copias.....	48
5. Fenol estabilizado (50 ml).....	49
6. Protocolo de transformación de Quimio-competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	50

Índice

7. Técnica de conjugación.....	50
8. Extracción de PHB (Law y Slepecky en 1962)	51
9. Determinación de Proteínas Totales.	52

LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Fórmula general de la estructura de PHAs bacterianos (Albertsson, y Varma, 2002). 4	4
Ilustración 2. Estructura de PHB en <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 (Fernández, 2012)..... 7	7
Ilustración 3. Ruta metabólica de la síntesis y degradación de PHB (Bergersen et al., 1990) 8	8
Ilustración 4. Esquema de condiciones de amplificación por PCR..... 23	23
Ilustración 5. Gel de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Amplificación por PCR de gen <i>phbZ</i> de <i>A. brasilense</i> Sp 245. M-Marcador, A1-Amplificado de muestra 1, A2-Amplificado de muestra 2. 28	28
Ilustración 6. a) Esquema de vector pCR 2.1 TOPO con el inserto del gen <i>phbZ</i> . b) Gel de electroforesis, digestión con enzima <i>Bam</i> HI. M-Marcador, D-Digestión, P-Plásmido. 29	29
Ilustración 7. a) Gel de electroforesis, digestión con enzima <i>Bam</i> HI, M-Marcador, P-Plásmido, D-Digestión. b) Esquema de vector pSUP: <i>phbZ</i> . c) Gel de electroforesis, digestión con enzima <i>Eco</i> RI, M-Marcador, D-Digestión, P-Plásmido..... 30	30
Ilustración 8. Gel de electroforesis. PCR de: 1-vector pSUP202 solo. 2- pSUP: <i>phbZ</i> , 3 y 4- pSUP: <i>phbZ</i> ::Km, M-Marcador..... 31	31

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Géneros microbianos que sintetizan PHAs. a) conocimiento detallado de la cinética de crecimiento y producción, b) acumulación de copoliésteres conocidos, c) arqueas, d) PHA encontrado en membranas celulares, e) géneros eucariotas.(Koller et al., 2010). 11	11
Tabla 2. Cepas utilizadas. 18	18
Tabla 3. Plásmidos utilizados. 19	19
Tabla 4. Antibióticos utilizados en cultivos. 21	21
Tabla 5. Oligonucleótidos de gen <i>phbZ</i> flanqueado. 22	22

Listas

Tabla 6. Oligonucleótidos de gen *phbZ* solo..... 24

Tabla 7. Construcciones posibles en la ligación del vector pSUP:phbZ y caset de Km..... 26

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Gráfica de producción de PHB silvestre vs mutante 33

Gráfica 2. Gráfica de regresión lineal. Extrapolación a 96 horas. 33

INTRODUCCIÓN

Generalidades de plásticos degradables y biodegradables

La contaminación por plásticos en el medio ambiente, afectando hábitats como el mar y suelos, es un tema relevante en la actualidad, el impacto antropogénico en el uso desmedido de productos derivados del petróleo como el PET (Poli EtilénTereftalato) y la manera incorrecta en la que son eliminados, ha llevado a niveles alarmantes de deterioro ambiental.

Entre los problemas que presentan los plásticos de un solo uso encontramos: dependen de un recurso natural no-renovable que es el petróleo, siendo este una fuente contaminante por los gases que emiten sus derivados en su degradación y causar el efecto invernadero; la permanencia que tienen en el medio incrementa la problemática en el ambiente y su uso asciende de manera exponencial. La contaminación por plásticos en el mar, donde la degradación del PET se realiza muy lentamente por la estructura química del polímero (a pesar de que no es nocivo directamente) no puede ser utilizado nuevamente para envases de alimentos por las impurezas que presenta o altos costos del proceso.

Para la degradación de algunos polímeros como el PVC (Policloruro de Vinilo) se han empleado aditivos, por ejemplo con base de almidón, para modificar sus propiedades con el fin de obtener productos que permanezcan menos tiempo en el ambiente. Dichos aditivos se degradan en medios biológicamente activos debido al consumo de los gránulos de almidón por algunos microorganismos.

Un ejemplo de estos aditivos se utilizó en bolsas que podían degradarse al contacto con el medio ambiente, se conoció comercialmente con el nombre de "Policlen C" (Uribe, 1996).

La idea detrás de los plásticos mezclados con almidón es que, una vez desechada en los vertederos, las bacterias en el suelo utilizan el almidón como

sustrato para producir energía y liberan fragmentos de polímeros que pueden ser degradados por otras. Las bacterias de hecho atacan el almidón, pero los fragmentos de polietileno no los degradan, quedando partículas difíciles de degradar (Reddy et al., 2003).

Otro ejemplo se tiene en los plásticos oxodegradables que son a base de petroquímicos, generalmente de polietileno, los cuales tienen pequeñas concentraciones de aditivos, como son sales de metal, que les permite degradarse a un ritmo acelerado. A diferencia de los plásticos de solo polietileno éstos suelen ser etiquetados como “degradables”, incluso “biodegradables” aunque no totalmente, ya que siguen siendo a base de polialquenos particularmente de polietileno y polipropileno.

Estos polímeros oxodegradables pueden causar un impacto ambiental negativo, algunas razones pueden ser: no son basados en fuentes renovables, tiene el potencial para dispersar los metales catalíticos en el medio ambiente, convierten el carbono de sumidero a carbono atmosférico, dependen de la cantidad de los aditivos para degradarse, la cantidad de luz y de temperatura afecta en gran medida, y se degradan en pequeñas partículas que realmente no son biodegradables. Sumado que los pequeños fragmentos que permanecen todavía, tienen peso molecular alto para desintegrarse como los materiales de bajo peso molecular (Niaounakis, 2013).

Los polímeros pueden estar compuestos de estructuras químicas que los hacen biodegradables, a pesar de esto sus enlaces ésteres no permiten que se hidrolicen fácilmente, provocando que permanezcan más tiempo en el ambiente (Niaounakis, 2013).

La incorporación de aditivos a polímeros basados en combustibles fósiles puede ayudar a una degradación acelerada pero no mejora su impacto ambiental, contrariamente puede dar lugar a ciertos efectos negativos, además la degradación de los plásticos oxodegradables, como por ejemplo bolsas, limita su

reutilización ya que no son adecuados para el almacenamiento de artículos por un periodo prolongado de tiempo (Niaounakis, 2013).

Los polímeros oxodegradables no son aptos para el reciclaje de los plásticos convencionales y los aditivos que utiliza para su reciclado hacen que el producto sea más susceptible a la degradación. En algunas ocasiones la cantidad de oxígeno en el ambiente no es suficiente para iniciar la degradación que puede tardar hasta 5 años y seguir siendo visibles como basura antes de que empiece a degradarse (Niaounakis, 2013).

Como se ha mencionado, existen varias opciones de plásticos biodegradables, sin embargo estos materiales presentan diversas inconsistencias: como lo es el tiempo de permanencia en el ambiente, nula o baja capacidad de reutilización y que su degradación sigue causando daños a diferentes hábitats. Por tal motivo surge la necesidad de introducir otra alternativa de plásticos biodegradables, por ejemplo los que son producidos por microorganismos llamados polihidroxicanoatos.

Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA's) son poliésteres biodegradables producidos por numerosos microorganismos como almacén de carbono y energía en presencia de elevadas fuentes de carbono y bajos niveles de nutrientes esenciales como son nitrógeno, azufre, fosfatos, la acumulación la realizan al producir gránulos intracelularmente que reutilizan en condiciones de inanición cuando se agota la cantidad de carbono en el medio.

La estructura de poliésteres derivados de cadenas cortas (de 3 a 5 átomos de carbono) y de cadena media (de 6 a 16 átomos de carbono) se muestran en ilustración 1 (Albertsson y Varma, 2002).

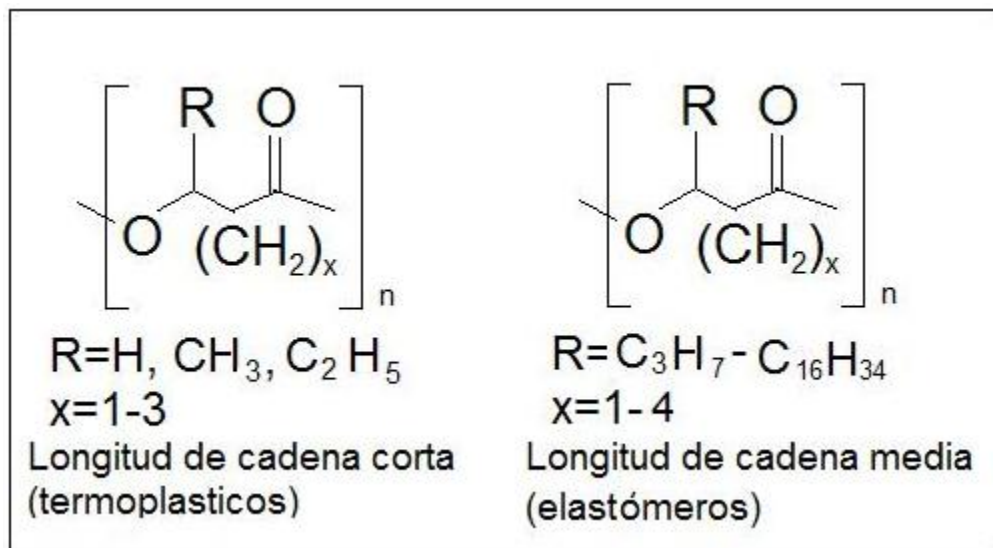


Ilustración 1. Fórmula general de la estructura de PHAs bacterianos (Albertsson, y Varma, 2002).

Entre la gran diversidad de microorganismos que se conoce que sintetizan PHAs, solo algunas bacterias se han empleado para la producción ya que pueden ser cultivadas de manera eficiente como células de alta densidad con alto contenido de PHA en un tiempo corto (Albertsson y Varma, 2002).

Poli-β-hidroxibutirato

Se ha encontrado que, polímeros activos de (Poli-β-hidroxibutirato) PHB y otros PHA's son sintetizados por una amplia variedad de microorganismos como material de almacenamiento intracelular de carbono y energía. El PHB es un termoplástico cristalino con una Tm (*Melting Temperature*) de 177°C (Mochizuki, 2002).

Durante los años 50's y 60's, se empezaron a producir estos polímeros para evaluación comercial de suturas y prótesis. Sin embargo, se mantuvo latente durante varios años hasta que ICI, (*Imperial Chemical Industries*) la empresa que

ayudo a Zeneca a realizar la producción y comercialización de PHAs, hizo un avance importante en la producción de un copolímero de β -hidroxibutirato y β -hidroxivalerato. Esta familia de materiales conocida como BiopolTM mejoró mucho las propiedades químicas comparado con el original homopolímero. En 1990, el primer producto comercial hecho de Biopol fue presentado en Alemania como una botella de shampoo biodegradable. (Albertsson y Varma, 2002).

Para reducir costos ICI también ha usado una estrategia en la que las células se desintegran por choque térmico, luego son tratadas con detergentes y enzimas para disolver los componentes celulares que no sean PHB, posteriormente el polímero se lava y flocula, finalmente se recupera como un polvo blanco del cual se hacen hojuelas. Posteriormente la producción de biopolímeros empezó a aumentar con Monsanto en 1996 y se detuvo la producción en 1998, otras empresas productoras se encuentran en Austria y Brasil, en este último por ejemplo, donde acoplaron el proceso de producción en una fábrica de azúcar y etanol a partir de los residuos de la extracción del azúcar de caña (González *et al.*, 2013).

Aunque los estudios que se realizaron anteriormente aportaron información para la obtención del polímero, el proceso sigue siendo tardado. Con respecto a la estrategia de cultivo para la producción de PHB, se ha visto que se puede alcanzar una productividad alta realizando cultivo por lote alimentado o cultivo continuo. Para el cultivo por lote alimentado de bacterias que requieren la limitación de algún nutriente para sintetizar PHB, se utiliza un sistema en dos etapas. En la primera se obtiene una concentración de biomasa deseada sin limitación de nutrientes. En la segunda se promueve la síntesis de PHA manteniendo en concentraciones limitantes uno de los nutrientes esenciales (González *et al.*, 2013). Aun así las bacterias mantienen un nivel del polímero constante, ya que al mismo tiempo que lo producen, realizan la degradación de éste, dependiendo de la concentración, metabolitos relacionados y cofactores (Jendrosseck, 2001).

Formación de PHB.

Se ha reportado en *Azotobacter vinelandii* que cuando las células vegetativas son móviles se transfieren a medio sólido sin nitrógeno e induce la formación de quistes. Cuatro horas después de la inducción, estas células pierden sus flagelos y sufren una última división celular para dar origen a dos células completamente redondas y muy encapsuladas, es decir cubiertas del exopolisacárido alginato. A las 6 horas empieza la secreción desde la superficie de las células de estructuras parecidas a membranas las cuales en aproximadamente 30 horas forman una capa más externa de exina que rodea al quiste maduro. Posteriormente se forma la intina que es una estructura que se encuentra en el espacio entre la exina y la membrana celular externa.

La culminación de estos eventos produce un quiste maduro que consiste en una célula redonda y pequeña con su membrana citoplasmica y una delgada pared celular de ácido murámico. Esta célula ó cuerpo central está cubierta por dos capas la intina y una exina compuestas principalmente de lipoproteínas y alginato, y dentro de ella se observan numerosos gránulos de PHB (Espín, 2001).

En el interior de las células bacterianas los PHA se disponen formando gránulos de naturaleza hidrofóbica rodeados por una monocapa lipídica en la que se encuentran ancladas proteínas implicadas en el metabolismo de los PHA y que se denominan GAP (*granule associated protein*) (Fernández, 2012).

Las GAP caracterizadas hasta ahora en las especies del género *Pseudomonas* son: polimerasas y depolimerasas de PHA, involucradas respectivamente en la síntesis y degradación del polímero; las fasinas son las GAP más abundantes y con una función estructural y reguladora, esta estructura se puede observar en la ilustración 2. El número y tamaño de los gránulos, así como su disposición y estructura macromolecular dependen del organismo productor y de las condiciones de producción (Fernández, 2012).

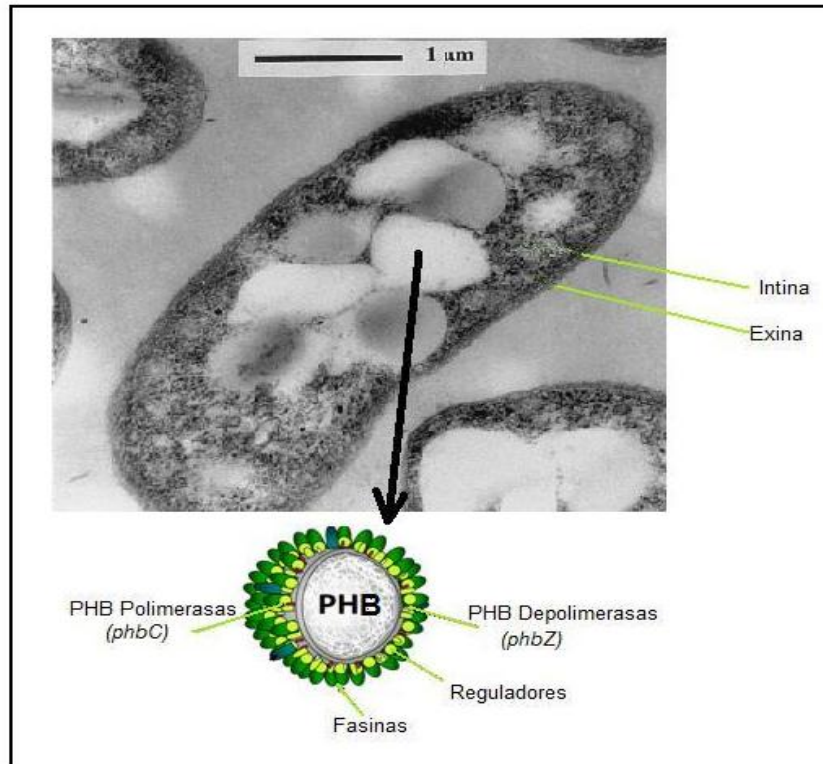


Ilustración 2. Estructura de PHB en *Pseudomonas putida* KT2440 (Fernández, 2012).

Ciclo del PHB

La ruta biosintética de PHB se compone de tres reacciones enzimáticas catalizadas por tres enzimas diferentes. La primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetyl-CoA en acetoacetyl-CoA por la enzima β -ceto-tiolasa (codificada por el gen *phbA*). La segunda reacción es la reducción de la acetoacetyl-CoA a β -hidroxibutiril-CoA por una acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH (codificada por el gen *phbB*). Por último, los monómeros de β -hidroxibutiril-CoA se polimerizan en PHB por PHB polimerasa, (codificada por el gen *phbC*) (Ilustración 3) (Reddy *et al.*, 2003).

Los intermediarios para la síntesis de los PHA provienen de rutas conectadas con el metabolismo central del carbono: la β -oxidación y la síntesis de novo de ácidos grasos. El acetil-CoA es un intermediario clave en la síntesis de PHA, como punto de conexión entre las rutas catabólicas y anabólicas implicadas en este sistema. El ciclo del PHA es un proceso continuo de síntesis y degradación del polímero en el que la acil-CoA sintetasa se encarga de transformar los productos de la depolimerización en intermediarios CoA (Fernández, 2012).

La degradación se inicia con la acción de una depolimerasa de PHB que libera el monómero de 3-hidroxi-butirato. La enzima deshidrogenasa 3-hidroxi-butirato cataliza la oxidación reversible del 3-hidroxi-butirato libre a acetoacetato, que posteriormente se inactiva a acetoacetyl coenzima A (acetoacetyl-CoA) por una CoA transferasa. Una cetotiolasa rompe la acetoacetyl-CoA para producir dos moléculas de acetil-CoA que se metabolizan a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Ilustración 3)(Aneja y Charles, 1999).

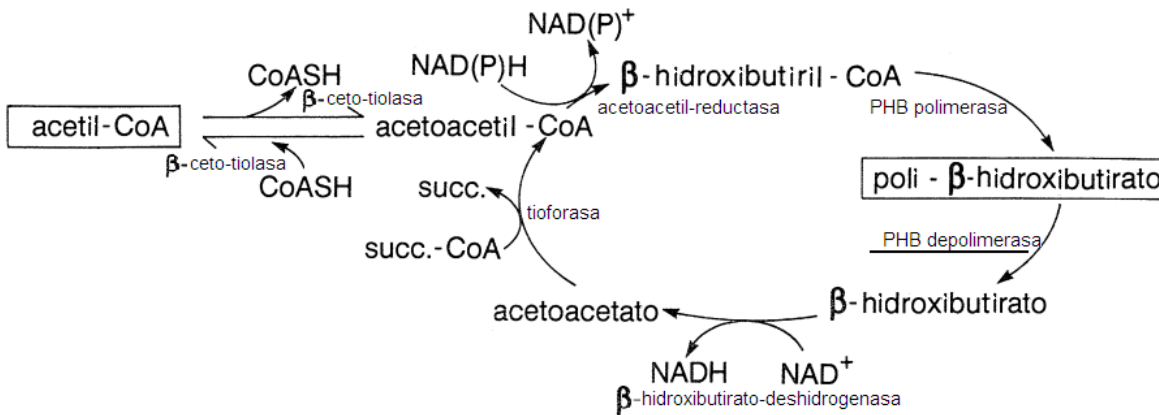


Ilustración 3. Ruta metabólica de la síntesis y degradación de PHB (Bergersen et al., 1990)

Los procesos de síntesis y degradación intracelular de los PHA se describen a menudo como procesos independientes, sin embargo, Fernández y

colaboradores en 2012 describen que en *P.putida* KT2442 el metabolismo de los PHA es un ciclo continuo en el que la polimerasa y la depolimerasa se encuentran activas de forma simultánea (Fernández, 2012). Y para *A. brasilense* se conoce que activa el mecanismo para metabolizar el PHB y convertirlo a Acetil CoA. La vía de degradación de PHB, comienza con la depolimerización de PHB a D- β -hidroxibutirato por depolimerasa de PHB (*PhaZ*). Una D- β -hidroxibutirato deshidrogenasa NAD dependiente oxida D- β -hidroxibutirato a acetoacetato, el cual puede ser convertido en acetoacetyl-CoA por varios sistemas. La transferencia de CoA a acetoacetato se produce ya sea directamente catalizada por la acetoacetyl-CoA sintasa, o indirectamente, a través de succinil-CoA reductasa, por succinil-CoA transferasa. En la siguiente reacción acetoacetyl-CoA activado se hidroliza en dos moléculas de acetyl-CoA, que pueden entrar en el ciclo de Krebs (Kadouri *et al.*, 2003).

La regulación genética de las polimerasas y las depolimerasas es diferente en algunos organismos, por ejemplo comparando los genes que regulan estas enzimas, en *Pseudomonas* se encuentran los genes *phaC1* y *phaC2* que codifican dos polimerasas y se encuentran separadas por el gen *phaZ* que codifica una depolimerasa intracelular. Se encuentra también el gen *phaD* que codifica un regulador transcripcional. Los genes *phaF* y *phal* codifican un tipo de fasinias (Catone, 2013).

Otro tipo de regulación conocida es que en la superficie de los gránulos de PHA se encuentra presente una acil-CoA sintetasa (ACS1) capaz de activar los productos de la despolimerización convirtiéndolos en (R)-HA-CoA, como parte del proceso cíclico de síntesis y degradación del polímero. La acción coordinada de estas actividades enzimáticas (polimerasa, depolimerasa y acil-CoA sintetasa) da lugar al “ciclo del PHA” que actúa como un “ciclo metabólico amortiguador” capaz de canalizar los intermediarios metabólicos hacia la síntesis de PHA o hacia otros destinos en función de la demanda celular (Fernández, 2012).

Degradación de PHB por depolimerasas (*phaZ*)

En la naturaleza los microorganismos son capaces de degradar los PHA, mediante la acción de PHA depolimerasas y PHA hidrolasas extracelulares, hasta CO₂ y agua (De Almeida, 2004). La degradación la realizan cuando requieren fuentes de carbono y energía; lo hacen por medio de las depolimerasas que son secretadas de las células y se adhieren a la superficie del polímero convirtiéndola en unidades de monómeros independientes. El tiempo que demora la degradación depende de la naturaleza propia del polímero así como también de las condiciones ambientales a las que sean expuestos, Su degradación se realiza en diversos ambientes incluyendo aerobios y anaerobios (Serrano, 2010).

La depolimerasa está relacionada estructuralmente con la familia de las esterasas, es decir que participan en la hidrólisis. Estas enzimas catalizan la liberación de acetoacetato derivado de polímeros intracelulares. Se ubican en la superficie del gránulo e hidrolizan todas las inclusiones de PHAs incluso los formados por monómeros poco usuales, lo que demuestra que actúa sobre una gran cantidad de sustratos como ocurre con otras esterasas.

Organismos productores de PHB

El PHB es producido por diferentes microorganismos como algunas algas y bacterias, en una amplia variedad de ambientes naturales. Algunas bacterias que pueden sintetizar poli-hidroxibutirato son mencionados en la tabla 1, destacando la capacidad de *Azospirillum* para producir este homopolímero (Baca *et al.*, 2010),

<i>Acidovorax</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Pedomicrobium</i>			
<i>Acinetobacter</i>	(wilde type) ^d	<i>Photobacterium</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Methylobacterium</i> ^b	<i>Syntrophomonas</i>
<i>Actinobacillus</i>	<i>Ferrobacillus</i>	<i>Penicillium</i> ^e	<i>Burkholderia</i> ^a	<i>Methylosinus</i>	<i>Thiobacillus</i>
<i>Actinomycetes</i>	<i>Gamphospheria</i>	<i>Protomonas</i>	<i>Caryophanon</i>	<i>Methylocystis</i>	<i>Thiocapsa</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Gloeocapsa</i> ^a	<i>Physarum</i> ^e	<i>Caulobacter</i>	<i>Methylomonas</i>	<i>Thiococcus</i>
<i>Alcaligenes</i> ^{a,b}	<i>Gloeotheca</i> ^a	<i>Pseudomonas</i> ^{a,b}	<i>Chloroflexus</i>	<i>Methylovibrio</i>	<i>Thiocystis</i>
<i>Allochromatium</i>	<i>Haemophilus</i>	<i>Ralstonia</i> ^{a,b}	<i>Chlorogloea</i> ^a	<i>Micrococcus</i>	<i>Thiodictyon</i>
<i>Anabaena</i> ^b	<i>Halobacterium</i> ^{a,c}	<i>Rhizobium</i> ^{a,b}	<i>Chromatium</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Thiopedia</i>
<i>Aphanothece</i> ^a	<i>Haloarcula</i> ^{a,b,c}	<i>Rhodobacter</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Microcystis</i>	<i>Thiosphaera</i>
<i>Aquaspirillum</i>	<i>Haloferax</i> ^{a,b,c}	<i>Rhodococcus</i> ^b	<i>Clostridium</i>	<i>Microlunatus</i> ^b	<i>Variovorax</i> ^{a,b}
<i>Asticcaulus</i>	<i>Halomonas</i> ^a	<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>Comamonas</i> ^{a,b}	<i>Microvoleus</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Axobacter</i>	<i>Haloquadratum</i> ^c	<i>Rhodospirillum</i> ^b	<i>Corynebacterium</i> ^b	<i>Moraxella</i>	<i>Wautersia</i> ^{a,b}
<i>Azomonas</i>	<i>Haloterrigena</i> ^c	<i>Rubrivivax</i>	<i>Cupriavidus</i> ^{a,b}	<i>Mycoplana</i> ^a	(today <i>Cupriavidus</i>)
<i>Aureobasidium</i> ^e	<i>Hydrogenophaga</i> ^{a,b}	<i>Saccharophagus</i>	<i>Cyanobacterium</i> ^b	<i>Nitrobacter</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Azohydromonas</i>	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Shinorhizobium</i>	<i>Defluviococcus</i> ^b	<i>Nitrococcus</i>	<i>Zoogloea</i> ^a
<i>Azospirillum</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Sphaerotilus</i> ^a	<i>Derxia</i> ^b	<i>Nocardia</i> ^{a,b}	
<i>Azotobacter</i> ^{a,b}	(recombinant)	<i>Spirillum</i>	<i>Delftia</i> ^{a,b}	<i>Nostoc</i>	
<i>Bacillus</i> ^{a,b}	<i>Lamprocystis</i>	<i>Spirulina</i> ^a	<i>Ectothiorhodospira</i>	<i>Oceanospirillum</i>	
<i>Beggiatoa</i>	<i>Lamproedia</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Oscillatoria</i> ^a	
<i>Beijerinckia</i> ^b	<i>Leptothrix</i>	<i>Stella</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Paracoccus</i>	
<i>Beneckea</i>	<i>Legionella</i>	<i>Streptomyces</i>	(recombinant) ^a	<i>Paucispirillum</i>	
<i>Brachymonas</i>	<i>Methanomonas</i>	<i>Synechococcus</i> ^a			

Tabla 1. Géneros microbianos que sintetizan PHAs. a) conocimiento detallado de la cinética de crecimiento y producción, b) acumulación de copolíesteres conocidos, c) arqueas, d) PHA encontrado en membranas celulares, e) géneros eucariotas.(Koller et al., 2010).

Características generales del género *Azospirillum*

Azospirillum ha sido encontrado principalmente en hábitats terrestres, donde puede colonizar raíces de algunas plantas por diversos mecanismos incluyendo la fijación de nitrógeno (Wisniewski 2011).

Se han realizado comparaciones entre genomas del género que revelan la extraordinaria plasticidad de su genoma. La relación genética entre las cepas de *Azospirillum* es comparable a la de *Rhizobium*, otro género de alfa-proteobacterias (Wisniewski 2011).

El genoma de algunas especies de *Azospirillum*, está constituido por varios megareplicones, siendo algunos lineares. Su número varía entre cepas de *A.brasilense*, encontrándose en promedio 7-8 replicones. En *A.lipoferum* el promedio es 10 replicones (Caballero, 2001).

Se pensó que los replicones de gran tamaño corresponderían al cromosoma, pero en *A. brasilense* se mostró que el genoma de esta especie está constituido por múltiples cromosomas, correspondiendo estos a replicones de 600-kb, 1000-kb y 1700-kb. En las otras especies de *Azospirillum* se encontró que el genoma está constituido por varios cromosomas, confirmándose la hipótesis sobre la multiplicidad de cromosomas en este género de bacterias. (Caballero, 2001).

En la base de datos de NCBI se tiene reportado en la genética de *A. brasilense* Sp245 un cromosoma y 6 plásmidos o replicones. Wisniewski y colaboradores especifican que la longitud de su secuencia genética es de 7530241 pb, la relación de G-C es de 68.49% de su contenido (Wisniewski *et al.*, 2011).

Dentro del género *Azospirillum* una de las especies que destaca por la capacidad de acumular PHB hasta el 80% de su peso seco es *A. brasilense* (Baca *et al.*, 2010),

Azospirillum brasilense

Azospirillum brasilense (α -subclase de las proteobacterias) es una bacteria Gram negativa, de vida libre, fijadora de nitrógeno y asociada a la rizosfera de plantas. Tiene un metabolismo carbonado y nitrogenado muy versátil, lo que permite adaptarse y establecerse en el competitivo entorno rizosférico. *Azospirillum brasilense* puede utilizar un amplio rango de sustratos, amonio, nitrato, nitrito, aminoácidos y nitrógeno molecular. En condiciones desfavorables, tales como desecación y carencia de nutrientes, se puede enquistar, recubriéndose de una capa de polisacáridos produciendo una acumulación de gránulos de poli β -hidroxibutirato, que sirven a la bacteria de reserva de fuente de energía (Collados, 2006).

ANTECEDENTES

En 2003 Kadouri y colaboradores clonaron y secuenciaron el gen *phbZ* de *Azospirillum brasilense* Sp7 y lo compararon con secuencias de depolimerasas de especies como *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense* y *A. doebereineriae* por Southernblot e hibridación. Y para la construcción y caracterización de la mutante que realizaron, insertaron un casete de resistencia a Kanamicina en un único sitio de restricción *NaeI*. Evaluando la cantidad de acumulación de PHB, la cepa mutante presentó en mayor cantidad la acumulación del polímero que la cepa silvestre, comprobando que el locus *phaZ* es requerido para la degradación de PHB. En situación de supervivencia, se menciona que la cepa silvestre resistió más al estrés por inanición, cuando fue incubada a una mayor temperatura (50°C) sobrevivió el 6.3% de la mutante a comparación de la silvestre que sobrevivió el 23% (Kadouri *et al.*, 2003).

En 2005 Khanna y Srivastava reportaron la producción de PHB en *E. coli* recombinantes debido a que los tiempos de crecimiento son menores aun sin limitación de nutrientes. En promedio indican que la acumulación de PHB puede alcanzar el 80-90% de peso seco. Por ejemplo en la cepa HNS174/pTZ18u-PHB contiene el plásmido TZ18u-PHB, el cual tiene los genes de biosíntesis de PHB y resistencia a Ampicilina de *Alcaligenes eutrophus*. Otra cepa que reportan es la de *E. coli* XL1- Blue que tiene el plásmido pKSSE5.3 que fue usado para producir homopolíester de ácido poli (4-hidroxibutírico) usando medio mineral que contiene glucosa y ácido 4 hidroxibutírico como fuente de carbono (Khanna y Srivastava, 2005).

En 2005 Molina obtuvo una cepa mutante de un fragmento del gen *phbC* mediante la inserción del casete *lacZ*-Km para su estudio en la biosíntesis de PHB en *A. brasilense*, analizando la secuencia que se clonó se encontró un codón de inicio putativo (ATG), donde se podía iniciar su traducción. Utilizando este codón para predecir la secuencia aminoacídica de la síntasa de *A. brasilense*, este grupo realizó un alineamiento con la PHB sintetasa de *Magnetobacterium*

magnetotactium, demostrando que las secuencias proteicas coincidían perfectamente. Aportando que el gen *phbC* es esencial para la biosíntesis de PHB pero sin identificar si existe regulación a nivel transcripcional de la síntesis de PHB en *A. brasilense* (Molina, 2005).

En 2012 Rivera expuso a diferentes tipos de estrés a *A. brasilense* para estudiar su influencia en la biosíntesis de PHB, ya que se conoce que al aumentar los niveles de PHB las células resisten condiciones de inanición. Las diferentes condiciones de estrés fueron térmico, osmótico y oxidativo. Concluyendo que el estrés térmico favorece la biosíntesis de PHB pero no de la proteína (en la mayoría de los casos). El estrés osmótico fue a una concentración menor, donde presentaba menor crecimiento de la célula pero sin afectar la biosíntesis de PHB. Sin encontrar diferencias significativas en estrés oxidativo para producción del PHB (Rivera, 2012).

En 2014 Martínez C. analizó la sobreexpresión del gen *phbC* en *A. brasilense* Sp7 para comparar la producción de PHB observando los mismos niveles con la cepa tipo y la mutante Sp7-p206c (*phbC*⁺⁺). Igualmente en el análisis de la proteína polimerasa no se encontraron diferencias significativas por la sobreexpresión del gen. También analizó la secuencia de la depolimerasa de *A. brasilense* Sp7 y encontró una variación genética muy grande entre las cepas de *A. brasilense*, el tamaño de la secuencia de la depolimerasa de Sp7 es mayor que la de Sp245 y de otras cepas, también analizó que una parte se encuentra en el cromosoma y el resto en el plásmido 4 de Sp245, al realizar un análisis de sitios conservados se observó que la secuencia funcional se encuentra en el cromosoma, por tal motivo se decidió usar esta secuencia (Martínez C., 2014).

JUSTIFICACIÓN

Azospirillum brasilense es una bacteria productora de PHB, un polímero biodegradable que actualmente ha aumentado sus requerimientos como sustituto a los plásticos que provienen del petróleo, por su rápida degradación, los costos de producción para la obtención de este polímero hasta el momento siguen siendo muy elevados, por tal motivo los estudios en regulación genética en este microorganismo ayudará a optimizar su producción.

Las bacterias degradan el PHB con ayuda de la enzima depolimerasa, sintetizada por el gen *phbZ*, para que pueda ser utilizado como fuente de carbono. Apoyándose de la ingeniería genética es como se han obtenidos diversos microorganismos modificados genéticamente, para aumentar la acumulación de PHB. Algunas modificaciones van desde la sobreexpresión de los genes que lo producen, hasta realizar la recombinación de éstos.

El realizar la mutación del gen que sintetiza una depolimerasa estaría provocando que exista una interrupción en el mecanismo de reabsorción del PHB para que sea utilizado como fuente de carbono por las bacterias. Si esto no sucede, la cantidad del polímero se acumulará en el medio el cual puede repercutir favorablemente en los costos de producción del polímero.

HIPÓTESIS

La inserción del casete de Kanamicina al gen *phbZ* (*phbZ::Km*) permitirá que la mutante de *A. brasilense* no degrade el PHB y así los niveles de éste aumenten en el cultivo.

OBJETIVOS

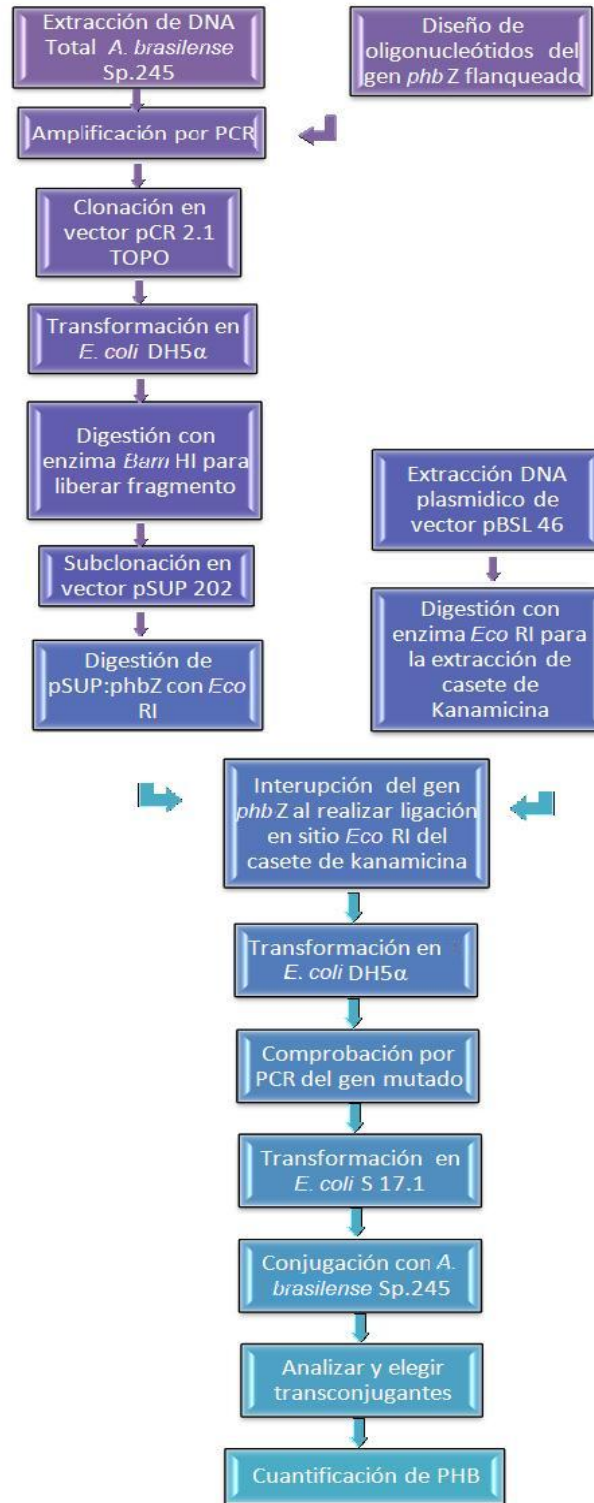
GENERAL

OBTENCIÓN DE LA MUTANTE *phbZ* (*phbZ::Km*) EN *Azospirillum brasilense* Sp. 245 Y ANÁLISIS PARCIAL DE LA ACUMULACIÓN DEL PHB.

PARTICULARES

- 1.- Clonar el gen *phbZ* en vector de clonación pCR 2.1 TOPO.
- 2.- Interrumpir la secuencia de gen *phbZ* con el casete de Kanamicina.
- 3.- Generar la mutante *phbZ::km* en *A. brasilense* Sp245.
- 4.- Cuantificar PHB de la cepa mutante y de la cepa silvestre.

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIAL Y METODOS

La descripción de las cepas que se utilizaron en este trabajo se muestra en la tabla 2, incluyendo las cepas obtenidas y adquiridas.

CEPAS	CARACTERISTICAS	REFERENCIAS
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre c/sec. liberada.	NCBI(No. de acceso emb HE577327.1)
<i>Azospirillum brasilense phbZ</i>	Presenta inserto de gen de resistencia a Kanamicina interrumpiendo el gen <i>phbZ</i> .	En este trabajo
<i>Escherichiacoli</i> DH5 α	Habilidad de aceptar plásmidos de inserción excepcionalmente bien.	NCBI(No. de acceso KF661097.1)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α TOPO: <i>phbZ</i>	<i>E. coli</i> que porta el vector pCR TOPO 2.1 <i>phbZ</i>	En este trabajo
<i>Escherichia coli</i> DH5 α pSUP 202: <i>phbZ</i>	<i>E. coli</i> que porta el vector pSUP 202: <i>phbZ</i>	En este trabajo
<i>Escherichia coli</i> DH5 α pSUP 202: <i>phbZ</i> ::km	<i>E. coli</i> que porta el vector pSUP 202: <i>phbZ</i> ::km	En este trabajo
<i>Escherichiacoli</i> s17.1 λ pir	Expresa el gen pir a partir de una copia lisógena del fago λ pir, y está diseñada para la propagación de plásmidos con el origen de replicación R6K	lifescience.biomedal.com
<i>Escherichiacoli</i> s17.1 <i>phbZ</i> ::km	Contiene construcción de vector pSUP 202: <i>phbZ</i> ::km	En este trabajo

Tabla 2. Cepas utilizadas.

Los plásmidos utilizados en este trabajo se nombran en la tabla 3.

PLASMIDOS	CARACTERISTICAS	REFERENCIAS
pCR TOPO 2.1	Vector de clonación que utiliza la ADN topoisomerasa I que su papel biológico es escindir y volver a unir ADN para facilitar la replicación.	lifetechnologies.com
pCR TOPO 2.1 <i>phbZ</i>	Obtenido de vector pCR TOPO 2.1 más la inserción del gen <i>phbZ</i> .	En este trabajo
pSUP 202	Tc ^r , Amp ^r , Cm ^r , Mob ⁺	Nunes <i>et al.</i> 2000
pSUP 202: <i>phbZ</i> ::km	Obtenido del vector pSUP 202 más inserto de gen <i>phbZ</i> interrumpido por casete de kanamicina.	En este trabajo
pBSL 46	Amp ^r , Km ^r , 1.3 kb <i>nptII</i> contiene casete de resistencia a Km	Alexeyev <i>et al.</i> 1995

Tabla 3. Plásmidos utilizados.

Medios y condiciones de cultivo.

La cepa *A. brasilense* Sp 245 se adquirió del mismo cepario que se tiene en el laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo-Hospedero del Centro de Investigaciones de Ciencias Microbiológicas ICUAP, por tal motivo no fue necesario identificar al organismo; se sembró en medio Luria-Bertani (LB) suplementado con 100 µg/ml de Ampicilina (Amp) incubándose a 32°C por 18 horas y a 150 rpm. Del mismo modo la cepa mutante *A. brasilense phbZ*⁻ suplementado con 100 µg/ml de Amp y 50 µg/ml de Kanamicina (Km).

Los medios de cultivo Rojo Congo, Medio Mínimo y K-Malato fueron utilizados en la selección de las cepas en los diferentes protocolos con *A. brasilense*.

Para *E. coli* se sembró en LB con los respectivos antibióticos que se muestran en la tabla 3. La incubación fue de 37°C a 150 rpm durante toda la noche.

Cepa	Antibióticos
<i>E. coli</i> DH5α	Ácido Nalidíxico 15 μ g/ml,
<i>E. coli</i> DH5α mas vector TOPO:<i>phbZ</i>	Amp 100 μ g/ml y Km 15 μ g/ml
<i>E. coli</i> DH5α mas vector pSUP 202:<i>phbZ</i>	Amp 100 μ g/ml y Cm 10 μ g/ml
<i>E. coli</i> DH5α mas vector pSUP 202:<i>phbZ</i>::km	Amp 100 μ g/ml y Km 15 μ g/ml.
<i>E. coli</i> S 17.1	Sm 20 μ g/ml
<i>E. coli</i> S 17.1 más vector pSUP 202:<i>phbZ</i>::km	Sm 20 μ g/ml y Km 15 μ g/ml

Tabla 4. Antibióticos utilizados en cultivos.

Diseño de Oligonucleótidos para obtención de gen *phbZ*.

En la base de datos de NCBI se encuentra liberado el genoma completo de *A. brasilense* Sp 245 (GI:356875477) así como la secuencia de genes de las depolimerasas de otras especies. A partir de esto, se buscó la secuencia del gen *phbZ* en el genoma completo, decidiéndose tomar 948 pb rio arriba del gen y 776 pb rio abajo de la secuencia ubicada en el cromosoma para favorecer una mayor complementariedad de bases y facilitar la doble recombinación con el gen original para el intercambio por el gen mutado. También se añadieron sitios de corte de la enzima *Bam* HI para facilitar la clonación e identificación de la secuencia una vez insertado en los vectores, tanto de clonación como el vector suicida. La secuencia de los oligonucleótidos se muestra en la tabla 5, subrayado los sitios de corte de la enzima *Bam* HI.

Nombre	Secuencia
Delantero: AB245Z-Fbam	5' <u>GCG GAT CCC</u> CGC ATC GCC GAG GTC ATC 3'
Reverso: AB245Z-Rbam	5' <u>CCG GAT CCC</u> CTT CCT GCG CTT CTG GGT C 3'

Tabla 5. Oligonucleótidos de gen *phbZ* flanqueado.

Los oligonucleótidos se probaron *in silico* en el programa “Primer Select” para verificar características y conocer su Tm requerida para la amplificación por PCR.

Extracción de ADN Total

De un cultivo de toda la noche se tomaron 3 ml y se centrifugó a 1 min a 12000 rpm, a este precipitado se le realizó la técnica de extracción mostrada en Anexo 3. Posteriormente se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Amplificación por PCR

Una vez obtenido el ADN se realizó la amplificación del gen por PCR con las siguientes condiciones:

Condiciones	Mix reacción
Tm= 69.5°C	Buffer PCR 1 x
Tiempo de extensión= 3 min.	dNTPs 2 mM
Número de ciclos= 25	MgCl ₂ 0.2 mM
	Oligonucleótido Delantero 0.62 µM
	Oligonucleótido Reverso 0.62 µM
	ADN 13 µg/ml
	DMSO 5 %
	Taq Recombinante 1 U

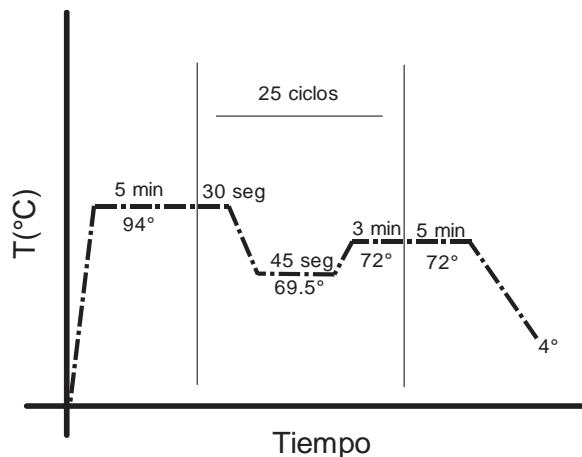


Ilustración 4. Esquema de condiciones de amplificación por PCR.

Clonación del inserto.

Para la Clonación se utilizó el vector pCR 2.1 TOPO, que utiliza una topoisomerasa para unir los extremos cohesivos que tiene el vector con los extremos del inserto. Tal reacción de ligación se dejó a 22°C toda la noche y posteriormente se usó para la transformación en células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes utilizando IPTG como inductor del operón *LacZ*, presente en el plásmido en el sitio de clonación, éste codifica para la β -galactosidasa que degrada la galactosa, en este caso X-gal que es un análogo, esto provoca una selección de las colonias, ya que de no recibir el inserto las células transformantes que captaron el plásmidos con el operón *LacZ* intacto, una vez inducidas por IPTG, estarán expresando β -galactosidasa, que hidroliza X-gal y colorea de azul las colonias. Las clonas transformantes que aceptaron el plásmido con el operón *LacZ* recombinante, que recibieron el fragmento que deseamos clonar, interrumpen el gen *lacZ* y por tanto, no pueden expresar β -galactosidasa ni degradar X-gal, permaneciendo de color blanco. De este modo, la selección de las colonias que contengan el fragmento deseado serán las que presenten dicha coloración.

Extracción de ADN plasmídico.

Para corroborar que el fragmento clonado fuera el correcto y se encontrara completo, una vez que se obtuvieron colonias con las características mencionadas anteriormente, se crecieron en tubos con 5 ml de medio LB más antibiótico de selección y se realizó la extracción del plásmido por técnica de miniprep (Anexo 4) procediendo la digestión con la enzima *Bam*HI.

Secuenciación y corroboración de sitios de corte.

Con la construcción obtenida en el vector pCR 2.1 TOPO se realizó la secuenciación para corroborar si se mantenían los sitios de corte de la enzima *Eco*RI ya que en la secuencia reportada en NCBI se muestran 2 sitios de reconocimiento dentro del gen que, al realizar la digestión con dicha enzima eliminaría una fracción de 726 pb, el cual no se lograba obtener. Para asegurar que la secuenciación fuera completa, se realizaron nuevos oligonucleótidos intermedios, ya que el tamaño de la secuencia fue de 2961 que es muy amplio para la técnica de secuenciación, los oligonucleótidos se ocuparon para realizar un caminado y cubrir el rango de confiabilidad de secuenciación. El diseño se realizó desde el inicio del gen completo (base 1), hasta el final sin incluir el último codón (base 1218), esto solo para posibles usos posteriores. La secuencia se muestra en la tabla 6.

Nombre	Secuencia
Delantero: PHBZ245F	5´ TTG CTC TAC ATC TCT ACG AAT CTG3´
Reverso: PHBZ245R	5´ ATT GTG CTT GCG GAT GAA CTC 3´

Tabla 6. Oligonucleótidos de gen *phbZ* solo.

Con los resultados de la secuenciación se pudo verificar la pérdida de un sitio *Eco* RI, lo cual fue benéfico, ya que la construcción quedó solo con dos de los tres sitios analizados inicialmente y, dio motivo a que la digestión con esta enzima se realizara de manera parcial permitiendo solo dos posibles combinaciones de ligación con mayor posibilidad de que el casete de resistencia a kanamicina se insertara dentro de la secuencia del gen para conseguir la mutación.

Subclonación en el vector suicida pSUP 202.

Se realizó la digestión del vector TOPO:*phbZ* con la enzima *Bam* HI para liberar el inserto y se utilizó para realizar la ligación en el vector suicida pSUP 202 en el sitio *Bam* HI que interrumpe al gen se resistencia a Tetraciclina (Tc), la ligación se realizó siguiendo la técnica de la T4 ADN ligasa de Thermo scientific incubando a 20°-22°C durante toda la noche y se utilizó para realizar transformación en *E. coli* DH5 α . Posteriormente se realizó la extracción de plásmido y digestiones con *Bam* HI donde mostró fragmentos de 7831 pb y 2962 pb y con la enzima *Eco* RI obteniendo fragmentos de 4568 pb y 6222 pb.

Obtención de la construcción del gen *phbZ::Km*.

Al verificar el sitio correcto de la enzima *Eco* RI que se mantuvo en la secuencia se realizaron las digestiones de los vectores pBSL46 y pSUP202:*phbZ* por separado con el mismo tiempo de proceso. Posteriormente se realizó la ligación colocando ambas reacciones de digestión y se dejó toda la noche, la cual se ocupó para la transformación de *E. coli* DH5 α , la selección se realizó en cajas de LB con agar al 1.5% y con Km y Cm ya que las posibles construcciones que podían obtenerse se muestran en la tabla 7.

Colonias	Antibiótico de Resistencia	Antibiótico que es Sensible	Longitud de secuencia (kb)
Sin interés	Amp y Km	Cm	12.6
Sin interés	Amp y Km	Cm	13.3
Con interés	Cm, Amp y Km	-	12.6

Tabla 7. Construcciones posibles en la ligación del vector pSUP:*phbZ* y caset de Km

Conjugación de *E. coli* S17.1 *phbZ::km* con *A. brasilense* Sp.245.

La cepa obtenida de *E. coli* S17.1 *phbZ::km* (donadora) se incubó a 37°C sin agitación y sin antibiótico mientras que *A. brasilense* Sp.245 (receptora) se incubó a 30°C con agitación sin antibiótico. Una vez que alcanzaron la fase logarítmica media se colocaron ambas cepas en placas de LB sin antibiótico a 30°C durante toda la noche. Para obtener el cultivo celular se colocó 1 ml de Solución Salina Isotónica (SSI) y posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 10², 10³, 10⁵ y extendidas en cajas de Medio Mínimo K-Malato con Amp y Km, las colonias obtenidas se sembraron numeradas en cajas de Medio Mínimo K-Malato con Amp y Km.

Las colonias candidatas se sembraron en Medio Rojo Congo para verificar morfología que presentaran el color rojo escarlata que caracteriza a *A. brasilense*. Otra selección se realizó al sembrar la mutante en Medio Mínimo K-Malato con Cm, ya que si se había realizado la doble recombinación el plásmido pSUP202 que presenta esta resistencia debería eliminarse y si la cepa que se estaba obteniendo seguía siendo *E. coli* tendría que crecer ya que sigue conteniendo el plásmido completo. Por último se verificó por medio de PCR tanto la cepa silvestre como las posibles mutantes.

Extracción de PHB

La cuantificación se realizó por triplicado en matraces de 250 ml con 50 ml de Medio Mínimo K-Malato. Se tomó la cepa silvestre de *A. brasilense* Sp245 como control y la mutante obtenida ajustadas con una D. O. de 1 desde un pre-cultivo de 24 horas. Las muestras se tomaron a las 24, 48 y 72 horas. La técnica de extracción fue la que reportan Law y Slepecky en 1962 (Anexo.8) explicando que al colocar la extracción de PHB en H₂SO₄ calentado se forma ácido crotónico el cual puede cuantificarse en el espectrofotómetro a 235 nm frente a luz UV y contrastándola con una curva de calibración de PHB.

Determinación de proteínas totales.

Al mismo tiempo que se tomó del cultivo para la cuantificación de PHB, se tomó 1 ml para realizar medición de proteínas totales por el método de Bradford. Tomando 100 µl del cultivo se lavó con PBS en dos ocasiones y se resuspendió en 200 µl del mismo, se adicionaron 200 µl de NaOH 1 N y se sometió a ebullición (95°C) por 10 minutos. Después de que se dejaron enfriar se adicionó 400 µl de HCl 0.5 N y 200 µl del reactivo Bradford, se mezcló y se dejó incubar por 10 min. Finalmente se realizó la lectura en espectrofotómetro a 595 nm y se obtuvo la concentración en mg de proteína por una curva de calibración de BSA.

Análisis estadísticos

Se realizó la relación PHB/proteína tomando los datos de la cantidad de mg de PHB sobre mg de proteína en un ml de cultivo. Teniendo como variables tiempo (24, 48 y 72 horas) y cepa (Silvestre y Mutante) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías utilizando un $\alpha=0.05$. Posteriormente un análisis de regresión lineal para un análisis de extrapolación de los datos.

RESULTADOS

Amplificación y Clonación del gen *phbZ*.

La amplificación por PCR del gen *phbZ*, se comprobó por electroforesis en gel de agarosa 1% (Ilustración 5), comprobando el tamaño del amplificado de 2962 pb ya que es el tamaño del gen de 1221 pb más 1742 pb que se adicionaron flanqueándolo y los que se agregaron a los oligonucleótidos.

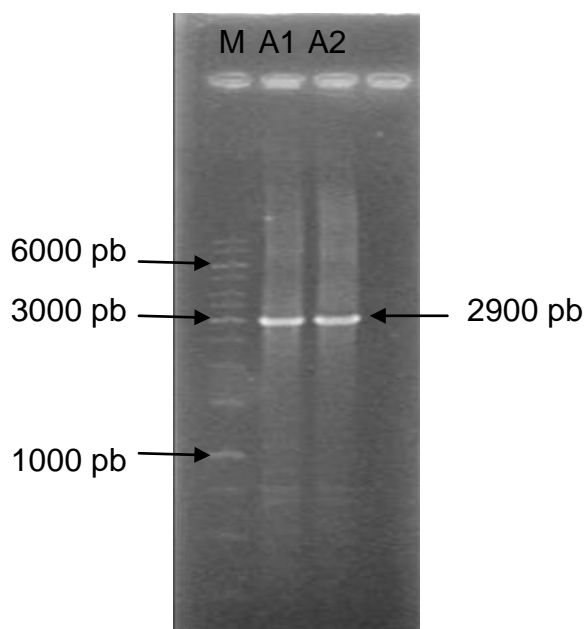


Ilustración 5. Gel de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Amplificación por PCR de gen *phbZ* de *A. brasilense* Sp 245. M-Marcador, A1-Amplificado de muestra 1, A2-Amplificado de muestra 2.

La clonación del gen se realizó en el vector pCR 2.1 TOPO siguiendo la técnica especificada en el kit del vector y se utilizó para realizar la transformación en células competentes de *E. coli* DH5 α a las cuales se les extrajo ADN plasmídico para realizar la digestión de la enzima *Bam* HI para comprobar la presencia del inserto de acuerdo al tamaño donde 2962 pb son del inserto y 3931

Resultados

pb del vector, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1%, los resultados se muestran en la ilustración 6.

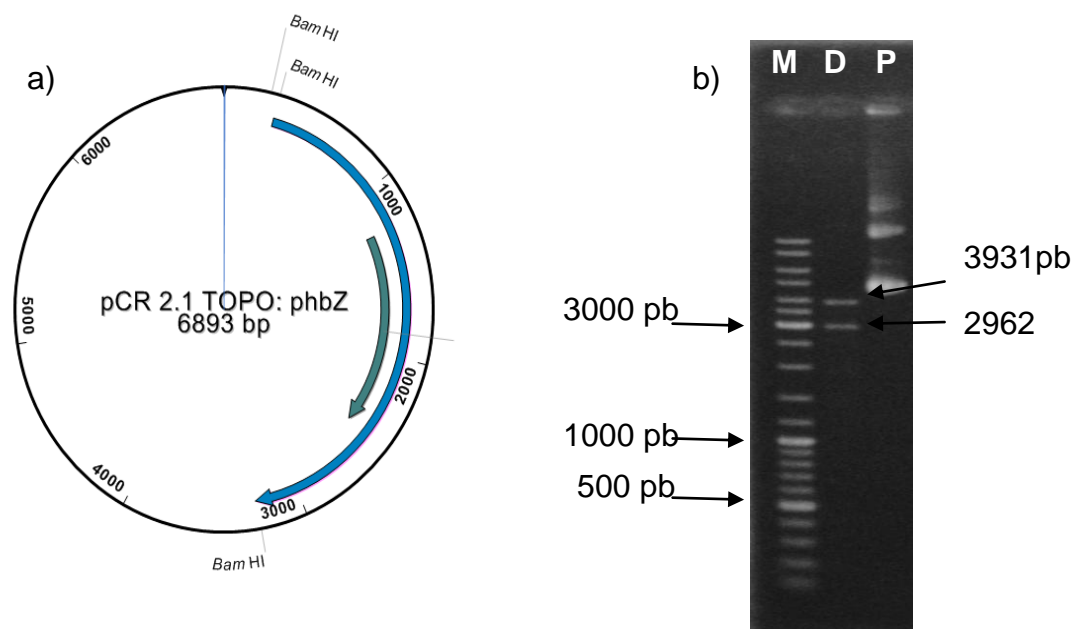


Ilustración 6. a) Esquema de vector pCR 2.1 TOPO con el inserto del gen *phbZ*. b) Gel de electroforesis, digestión con enzima *Bam* HI. M-Marcador, D-Digestión, P-Plásmido.

Subclonación del gen *phbZ* en el vector suicida pSUP202.

De la digestión del vector TOPO:*phbZ* se obtenían dos fragmentos de 2962 pb y 3931 pb, al mezclarlas en la reacción de ligación con el del vector pSUP202 con tamaño de 7830 pb se obtenían distintas opciones de construcción donde podrían obtenerse los siguientes perfiles: a) el vector pSUP202 solo que mide 7.8 kb, con resistencia a Tc-Cm-Amp b) vector pCR TOPO linearizado que mide 3.9 kb con resistencia a Km-Amp, y c) vector pSUP 202 más inserto con un fragmento que mide 10.7 kb con resistencia a Cm-Amp, pero sensibles a Tc comprobándolo también al realizar la digestión nuevamente con *Bam* HI mostrando los tamaños de 7831 pb y 2962 pb y *Eco* RI obteniendo los tamaños de 4568 pb y 6222 pb. La construcción se muestra en la ilustración 7.

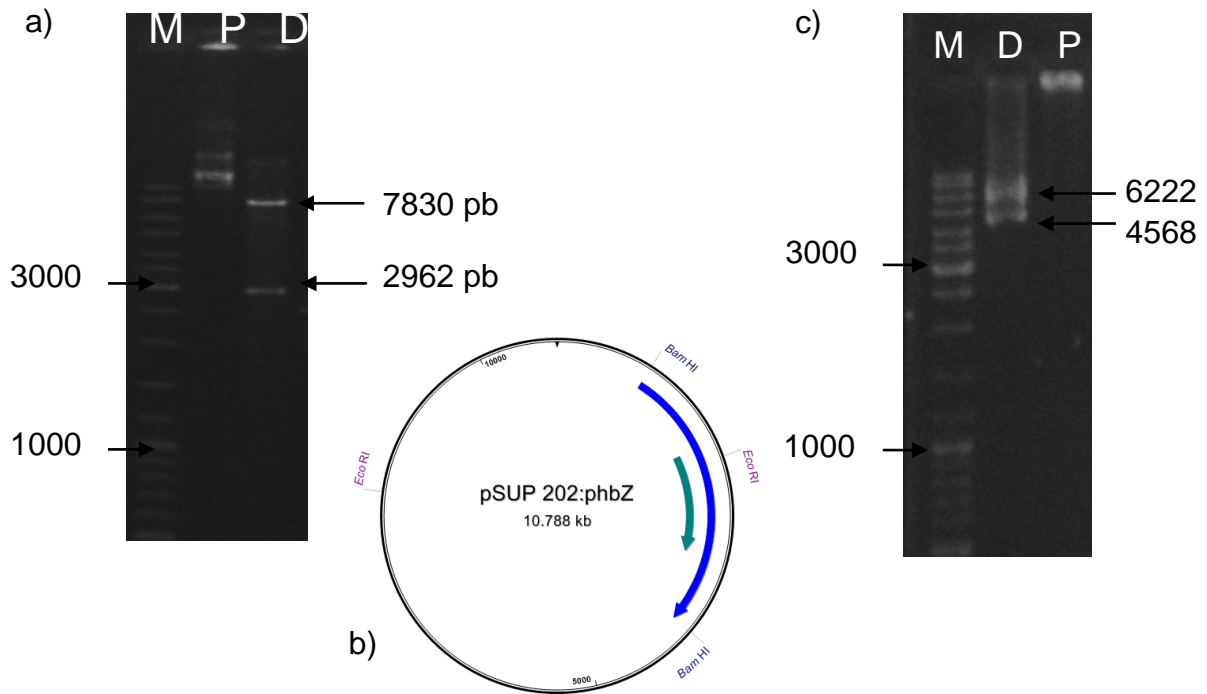


Ilustración 7. a) Gel de electroforesis, digestión con enzima *Bam* HI, M-Marcador, P-Plásmido, D-Digestión. b) Esquema de vector pSUP:*phbZ*. c) Gel de electroforesis, digestión con enzima *Eco* RI, M-Marcador, D-Digestión, P-Plásmido.

Obtención de la construcción del gen *phbZ*::Km

La digestión del vector pSUP:*phbZ* se realizó parcial para que se tuviera la opción de que se hiciera solo uno corte de los dos sitios *Eco* RI que presentaba. El sitio adicional donde no debía hacerse el corte está en un caset de resistencia a Cm, por lo que si el inserto se colocaba ahí lo interrumpía y las cepas que crecieran con esa construcción que no eran las funcionales, serían sensibles a Cm, por lo que se eligieron las cepas que tuvieran la resistencia tanto a Cm y a Km. Para corroborar la construcción se realizó PCR con los oligonucleótidos del gen *phbZ* solo (los segundos oligonucleótidos diseñados), donde debía presentar los siguientes tamaños: vector pSUP202 solo, al no tener ningún inserto, no debía amplificar nada; el vector pSUP:*phbZ*, debía mostrar un tamaño de 1221 pb y el

Resultados

vector pSUP:*phbZ*::km con un tamaño de 2421 pb el cual se muestra en la ilustración 8.

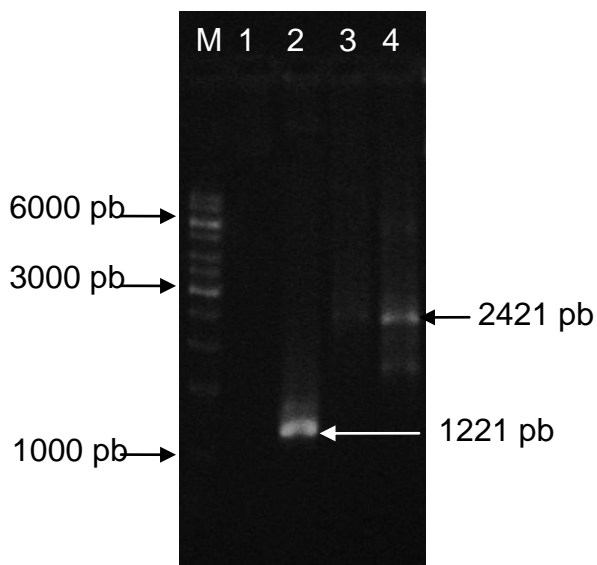


Ilustración 8. Gel de electroforesis. PCR de: 1-vector pSUP202 solo. 2- pSUP:*phbZ*, 3 y 4- pSUP:*phbZ*::Km, M-Marcador.

Una vez que se verificó la construcción se realizó la transformación en *E. coli* S17.1 y con ella se realizó la conjugación en *A. brasilense* Sp245. La selección de las transconjugantes se realizó por medio de cultivo, ya que se verificó que *E. coli* S17.1 no crecía en Medio Mínimo K-Malato a diferencia de *A. brasilense*. Se obtuvieron 5 colonias prospecto y se sembraron en medio Rojo Congo para comparar morfología, asimismo se sembró en Medio Mínimo K-Malato con Cm donde no mostro crecimiento comprobando la eliminación del vector.

Cuantificación de PHB

La cepa mutante obtenida y la silvestre se sembraron en Medio Mínimo K-Malato, ya que al ser un medio con alta concentración de carbono y limitado de nitrógeno provoca que el organismo inicie la producción de PHB incluso desde tiempos de incubación muy tempranos observándose que puede ser a la par de la

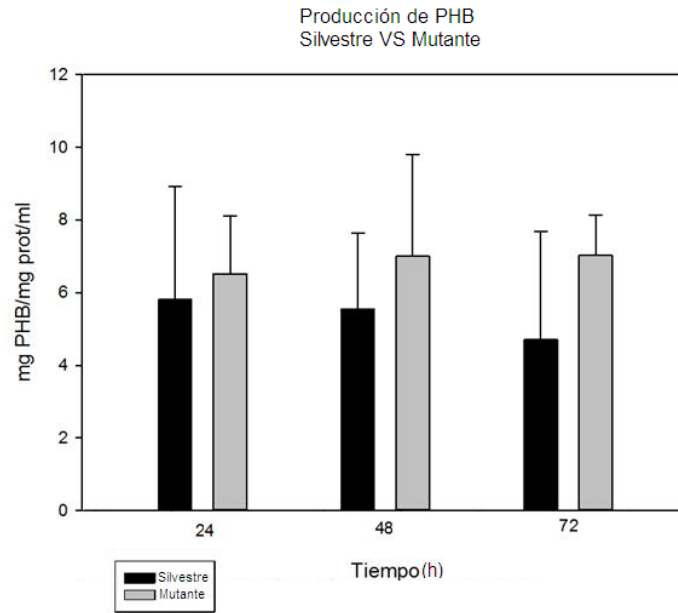
producción de metabolitos primarios. Por tal motivo se tomó como pre-inóculo un cultivo de 24 horas y los tiempos que se midieron fueron de 24, 48 y 72 horas, se realizaron 3 ensayos por triplicado para obtener una n de 27 por cada cepa.

Para obtener la relación mg PHB/mg proteína/ml de cultivo se tomó la lectura de D.O. tanto de PHB (ácido crotonico) como de las proteínas y se realizaron los cálculos con las curvas de calibración de PHB comercial y curva de calibración de BSA, obteniendo cantidad en mg al despejar “ y ” de la pendiente.

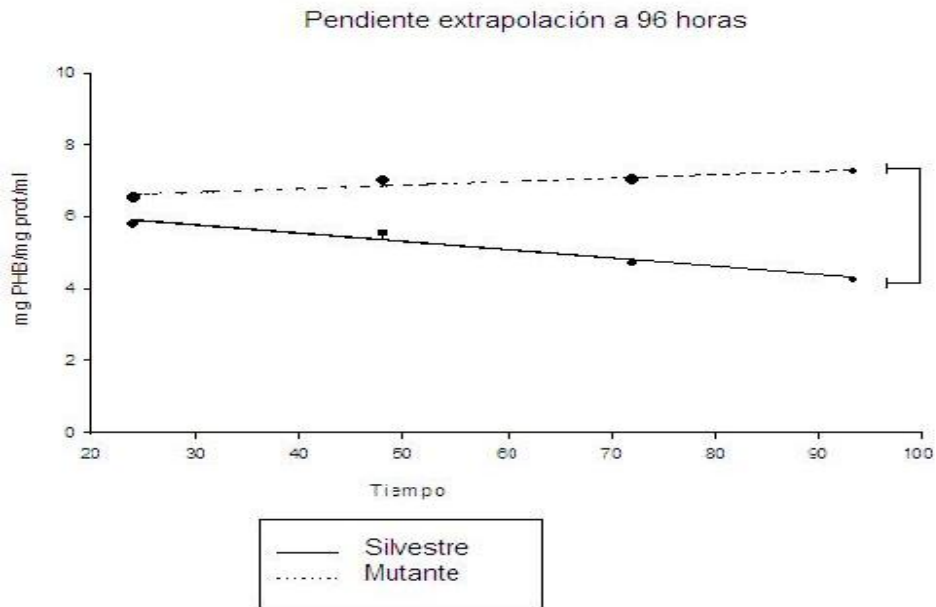
Análisis estadísticos.

Para realizar la grafica se obtuvieron los promedios de cada cepa a los diferentes tiempos y se calculó su desviación estándar (Gráfica 1). Se puede observar la tendencia que tiene la cepa mutante de mantener la cantidad de PHB, pero al realizar los análisis de ANOVA de dos vías nos muestra una $P=0.679$ al relacionar ambas variables, por tal motivo se analiza la varianza de cada variable por separado donde al tomar en cuenta la variable cepa nos muestra una $P=0.05$, aunque es muy cercana a nivel de significancia aún está dentro de los valores rechazables. Por último con la variable tiempo el valor de $P=0.895$ que tampoco muestra diferencia estadísticamente significativa. Por tal motivo podríamos decir que la cantidad de PHB/proteína no es significativamente mayor en la Mutante que en la Silvestre en los tiempos de 24, 48 y 72 horas.

Posteriormente se realizó un análisis de regresión lineal donde se extrapolaron los datos a un tiempo de 96 horas para poder observar si a este tiempo la diferencia que llega a aumentar puede ser significativa (Gráfica 2).



Gráfica 1. Gráfica de producción de PHB silvestre vs mutante



Gráfica 2. Gráfica de regresión lineal. Extrapolación a 96 horas.

Discusión

Mutación del gen *phbZ*

Los análisis *in silico* de la depolimerasa de *A. brasilense* Sp7 realizados por Martínez C. (2014) muestran una alineación con *A. brasilense* Sp245, la comparación indica que una parte de la secuencia coincide con un fragmento en el plásmido 4 y otra parte se encuentra dentro del cromosoma, en dichos estudios se identificaron los dominios conservados, lo cual concuerda con lo reportado en la base de datos del NCBI (No. de acceso emb|HE577327.1|) donde refieren que el gen que sintetiza a la proteína se encuentra en cromosoma, a diferencia de la fracción del plásmido 4 que no mantiene dominios conservados con la familia de las depolimerasas. Por lo tanto al realizar la inserción del casete de resistencia a Km en la secuencia que se encuentra en el cromosoma, interrumpe la síntesis de la depolimerasa.

Nunes y colaboradores (2000) realizaron una mutación de los genes *Nif* en *Azospirillum brasilense* donde miden la eficacia del vector suicida pSUP 202 para la transferencia de transposones en esta cepa ya que tiene el plásmido integrativo RP4 dentro de su cromosoma y por lo tanto puede movilizar el plásmido teniendo el mismo gen *mob*.

Cuando se notó que la pérdida de uno de los sitios *Eco* RI beneficiaba por dejar solo uno de los dos sitios, el que se presentaba dentro del gen, se pudo asegurar que al insertar el casete de Km se llevaría a cabo la mutación. En el caso contrario, que los dos sitios se hubieran mantenido las posibilidades de obtener la construcción deseada hubieran sido mayores.

Acumulación de PHB y actividad de la depolimerasa.

El comportamiento de los datos en las graficas de cuantificación de PHB se puede comparar con lo reportado por Jendrosseck y Handrick en 2002 donde mencionan que la depolimerasa es expresada cuando los niveles de carbono disminuyen, que en la mayoría de casos ocurre en fase de crecimiento estacionario, en ese momento la depolimerasa es expresada para iniciar la degradación del PHB. Lo contrario sucede en la cepa mutante, ya que los niveles del polímero presente se mantienen constantes a partir de las 48 horas, mostrando que si existe un cese de actividad de la proteína.

De acuerdo a las cinéticas de producción/acumulación de PHB se observó que a las 24 horas ya mostraba una elevada acumulación en ambas cepas que comparando con los resultados de Martínez M. (2014) donde al realizar la cuantificación de PHB a las 0,3,6 y 9 horas observó que la producción inicia a pocas horas de la inoculación cuando se toma un precultivo que ya se encuentra en proceso de producción.

Aunque en los tiempos ensayados en este proyecto iniciaron desde las 24 horas, concuerdan con la elevada cantidad inicial de PHB en tiempos tempranos (antes de las 24 horas) que, posteriormente disminuye cuando en la bacteria tiene la necesidad de carbono, del mismo modo que York y colaboradores (2003), observaron en sus cultivos de *Ralstonia eutropha* tanto silvestre como mutantes (*phaZ*⁻) un comportamiento alterado en las primeras 12 horas de crecimiento de cultivo, regulándose a las 24 horas y a partir de ese tiempo realizan la comparación de producción de PHB en cada cepa. Por tanto se puede atribuir a que la bacteria sintetiza y degrada el polímero en coordinación con la producción de metabolitos primarios aunado a que depende de la disposición de nutrientes que se encuentren en el medio (Jendrosseck y Handrick, 2002).

Se conoce también que en *Pseudomonas oleovorans*, tanto la síntesis y degradación intracelular de PHB se lleva a cabo antes de que la bacteria complete

la utilización de la fuente de carbono del medio, la célula disminuye la concentración de polimerasa mientras que incrementa la producción de la depolimerasa, cabe mencionar que en *Alcaligenes eutropha* la síntesis y degradación procede simultáneamente (González, 2013).

Al decir que la actividad de la depolimerasa en *A. brasilense* Sp 245 disminuyó, se puede afirmar que es porque la mutación en el gen *phbZ* fue en la secuencia que se ubica en el cromosoma.

La diferencia de la acumulación de PHB entre la mutante y la silvestre pudiera ser mayor si se realizara un cambio de cultivo una vez llegado a la fase donde existe una mayor acumulación del polímero, como lo realizaron York y colaboradores (2003) en *Ralstonia eutropha*, que durante el periodo de cultivo de 72 horas en medio rico (TBS) todas sus cepas analizadas mostraban un patrón de acumulación similar acercándose al 80% de peso seco. Cuando las cepas cambiaban de medio a uno de aprovechamiento de PHB, la cepa silvestre había utilizado la mitad de su contenido de PHB después de 48 horas y sus cepas con deleciones en los genes de las depolimerasas no perdían contenido de PHB en el mismo tiempo.

Conclusiones

- ✓ Se clonó el gen *phbZ* en vector de clonación pCR 2.1 TOPO.
- ✓ Se Interrumpió la secuencia de gen *phbZ* con el casete de Kanamicina dentro del vector pSUP 202.
- ✓ Se obtuvo la cepa mutante *A. brasilense phbZ* al realizar la conjugación de la cepa *E. coli* S 17.1 que contiene la construcción del gen mutado con la cepa silvestre *A. brasilense* Sp 245.
- ✓ Se cuantificó PHB de cepa silvestre y cepa mutante. Se observó que la cantidad de polímero acumulado de la mutante es mayor al de silvestre.

Perspectivas.

- ✓ Analizar capacidades de crecimiento y de resistencia a diferentes ambientes de estrés y observar la capacidad de acumulación de PHB variando las fuentes de carbono.
- ✓ Analizar si existe alguna relación entre la cantidad de células con respecto a la cantidad de polímero que se mantiene en el cultivo.
- ✓ Verificar en diferentes tiempos de producción del PHB tanto cortos como extensos la tendencia que adquiere la mutante con respecto a inoculación de cultivos jóvenes y/o contrastarlo con cultivos iniciados en la producción del polímero.

BIBLIOGRAFIA

1. **Albertsson A. y Varma I.** 2002. Aliphatic Poliesteres in: Biopolymers, Biology, Chemistry, Biotecnology, Aplicacions, Poliesteres III, Aplicacions and Comercial Products, edited by Doi Y., Steinbüchel A. ed. Wiley-vch. Japan-Germany.
2. **Alexeyev M. F., Shokolenko I. N., CroughanTimoty P.** 1995. Improved antibiotic-resistance gen cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene*. 160: 63–67.
3. **Aneja P., y Charles T. C.** 1999. Poly-3-Hydroxybutyrate Degradation in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*: Isolation and Characterization of a Gene Encoding 3-Hydroxybutyrate Dehydrogenase. *J.Bacteriol.* 181(3): 849–857.
4. **Baca K., Sanchez M., Carreño C., Mendoza G.** 2010. Polihidroxicanoatos de cepas de *Azospirillum spp.* Aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz” en Limbayeque. *Scientia Agropecuaria* 1(2010) 213–224.
5. **Bergersen B. F. J., F. R. S. y Turner G. L.** 1990. Bacteoids from soybean root nodules: accumulation of poly- β - hydroxybutyrate during supply of malate and succinate in relation to N_2 fixation in flow-chamber reactions. *Proc. R. Soc. Lond. B* 240, 39-59.
6. **Caballero M. J.** 2001. El género *Azospirillum*. Capítulo 10. En: Microbios en línea. Martínez R. E. y Martínez R. J. (eds). Libro virtual editado por UNAM. ISBN:968-36-8879-9. En: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>. consultado en mayo 2, 2014.
7. **Catone M. V.** 2013. Identificación y análisis de los genes asociados almetabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomona sextremaustralis*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Química Biológica.

8. **Collados C. C.** 2006. Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificado genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizosfera de trigo y maíz. Tesis Doctoral Universidad de Granada.
9. **De Almeida A., Ruiz J. A., López N. I. y Petinnari M. J.** 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. Revista Química Viva. (3), año 3: 122-133.
10. **Espín G.** 2001. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Capítulo 6. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. En: Microbios en línea. Martínez R. E. y Martínez R. J. (eds). Libro virtual editado por UNAM. ISBN:968-36-8879-9. En: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>. Consultado mayo 21, 2014.
11. **Fernández E. I.** 2012. Estudio del metabolismo de polihidroxicanoatos en *Pseudomonas putida*: Implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados. Tesis Doctoral. Universidad Complutense De Madrid Facultad De Ciencias Biológicas Departamento De Bioquímica Y Biología Molecular. Madrid, España.
12. **González G. Y., Meza C. J. C., González R. O. y Córdova L. J. A.** 2013. Síntesis y biodegradación de Polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. Rev. Int. Contam.Ambie. 29 (1) 77-115.
13. **Jendrossek D.** 2001. Microbial Degradation of Polyesters. Institut Für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, Allmandring 31,70569 Stuttgart, Germany.in: Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology by ScheperT., Ed. Springer. Germany pp 318.
14. **Jendrossek D. y Handrick R.** 2002. Microbial degradation of Polyhydroxyalkanoates. Annu. Rev. Microbiol. 56:403–32.
15. **Kadouri D., Jurkevitch E. y Okon Y.** 2003. Poly β -hydroxybutirate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. Arch Microbiol. 180: 309-318.

16. **Khanna S. y Srivastava A. K.** 2004. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* 40 (2). 607-619.
17. **Koller M., Salerno A., Días M., Reiterer A. y Braunegg G.** 2010.
18. **Law J. y Slepecky R.** 1961. Assay of Poly- β - hydroxybutyric acid. *Bacteriol. July 1961 vol. 82 no. 1* 33-36.
19. **Martinez C. R.** 2014. Sobreexpresión del gen *phbC* y producción de poli β hidroxibutirato en *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. Centro de investigación en Ciencias Microbiológicas ICUAP.
20. **Martínez M. Á.** 2014. Análisis de la sobreexpresión de los genes *phbA* y *phbB* en *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis de Maestría. Centro de investigación en Ciencias Microbiológicas ICUAP.
21. **Mochizuki M.** 2002. Properties and Application of Aliphatic Polyester Products in: *Biopolymers, Biology, Chemistry, Biotechnology, Applications, Polyesters III, Applications and Commercial Products*, edited by Doi Y., Steinbüchel A. ed. Wiley-vch. Japan-Germany
22. **Molina R. D.** 2005. Estudio de la regulación de la biosíntesis de PHB en *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis de Maestría. Centro de investigación en Ciencias Microbiológicas ICUAP.
23. **Niaounakis M.** 2013. *Biopolymers: Reuse, Recycling, and Disposal*. Ed. Elsevier. 1ª edición, EE UU. 2013. DOI: 10.1016/B978-1-4557-3145-9.00002-6 pp 82-83.
24. **Nunes C. P., Passaglia L. M. P., Schrank A., Schrank I. S.** 2000. Directed mutagenesis affects recombination in *Azospirillum brasilense nif* genes. *Genetics and Molecular Biology*. 23, 4: 901-905.
25. **Reddy C.S.K, Ghai R., Rashmi, Kalia V.C.** 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology*. 87 (2): 137–146.
26. **Rivera V. V. A.** 2012. Análisis de la síntesis de Poli- β -hidroxibutirato bajo diferentes condiciones de crecimiento de *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. Centro de investigación en Ciencias Microbiológicas ICUAP.
27. **Serrano R. J. Y.** 2010. Polihidroxicanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación

- del medio ambiente. TEORÍA Y PRAXIS INVESTIGATIVA. Centro de Investigación y Desarrollo CID / Fundación Universitaria de Área Andina.5 (2): 79-84.
- 28. Uribe V. M. y Pierre Y. M.** 1996. Los Polímeros, síntesis, caracterización, degradación y reología. Instituto Politécnico Nacional, Primera edición, México. 253-255.
- 29. Wisniewski F., Borziak K., Khalsa G., Alexandre G., Sukharnikov L., Wuichet K., Hurst G., McDonald W., Robertson J., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Condemine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A., González V., Mavingui P., Zhulin I.** 2011. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. PLoS Genet 7(12): e1002430. doi:10.1371/journal.pgen.1002430.
- 30. York G. M., Lupberger J., Tian J., Lawrence A. G., Stubbe J., Sinskey A, J.** 2003. *Ralstonia eutropha* H16 Encodes Two and Possibly Three Intracellular Poly [D-(-)-3-Hydroxybutyrate] Depolymerase Genes. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, July 2003, p. 3788–3794

ANEXOS

1. Medios de cultivo.

Medio LB (Luria Bertani) (1000 ml).

Peptona de Caseína 10 gr.

Extracto de levadura 5 gr.

NaCl 1gr.

Ajustar pH= 7 con NaOH

Esterilizar 15 lb/20 min.

Medio Mínimo (1000 ml)

Base K-Malato

KH_2PO_4 0.87 gr.

K_2HPO_4 1.67 gr.

MgSO_4 0.29 gr.

NaCl 0.48 gr.

Ácido málico 4.5326 gr.

Agar bacteriológico 1.5%

Ajustar pH= 6.9 con KOH

Esterilizar 5 lb/30 min

Anexos

Sales (1000 ml)

CaCl 0.7% 10 ml.

FeCl₃ 1% 1 ml.

NaMoO₄ 0.5% 5 ml.

NH₄Cl 20% 1 ml.

Esterilizar 5 lb/30 min

Oligoelementos (1000 ml)

MnSO₄ 2.5 gr.

ZnSO₄ 0.7 gr.

CoSO₄ 0.14 gr.

CuSO₄ 0.125 gr.

H₃BO₄ 0.03 gr.

1 ml. para 1000 ml. de medio.

Esterilizar 5 lb/30 min

Rojo Congo (1000 ml)

Ácido málico 5 gr.

Extracto de levadura 0.5 gr.

K₂HPO₄ 10% 0.5 ml.

MgSO₄ 10% 2 ml.

NaCl 10% 0.1 ml

Na₂MoO₄ 0.1% 0.2 ml

FeCl₃ 1% 0.14 ml

KOH 0.48 gr.

Rojo Congo (1:400) 1.5 ml.

Agar bacteriológico 15 gr.

Ajustar pH= 6.8 con KOH

Esterilizar 15 lb/20 min

2. Electroforesis en gel de agarosa.

Para realizar al 1%, se pesa 1 gr. de agarosa para 100 ml de bueffer TAE 1x.

TAE buffer de electroforesis 50x para 100ml

Tris base 24.2 g

Glacial ácido acético 5.71 ml

Na₂ EDTA 3.72 gr

Agua hasta completar 100 ml.

La tinción del gel se realiza en Bromuro de Etidio

3. Protocolo de extracción de ADN total.

1. Inocular la cepa de interés en medio rico 5 ml agregar antibiótico si es resistente.
2. Incubar a la T° deseada (30° y 37° C) 16-18 horas.
3. Centrifugar 1 min. a 12 000 rpm.
4. Tirar el sobrenadante. Resuspender en 570 µl. de buffer SET esperar 30 segundos.
5. Agregar 30 de SDS 20% (puede resuspender con vortex) durante 1 min.
6. Incubar a 80° C por 5 min. Enfriar a TA.
7. Agregar 200 µl de NaCl 5M (sol. saturada).
8. Mezclar con vortex 1 min. Hasta que se forme un precipitado, incubar en hielo.
9. Centrifugar 10 a 13 000 rpm a TA.
10. Pasar sobrenadante a un tubo limpio. Adicionar 800 µl de isopropanol.
11. Mezclar durante 90 segundos de forma suave.

12. Centrifugar 20 min. a 12 000 rpm a TA.
13. Tirar sobrenadante y lavar 3 veces con 1 ml de etanol al 70%. Cada lavado centrifugar a 12000 rpm por 5 min.
14. Resuspender con 75 μ l. (o depende del tamaño de la pastilla) de RNAsa con agua.
15. Incubar 30 min. A 37° C.
16. Guardar en refrigeración a 4° C.

Soluciones.

EDTA 0.5 M Ajustar pH 8 con NaOH 10M

Tris 2M

Sol SET (50 ml):

Agua 48.37 ml

Tris 2M 0.62 ml

EDTA 0.5 M 1 ml

Sacarosa 7.5 gr.

Esterilizar 10lb/30 min

NaOH 10 M

SDS 20%

NaCl 5M

4. Protocolo lisis de ADN plasmídico de bajo número de copias.

1. Cultivar en 5 ml de LB con antibiótico de selección y agitación continua a la T° adecuada.
2. Después de 16-18 hrs. Centrifugar 3 ml de cultivo a 10 000 rpm por 3 min. o hasta obtener la pastilla.
3. Lavar la pastilla 2 veces con 300 µl de TE, debe resuspenderse antes de centrifugar.
4. Colocar 300 µl de Sol. P1 fría y resuspender, agregar 8 µl de lisozima (10 mg/ml). Dejar 10 min a 37° C y después 5 min en hielo.
5. Agregar 200 µl de Sol P2 y mezclar el tubo por inversión 7 veces, dejar 5 min a TA.
6. Agregar 350 µl de Sol P3 y mezclar el tubo por inversión muy suavemente. Se observa el precipitado blanco. Incubar 10 min en el congelador.
7. Centrifugar 10 000 rpm 15 min a 4° C.
8. Tomar el sobrenadante y pasarlo a otro tubo eppendorf, tratar de no tomar nada del precipitado, aunque no se pueda recuperar todo el líquido.
9. Agregar 200 µl de fenol estabilizado y 200 µl de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1). Mezclar por inversión durante 30 seg. y centrifugar a 12 000 rpm por 5 min.
10. Hacer un lavado con 400 µl de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1). Centrifugar 8 min a 10 000 rpm. Como se forman 2 fases se trabaja con la fase acuosa superior.
11. Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo y agregar 600 µl de isopropanol, agitar y dejar 10 min a TA. Centrifugar a 13 200 rpm por 20 min.
12. Eliminar el sobrenadante. Lavar con 1 ml de etanol al 70% 3 veces.
13. Eliminar el etanol, dejar secar muy bien y resuspender en 50 µl de RNAsa diluida (4:996) incubar a 37° C x 30 min.

Soluciones:

TE: 10mM Tris

1mM EDTA

pH 8.0

P1: 50 mM Tris

10mM EDTA

pH 8.0

P2: 0.2 M NaOH

1% SDS

P3: Acetato de Potasio 3M

pH 5.5 ajustado con acido acético.

5. Fenol estabilizado (50 ml)

1. Remover el fenol líquido del congelador, calentar a temperatura ambiente y fundir a 68°C. Agregar 50 ml de fenol fundido en un frasco.
2. Agregar Hidroxiquinolina [0.1%] para colorear la fase fenólica (puede omitirse este paso).
3. Agregar 50 ml de Tris (0.5 M, pH 8) y agitar 15 min con barra magnética.
4. Dejar que se separen las fases, aspirando toda la fase acuosa posible.
5. Agregar 50 ml de Tris (0.1 M, pH 8) y agitar 15 min.
6. Remueva la fase acuosa.
7. Repita la extracción con 50 ml de Tris 0.1 M hasta que el pH de la fase fenólica sea de 7.8 o mayor.
8. Se agrega 0.1 Vol de Tris HCl 0.1 M con 0.2% de β -mercaptoetanol.

6. Protocolo de transformación de Quimio-competentes de *E. coli* DH5 α

1. Agregar 5 μ l de la reacción de clonación (ligación) en 200 μ l de células QC *E. coli* DH5 α y mezclar cuidadosamente.
2. Incubar en hielo por 5-30 min. El tiempo de incubación no parece no afectar la eficiencia de transformación.
3. Choque térmico a las células por 30 seg. a 42° C sin agitación.
4. Transferir los tubos a hielo.
5. Agregar 250 μ l de medio LB a TA.
6. Tapar el tubo y ponerlo a incubar en agitación horizontalmente (200 rpm a 37°C por 1.5 hrs.)
7. Espatular de 10 a 50 μ l de la transformación a una placa precalentada si se trata de selección por Xgal.
8. Incubar las placas a 37°C. Colonias visibles se verán después de 8 hrs. El color azul-blanco después de las 12 hrs. (para ampicilina), para km dejar toda la noche.
9. Para la selección de las colonias con el inserto deben tomarse las blancas o posiblemente azul claro. Repicar en caja nueva enumerando cada colonia.

7. Técnica de conjugación

1. Sembrar 5 ml de cepa donadora *E. coli* S 17.1 (que contiene plásmido pSUP 202:phbZ::Km) en medio LB sin antibiótico sin agitación por 8 hr.
2. Sembrar cepa receptora *A. brasilense* Sp 245 en Medio Mínimo K- Malto sin antibiótico sin agitación por 8 hr.
3. Tomar 100 μ l de cultivo de cepa donadora (*E. coli* S 17.1) y colocarlo en una placa de medio LB sin antibiótico. Dejar secar.

4. Tomar 100 μ l de cultivo de cepa receptora (*A. brasilense* Sp 245) y colocarlo en la placa de medio LB sin antibiótico sobre la gota de la cepa donadora. Dejar secar.
5. Incubar a 30°C por 18 horas.
6. Colocar 1 ml de Solución Salina Isotónica (SSI) sobre el crecimiento de células en la placa. Resuspender para colectar la mayoría de las células.
7. Colectar la suspensión y colocarlo en un tubo con 9 ml de SSI (dilución 10^{-1}).
8. Realizar diluciones (10^{-3} , 10^{-5}). Extender en placas de Medio Mínimo K-Malato con Amp y Km. Incubar a 30°C toda la noche.
9. Las colonias obtenidas se re-siembran en placas de Rojo Congo con Amp y Km.

8. Extracción de PHB (Law y Slepecky en 1962)

1. Incubar cultivo a 30°C, 175 rpm.
 2. Centrifugar 5 ml de cultivo durante 6 min a 8000 rpm. Descartar sobrenadante.
 3. Lavar la pastilla de células con 1 ml de $MgSO_4$ 10 mM. Centrifugar 5 min. a 12000 rpm. Descartar sobrenadante.
 4. Resuspender la pastilla en 1.5 ml de hipoclorito de sodio (cloralex) e incubar 1.5 horas a 37°C a 200 rpm.
 5. Centrifugar 10 min a 12000 rpm y descartar cuidadosamente el sobrenadante.
 6. Lavar la pastilla con 1 ml de agua destilada. Centrifugar 5 min a 12000 rpm. Descartar sobrenadante.
 7. Lavar la pastilla con 1 ml de acetona. Centrifugar 5 min a 12000 rpm. Descartar sobrenadante.
 8. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol 100%. Centrifugar 5 min a 12000 rpm. Descartar sobrenadante. Dejar evaporar totalmente el etanol.
-

9. Resuspender la pastilla en 1 ml de cloroformo y pasar la solución a un tubo de vidrio. Enjuagar el tubo eppendorf con 1 ml de cloroformo y verterlo igualmente al tubo de vidrio.
10. Evaporar el cloroformo a 65°C. Adicionar 5 ml de H₂SO₄ concentrado. Mantener a 95°C durante 30 min y dejar enfriar.
11. Leer absorbancia a 235 nm (luz UV) frente a un blanco de H₂SO₄ concentrado y calentado previamente a 95°C por 30 min.

9. Determinación de Proteínas Totales.

1. Tomar 200 µl de cultivo, colocarlo en un tubo eppendorf y centrifugar a 12000 rpm por 6 min. Descartar sobrenadante.
2. Agregar 1 ml de PBS, Resuspender y centrifugar a 12000 por 5 min. Descartar por completo el sobrenadante.
3. Agregar agua hasta completar 200 µl.
4. Agregar 200 µl de NaOH 1N, resuspender y poner a ebullición durante 5 min. Dejar enfriar.
5. Agregar 400 µl de HCl 0.5 N y mezclar.
6. Agregar 200 µl de reactivo de Bradford e incubar 15 min.
7. Resuspender y leer absorbancia a 595 nm a luz visible.