



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**



**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS**

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**

**Análisis del efecto de la co-transcripción  
de los genes *phbABC* sobre la producción  
de PHB de *Azospirillum brasilense* Sp245**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)**

**PRESENTA:**

I.B.Q. Antonio Gamaliel Aguilar García

**ASESOR DE TESIS:**

D.C. Luis Javier Martínez Morales

Puebla, Pue., México.

**24 de Junio del 2016**



# AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis, primeramente me gustaría agradecerle a ti Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

Mamá te agradezco con todo mi corazón, que me hayas ayudado e impulsado a estudiar, que siempre estuvieras conmigo en mis alegrías y tristezas, tú siempre has sido para mí una súper mujer que me ha enseñado a luchar en la vida. Ahora que termino mis estudios de maestría, te lo agradezco ya que es la culminación de tus esfuerzos combinados con los míos. Gracias madre.

Papá te agradezco de corazón todos tus esfuerzos, la ayuda que siempre me diste, por enseñarme a ser responsable, por darme un norte y un soporte para mi valor y mi palabra. Eres quién con esfuerzo me dió lo que no tuvo, que con esfuerzo me dió todo aquel consejo que me ha de servir siempre para toda la vida. Gracias papá.

A mis hermanas Laura y Roció les agradezco no solo por estar presentes aportando buenas cosas a mi vida, sino por los grandes lotes de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado. Muchas gracias hermanitas.

Cuando me preguntan cuantos hermanos tengo, siempre respondo más de dos, ya que tengo dos hermanas de sangre y algunos de corazón, a Gerardo Culej, Antonio Valdivia, David Hernández y a Saúl Jijón, ustedes han llegado a mi en diferentes etapas de mi vida como una mano derecha, les agradezco por todas sus excelentes ayudas y aportes a mi proyecto de tesis, al igual que todos los buenos momentos pasados.

Gracias a mi cómplice y mejor amiga Valentina García (primuchis) que más que ser mi prima, te haz convertido en mi hermana, te agradezco por tu desinteresada ayuda, por echarme la mano cuando siempre la necesité, por aportar considerablemente alegría a mi, por tu hermosa familia y por los buenos momentos en los que convivimos.

A mis abuelitos Rafaela y Sosimo, por todas sus bendiciones. Los cimientos de mi desarrollo, todos y cada uno de ustedes familia Aguilar y familia García, han destinado tiempo para enseñarme nuevas cosas, para brindarme aportes invaluable que servirán para toda mi vida. Les agradezco con creces. Los quiero.

A mis amigos Miguelandis (Miguel Castañeda, Thali, Lili, Jimena, Araceli, Chucho, Gis, Inés, Lau, Flor, Gaby, Arturo y Viki) seguramente se me habrá olvidado algun nombre. Sin embargo, la finalidad de este párrafo es agradecerles a todas aquellas personas que han y están marcado mi vida y que me han permitido ser parte de la suya, amigos, compañeros de trabajo entrañables que han separado su camino y los que ahora caminan conmigo, y quienes confiaron en mi de una u otra forma para dejar huella por esta vida, a no pasar desapercibida, y a seguir siendo quien soy ahora, a todos ustedes....

A mis amigos América, Areli, Carlos, Eli, Eva, Liliette, Mafer, Mónica y Rodolfo, por compartir momentos inolvidables a su lado a lo largo de la maestría, por seguir disfrutando de nuestra amistad.

A mis amigos de microbiología, Cinthia, Carlos, Dani, Rox, Iván, Denisse, Iris y Toño, por brindarme su amistad y transmitirme sus buenos deseos para que yo realice este objetivo en mi vida.

Elena Escobar gracias por ayudarme en el tiempo que estuve de estudiante, por tu apoyo y consejos, porque siempre tuviste disponibilidad para mí. Ahora que culmino la maestría, tú también formas parte de este logro. Gracias amiga.

A mis compañeros de laboratorio Sofía, Itzel Anaya, Belén, Pablo y Ángeles por su dedicación, su amistad y apoyo para realizar este trabajo de tesis. Gracias a todos.

Quisiera agradecer a cada uno de mis profesores, a el D.C. Luis Javier Martínez Morales y a la D.C. Lucía Soto Urzúa por su valiosa tutoría en todo el proceso de realización de esta tesis y a mis sinodales D.C. Beatriz Eugenia Baca, D. C. Irma Herrera Camacho y D. C. Candelario Vázquez Cruz por permitirme compartirles los hallazgos de esta investigación.

Al Conacyt, que a través de su programa integral, mis compañeros y yo pudimos lograr esta meta que nos propusimos desde el primer momento en que ingresamos a la maestría.

A la Facultad de Microbiología por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de ella, hoy y siempre.

Finalmente agradezco a quien lee este apartado y más de mi tesis, por permitir a mis experiencias, investigaciones y conocimiento, incurrir dentro de su repertorio de información mental.

# **DEDICATORIA**

Dedicado para mi amada madre Ana, que siempre puso el extra en lo ordinario y me enseñó lo que un verdadero ser humano debe ser.

Pensé encontrar alguna frase que poner, ciertamente las he visto en algunas tesis reflejando conocimiento, sabiduría y esfuerzo, dicha por alguna persona que haya dejado huella en la humanidad. Sin embargo, no plasmo una frase en esta tesis, dejo una carta escrita por una pequeña niña de 13 años, quien murió de cáncer y dejó este mensaje escrito en la parte trasera de su espejo. Su mensaje me ha hecho valorar la vida y su sentido, este mensaje habla sobre el amor, la felicidad y su enfermedad.

La felicidad depende de nosotros mismos. Quizá no es sobre un final feliz. Quizá es sobre lo vivido. El propósito de la vida es una vida con propósito. La diferencia entre lo ordinario y lo extraordinario es ese pequeño extra. La felicidad es una dirección no un destino. Gracias por existir. Sean felices, libres, crean, sean siempre jóvenes.

Conocen mi nombre no mi historia. Han escuchado lo que he hecho, pero no por lo que he pasado.

El amor es como un cristal, se mira muy encantador pero es fácil de romperse. El amor es raro, la vida es extraña, nada dura y la gente cambia. Cada día es especial, así que aprovéchenlo al máximo. Mañana pueden enfermarse de algo terminal, así que aprovechen al máximo cada día. La vida es mala solo si ustedes la hacen mala. Si alguien los ama, entonces no deben de dejarle escapar sin importar qué tan dura sea la situación. Recuerden que la vida está llena de subidas y bajadas.

Nunca renuncien a algo si no pueden dejar pasar un día sin pensar en ello. Quiero ser esa joven que hace mejores los malos días y la que hace que digas: ‘mi vida ha cambiado desde que la conocí’.

El amor no es cuántas veces digas ‘te amo’, es cuantas veces puedas probar que es cierto. El amor es como el viento, se puede sentir pero no se puede ver. Estoy esperando a enamorarme de alguien a quien pueda abrirle mi corazón. El amor no es sobre quién puedas visualizar pasando el futuro contigo, es sobre quién puedas visualizar pasando la vida contigo. La vida es un juego para todos pero el amor es el premio.

Sólo yo puedo juzgarme. A veces el amor duele. Ahora estoy peleando conmigo misma. Puedo sentir su dolor. Los sueños son mi realidad. Duele pero está bien, estoy acostumbrada.

No se apresuren a juzgarme, solo ven lo que yo escogí que vieran. No conocen la verdad. Sólo quiero divertirme y ser feliz sin ser juzgada.

Esta es mi vida, no la suya, no se preocupen por lo que hago. La gente los va a odiar, los va a calificar, los va a destrozar, pero qué tan fuerte lo soporten es lo que los hace a ustedes. ¡A ustedes!

# ÍNDICE

	Paginas
AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	III
ÍNDICE.....	V
ABREVIATURAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
RESUMEN.....	XI
I.- INTRODUCCIÓN.....	01
1.1- Características de <i>Azospirillum spp.</i> ....	02
1.2- El género <i>Azospirillum brasilense.</i> ....	02
1.3- Genética de <i>A. brasilense.</i> ....	03
1.4- Poli-β-hidroxibutirato. ....	04
1.5 - Vía metabólica para la producción de PHB. ....	05
II.- ANTECEDENTES.....	06
2.1- Genes <i>phbA</i> , <i>phbB</i> y <i>phbC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7. ....	06
2.2- Regulación genética de la biosíntesis de PHB. ....	06
2.3- Producción de PHB en <i>A. brasilense</i> Sp245. ....	07
2.4- sobreproducción utilizando el vector pMMB206 en <i>A. brasilense</i> Sp245. ....	07
III.- ANTECEDENTES DIRECTOS.....	08
IV.- HIPÓTESIS.....	09
V.- JUSTIFICACIÓN.....	09
VI.- OBJETIVOS.....	10
Objetivo general. ....	10
Objetivos específicos. ....	10
VII.- ESQUEMA DE TRABAJO.....	10
VIII.- METODOLOGÍA.....	12
8.1- Medios de cultivo. ....	13
8.2- Extracción de DNA genómico. ....	13
8.3- Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS. ....	13
8.4- Diseño de iniciadores. ....	13
8.5- Amplificación por PCR de los genes <i>phbAB</i> y <i>phbC.</i> ....	14
8.6- Purificación de DNA a partir de gel de electroforesis. ....	15
8.7- Clonación de <i>phbAB</i> y <i>phbC.</i> ....	15
8.8- Subclonación de las construcciones pbsk-AB y pbsk-C. ....	15
8.9- Conjugación de las construcciones p206-AB, p206-C y p206-ABC. ....	15
8.10- Cinéticas de crecimiento de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC. ....	16

8.11- Determinación de proteínas totales. ....	16
8.12- Cuantificación de PHB. ....	16
IX.- RESULTADOS.....	17
9.1- Análisis de secuencias de los genes <i>phbABC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7 y Sp245. ....	17
9.2- Análisis de dominios de los genes <i>phbABC</i> . ....	18
9.3- Búsqueda de operones, promotores y terminadores. ....	19
9.4- Diseño de iniciadores. ....	20
9.5- Amplificación de los genes <i>phbAB</i> y <i>phbC</i> . ....	21
9.6- Clonación de <i>phbAB</i> y <i>phbC</i> en el vector de clonación pBluescript SK(-). ....	22
9.7- Subclonación de los genes <i>phbAB</i> y <i>phbC</i> en el vector de expresión pMMB206. ....	24
9.8- Cinética de crecimiento de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC. ....	30
9.9- Cuantificación de PHB. ....	30
X.- DISCUSIÓN.....	35
XI.- CONCLUSIÓN.....	38
XII.- PERSPECTIVAS.....	38
XIII.- BIBLIOGRAFÍA.....	39
XIV.- ANEXOS.....	43
ANEXO I.- Medio Luria Bertani (LB). ....	43
ANEXO II.- LB modificado (LB+). ....	43
ANEXO III.- Rojo Congo (RC). ....	44
ANEXO IV.- Medio Mínimo (MM). ....	44
ANEXO V.- Extracción de DNA genómico de bacterias Gram negativas. ...	45
ANEXO VI.- Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS. ...	47
ANEXO VII.- Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> utilizando cloruro de calcio. ....	49
ANEXO VIII.- Transformación de células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> . ...	50
ANEXO IX.- Extracción de DNA de geles de agarosa. ....	51
ANEXO X.- Ligación de vector con inserto. ....	52
ANEXO XI.- Protocolo de conjugación <i>Azospirillum</i> spp. – <i>Escherichia coli</i> . ....	52
ANEXO XII.- Protocolo de cuantificación de proteínas. ....	53
ANEXO XIII.- Protocolo de cuantificación de PHB. ....	54
ANEXO XIV.- Curva de calibración de BSA. ....	56
ANEXO XV.- Curva de calibración de PHB. ....	57

## ABREVIATURAS

ADB	Buffer de unión a DNA
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
Amp	Ampicilina
BSA	Albúmina Sérica bovina
C/N	Desbalance nutricional, alta concentración de carbono y baja de nitrógeno.
Cm	Cloranfenicol
cm	Centímetro
Conc	Concentración
DO/DO <sub>600</sub>	Densidad óptica/ Densidad óptica medida a $\lambda=600$ nm
EPS	Exopolisacáridos
g	Gramo
h	Hora(s)
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
Kb	10 <sup>3</sup> pb
Km	Kanamicina
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LB+	Medio LB modificado
M	Molaridad
Mb	Megabases
mg	Miligramo
min	Minutos
MM	Medio Mínimo
mM	Milimolar
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma Reducida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma Reducida)
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
nm	Nanómetro
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases
pBluescript Sk (-)	
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFGE	Estudios de electroforesis de campos pulsados
PGPR	Rizobacteria Promotora de Crecimiento Vegetal
PHAs	Polihidroxialcanoato (s)
PHB	Poli- $\beta$ -hidroxibutirato
RC	Medio rojo Congo
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Shine-Dalgarno
seg	Segundos
Tm	Temperatura de fusión
UFC	Unidad formadora de colonia
UV	Ultravioleta

Vol	Volumen(es)
WT	Wild type/Cepa silvestre
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu_{(M\acute{a}x)}$	Velocidad especifica (máxima) de crecimiento
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{l}$	Microlitro

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Paginas
Fig. 1	Gránulos de PHB de <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7. .... 01
Fig. 2	Taxonomía de <i>Azospirillum brasilense</i> . .... 02
Fig. 3	Mapa físico de los genes <i>phbBAC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7. .... 03
Fig. 4	Estructura de un granulo de Polihidroxicanoato (PHA). .... 05
Fig. 5	Ciclo metabólico del poli- $\beta$ -hidroxibutirato. .... 05
Fig. 6	Microfotografías de <i>A. brasilense</i> Sp7 que muestran el efecto de la deleción de los genes involucrados en la ruta del PHB. .... 06
Fig. 7	Mapa y construcción del vector pMMB206. .... 08
Fig. 8	Cuantificación de PHB de la mutante que posee una inserción del casete de Km en el gen <i>phbZ</i> en <i>A. brasilense</i> Sp245. .... 09
Fig. 9	Esquema de amplificación por PCR. .... 14
Fig. 10	Esquema de los genes <i>phbA</i> , <i>phbB</i> y <i>phbC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp245 y Sp7. .... 17
Fig. 11	Mapa de dominio y la alineación de secuencias. .... 19
Fig. 12	Esquema de los genes <i>phbA</i> , <i>phbB</i> y <i>phbC</i> de <i>A. brasilense</i> Sp245. .... 20
Fig. 13	Análisis de gel de agarosa al 0.8% de <i>phbAB</i> y <i>phbC</i> . .... 21
Fig. 14	Análisis de la transconjugante Ecpbsk-AB. .... 22
Fig. 15	Análisis de la transconjugante Ecpbsk-C. .... 23
Fig. 16	Secuenciación por caminado y resultado del alineamiento del <i>phbAB</i> . .... 24
Fig. 17	Secuenciación por caminado y resultado del alineamiento de <i>phbC</i> . .... 24
Fig. 18	Análisis de la construcción p206-AB. .... 25
Fig. 19	Análisis de la construcción p206-C. .... 26
Fig. 20	Análisis de la construcción p206-ABC. .... 27
Fig. 21	Análisis de la transconjugante Ab245p206AB. .... 28
Fig. 22	Análisis de la transconjugante Ab245p206C. .... 29
Fig. 23	Análisis de la transconjugante Ab245p206ABC. .... 29
Fig. 24	Cinética de Crecimiento de las cepas: WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC. .... 30
Fig. 25	Cuantificación de PHB del ensayo sin inducir a las 24, 48 y 72 h. .... 31
Fig. 26	Cuantificación de PHB del ensayo de inducción con IPTG a las 24, 48 y 72 h. .... 31
Fig. 27	Cuantificación de PHB a las 24 h ..... 32
Fig. 28	Cuantificación de PHB a las 24 h comparando los ensayos inducidos con los no inducidos. .... 33
Fig. 29	Cuantificación de PHB a las 48 h ..... 34
Fig. 30	Cuantificación de PHB a las 72 h ..... 34
Fig. A	Curva de calibración de BSA. .... 56
Fig. B	Curva de calibración de PHB. .... 57

# ÍNDICE DE TABLAS

	Paginas
Tabla 1	Datos representativos del genoma de <i>A. brasilense</i> Sp245. .... 04
Tabla 2	Bacterias y transconjugantes utilizados en este proyecto. .... 12
Tabla 3	Plásmidos y construcciones utilizados en éste proyecto. .... 12
Tabla 4	Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes <i>phbAB</i> y <i>phbC</i> . .... 14
Tabla 5	Mezcla de reacción de PCR para un volumen de 20 µl. .... 14
Tabla A	Lecturas de absorbancia de la curva patrón de BSA. .... 56
Tabla B	Lecturas de absorbancia de la curva patrón de PHB. .... 57

## RESUMEN

*Azospirillum brasilense* acumula gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), éste favorece su establecimiento y sobrevivencia bajo condiciones de estrés. El PHB pertenece al grupo químico de los polihidroxicanoatos (PHAs), muestran propiedades similares a algunos plásticos derivados del petróleo, difiriendo de estos en que es reciclable, fácil de degradar por muchos microorganismos, es compatible con otros polímeros y es biocompatible con el cuerpo humano; por lo que tiene importancia en la fabricación de plásticos biodegradables, en la industria química, alimentaria y farmacéutica.

Debido a sus diversas aplicaciones es importante el estudio a bacterias en donde aumente la acumulación de PHB. Las investigaciones más recientes centran su atención en la generación de cepas que han sido modificadas genéticamente en las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de PHB como estrategia para mejorar la producción de este polímero.

Los tres genes que se consideran esenciales en la ruta biosintética del PHB son el *phbA* ( $\beta$ -cetotiolasa), *phbB* (acetoacetil coenzima A reductasa) y *phbC* (PHB sintasa); El objetivo de este trabajo es incrementar la producción de PHB al sobreexpresar estos tres genes que se han identificado, clonado, secuenciado y bajo control del promotor de un plásmido de expresión en la cepa *A. brasilense* Sp245.

*A. brasilense* Sp245 posee dos genes del *phbA*, tres genes del *phbB* y dos genes del *phbC*, localizando algunos de estos genes en el cromosoma y en plásmidos. El análisis bioinformático proporciono información de los genes que se utilizarían para clonarlos el vector de expresión pMMB206.

Los genes *phbA* y *phbB* ubicados en el plásmido uno, ambos se amplificaron, incluyendo la región SD del *phbA*, la región intergénica y el codón de paro del *phbB*, el amplificado fue clonado en pMMB206 y transferido por conjugación en *A. brasilense* Sp245, nombrándola como Ab245p206AB; el *phbC* presente en el cromosoma fue clonado y se transfirió de la misma manera, nombrando a la transconjugante como Ab245p206C; El *phbC* se clonó río abajo del gen *phbB* de la cepa Ab245p206AB, por consiguiente los tres genes se transcriben juntos y bajo el control del promotor, siguiendo nuestra nomenclatura a esta cepa se le nombro Ab245p206ABC y se utilizó como control a *A. brasilense* Sp245 y a la cepa *A. brasilense* Sp245 que contiene el vector pMMB206 designando a las cepas como WT y Ab245p206 respectivamente.

Se cuantificó el PHB de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206ABC y Ab245p206C a las 24, 48 y 72 h de cultivo, obteniendo un incremento en el PHB en todas las cepas ensayadas a las 24 h, posteriormente el PHB desciende conforme el tiempo de crecimiento aumenta, estos resultados son semejantes en los ensayos inducidos como los no inducidos; La inducción se realizó con 0.5 mM de IPTG a una DO<sub>600</sub> de 0.6, se cuantificó el PHB después de 14 h de haber inducido (24 h de crecimiento), la cantidad de PHB de la cepa Ab245p206ABC no presenta diferencia

significativa en ninguno de los dos tipos de ensayos y al comparar la cantidad que se cuantificó de la cepa WT no existe diferencia significativa, anulando la hipótesis que al sobreexpresar los tres genes en forma de operón habría un incremento en la cantidad de PHB, sin embargo se observa una diferencia significativa de Ab245p206C al producir un 62.5% más de PHB en el ensayo de inducción con respecto al no inducido y un 46.23% más al compararla con la WT, por lo cual la transconjugante con mayor acumulación de PHB es la que expresa la enzima PHB sintasa bajo las condiciones de este estudio.

## I.- INTRODUCCIÓN

*Azospirillum brasilense* es una bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR), tiene la capacidad de acumular gránulos insolubles de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), el cual favorece su establecimiento y sobrevivencia bajo condiciones de estrés, tales como irradiación con luz ultravioleta, altas temperaturas, presión osmótica y desecación (Fig. 1).

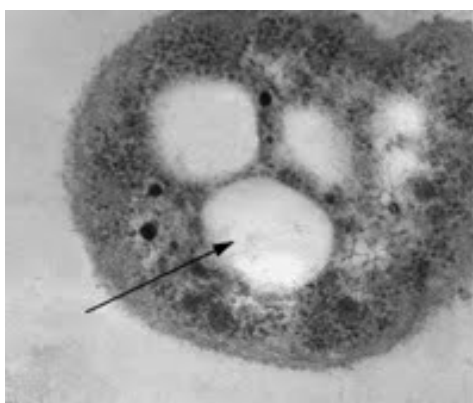


Figura 1.- Gránulos de PHB de *Azospirillum brasilense* Sp7 (tomado de Kadouri *et al.* 2002).

El PHB pertenece al grupo químico de polihidroxicanoatos (PHAs), los cuales son moléculas que muestran propiedades similares a plásticos comunes como el polipropileno, difiriendo en que es fácil de degradar por muchos microorganismos y compatible con otros polímeros, formando copolímeros con propiedades que les permite ser manejados en diversas formas (Meng *et al.* 2015), el PHB ha alcanzado considerable importancia comercial como plásticos biodegradables y materiales de alta tecnología en el campo de la medicina (Wu *et al.* 2009).

Debido a las amplias y variadas aplicaciones que pueden tener estos biopolímeros es importante seleccionar cepas con una acumulación aumentada de PHB. Las investigaciones centran su atención en la optimización de los parámetros de cultivo, así como la generación de cepas que han sido modificadas genéticamente en sus rutas metabólicas como estrategias para mejorar la producción de PHB (Van der Walle *et al.* 2001).

En este proyecto se realizó el estudio de la producción de PHB en *A. brasilense* Sp245 mediante el conocimiento y manipulación de los genes implicados en la biosíntesis de PHB, los cuales son *phbA* ( $\beta$ -cetotiolasa), *phbB* (acetil CoA reductasa), y *phbC* (PHB sintasa) clonándolos en el plásmido pMMB206 bajo el control del promotor fuerte e inducible con IPTG denominado  $P_{taclac}$ , los genes que fueron clonados son *phbAB*, *phbABC* y *phbC*, analizando las construcciones por patrón de restricción, PCR y secuenciación, la cuantificación de la producción de PHB en las transconjugantes se determinó, esperando un aumento en el contenido de PHB de transconjugantes que contengan a los genes *phbAB*, *phbABC* y *phbC*, sin embargo la cepa Ab245p206C que

contiene la construcción con el gen *phbC* mostro un aumento considerable en la cuantificación de PHB.

### 1.1- Características de *Azospirillum spp.*

En 1925 Beijerinck describió a *Spirillum lipoferum* y en 1973 Peña-Cabriales y Döbereiner son los que iniciaron los estudios de esta bacteria (Döbereiner, 1983). Clasificada como una bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR) por su capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) a amonio (NH<sub>4</sub>) e incorporarlo a la rizósfera y por poder producir diversas fitohormonas que mejoran el desarrollo de la raíz, la absorción de agua y minerales, en muchos casos las plantas son más productivas (Dobbelaere *et al.* 2001). El género *Azospirillum* proporciona beneficios para el crecimiento de plantas y de cultivos económicamente importantes, por lo cual en algunos países se implementó como biofertilizante (Massena *et al.* 2011), En la actualidad su uso comercial se extiende a diferentes países, incluido México (Bashan *et al.* 2004).

*Azospirillum* pertenece a la subclase de las  $\alpha$ -proteobacterias, son Gram negativas, poseen forma vibroide y movilidad en espiral, además han sido considerados como microorganismos diazotróficos, endofíticos y de vida libre (Fig. 2). *Azospirillum* tiene un metabolismo versátil de carbono y nitrógeno lo cual sugiere lo bien adaptadas que están a un ambiente competitivo como el de la rizósfera. Este género posee mecanismos fisiológicos eficientes tales como la formación de quistes (Bashan, 1999), que le ayuda a sobrevivir en condiciones desfavorables, este cambio morfológico está acompañado por el desarrollo de una capa externa de polisacáridos y por la acumulación de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato que puede servir como fuente de carbono y energía bajo condiciones de estrés e inanición (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

**Reino:** Bacteria

**Phylum:** Proteobacteria

**Clase:** Alphaproteobacteria

**Orden:** Rhodospirillales

**Familia:** Rhodospirillaceae

**Género:** *Azospirillum*

**Especie:** *brasilense*

Figura 2.- Taxonomía de *Azospirillum* (Consultado el día 18 de noviembre del 2015 en NCBI Taxonomy Browser <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>).

### 1.2- El género *Azospirillum brasilense*.

Es heterotrófico, fija nitrógeno en condiciones microaerofílicas; puede utilizar una amplia gama de azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos como fuentes de carbono, tales como D-fructosa, D-gluconato y Glicerol (Massena *et al.* 2011). Esta bacteria es conocida por presentar pleomorfismo y por cambiar su actividad metabólica con rapidez en respuesta a los cambios del ambiente (Pereg *et al.* 2000). En condiciones

microaerófilicas son móviles, lo cual se debe a la presencia de dos tipos de flagelos: un flagelo polar que es sintetizado en medio líquido responsable del nado de las bacterias y numerosos flagelos laterales, sintetizados en medios sólidos y semisólidos, los cuales sirven para coordinar el movimiento a lo largo de la superficie (Katzy *et al.* 2001). Bajo condiciones aeróbicas, particularmente en cultivos viejos, pasan de la forma vibroide a una forma redonda encapsulada denominada como cisto, no móvil, formando agregados que por adhesión flocculan en cultivos líquidos.

Se han identificado muchos genes de *Azospirillum* involucrados en procesos metabólicos importantes tales como la fijación del nitrógeno, la adhesión a la raíz de la planta, la biosíntesis de fitohormonas, la biosíntesis del triptófano, el metabolismo de carbono y algunas otras menos caracterizadas y se han creado mutantes por medio de químicos, radiación, mutagénesis Tn5 e interrupción de genes (Holguin *et al.* 1999). Kadouri y colaboradores en el 2002 determinaron el mapa físico de los genes *phbABC* de la ruta metabólica del PHB (Fig. 3), en el 2003 identificaron y caracterizaron los genes que participan en la ruta de despolimerización del PHB en *A. brasilense* Sp7.

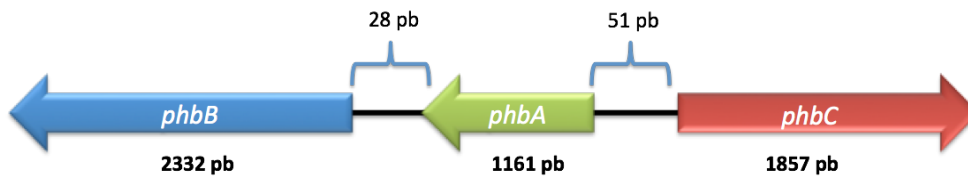


Figura 3.- Mapa físico de los genes *phbBAC* de *A. brasilense* Sp7. Las flechas indican la dirección y el inicio de la transcripción (Modificado de Kadouri *et al.* 2002).

### 1.3- Genética de *A. brasilense*.

El tamaño del genoma de *A. brasilense* es de alrededor de 7 Mb, muestra siete megareplicones que varían de tamaño entre 0.63 a 2.5 Mb (Didonet *et al.* 2000). En 1982 Wood y colaboradores reportaron la presencia de minicromosomas en *A. lipoferum* y *A. brasilense* basado en su tamaño molecular aparente que es mayor de 2.8 Mb. Estudios de electroforesis de campos pulsados (PFGE) confirmaron la complejidad del genoma de esta especie constituido por múltiples plásmidos tanto circulares como lineales (Didonet *et al.* 2000), los genes 16S rRNA encontrados en cada uno de los plásmidos sugiere la multiplicidad de cromosomas, los cuales corresponden a replicones de alrededor de 200 kb, 700 kb, 800 kb y 1700 kb. (Caballero *et al.* 1999).

La presencia de plásmidos fue una de las primeras características reportadas del género *Azospirillum*, y es común en *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Algunas cepas contienen hasta seis plásmidos y la presencia de un plásmido de aproximadamente 90 MDa común entre las cepas de *A. brasilense* y algunas de *A. lipoferum* denominado como p90, se cree que codifica para funciones celulares esenciales, como la movilidad, adsorción a raíz, morfología de la colonia, crecimiento en medio mínimo y dos *loci* que confieren resistencia a ampicilina (Holguin *et al.* 1999). El tamaño del cromosoma de *A. brasilense* Sp245 es de 2 871 kb, contiene un megaplásmido con el peso de 1 571 kb y

cinco plásmidos con un rango de tamaño de 111 a 768 kb como se observa en la tabla 1.

Tabla 1.- Datos representativos del genoma de <i>A. brasilense</i> Sp245.							
	Cromosoma	Plásmido 1	Plásmido 2	Plásmido 3	Plásmido 4	Plásmido 5	Plásmido 6
Nombre	-	AZOBR_p1	AZOBR_p2	AZOBR_p3	AZOBR_p4	AZOBR_p5	AZOBR_p6
RefSeq	NC_016617.1	NC_016594.1	NC_016618.1	NC_016595.1	NC_016596.1	NC_016619.1	NC_016597.1
INSDC	HE577327.1	HE577328.1	HE577329.1	HE577330.1	HE577331.1	HE577332.1	HE577333.1
Tamaño (Mb)	3.02	1.77	0.91	0.78	0.69	0.19	0.17
GC%	68.6	68.6	68.3	68.2	69	66.6	66.8
Proteína	2654	1429	707	677	556	135	107
rRNA	3	8	2	-	1	-	-
tRNA	44	25	2	-	9	-	1
Otros RNA	10	3	3	-	3	-	1
Genes	2871	1571	768	706	606	146	111
Pseudogenes	160	106	54	29	37	11	2

Símbolos: RefSeq: NCBI Reference Sequence Database, INSDC :The International Nucleotide Sequence Database Collaboration. Consultado el día 18 de noviembre del 2015 en NCBI Genome <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>.

#### 1.4- Poli- $\beta$ -hidroxibutirato.

El poli- $\beta$ -hidroxibutirato pertenece al grupo químico de polihidroxicanoatos (PHAs), los cuales muestran propiedades similares a algunos plásticos derivados del petróleo difiriendo en que son biodegradables, compatibles con otros polímeros y se consideran como inherentemente biocompatibles; esta biocompatibilidad se ha aprovechado en numerosas aplicaciones médicas, en los que los biopolímeros han sido utilizados como soportes o matrices en la ingeniería de tejidos, apósitos para heridas y administración de fármacos (Bernd y Rehm, 2010).

En 1925 el PHB fue descubierto por primera vez en cuerpos de inclusión dentro del citoplasma de *Bacillus megaterium* y posteriormente en una amplia variedad de bacterias, principalmente los que habitan en los ecosistemas de suelo y agua (Nutti *et al.* 1972; Anderson y Dawes, 1990; Poli *et al.* 2011).

El PHB es producido por algunas bacterias cuando la fuente de carbono es disponible y otros nutrientes son limitantes, por lo tanto el PHB se considera productor de poder reductor y almacenaje de carbono en estos microorganismos. Los gránulos de PHB se deposita como inclusiones intracelulares esféricas con un núcleo amorfo, hidrofóbico el cual está cubierto por una capa de lípidos y rodeado principalmente por

proteínas y enzimas implicadas en la síntesis de PHB y su degradación (Fig. 4) (Potter y Steinbüchel, 2005; Rehm, 2006; Jendrosseck, 2009).

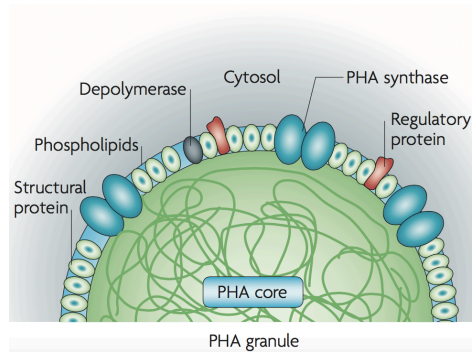


Figura 4.- Estructura de un gránulo de Polihidroxialcanoato (PHA). Tomado de Bernd y Rehm, 2010.

### 1.5 - Vía metabólica para la producción de PHB.

La vía de biosíntesis para la producción de PHB consiste de tres reacciones básicas a partir de acetil-CoA (Fig. 5): primero, la enzima  $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa (codificada por *phbA*) cataliza la transferencia reversible del grupo acetil a acil-CoA, condensando dos moléculas de acetil-CoA en acetoacil-CoA; la segunda reacción es la reducción de (R)-3-hidroxiacil-CoA por la acetoacil-CoA deshidrogenasa (codificada por *phbB*) dependiente de NADPH siendo un proceso reversible y por último en la tercera reacción los monómeros de (R)-3-hidroxiacil-CoA son polymerizados para formar poli-3-hidroxiacilato por la polimerasa P(3HB) (codificada por el gen *phbC*), o mejor conocida como PHB sintasa y la cual determina la composición del polímero resultante (Trotsenko y Belova, 1999).

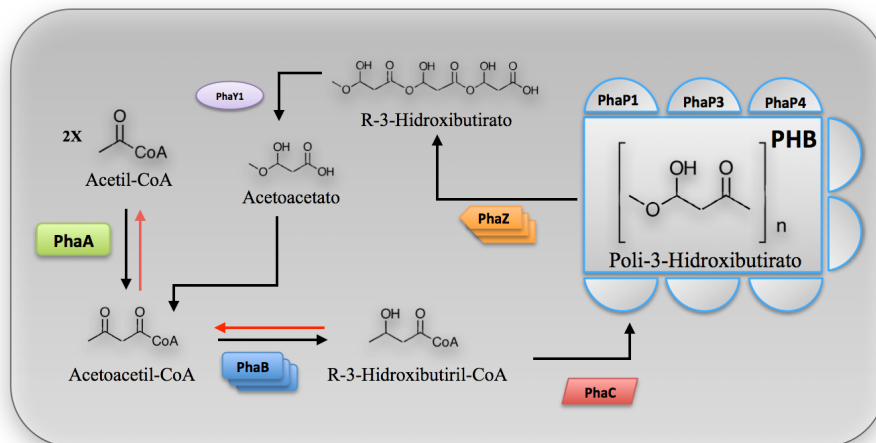


Figura 5.- Ciclo metabólico del poli-β-hidroxiacilato.

## II.- ANTECEDENTES

### 2.1- Genes *phbA*, *phbB* y *phbC* de *A. brasilense* Sp7.

Se ha establecido el mapa físico del operón que contiene los genes de la ruta metabólica del PHB e identificado y caracterizado el *phaZ*, el cual participa en la ruta de despolimerización del PHB en *A. brasilense* Sp7 (Kadouri *et al.* 2003). El *phbC* contiene 1854 pb y se transcribe en dirección divergente a los genes *phbA* y *phbB*. El gen *phbA* tiene 1161 pb, seguido del *phbB* que tiene 2332 pb. Existen zonas ricas en purinas que preceden a los codones de inicio de los tres ORFs. Las secuencias de SD se encontraron a 10 nucleótidos río arriba del codón de inicio de *phbB* y 12 nucleótidos río arriba de *phbA*. La secuencia SD del *phbC* no se reporta en este artículo.

*A. brasilense* Sp7 cultivado en medio mínimo con una limitación de Nitrógeno frente a un exceso de la fuente de Carbono, después de 24 h de incubación a 30°C se puede apreciar la acumulación de gránulos de PHB y al agotar los nutrientes en el medio, la degradación de este polímero comienza para sustentar la sobrevivencia de la bacteria y a las 48 h de cultivo los gránulos de PHB se han despolimerizado en su totalidad. Kadouri en el año 2002 eliminó el gen *phbC*, consiguiendo que *A. brasilense* Sp7 no pudiera acumular gránulos de PHB y en el 2003 eliminó el gen *phbZ* el cual codifica para la enzima que se encarga de la despolimerización de los gránulos de PHB, consiguiendo acumular una mayor cantidad de este polímero en comparación de la cepa silvestre en 48 h (Fig. 6).

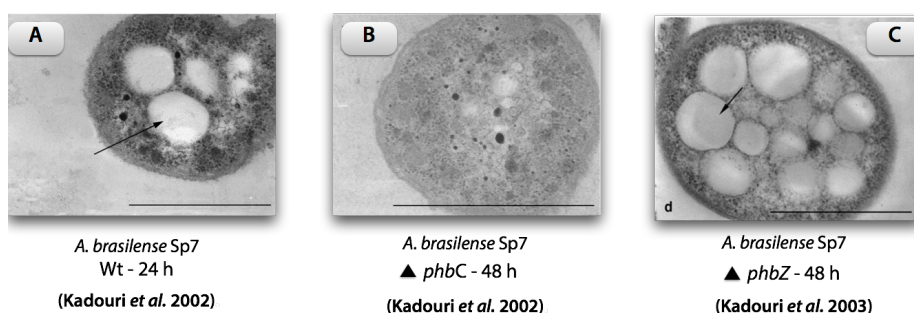


Figura 6.- Microfotografías de *A. brasilense* Sp7 que muestran el efecto de la delección de los genes involucrados en la ruta del PHB y su acumulación en 48 h. A) *A. brasilense* Sp7; B) Delección del gen *phbC* y C) Delección del gen *phbZ*. Tomado de Kadouri *et al.* 2002 y 2003.

### 2.2- Regulación genética de la biosíntesis de PHB.

Desde el punto de vista bioquímico y genético la producción de PHAs ocurre por varias vías metabólicas, usando la enzima  $\beta$ -cetotilasa y acetoacetyl-CoA reductasa por la vía de  $\beta$ -oxidación y la vía de síntesis *de novo* de ácidos grasos (Shyan *et al.* 2000), por lo que se comenta que el *loci pha* ha divergido considerablemente en las especies que producen este metabolito. El *loci* que codifica los genes para la formación de PHA se ha caracterizado en algunas especies, proporcionando las claves para el diseño y la ingeniería de organismos recombinantes para la producción de PHA (Madison y

Huisman, 1999), este conocimiento nos ha provisto de potentes herramientas para diseñar bacterias que son capaces no sólo de la producción de biopolímeros eficientes, sino también la producción de polímeros modificados e incluso no naturales que exhiben características únicas para aplicaciones específicas de alto valor (Bernd y Rehm, 2010).

En contraste con otros microorganismos *A. brasilense* no produce copolímeros de hidroxialcanoatos, sólo homopolímeros de PHB, las cantidades relativas pueden llegar a alcanzar más del 80% del peso seco de la biomasa celular (Itzigsohn *et al.* 1995; Kadouri *et al.* 2003, 2005). El análisis de la secuencia del *PhbC* de *A. brasilense* Sp7 muestra un alto grado de similitud con otras sintasas, su interrupción o escisión del gen suprime la acumulación de PHB y causa una disminución en la supervivencia con incremento en la movilidad, producción de exopolisacáridos (EPS) y adhesión a la raíz (Kadouri *et al.* 2002).

### **2.3- Producción de PHB en *A. brasilense* Sp245.**

Algunas especies como *A. brasilense* y *A. lipoferum* pueden acumular altos niveles de PHB (hasta 88% de la biomasa seca de células) bajo condiciones de desequilibrio de nutrientes, como la limitación de oxígeno o una alta relación carbono/nitrógeno (Itzigsohn *et al.* 1995). A menudo *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp7 han sido comparadas y documentadas para mostrar varias diferencias de comportamiento en condiciones similares, al comparar la producción de PHB entre estas cepas cultivadas en condiciones microaerofílicas, en un medio con deficiencia de nitrógeno y altas concentraciones de carbono, *A. brasilense* Sp245 produce casi un 10% más que la cepa Sp7 (Kamneva *et al.* 2011).

### **2.4- sobreproducción utilizando el vector pMMB206 en *A. brasilense* Sp245.**

Morales y colaboradores en el año 1991 construyeron una familia de vectores de expresión denominados como pMMB, estos vectores son de bajo número de copias, además tienen la capacidad para la detección directa de plásmidos que contengan insertos, esto debido a la interrupción del *lacZ*. El vector pMMB206 posee como característica principal el uso de un promotor fuerte e inducible con IPTG denominado  $P_{taclac}$ , el cual posee bajo nivel de expresión sin inducir (Fig. 7), este vector ha mostrado que se mantiene de manera extracromosomal por replicación autónoma, estable y puede ser utilizado para experimentos de complementación en *trans* (Steyert y Pineiro, 2007).

El factor de transcripción  $\sigma^E$  (RpoE) en *A. brasilense* Sp7 inicia la síntesis de carotenos, pero en presencia de un represor denominado ChrR se inhibe su expresión, en el 2002 Thirunavukkarasu y colaboradores clonaron el *rpoE* en el vector pMMB206 obteniendo la transconjugante en *A. brasilense* Sp7 con esta construcción, al sobreexpresar el *rpoE* la síntesis de carotenos aumenta considerablemente en

comparación con las cepas *A. brasilense* Sp7 y Car-1 (mutante mini-Tn5 que tiene inactivo el gen *chrR* en *A. brasilense* Sp7).

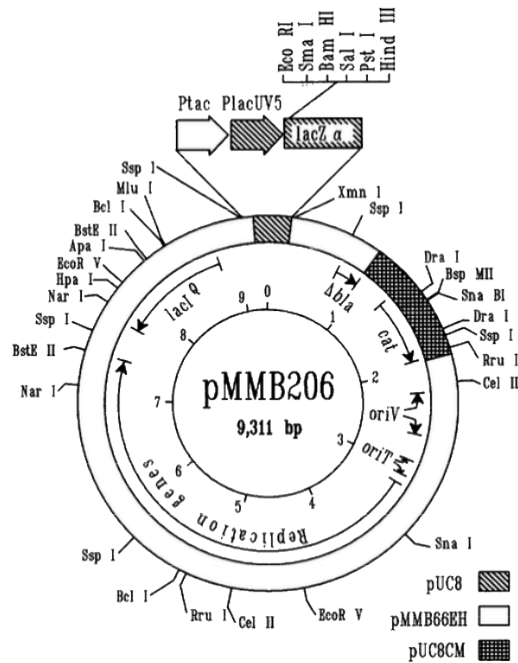


Figura 7.- Mapa y construcción del vector pMMB206. Tomado de Morales *et al.* 2007.

### III.- ANTECEDENTES DIRECTOS

En el año 2014 se realizó la clonación de los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* de *A. brasilense* Sp7 en el vector de expresión pMMB206, cada gen fue amplificado y clonado a partir del codón de inicio utilizando la secuencia SD del mismo vector, transformando las construcciones en *E. coli* S17.1 y posteriormente fueron conjugadas en *A. brasilense* Sp7, la concentración de 1 mM de IPTG fue determinada por curvas de inducción y se empleó cuando el cultivo obtuvo una DO<sub>600</sub> de 0.6 crecidas en medio MM sin desbalance de ningún nutriente, se cuantificó la acumulación de PHB a las 0, 3, 6, 9 y 72 h posterior a la inducción de las transconjugantes que contienen las construcciones con los genes *phbA*, *phbB* y *phbC*, la sobreexpresión de las transconjugantes no reflejó un incremento de PHB, sin embargo la transconjugante que contiene al gen *phbC* aumentó la producción sostenida de PHB con respecto a la cepa silvestre durante las primeras 6 h (Martínez Cámara, 2014; Martínez Martínez, 2014).

En el 2014 con el objetivo de incrementar la cantidad de PHB en *A. brasilense* Sp7 se planteó sobreexpresar de manera independiente los tres genes involucrados en la biosíntesis de PHB, sin embargo otra estrategia para aumentar los niveles de PHB es la empleada por Kadouri y colaboradores en el 2003, al deletar el gen que codifica a la PHB depolimerasa impiden que los gránulos se degraden; en el 2015 se empleó una estrategia similar en *A. brasilense* Sp245, el gen que codifica para la PHB depolimerasa en esta bacteria es el *phbZ*, en el cual se insertó un casete de Km para interrumpir su expresión, como resultado la cantidad del polímero acumulado fue casi constante al

transcurrir el tiempo de crecimiento, incluso a las 72 h permanecía con una acumulación de PHB mayor a la que se cuantificó a las 24 h (Fig.8), caso contrario a la cepa silvestre, la cantidad de PHB fue en descenso (Rosales, 2015).

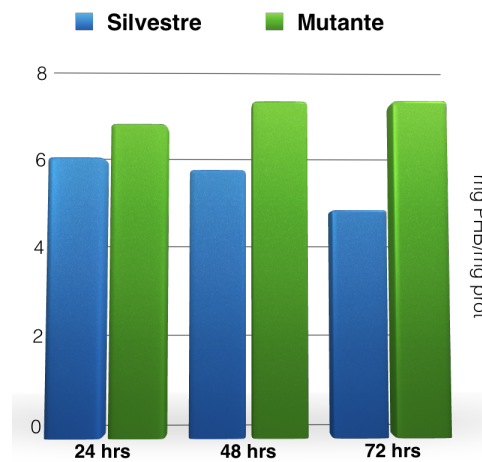


Figura 8.- Cuantificación de PHB de la mutante que posee una inserción del casete de Km en el gen *phbZ* en *A. brasilense* Sp245. Modificado de Rosales, 2015.

#### IV.- HIPÓTESIS

Para incrementar la acumulación de PHB en la cepa *A. brasilense* Sp245 es necesario lograr una mayor eficiencia en la sobreexpresión de los genes *phbABC*, de manera que los tres genes estén co-transcribiéndose y se encuentren regulados por un promotor, organizados en forma de operón en un vector de expresión.

#### V.- JUSTIFICACIÓN

En respuesta a los problemas y efectos nocivos de los residuos plásticos en el medio ambiente, ha habido un considerable interés en el desarrollo de materiales plásticos biodegradables. Los PHAs son sustitutos atractivos para los plásticos convencionales y a pesar de que sean reportado más de 150 componentes, dando lugar a una enorme diversidad de propiedades materiales, tan solo se han estudiado aproximadamente 250 microorganismos diferentes que sintetizan PHAs y solamente algunas de estas bacterias acumulan una cantidad considerable para ser utilizadas en la industria, tales como *Ralstonia eutropha*, *A. brasilense*, *Azotobacter vinelandii*, entre otros, incluso para mejorar la producción de PHB se emplean bacterias recombinantes, mediante el establecimiento de vías de biosíntesis en bacterias no poliméricas (*E. coli* que albergaban los genes de la vía de biosíntesis de PHB), por lo cual es posible producir relativamente mayores concentraciones de PHB (hasta un 81% de peso seco) en comparación con las cepas productoras de PHB de tipo silvestre.

Un inconveniente importante en la comercialización de los PHAs, es debido a que el costo económico es más alto en comparación con los plásticos convencionales, por lo cual es importante obtener la mayor producción del polímero, al aumentar la

producción de PHB el costo se reduce y si bien se conocen las condiciones nutricionales y genéticas que promueven la producción de PHB en algunas bacterias, en *A. brasilense* Sp245 existen pocos estudios acerca del incremento de la producción del polímero, por lo que consideramos usar como estrategia clonar y conjugar los tres genes implicados en la síntesis de PHB (*phbABC*) para observar si existe un efecto en el incremento de la acumulación de PHB en *A. brasilense* Sp245.

## VI.- OBJETIVOS

### Objetivo general

- Estudiar el efecto de la sobreexpresión de los genes *phbABC* en la cepa de *A. brasilense* Sp245.

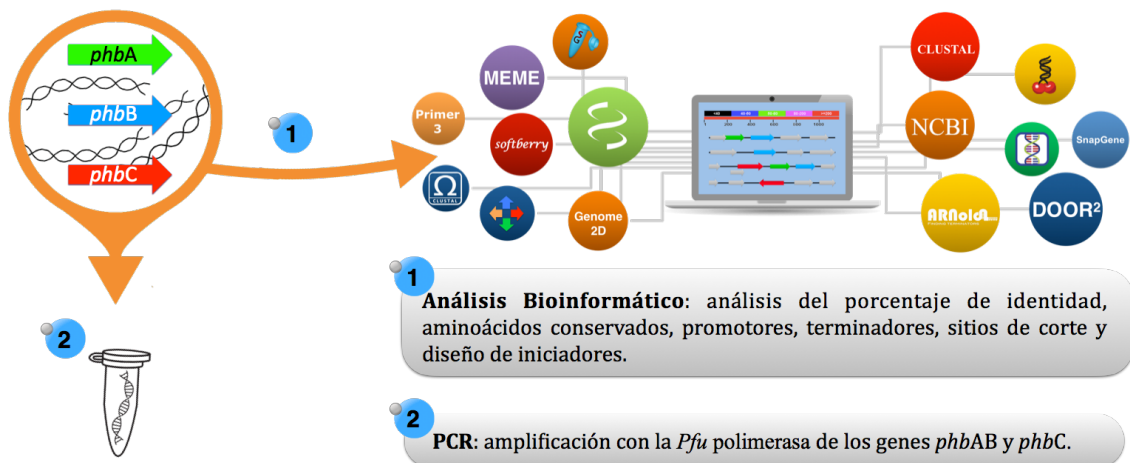
### Objetivos específicos

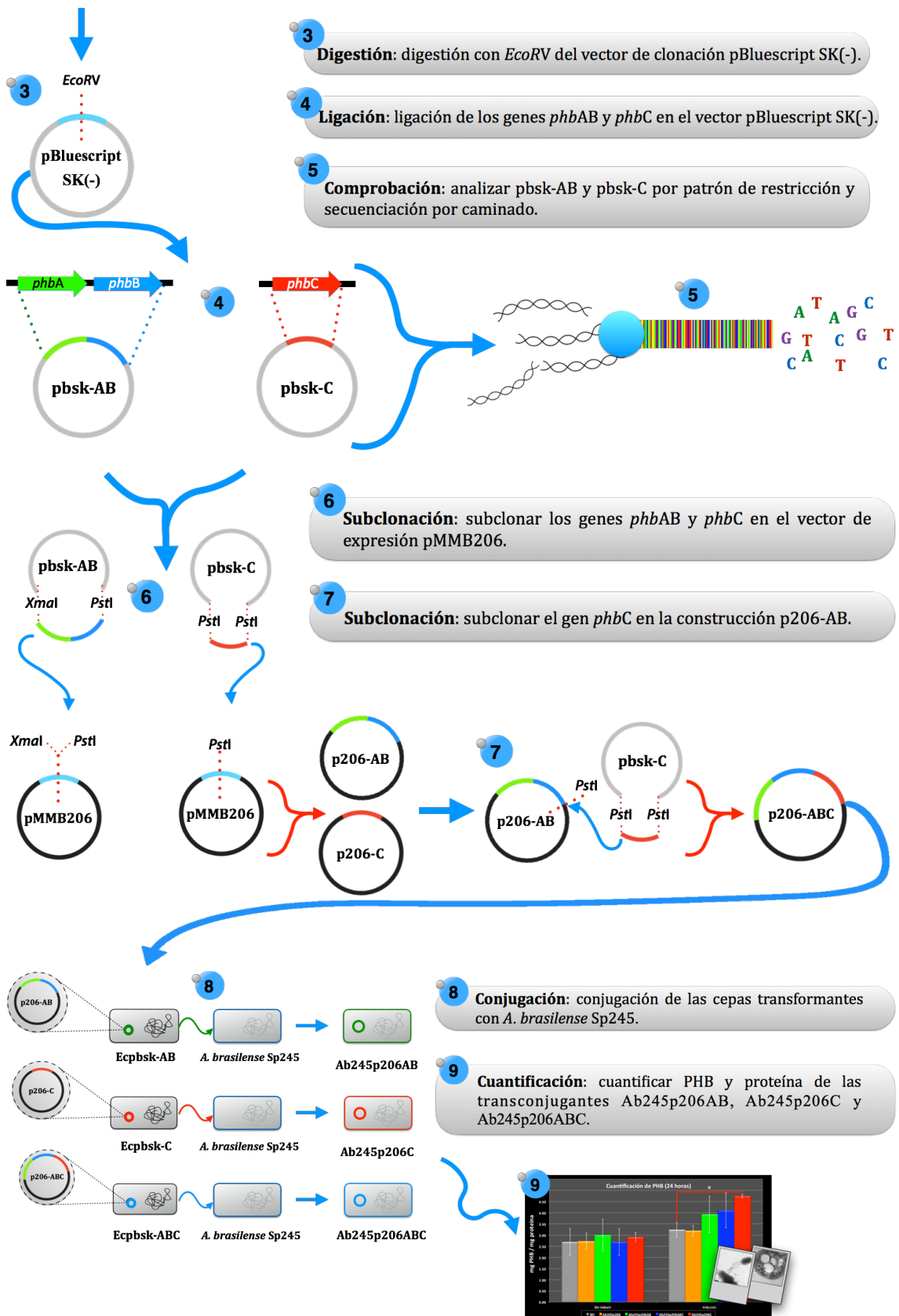
- Amplificar y clonar los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* en un vector de clonación.
- Subclonar los genes *phbABC* en el vector de expresión pMMB206.
- Cuantificar la producción de PHB en *A. brasilense* Sp245 (*phbABC*<sup>++</sup>).

## VII.- ESQUEMA DE TRABAJO

### Amplificación y clonación de *phbAB* y *phbC*

Se amplificaron los genes *phbAB* y *phbC* utilizando la enzima *Pfu* polimerasa por otro lado, el vector pBluescript Sk(-) se digirió con *EcoRV* para su ligación con dichos genes.





Se emplearon como control la cepa WT y *A. brasilense* Sp245 que contiene al vector pMMB206 al cual se le denominó Ab245p206.

## VIII.- METODOLOGÍA

Las características fenotípicas de las cepas que se utilizaron en este trabajo y de las transconjugantes obtenidas en este trabajo se muestran en la tabla 2 y los plásmidos utilizados y construcciones realizadas se describen en la tabla 3.

**Tabla 2.- Bacterias y transconjugantes utilizados en este proyecto.**

Cepas	Características	Resistencia	Numero de acceso
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp245	Cepa silvestre de estudio.	Amp <sup>r</sup>	HE577327
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre sobre la cual se han realizado estudios de PHB.	Amp <sup>r</sup>	AF353206
Ab245p206AB	<i>A. brasilense</i> Sp245 que contiene la construcción p206-AB.	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
Ab245p206C	<i>A. brasilense</i> Sp245 que contiene la construcción p206-C.	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
Ab245p206ABC	<i>A. brasilense</i> Sp245 que contiene la construcción p206-ABC.	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
<i>E. coli</i> S17.1 ( <i>helper</i> )	<i>E. coli</i> con funciones cromosómicamente integradas, codifica para los genes necesarios para la conjugación y la transferencia de ADN ( <i>tra</i> ) del plásmido pRK2013.	Km <sup>r</sup>	Phadnis y Das, 1987
<i>E. coli</i> DH5a	Cepa de clonación con múltiples mutaciones que permiten a las transformaciones una alta eficiencia.	Nal <sup>r</sup>	Gibco BRL
Ecpbsk-AB	<i>E. coli</i> DH5a que contiene la construcción pbsk-AB	Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
Ecpbsk-C	<i>E. coli</i> DH5a que contiene la construcción pbsk-C	Amp <sup>r</sup>	Este trabajo
Ecp206-AB	<i>E. coli</i> DH5a que contiene la construcción p206-AB	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
Ecp206-C	<i>E. coli</i> DH5a que contiene la construcción p206-C	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
Ecp206-ABC	<i>E. coli</i> DH5a que contiene la construcción p206-ABC	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
Ecp206	<i>E. coli</i> DH5a que contiene el vector pMMB206	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo

**Tabla 3.- Plásmidos y construcciones utilizados en éste proyecto.**

Plásmidos	Características	Resistencia	Referencia
pBluescript SK(-)	Vector de clonación estándar.	Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pMMB206	Vector de expresión. Vector de amplio rango de hospedero, de bajo número de copias y permiten análisis directo de los recombinantes. Este vector contiene secuencias que codifican lacIq y lacZ alfa el cual permite la detección directa de la inactivación de la complementación alfa. Se muestran bajo nivel de expresión sin inducción. Expresión del gen CAT.	Cm <sup>r</sup>	Morales <i>et al.</i> 1991
pbsk-AB	Vector pBluescript SK(-) el cual le fue clonado el <i>phbAB</i> .	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
pbsk-C	Vector pBluescript SK(-) el cual le fue clonado el <i>phbC</i> .	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
p206-AB	Vector pMMB206 el cual le fue clonado el <i>phbAB</i> .	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
p206-C	Vector pMMB206 el cual le fue clonado el <i>phbC</i> .	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo
p206-ABC	Vector pMMB206 el cual le fue clonado el <i>phbABC</i> .	Cm <sup>r</sup>	Este trabajo

## **8.1- Medios de cultivo.**

Se emplearon cuatro tipos diferentes de medios de cultivo, para el crecimiento de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  se utilizó el medio Luria Bertani (LB) (Anexo I), para el proceso de conjugación entre *E. coli* DH5 $\alpha$  y *A. brasilense* Sp245, se usó el mismo medio de cultivo, pero con una modificación, denominado como LB modificado (LB+) (Anexo II), el cual permitió el crecimiento de ambas bacterias; para su crecimiento y selección de *A. brasilense* Sp245 se hizo uso de los medios Rojo Congo (RC) (Anexo III) y Medio Mínimo (MM) (Anexo IV), cabe destacar que éste último se empleó para los ensayos de cuantificación de PHB.

## **8.2- Extracción de DNA genómico.**

Las cepas fueron tomadas de los gliceroles almacenados a -70°C en el cepario del laboratorio de Fisiología Microbiana de la interacción Microorganismo - Hospedero del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, de cada cepa se tomaron 50  $\mu$ l los cuales fueron inoculados en tubos de ensaye que contenían 5 ml de MM y crecidos a 30°C a 175 rpm por 18 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se extrajo DNA genómico por la técnica de Miller y colaboradores en 1998 (Anexo V). Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0.8 % a 80 volts para verificar la calidad de las mismas.

## **8.3- Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS.**

Se centrifugaron 3 ml del cultivo a 8 000 rpm durante 3 min. Se extrajo DNA del plásmido usando el protocolo de Sambrook y Russel, 2001 (Anexo VI). Una vez obtenido el DNA se realizó un corrimiento electroforético en agarosa al 1%.

## **8.4- Diseño de iniciadores.**

Para determinar el alelo de los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* de *A. brasilense* Sp245 que serían utilizados, se realizó el análisis de las secuencias de *A. brasilense* Sp245 y se comparó con las de *A. brasilense* Sp7 (secuencias descargadas del banco de genes de NCBI), se analizó el tamaño, se determinó el porcentaje de identidad y los aminoácidos conservados; para el diseño de iniciadores, fue necesario realizar la búsqueda de promotores y terminadores tomando en cuenta su identidad, los resultados del análisis bioinformático, determinó los genes que serían utilizados para la sobreexpresión, se diseñaron cuatro iniciadores con sitios de restricción correspondiente al sitio múltiple de clonación del pMMB206 para su clonación, además de diseñar cinco iniciadores como resultado de la secuenciación por caminado (Tabla 4), los programas que fueron utilizados para el diseño de iniciadores son DNASTAR (Lasergene) y Primer3 versión 4.0.0.

Tabla 4.- Iniciadores utilizados para la amplificación de los genes *phbAB* y *phbC*.

Iniciador	Secuencia (5' a 3')	Tm
<i>FXmaI-phbA</i>	CCAT <b>CCCGG</b> GAAGAACGGAATCACGGAGAC	66°C
<i>RPstI-phbB</i>	AGCG <b>CTGCAG</b> TGTAGATCGGCATTGCTCAG	65°C
<i>FPstI-phbC</i>	ACTT <b>CTGCAG</b> GGCACTGTATAAACCGCACACA	64°C
<i>RPstI-phbC</i>	GGGC <b>CTGCAG</b> TTATGGGCCATCTCTTGTGG	63°C
Iniciadores empleados para la secuenciación por caminado		
<i>F2-phbAB</i>	CTCGGCGGTTCTGGTGAC	59°C
<i>F3-phbAB</i>	CGGAGGCTTACTGCTCGAT	57°C
<i>R2-phbAB</i>	GTCCAGCGCGTTCATCTT	56°C
<i>R3-phbAB</i>	AGATCGAGGCCGACGAGAT	58°C
<i>F2-phbC</i>	ACTTCTACACCCGCCAGTTC	57°C

### 8.5- Amplificación por PCR de los genes *phbAB* y *phbC*.

Se llevó a cabo la amplificación utilizando la enzima *Pfu* DNA Polimerasa de acuerdo a las instrucciones del fabricante FERMENTAS®, la reacción se realizó a un volumen de 20 µl utilizando los datos de la tabla 5, posteriormente fue amplificado empleando las condiciones de la figura 9.

Tabla 5.- Mezcla de reacción de PCR para un volumen de 20 µl.

Reactivos	Cantidad
Iniciador Delantero (10 pmol/µl)	1 µl
Iniciador Reverso (10 pmol/µl)	1 µl
dNTP Mix (2 Mm)	3.2 µl
10X Pfu Buffer con MgSO4	2 µl
DNA (0.1-1 µg)	1 µl
MgSO <sub>4</sub> (25mM)	0.8 µl
DMSO	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polimerasa	0.2 µl
Agua libre de nucleasas	9.8 µl

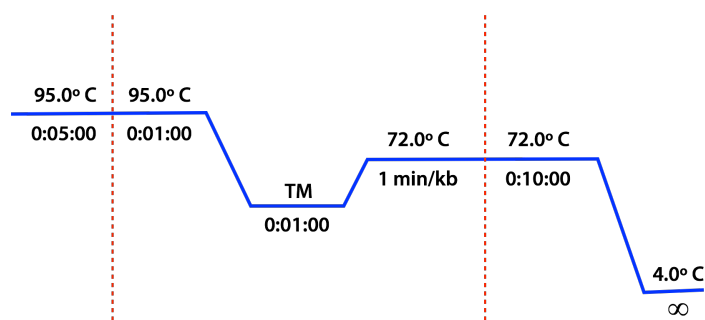


Figura 9.- Esquema de amplificación por PCR

## **8.6- Purificación de DNA a partir de gel de electroforesis.**

Después de visualizar el tamaño del fragmento de DNA en geles de agarosa al 0.8 %, se cortó la banda de DNA del tamaño esperado y se purificó empleando el kit de Zymoclean™ Gel DNA Recovery de la marca Zymo Research® (Anexo IX).

## **8.7- Clonación de *phbAB* y *phbC*.**

Los genes *phbAB* (3,618 pb) y *phbC* (1,971 pb) fueron amplificados utilizando la enzima *Pfu* DNA Polimerasa, la cual cataliza la polimerización de nucleótidos de alta fidelidad, logrando productos de PCR con extremo romo, por lo tanto, el vector de clonación pBluescript SK (-) fue digerido con la enzima *EcoRV*, la cual deja extremos romos, posteriormente fueron purificados y ligados. Para la ligación se empleó la enzima T4 DNA Ligasa de la marca FERMENTAS®, realizando la reacción a un volumen de 20 µl, incubándola durante la noche a 20°C (Anexo X). La reacción de ligación fue transformada en células químicamente competentes de *E. coli* DH5α, las cuales fueron preparadas (Anexo VII) y transformadas (Anexo VIII) según el protocolo de Sambrook y Russel, 2001; para la selección de las colonias transformantes, fueron sembradas en agar LB con X-gal (50 µg/ml) y ampicilina (Amp; 100 µg/ml), debido a la resistencia que contiene el vector pBluescript SK(-) las colonias que crecen son las que poseen el vector, además el gen a *lacZ*, es interrumpido por el sitio múltiple de clonación del vector de manera que las colonias blancas son las que no expresan a la β-galactosidasa y por lo tanto tendrían el inserto clonado.

## **8.8- Subclonación de las construcciones pbsk-AB y pbsk-C.**

Las construcciones pbsk-AB y pbsk-C fueron digeridos con *XmaI-PstI* y *PstI* respectivamente, de la misma forma el vector pMMB206 fue digerido con las mismas enzimas, posteriormente el vector y los insertos fueron purificados, ligados y transformados a células *E. coli* DH5α químicamente competentes, para el análisis de las candidatas transformantes se extrajo el DNA plasmídico, examinándolas por patrón de restricción y PCR, obteniendo las construcciones p206-AB y p206-C, designando a las transformantes como Ecp206-AB y Ecp206-C respectivamente. El gen *phbC* se extrajo por digestión con *PstI* del pbsk-C y fue clonado río abajo del gen *phbB* de la construcción p206AB, por consiguiente los tres genes se transcriben juntos, bajo el control del promotor del plásmido pMMB206, posteriormente fue transformada a *E. coli* DH5α químicamente competentes, siguiendo el mismo criterio de selección de las candidatas transformantes se obtuvo a la construcción p206-ABC, se analizó la dirección de *phbC* por patrón de restricción y PCR, designando a esta transformante como Ecp206-ABC.

## **8.9- Conjugación de las construcciones p206-AB, p206-C y p206-ABC.**

Para la conjugación se utilizó la cepa donadora *E. coli* DH5α que contenga cualquiera de las tres construcciones (p206-AB o p206-C o p206-ABC), la cepa

receptora *A. brasilense* Sp245 y una cepa ayudadora para movilización de cualquiera de las construcciones denominada *E. coli* helper, la conjugación triparental se realizó en medio LB+, para la selección de las candidatas se sembraron colonias en un placa de medio MM con Cm (30 µg/ml) y Amp (100 µg/ml), realizando dos resiembras en este mismo medio y posteriormente dos resiembras en medio RC con las mismas concentraciones de antibiótico empleadas; para la selección de las transconjugantes se extrajo DNA plasmídico de grupos de 10 colonias y se realizó la PCR empleando un iniciador universal M13 que posee el vector pMMB206 y un iniciador que fue sintetizado para la amplificación de los genes *phbAB* y *phbC*, al obtener a la transconjugante del grupo que contiene la construcción correspondiente a p206-AB, p206-C o p206-ABC, fue almacenada en glicerol al 50% a -80°C para su posterior uso, las transconjugantes fueron denominadas como Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC.

### **8.10- Cinéticas de crecimiento de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC.**

Se inoculó una colonia en un tubo de 13x100 que contiene 5 ml de medio MM adicionado con Amp (100 µg/ml) y para las transconjugantes que contienen las construcciones o el vector pMMB206, se adiciono además el antibiótico cloranfenicol (Cm; 30 µg /ml) el precultivo se incubó a 30°C, 200 rpm durante 18 h, posteriormente se ajustó la DO<sub>600</sub> a 0.1, se inoculó a un matraz de 125 ml que contiene 50 ml de MM adicionado con los antibióticos de selección correspondientes, incubándolos a 30°C a 175 rpm por 36 h. Se tomaron alícuotas cada 2 h durante 36 h de crecimiento y se realizaron tres ensayos independientes por cuadruplicado.

### **8.11- Determinación de proteínas totales.**

La determinación de proteínas totales se realiza para relacionar la cantidad en mg de PHB sobre la cantidad en mg de proteína. El método consiste en romper las células con calor, obtener el extracto crudo y determinar la concentración de proteína presente con el método de Bradford (Anexo XII). A mayor densidad celular mayor será la cantidad de proteínas en el cultivo. Se centrifugó 100 µl del cultivo y se lavó dos veces con PBS, al final fue resuspendido con un volumen de 200 µl con este mismo buffer, adicionando 200 µl de NaOH 1N y llevándolo a ebullición durante 10 min, se dejó enfriar después para agregarle 400 µl de HCl 1N y 200 µl del stock de Bradford (BIORAD) dejando reaccionar por lo menos 5 min y leyendo al espectrofotómetro a 595 nm, la cuantificación de la proteína se realizó en base a una curva patrón de Albumina Sérica Bovina (BSA) cuyo rango de concentración es de 1.5 a 10.5 µg/ml (Anexo XIV).

### **8.12- Cuantificación de PHB.**

El poli-β-hidroxitirato se convierte a ácido crotónico en presencia de ácido sulfúrico concentrado, la máxima absorción del ácido es a 235 nm en la región de UV

(Law y Slepecky, 1961), cuantificando la producción de PHB en las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC a tiempos de incubación de 24, 48 y 72 h empleando como medio de cultivo el MM, se utilizó un precultivo de 48 h que después se ajustó la DO<sub>600</sub> a 0.1 para inocular los matraces de 125 ml, que contenían 50 ml del medio incubándolo a 30° C y 175 rpm. Se realizaron dos tipos de ensayos, el primero sin inducir y el segundo se indujo con 0.5 mM de IPTG con cultivos a una DO<sub>600</sub> de 0.6 y cada ensayo se realizó por triplicado, en el ensayo de inducción se tomó muestra para cuantificación de proteínas y PHB en el tiempo cero (antes de agregar IPTG) y posteriormente se tomó muestra a los tiempos antes mencionados; la extracción de PHB se realizó de acuerdo al protocolo de 1961 de Law y Slepecky, el contenido del biopolímero se estimó a partir de una curva patrón de PHB (Anexo XIII).

## IX.- RESULTADOS

### 9.1- Análisis de secuencias de los genes *phbABC* de *A. brasilense* Sp7 y Sp245.

Se realizó el análisis de las secuencias de los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* de *A. brasilense* Sp245 y Sp7 que se encuentran reportados en el banco de genes del NCBI, comparando las secuencias de estas dos bacterias tomando en consideración el tamaño y el porcentaje de identidad en aminoácidos; los resultados del alineamiento en el programa ClustalW, nos sugiere las secuencias para la sobreexpresión según el porcentaje de identidad más alto son *phbA* y *phbB* localizados en el plásmido uno con un 100% y 97.43% respectivamente y un 93.66% del *phbC* localizada en el cromosoma, el porcentaje de identidad así como el mapa físico de los genes de *phbABC* de estas dos bacterias se representan en la figura 10.

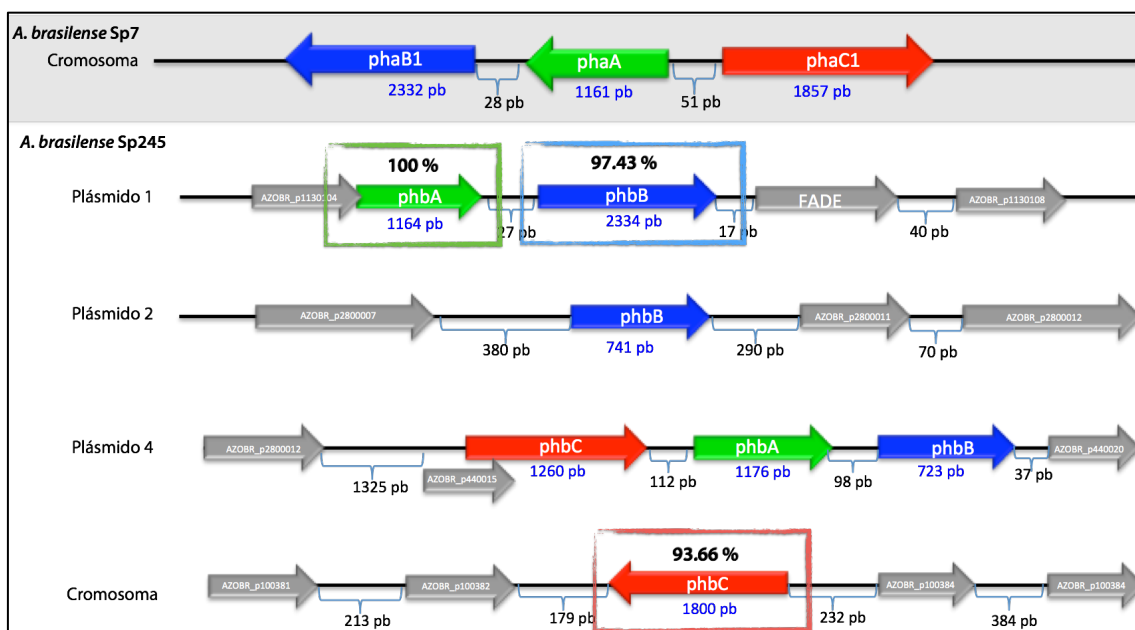


Figura 10.- Esquema de los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* de *A. brasilense* Sp245 y Sp7, en plásmido o cromosoma. (Consultado de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> el día 8 de junio del 2014).



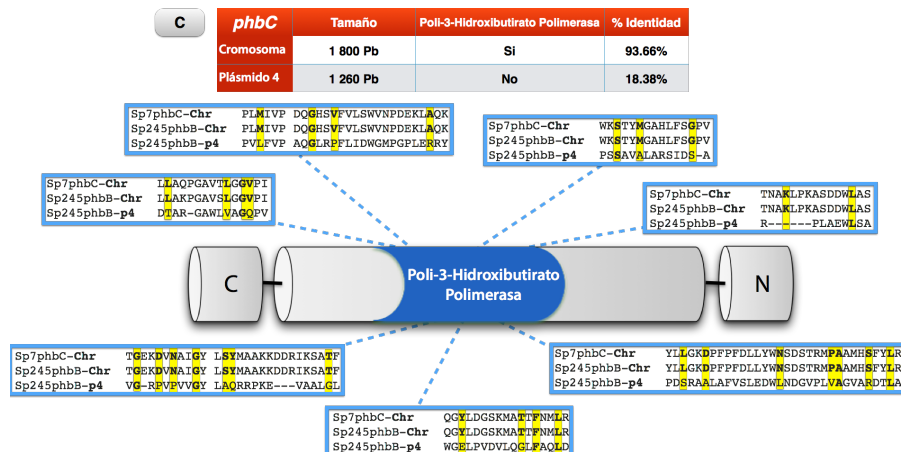


Figura 11.- Mapa de dominio y la alineación de secuencias; **A)** *phbA*: regiones conservadas del dominio Tiolasa; **B)** *phbB*: regiones conservadas del dominio 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y Crotonasa; **C)** *phbC*: regiones conservadas del dominio Poli-3-hidroxibutirato Polimerasa. Resultado de ClustalW y Conserved domains-NCBI.

### 9.3- Búsqueda de operones, promotores y terminadores.

Se realizó la búsqueda de operones con los programas bioinformáticos Softberry (FGENESB: Bacterial Operon and Gene Prediction) y DOOR<sup>2</sup> (Database of prokaryotic Operons), Para la búsqueda del promotor se utilizaron los programas PRODORIC (Virtual Footprint) y Genome2D (Prokaryote promoters) y para el análisis de terminadores se utilizó Softberry (FindTerm) y RNAProf (RNA Sequence, Structure & Function Lab). Los resultados de los análisis sugieren que los genes *phbA* y *phbB* se encuentran regulados por un solo promotor, es decir que se encuentran formando un operón, los genes que lo conforman son *merR* family (codifica para un regulador transcripcional de la familia *merR*), *phbA* ( $\beta$ -cetoacil-CoA tiolasa), *phbB* (deshidrogenasa acetoacil-CoA), FADE (acil-CoA deshidrogenasa) y un gen que codifica para una proteína de función desconocida con numero de acceso de CCD00885.1; Rio arriba del gen *merR* family a 25 pb se encuentra el sitio SD, a 30 pb el inicio de la región -10 y a 54 pb el inicio de la región -35, el terminador dependiente de Rho fue localizado a 164 pb rio abajo del gen CCD00885.1 (Fig. 12A). El *phbC* posee su propio promotor y terminador, según los análisis bioinformáticos, la región -10 del promotor se ubica a 171 pb rio arriba del gen, la región -35 a 193 pb y el terminador se localizó a 306 pb rio abajo del gen (Fig. 12B).

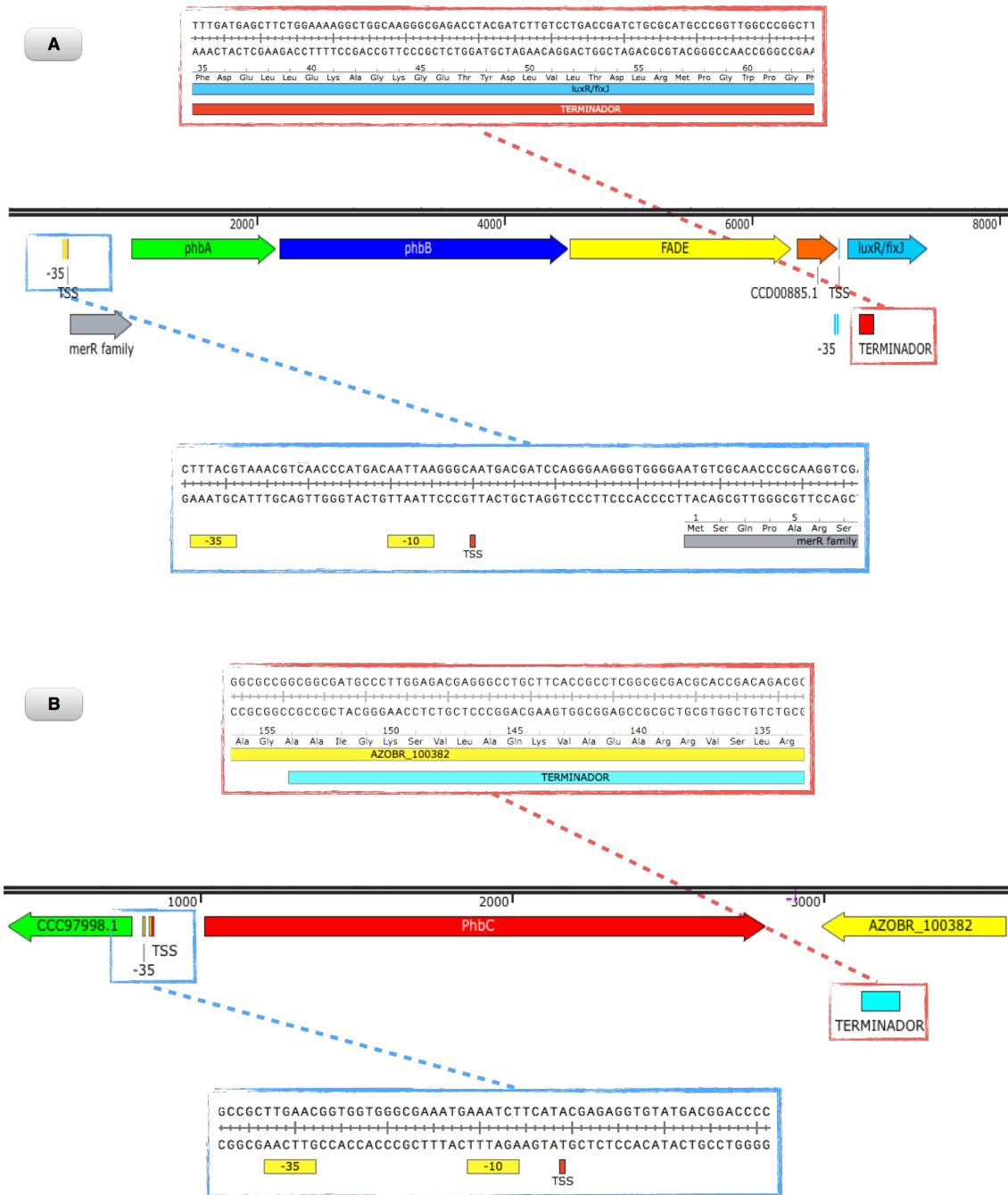


Figura 12.- Esquema de los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* de *A. brasilense* Sp245 en plásmido o cromosoma (Consultado de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> el 8 de junio del 2014), Se ilustra la posición del promotor, el sitio SD y la región terminadora. **A)** Mapa del operón del plásmido uno, en el que se encuentran *phbA* y *phbB*. **B)** Mapa del *phbC* localizado en el cromosoma.

Los resultados del análisis bioinformático sugieren que podríamos amplificar de manera conjunta a *phbA* y *phbB*, ya que no se encontró ningún sitio terminador, por ello se diseñó un solo par de iniciadores para amplificarlos.

#### 9.4- Diseño de iniciadores.

Basados en este análisis bioinformático se diseñaron los iniciadores *FXmaI-phbA*, *RPstI-phbB*, *FPstI-phbC* y *RPstI-phbC* utilizando la secuencia de nucleótidos de

los respectivos genes y tomando en cuenta los sitios de restricción del plásmido pMMB206, se determinó que el sitio *Xma*I fuera introducido al diseño de iniciador delantero del *phbA* y el sitio *Pst*I fuera adicionado al iniciador reverso del *phbB*, es decir que los genes *phbA* y *phbB* se amplificaran juntos, además de poseer sitios de corte distintos para que su posterior ligación fuera de manera dirigida; para el *phbC* el sitio *Pst*I fue añadido tanto para el iniciador delantero y para el reverso (Tabla 4).

Los iniciadores delanteros se diseñaron río a arriba del sitio SD de los genes *phbA* y *phbC* y río abajo del promotor de estos genes, es decir que ninguno de estos genes posee promotor, ya que el objetivo es que estén regulados por el promotor  $P_{taclac}$  del vector pMMB206 y para los iniciadores reversos se diseñaron río abajo del codón de paro de los genes *phbB* y *phbC*, las herramientas que fueron utilizados para el diseño de iniciadores son DNASTAR (Lasergene) y Primer3 versión 4.0.0.

### 9.5- Amplificación de los genes *phbAB* y *phbC*.

Se amplificaron los genes *phbAB* y *phbC* utilizando los iniciadores antes mencionados y empleando como templado el DNA de la cepa *A. brasilense* Sp245, se usó la polimerasa de alta fidelidad *Pfu* DNA Polimerasa de la marca FERMENTAS, la cual posee como una de sus características el dejar extremos romos al inicio y final del producto de PCR, posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Fig. 13A y 13B).

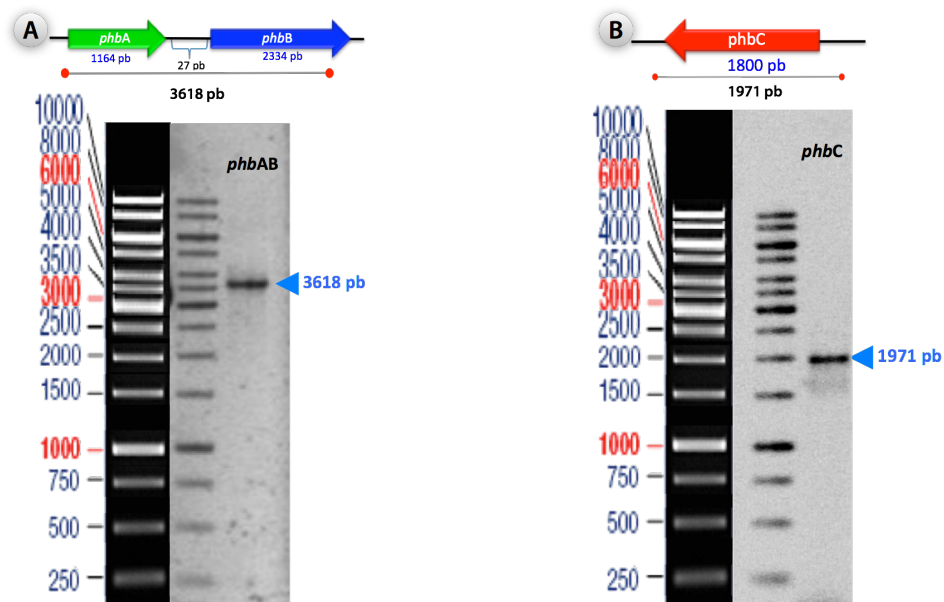


Figura 13.- Análisis de gel de agarosa al 0.8% de los productos de amplificación. **A)** Electroforesis del producto de PCR de *phbAB*. **B)** Electroforesis del producto de PCR de *phbC*.

## 9.6- Clonación de *phbAB* y *phbC* en el vector de clonación pBluescript SK(-).

Ambos productos de amplificación de PCR poseen los extremos romos, el vector pBluescript SK(-) fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, dejando extremos romos, necesarios para la ligación de los amplicones *phbAB* y *phbC* con los tamaños de 3 618 pb y 1 971 pb respectivamente. Para realizar la clonación, los insertos y el vector linearizado fueron purificados, cuantificados y ligados durante al menos 8 h (Anexo X). Posteriormente la reacción de ligación se transforma en *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes. Se obtuvieron las transconjugantes deseadas a las que se les denominaron Ecpbsk-AB y Ecpbsk-C, las construcciones pbsk-AB (6 577 pb) y pbsk-C (4 915 pb) fueron verificadas por patrón de restricción y amplificación por PCR utilizando los iniciadores universales M13 (Fig. 14 y 15).

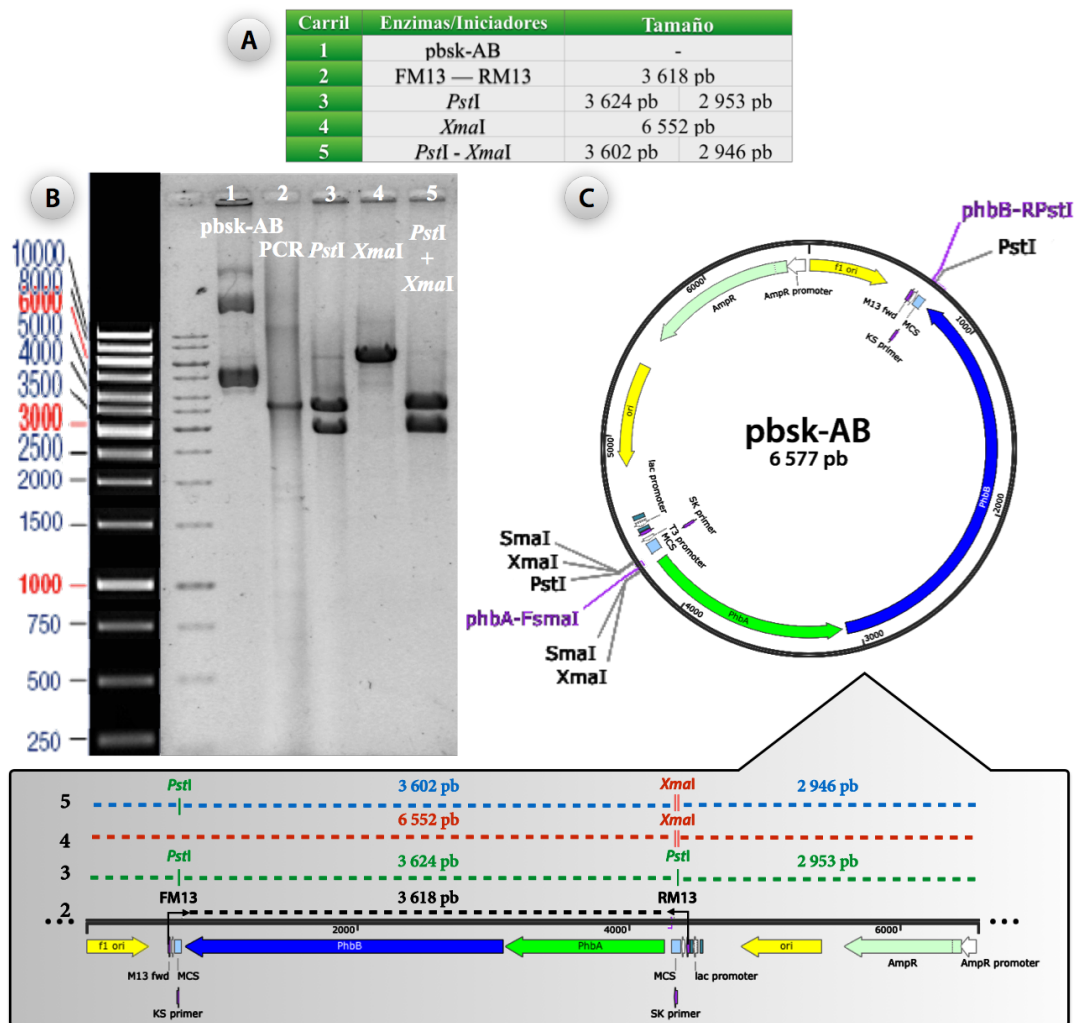


Figura 14.- Análisis de la transformante Ecpbsk-AB. **A)** Tabla que especifica los tamaños de la amplificación y digestiones realizadas de la construcción pbsk-AB. **B)** Gel de agarosa al 1% usando el marcador molecular 1 Kb DNA ladder; DNA plasmídico del pbsk-AB (carril 1), PCR usando los iniciadores M13 (carril 2), digestión con las enzimas *Pst*I (carril 3), *Xma*I (carril 4) y *Pst*I-*Xma*I (carril 5). El tamaño de las bandas están descritas en la tabla A. **C)** Ubicación de los iniciadores y sitios de corte en la construcción pbsk-AB.

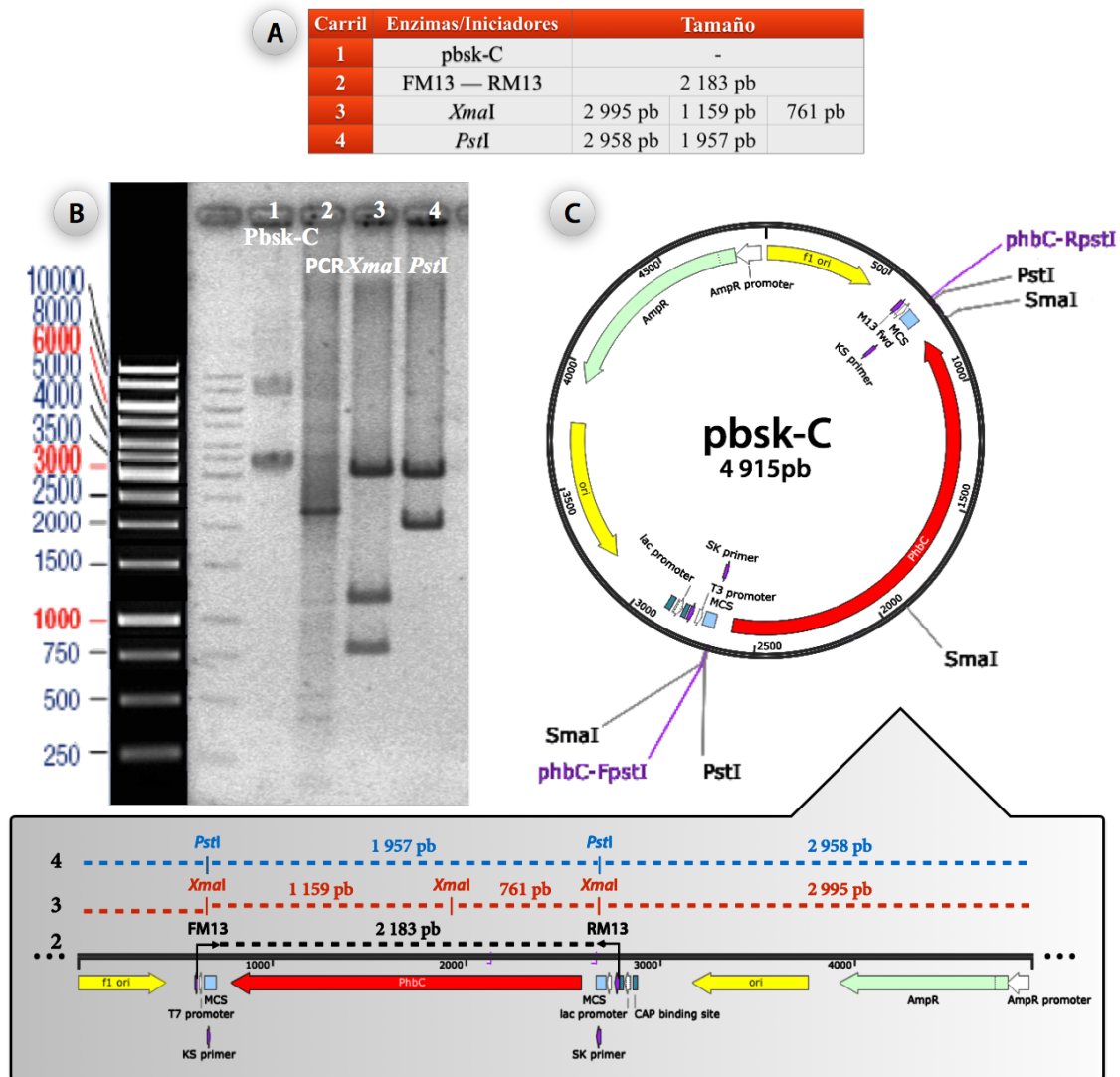


Figura 15.- Análisis de la transformante Ecpbsk-C. **A)** Tabla que especifica los tamaños de la amplificación y digestiones realizadas de la construcción pbsk-C. **B)** Gel de agarosa al 1% usando el marcador molecular 1 Kb DNA ladder; DNA plasmídico del pbsk-C (carril 1), PCR usando los iniciadores M13 (carril 2), digestión con las enzimas *Xma*I (carril 3), y *Pst*I (carril 4). El tamaño de las bandas están descritas en la tabla A. **C)** Ubicación de los iniciadores y sitios de corte en la construcción pbsk-C.

El análisis en gel de agarosa al 0.8% demostró que las construcciones de las transconjugantes Ecpbsk-AB y Ecpbsk-C, contienen a los genes *phbAB* y *phbC* respectivamente, posterior a esto, fue necesario secuenciar los genes para verificar que no existiera algún tipo de alteración en sus bases por motivos de la amplificación, fue necesario realizar la secuenciación por caminado, por ende se obtuvo como resultado el diseño de cuatro nuevos iniciadores para la construcción pbsk-AB y un nuevo iniciador para la construcción pbsk-C, estos iniciadores se encuentran descritos en la tabla 4. El resultado del análisis de secuenciación demostró que no existe ninguna mutación en la secuencia de bases de ninguno de los genes secuenciados, este análisis se realizó por alineamiento en BLASTnt y en ClustalW (Fig. 16 y 17), por lo cual se procedió a la subclonación de estos genes en el vector pMMB206.

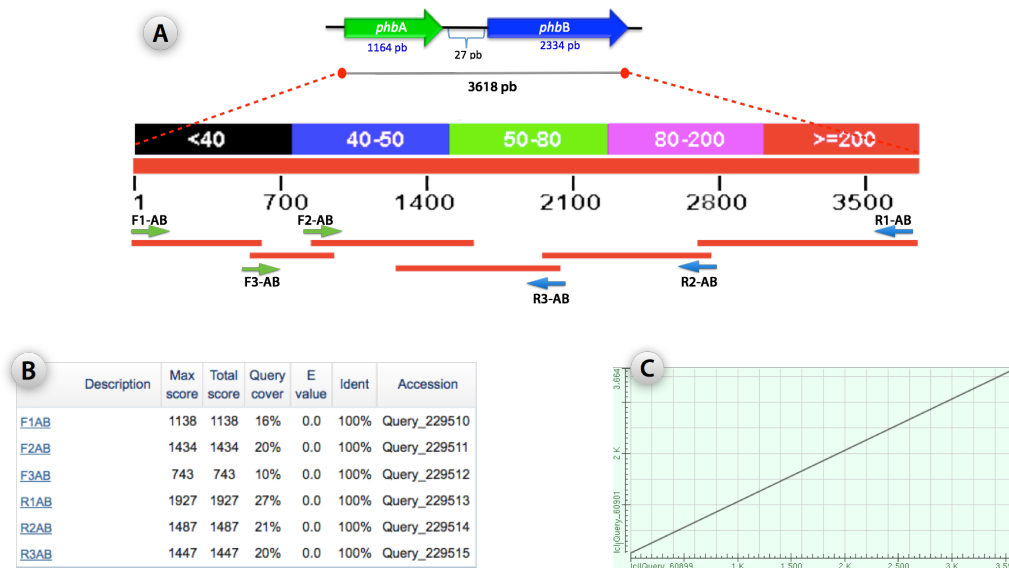


Figura 16.- Secuenciación por caminado y resultado del alineamiento del *phbAB*. **A)** Localización de los iniciadores y el segmento que fue secuenciado después de depurar las secuencias. **B)** Alineamiento de las secuencias depuradas (BLASTnt). **C)** Compilación de todas las secuencias en una sola y alineada a la secuencia *phbAB* de *A. brasilense* Sp245.

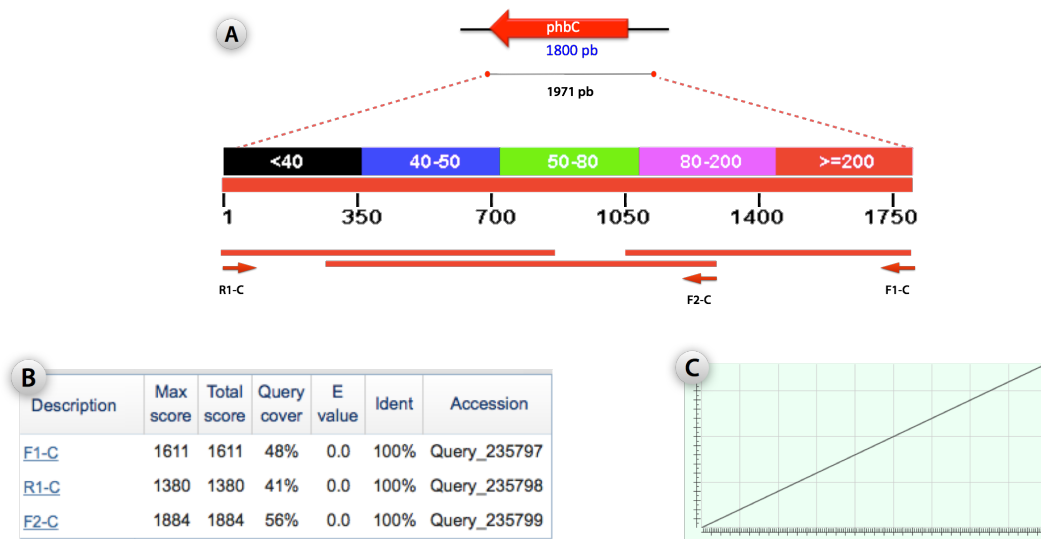


Figura 17.- Secuenciación por caminado y resultado del alineamiento de *phbC*. **A)** Localización de los iniciadores y el segmento que fue secuenciado después de depurar las secuencias. **B)** Alineamiento de las secuencias depuradas (BLASTnt). **C)** Compilación de todas las secuencias en una sola y alineada con la secuencia *phbC* de *A. brasilense* Sp245.

## 9.7- Subclonación de los genes *phbAB* y *phbC* en el vector de expresión pMMB206.

Para la subclonación, la construcción pbsk-AB fue digerido con las enzimas *Xma*I y *Pst*I para liberar el inserto *phbAB* del vector pBluescript SK(-), de la misma forma el vector pMMB206 fue digerido con las mismas enzimas, posteriormente el inserto y el vector pMMB206 linearizado fueron purificados, ligados y transformadas a *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes, para el análisis de las transformantes candidatas se extrajo el DNA plasmídico y fueron examinadas por patrón de restricción

y PCR, se generó el plásmido p206-AB y a la transformante se le denominó Ecp206-AB (Fig. 18). La construcción pbsk-C y el vector pMMB206 fueron digerido con *Pst*I, posteriormente se realizó la purificación, ligación y transformación bajo las mismas condiciones en la que se obtuvo la construcción p206-AB; el proceso de selección de las transformantes también incluyó el análisis sobre la dirección en la que se clono *phbC*, la transformante que contiene la construcción p206-C fue denominada como Ecp206-C (Fig. 19).

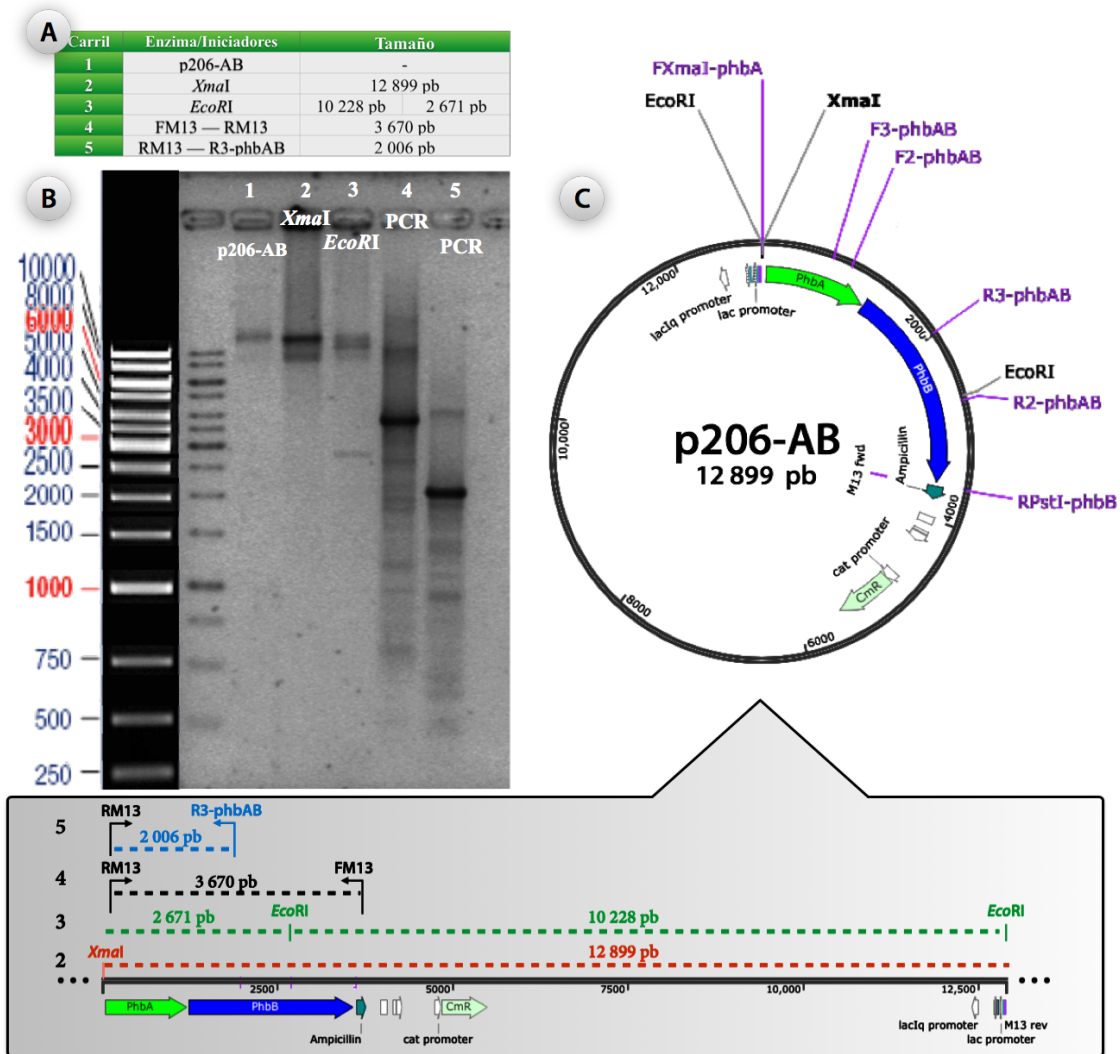


Figura 18.- Análisis de la transformante Ecp206-AB. **A)** Tabla que especifica los tamaños de la amplificación y digestiones realizadas de la construcción p206-AB. **B)** Gel de agarosa al 1% usando el marcador molecular 1 Kb DNA ladder; DNA plasmídico del p206-AB (carril 1), digestión con las enzimas *Xma*I (carril 2), *Eco*RI (carril 3), PCR usando los iniciadores M13 (carril 4), PCR con el iniciador reverso M13 y el iniciador R3-phbAB diseñado para la secuenciación por caminado del *phbAB* (carril 5). El tamaño de las bandas están descritas en la tabla A. **C)** Ubicación de los iniciadores y sitios de corte en la construcción p206-AB.

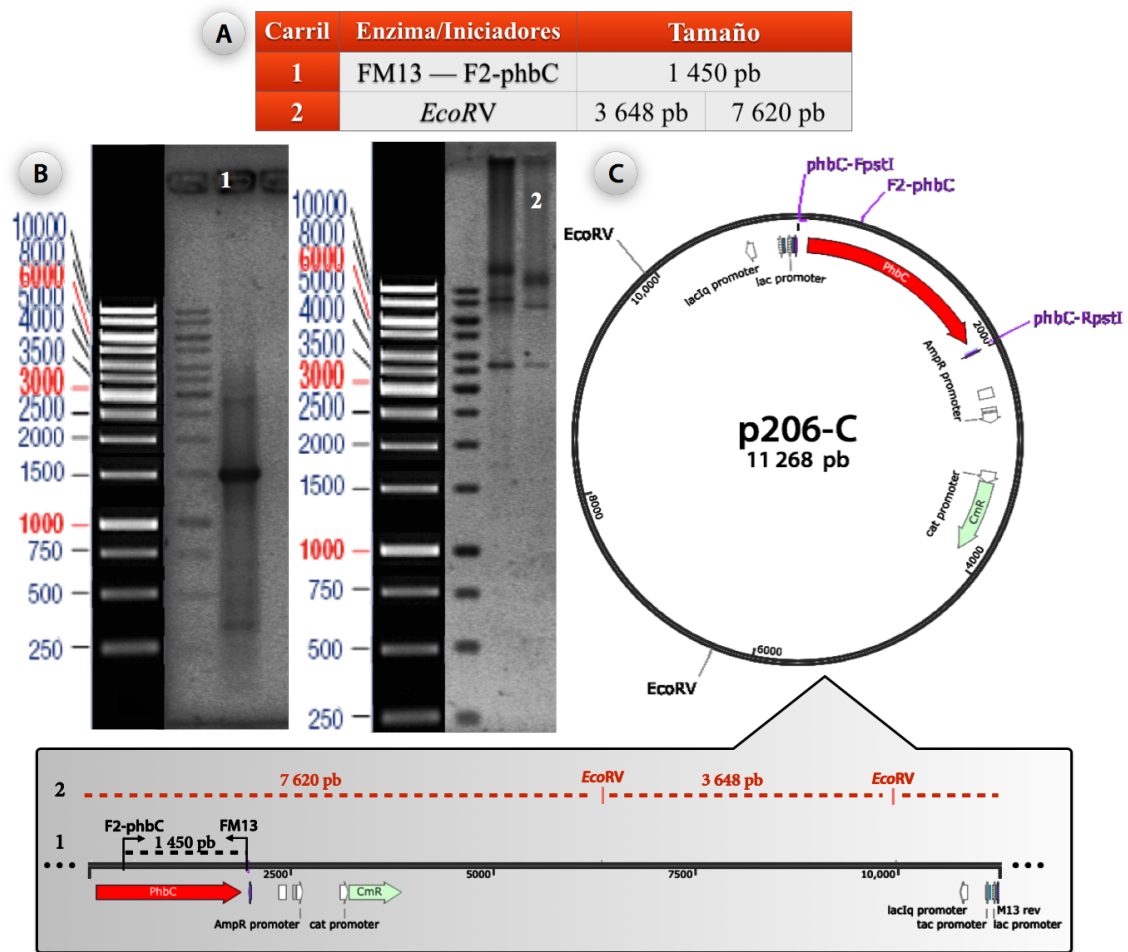


Figura 19.- Análisis de la transformante Ecp206-C. **A)** Tabla que especifica los tamaños de la amplificación y digestión realizada de la construcción p206-C. **B)** Gel de agarosa al 1% usando el marcador molecular 1 Kb DNA ladder; PCR con el iniciador delantero M13 y el iniciador F2-phbC diseñado para la secuenciación por caminado del *phbC* (carril 1), digestión con la enzima *EcoRV* (carril 2). El tamaño de las bandas están descritas en la tabla A. **C)** Ubicación de los iniciadores y el sitio de corte en la construcción p206-C.

Se utilizó la construcción p206-AB y de la construcción pbsk-C se obtuvo el fragmento *phbC*, se digirieron ambos plásmidos con la enzima *PstI*, se purificaron las bandas correspondientes según el perfil electroforético, se ligaron y transformaron en *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes; el DNA de las candidatas fue analizado, comprobando la dirección de *phbC* en la nueva construcción por patrón de digestión, obteniendo así la construcción p206-ABC, la transformante se denominó EcP206-ABC (Fig. 20).

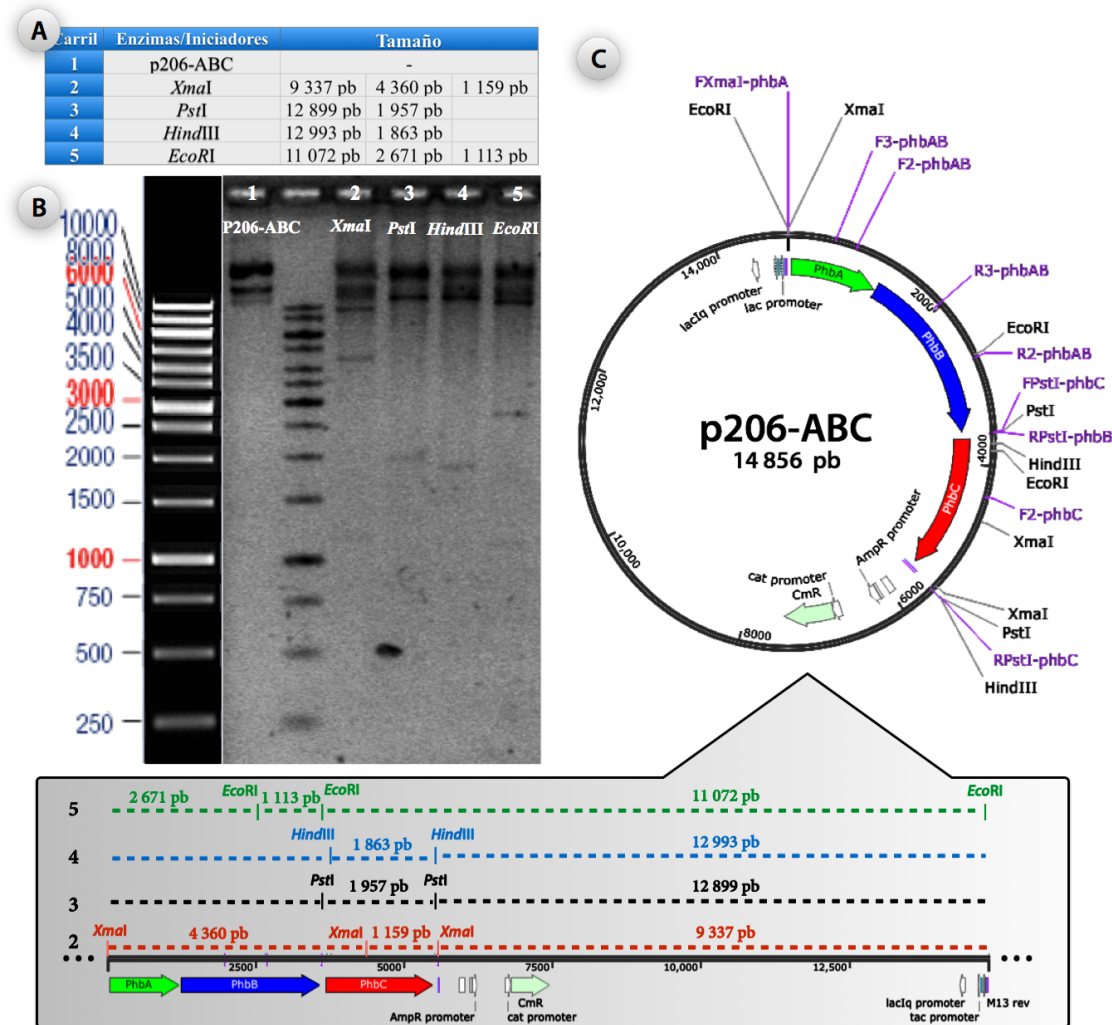


Figura 20.- Análisis de la transformante Ecp206-ABC. **A)** Tabla que especifica los tamaños de las digestiones realizadas de la construcción p206-ABC. **B)** Gel de agarosa al 1% usando el marcador molecular 1 Kb DNA ladder; DNA plasmídico del p206-ABC (carril 1), digestión con las enzimas *Xma*I (carril 2), *Pst*I (carril 3), *Hind*III (carril 4), y *Eco*RI (carril 5). El tamaño de las bandas están descritas en la tabla A. **C)** Ubicación de los sitios de corte en la construcción p206-ABC.

Lo siguiente fue generar la cepa que se utilizó como control negativo, para ello el vector pMMB206 purificado fue transformado en *E. coli* DH5 $\alpha$  químicamente competentes, las bacterias transformantes se sembraron en medio LB con Cm (30  $\mu$ g/ml), X-gal (50  $\mu$ g/ml) e IPTG (0.5 mM), las transformantes candidatas fueron seleccionadas con base a la resistencia del antibiótico y la presencia del color azul en las cepas como consecuencia de la inducción con IPTG, esto debido a que las cepas que contengan el vector pMMB206 tienen el gen *lacZ* sin interrumpir, el cual expresa la enzima  $\beta$ -galactosidasa que hidroliza el X-gal presente en el medio, desarrollando un precipitado azul en la colonia, a esta transformante se le designo como Ecp206.

Cada una de las transformantes en *E. coli* DH5 $\alpha$  nombradas como Ecp206, Ecp206-AB, Ecp206-C y Ecp206-ABC fue empleada para la conjugación con *A. brasilense* Sp245, después de llevar a cabo resiembras en el medio MM y RC con Cm (30  $\mu$ g/ml), se realizó la selección de las cepas candidatas mediante PCR, obteniendo las

transconjugantes de *A. brasilense* Sp245, designándolas con el nombre de Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC, para comprobar que *A. brasilense* Sp245 posea la construcción (p206-AB, p206-C o p206-ABC) se empleó la selección por resistencia del antibiótico Cm y debido a que las construcciones contienen los mismos genes de su fondo genético, se utilizó la amplificación de PCR con uno de los iniciadores universales M13 y uno de los iniciadores que se sintetizaron para la secuenciación por caminado (Fig. 21, 22 y 23).

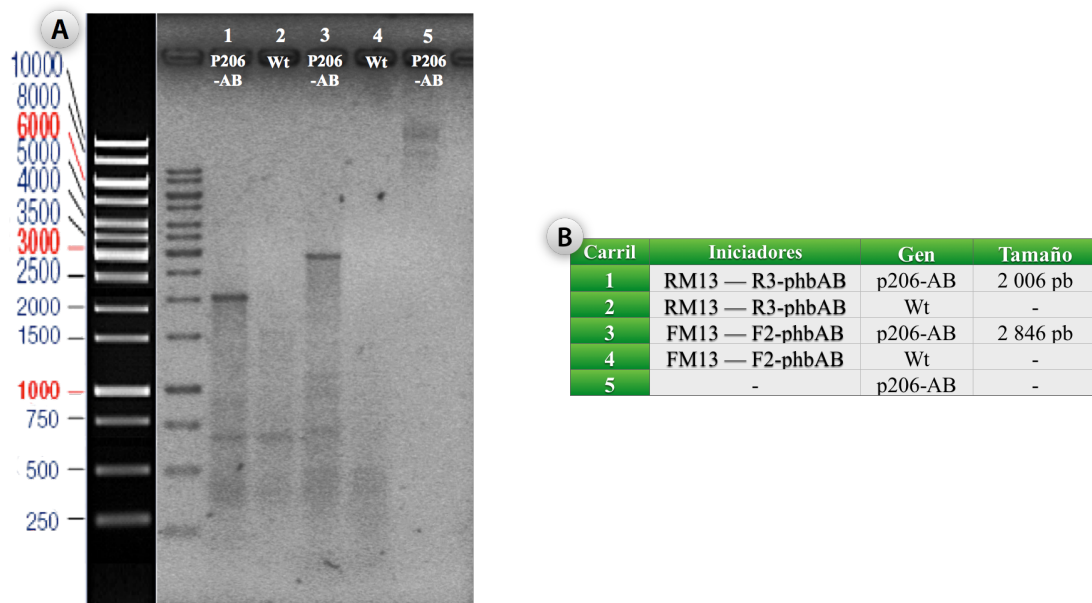
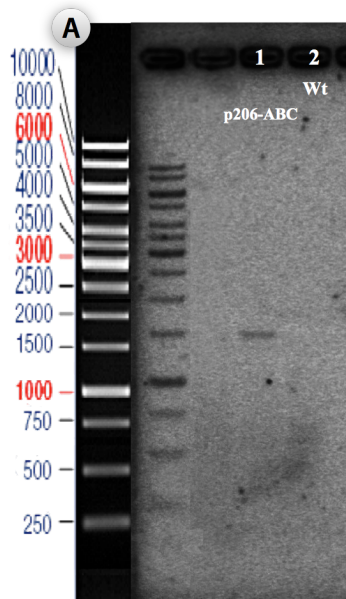


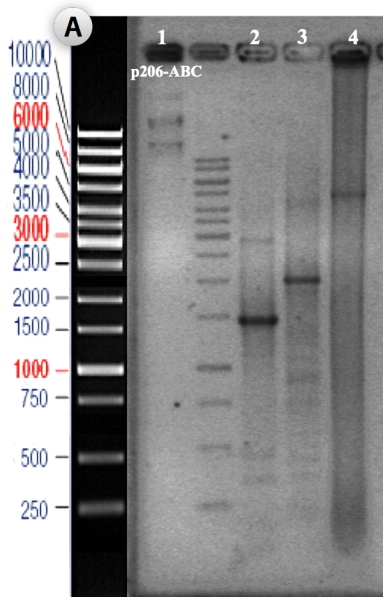
Figura 21.- Análisis de la transconjugante Ab245p206AB. **A)** Gel de agarosa al 1% usando el marcador molecular 1 Kb DNA ladder; PCR con el iniciador reverso M13 y el iniciador R3-phbAB de las cepas Ab245p206AB (carril 1) y de la WT (carril 2), PCR con el iniciador delantero M13 y el iniciador F2-phbAB de las cepas Ab245p206AB (carril 3) y de la WT (carril 4) y DNA plasmídico del p206-AB (carril 5). Los iniciadores R3-phbAB y F2-phbAB fueron sintetizados para la secuenciación por caminado del *phbAB*. **B)** Tabla que especifica los tamaños de los amplificados de los iniciadores empleados en la construcción p206-AB.



**B**

Carril	Iniciadores	Gen	Tamaño
1	FM13 — F2-phbC	p206-C	1 450 pb
2	FM13 — F2-phbC	Wt	-

Figura 22.- Análisis de la transconjugante Ab245p206C. **A)** Gel de agarosa al 1% usando el marcador molecular 1 Kb DNA ladder; PCR con el iniciador delantero M13 y el iniciador F2-phbC (sintetizados para la secuenciación por caminado del *phbC*) de las cepas Ab245p206C (carril 1) y de la WT (carril 2). **B)** Tabla que especifica los tamaños de los amplificados de los iniciadores empleados en la construcción p206-C.



**B**

Carril	Enzima/Iniciadores	Tamaño
1	p206-ABC	-
2	FM13 — F2-phbC	1 450 pb
3	RM13 — R3-phbAB	2 000 pb
4	F2-phbAB — <i>R</i> PstI-phbC	4 775 pb

Figura 23.- Análisis de la transconjugante Ab245p206ABC. **A)** Gel de agarosa al 1% usando el marcador molecular 1 Kb DNA ladder; DNA plasmídico del p206-ABC (carril 1), PCR con el iniciador delantero M13 y el iniciador F2-phbC (carril 2), PCR con el iniciador reverso M13 y el iniciador R3-phbAB (carril 3) y PCR con el iniciador F2-phbAB y el iniciador *R*PstI-phbC (carril 4). Los iniciadores F2-phbC y R3-phbAB fueron sintetizados para la secuenciación por caminado del *phbC* y *phbAB* respectivamente. **B)** Tabla que especifica los tamaños de los amplificados de los iniciadores empleados en la construcción p206-ABC.

## 9.8- Cinética de crecimiento de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC.

Durante el cultivo de cada cepa, por separado se tomó muestra cada 2 h durante 36 h, cada ensayo se realizó por cuadruplicado en tres ensayos independientes. Los datos fueron tabulados y graficados en EXCEL (Fig. 24), observando el comportamiento en la cinética de crecimiento de las cepas Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC no se aprecia alteración en su  $DO_{600}$  con respecto a la WT, sin embargo la cepa Ab245p206 sufre un retraso en el crecimiento, alcanzando una  $DO_{600}$  similar a la WT hasta las 22 h de crecimiento.

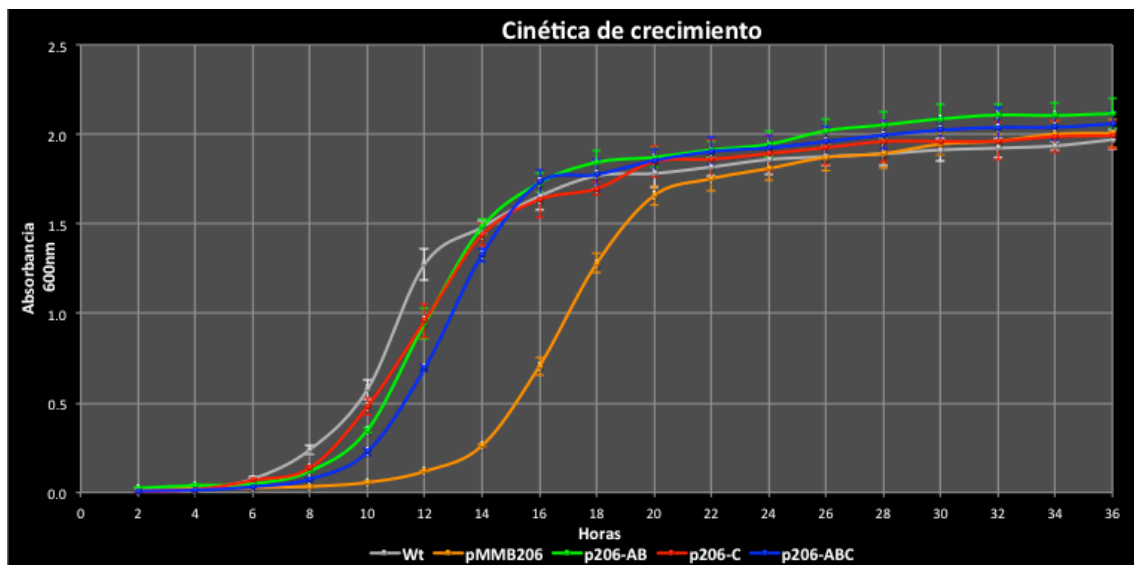


Figura 24.- Cinética de crecimiento en MM sin ningún tipo de desbalance nutricional de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC durante 36 h.

## 9.9- Cuantificación de PHB.

La cuantificación de PHB se realizó en base a la técnica descrita por Law y Slepecky en 1961 y los datos fueron normalizados con la cuantificación de las proteínas totales por mililitro de cultivo. La toma de muestra de los ensayos sin inducir se realizó a las 24, 48 y 72 h (Fig. 25); y para los ensayos de inducción también (Fig. 26). El contenido del biopolímero se estimó a partir de una curva patrón de PHB (Anexo XV).

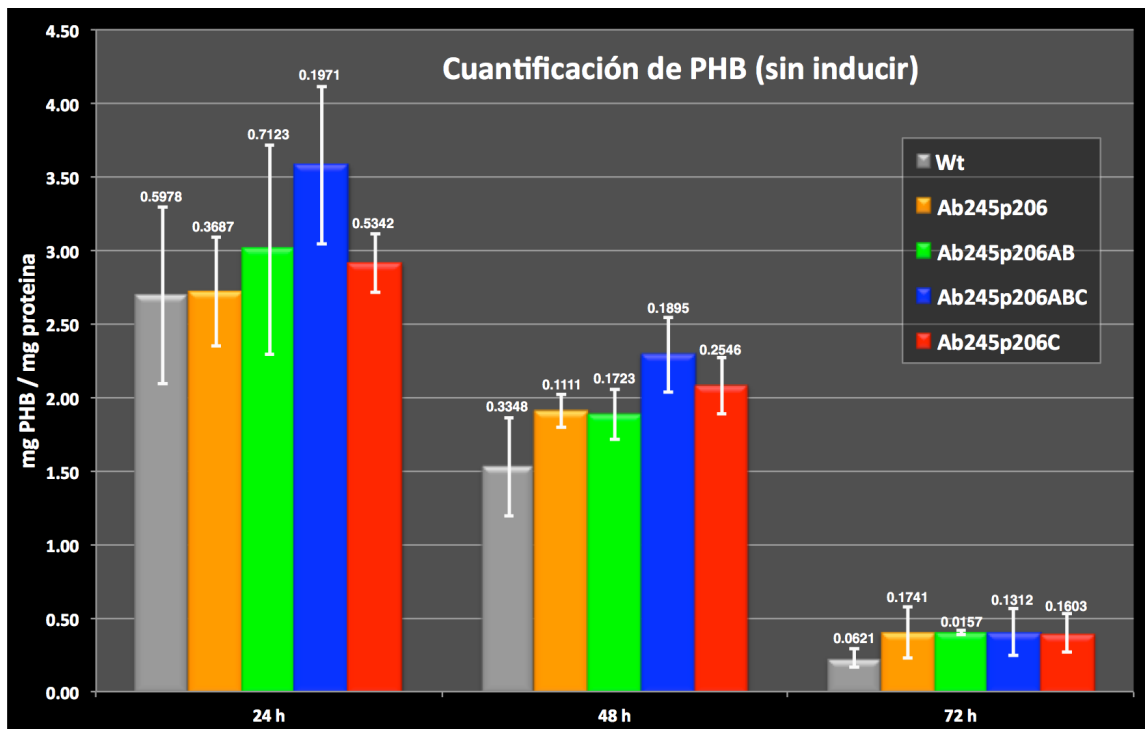
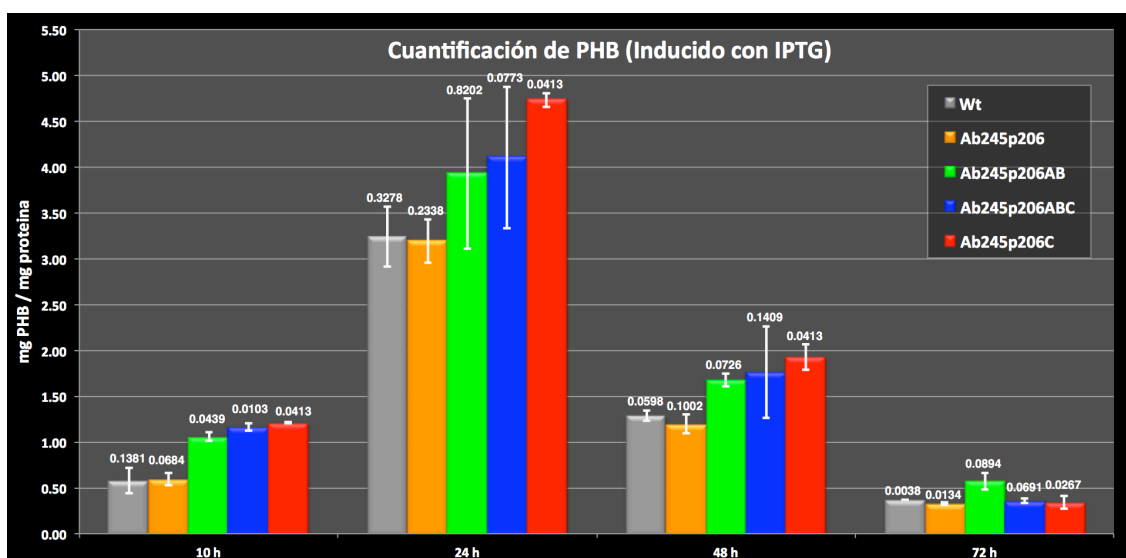


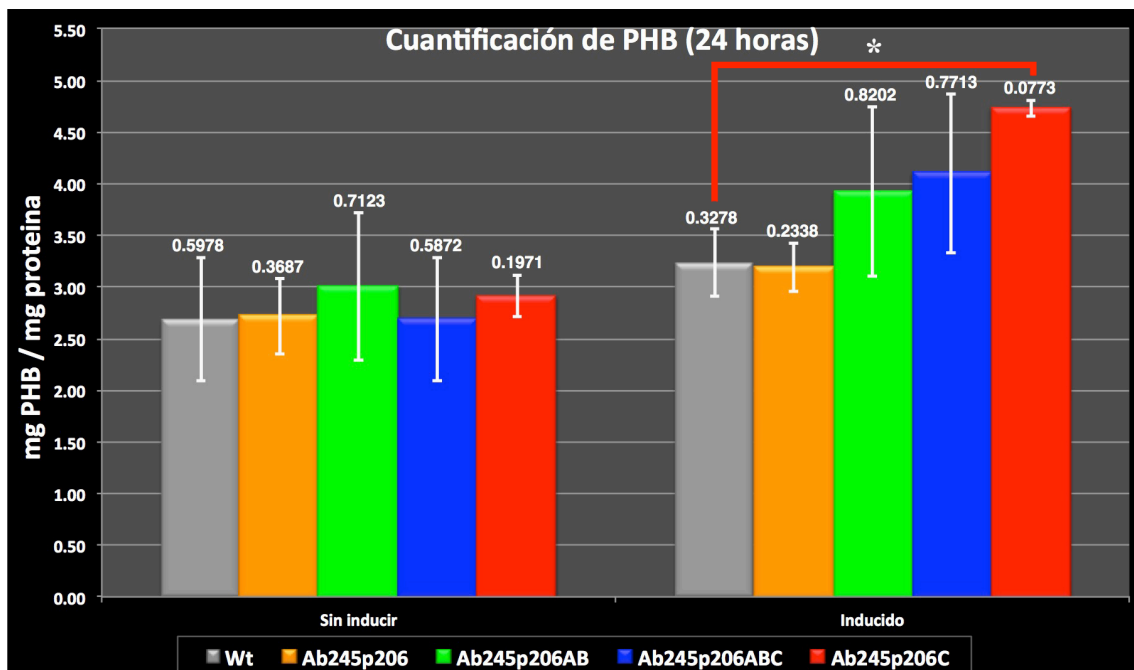
Figura 25.- Cuantificación de PHB de los ensayos sin inducir a las 24, 48 y 72 h de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC crecidas en MM sin ningún tipo de desbalance nutricional. La desviación estándar se representa por barras de error en color blanco en área del gráfico y los datos de las cuantificaciones se especifican en la tabla inferior al gráfico.



Cuantificación de PHB de los ensayos inducidos con IPTG								
Muestras	10 Horas		24 Horas		48 Horas		72 Horas	
	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar
Wt	0.5803	0.1382	3.2371	0.3278	1.2853	0.0598	0.3716	0.0038
pMMB206	0.5975	0.0684	3.1900	0.2338	1.1965	0.1002	0.3300	0.0134
p206-AB	1.0578	0.0439	3.9269	0.8202	1.6805	0.0726	0.5722	0.0894
p206-C	1.2092	0.0103	4.7335	0.0773	1.9285	0.1409	0.3381	0.0691
p206-ABC	1.1660	0.0413	4.1041	0.7713	1.7592	0.4956	0.3619	0.0267

Figura 26.- Cuantificación de PHB de los ensayos inducidos con IPTG a las 24, 48 y 72 h de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC crecidas en MM sin ningún tipo de desbalance nutricional. La desviación estándar se representa por barras de error en color blanco en área del gráfico y los datos de las cuantificaciones se especifican en la tabla inferior al gráfico.

Las cuantificaciones de PHB de los ensayos de inducción se realizaron con base a las fases de la cinética de crecimiento (Fig. 24), los datos de la cinética indicaron que las cepas se encuentran en fase exponencial las 10 h, tomando las muestras en esta fase y después de la inducción con 0.5 mM de IPTG en el que se encuentra en la fase estacionaria (24 h); se observó un aumento de 1.82 mg PHB/mg proteína en la cepa Ab245p206C con respecto a la WT en los ensayos de inducción (Fig. 27) también se obtuvo un incremento de 1.75 mg PHB/mg proteína al comparar a Ab245p206C en los ensayos de inducción con respecto a los ensayos no inducidos (Fig. 28); se realizó el análisis estadístico de dos vías utilizando un nivel de significancia  $P \leq 0.05$ .



Cuantificación de PHB a las 24 h de crecimiento de los cultivos sin inducir e inducidos con IPTG						
Muestras	Sin inducir			Inducido con PHB		
	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar	ANOVA	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar	ANOVA
Wt	2.6916	0.5978	-	3.2371	0.3278	-
pMMB206	2.7190	0.3687	0.4750	3.1900	0.2338	0.4426
p206-AB	3.0056	0.7123	0.2955	3.9269	0.8202	0.1667
p206-C	2.9120	0.1971	0.2980	4.7335	0.0773	0.0419
p206-ABC	3.5757	0.5342	0.0648	4.1041	0.7713	0.1667

Figura 27.- Cuantificación de PHB a las 24 h de los ensayos sin inducir e inducidos con IPTG. (\*) indica una diferencia significativa  $P \leq 0.05$ , la desviación estándar se representa por barras de error en color blanco en área del gráfico y los datos de las cuantificaciones se especifican en la tabla inferior al gráfico.

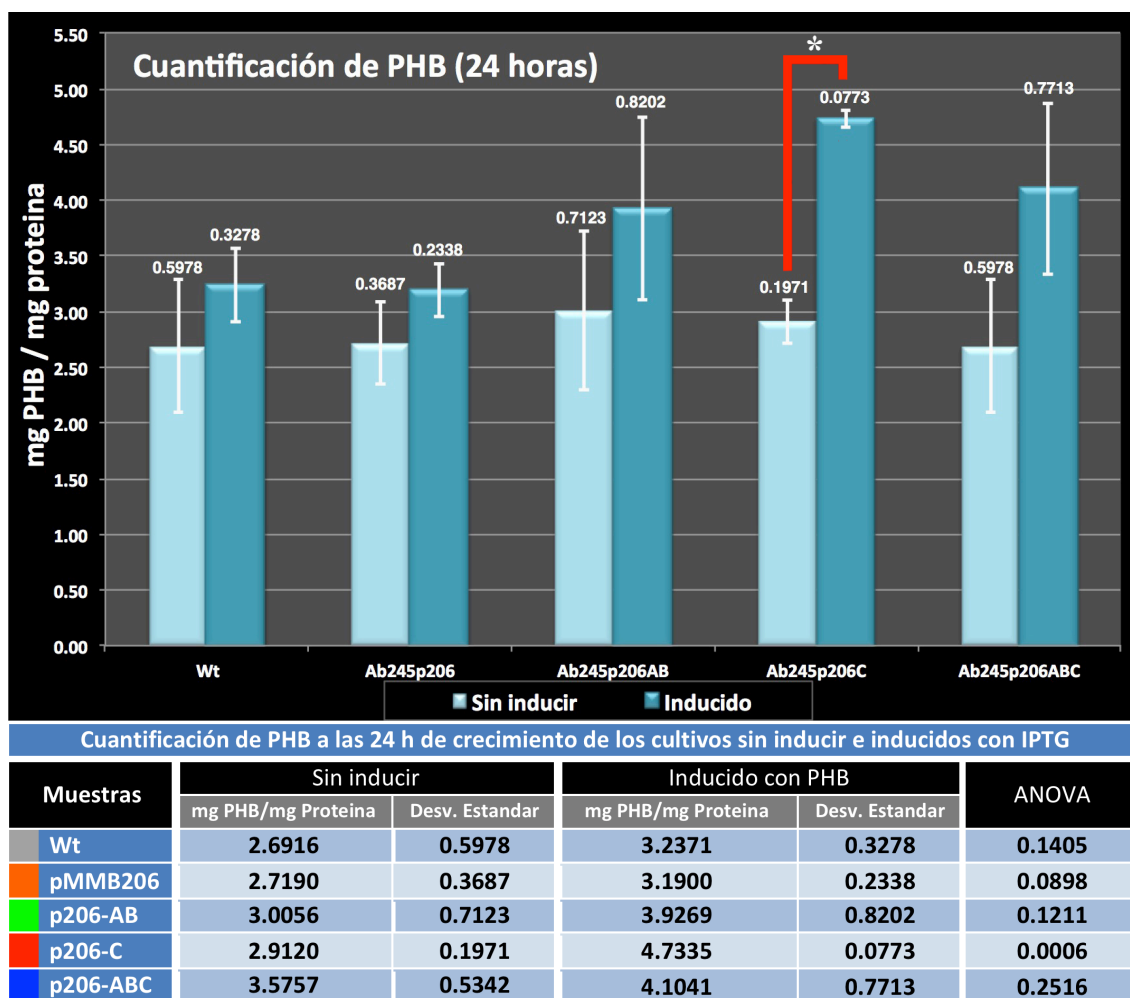
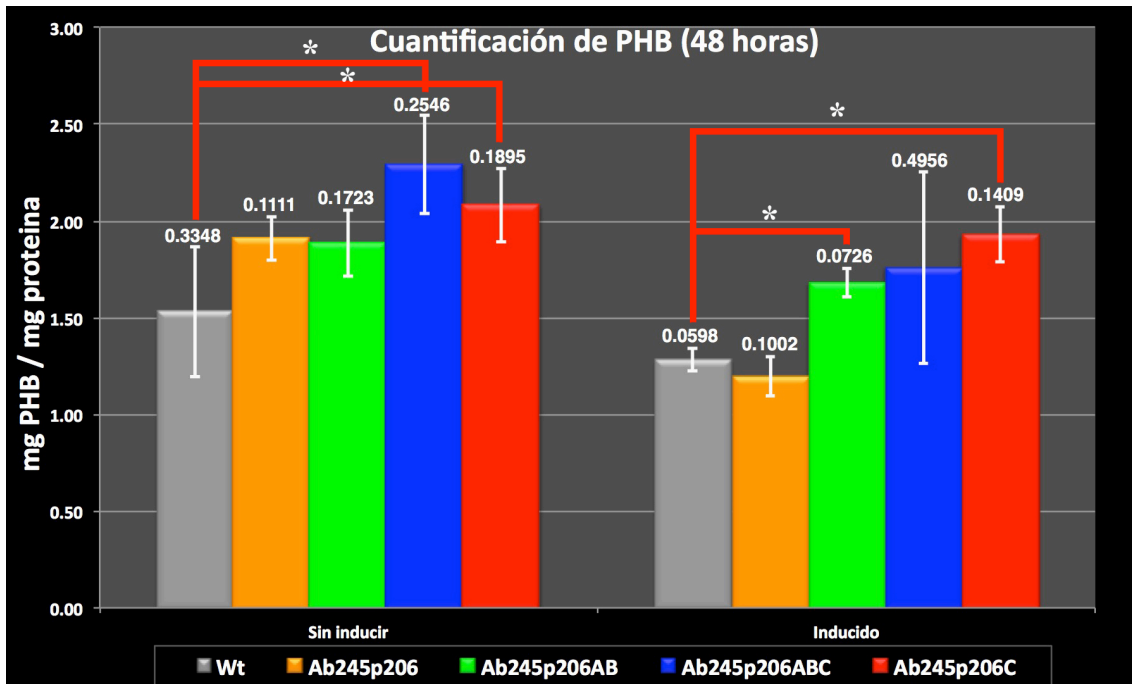


Figura 28.- Cuantificación de PHB a las 24 h de los ensayos sin inducir e inducidos con IPTG. (\*) indica una diferencia significativa  $P \leq 0.05$ , la desviación estándar se representa por barras de error en color blanco en área del gráfico y los datos de las cuantificaciones se especifican en la tabla inferior al gráfico.

Al comparar la cuantificación de PHB de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC de los ensayos inducidos con los no inducidos de las 48 y 72 h presentan una producción de PHB similar. La cepa Ab245p206C presento diferencia significativa en la cuantificación de PHB a las 48 h en los en los dos tipos de ensayos, dando un incremento con respecto a la WT de 0.5486 mg PHB/mg proteína en el ensayo sin inducir y un 0.6432 mg PHB/mg proteína en el ensayo inducido; la cepa Ab245p206ABC registro un aumento de 0.7615 mg PHB/mg proteína con respecto a la WT en el ensayo sin inducir y la cepa Ab245p206AB incremento un 0.3952 mg PHB/mg proteína en el ensayo inducido (Fig. 29).

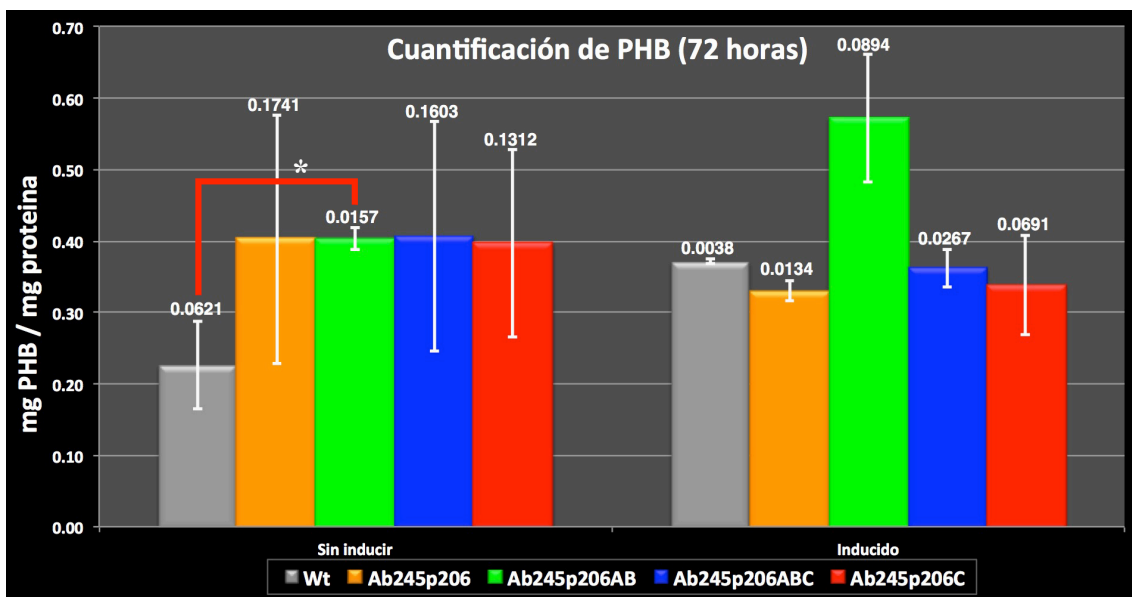
La cuantificación de PHB a las 72 h disminuye por debajo de 0.70 mg PHB/mg proteína, obteniendo una cantidad semejante en ambos ensayos (Fig. 30).



**Cuantificación de PHB a las 48 h de crecimiento de los cultivos sin inducir e inducidos con IPTG**

Muestras	Sin inducir			Inducido con PHB		
	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar	ANOVA	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar	ANOVA
Wt	1.5296	0.3348	-	1.2853	0.0598	-
pMMB206	1.9084	0.1111	0.0904	1.1965	0.1002	0.2078
p206-AB	1.8875	0.1723	0.0993	1.6805	0.0726	0.0148
p206-C	2.0782	0.1895	0.0429	1.9285	0.1409	0.0313
p206-ABC	2.2911	0.2546	0.0192	1.7592	0.4956	0.2014

Figura 29.- Cuantificación de PHB a las 48 h de los ensayos sin inducir e inducidos con IPTG. (\*) indica una diferencia significativa  $P \leq 0.05$ , la desviación estándar se representa por barras de error en color blanco en área del gráfico y los datos de las cuantificaciones se especifican en la tabla inferior al gráfico.



Cuantificación de PHB a las 72 h de crecimiento de los cultivos sin inducir e inducidos con IPTG						
Muestras	Sin inducir			Inducido con PHB		
	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar	ANOVA	mg PHB/mg Proteína	Desv. Estandar	ANOVA
Wt	0.2266	0.0621	-	0.3716	0.0038	-
pMMB206	0.4026	0.1741	0.1076	0.3300	0.0134	0.0611
p206-AB	0.4038	0.0157	0.0161	0.5722	0.0894	0.0969
p206-C	0.3965	0.1312	0.0701	0.3381	0.0691	0.3087
p206-ABC	0.4063	0.1603	0.0912	0.3619	0.0267	0.3493

Figura 30.- Cuantificación de PHB a las 72 h de los ensayos sin inducir e inducidos con IPTG. (\*) indica una diferencia significativa  $P \leq 0.05$ , la desviación estándar se representa por barras de error en color blanco en área del gráfico y los datos de las cuantificaciones se especifican en la tabla inferior al gráfico.

## X.- Discusión.

Algunas especies del género de *Azospirillum* como *A. brasilense* y *A. lipoferum* pueden acumular altos niveles de PHB, hasta un 88% peso seco bajo condiciones de desequilibrio de nutrientes, limitación de oxígeno (0.007 atm) o una relación alta C/N (Itzigsohn *et al.* 1995). De ahí que los medios utilizados para la producción de PHB deban tener un desbalance nutricional para incrementar su producción; sin embargo en los ensayos realizados en este proyecto fue empleado MM sin ningún tipo de desbalance e inducido con IPTG, con el objetivo de no inducir la vía del PHB por efecto del desbalance, siendo el principal responsable de la de la síntesis de PHB el promotor  $P_{taclac}$  del plásmido pMMB206, al menos hasta que el medio no alcance un desbalance por efecto del consumo de nutrientes.

*A. brasilense* Sp7 cultivado en MM sin ningún tipo de desbalance nutricional, después de 24 h de incubación a 30°C, se puede apreciar la acumulación de gránulos de PHB y al agotarse los nutrientes en el medio de cultivo, la degradación de este polímero inicia y a las 48 h los datos aportados de la cuantificación de PHB sugieren la despolimerización casi en su totalidad, e incluso después de las 72 h. El análisis de microscopia de transmisión mostró grandes gránulos de PHB en la mutante *phaZ* (*phaZ* deletado), pero ninguno en la cepa silvestre según lo reportado por Kadouri y colaboradores en el 2003; con este antecedente se realizó la cuantificación de PHB a las 24, 48 y 72 h, ya que la curva de crecimiento sugiere que a las 24 h todas las cepas están en fase estacionaria temprana, a las 48 y 72 h están en fase estacionaria tardía.

La inducción se realizó en la fase exponencial de acuerdo con la cinética de crecimiento (a las 10 h de haber inoculado los matraces se agregó el agente inductor), estos resultados concuerdan con la fase exponencial a la cual se induce a *A. brasilense* Sp7 para la sobreexpresión de carotenos, en el cual fue empleado el plásmido pMMB206 (Thirunavukkarasu *et al.* 2008), la concentración de IPTG fue estimado por Morales y colaboradores en 1991, por lo cual se agregó 0.5 mM de IPTG a las 10 h, siendo esta la concentración adecuada para la inducción del promotor  $P_{taclac}$  del plásmido pMMB206.

El comportamiento en el crecimiento de las cepas WT, Ab245p206, Ab245p206AB, Ab245p206C y Ab245p206ABC es similar desde el inicio de la fase de

adaptación hasta alcanzar la fase estacionaria tardía, sin embargo la cepa Ab245p206 (el cual contiene al vector pMMB206) su velocidad de crecimiento se ve retrasada como se observa en la figura 24, a pesar de ello la producción de PHB no se ve alterada si la comparamos con la cepa silvestre, tanto en ensayos de inducción como en los no inducidos, esto concuerda con lo reportado por Thirunavukkarasu y colaboradores (2008), que al cuantificar el contenido de carotenos no varía en la cepa *A. brasilense* Sp7 (silvestre) y la cepa que contiene el plásmido pMMB206.

Los genes que se emplearon para la sobreexpresión según los resultados de los análisis bioinformáticos de los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* de *A. brasilense* Sp245 comparada con *A. brasilense* Sp7 son *phbA* y *phbB* localizados en el plásmido uno con un 100 y 97.43% de identidad respectivamente y el *phbC* localizada en el cromosoma con 93.66% de identidad; el porcentaje de identidad y los aminoácidos conservados sugieren que los genes que se utilizaron para clonar cumplirían la función de los genes de *A. brasilense* Sp7 que fueron analizados por Kadouri y colaboradores en el 2002, el análisis de operones y la búsqueda de terminadores y promotores fue realizado para designar el sitio en el que se diseñarían los iniciadores, ya que los amplificadores no deberían tener otro promotor que la del plásmido pMMB206 para poder regular su expresión, ni terminadores que impidan la correcta transcripción de los genes, además cada gen conservo el sitio SD del fondo genético de *A. brasilense* Sp245, las clonaciones fueron comprobadas mediante secuenciación por caminado para descartar algún tipo de mutación o cambio en la secuencia, siendo el único responsable de la sobreexpresión de los genes el promotor  $P_{taclac}$  del plásmido pMMB206.

Desde el punto de vista bioquímico y genético, la producción de PHAs ocurre por varias vías metabólicas, usando la enzima  $\beta$ -cetotiolasa y acetoacetyl-CoA reductasa, por la vía de  $\beta$ -oxidación y la vía de síntesis *de novo* de ácidos grasos (Shyan *et al.* 2000); La cepa Ab245p206AB expresa los genes *phbA* y *phbB* que codifican para estas enzimas respectivamente y al inducir a la transconjugante los niveles de PHB que se cuantifica a las 24 h es mayor con respecto a la silvestre, sin embargo no aumenta lo suficiente si comparamos la producción de PHB de esta transconjugante en los ensayos de inducción y los no inducidos a las 24 h.

La  $\beta$ -cetotiolasa y acetoacetyl-CoA reductasa no son específicas del ciclo del PHB, a la vez están involucradas en otras rutas metabólicas. La  $\beta$ -cetotiolasa se emplea en el paso inicial de la ruta de PHB condensando dos moléculas de acetyl-CoA, la reacción de condensación es un paso reversible y esta misma enzima es la responsable de la degradación de los gránulos de PHB ya que también se encarga de la escisión tiolítica de acetoacetyl-CoA en acil-CoA y acetyl-CoA; La segunda reacción del ciclo también es un proceso reversible y es la reducción de acetoacetyl-CoA a (R)-3-hidroxi-butiril-CoA por acetoacetyl-CoA reductasa (Trotsenko y Belova, 1999), es decir que aunque se sobreexpresó a *phbAB* en la cepa Ab245p206AB estamos estimulando la formación de los gránulos de PHB e incluso su utilización cuando la bacteria entre en un periodo de inanición.

En la tercera reacción del ciclo los monómeros de (R)-3-hidroxi-butiril-CoA son enlazados a una molécula de PHA existente por la formación de un enlace éster; La PHB polimerasa es específica y juega un papel importante en el ciclo del PHB. Al comparar la producción de PHB de la cepa Ab245p206ABC con la cepa Ab245p206AB a las 24 h en los ensayos de inducción y bajo las condiciones que se emplearon en este estudio, no se observa una diferencia significativa, aunque la PHB polimerasa es la enzima que promueve la vía del PHB y según nuestra hipótesis al sobreexpresar a los tres genes se incrementaría la acumulación de PHB, sin embargo lo reportado por Hiroe y colaboradores en el 2012, al variar el orden de tres genes que fueron clonados río abajo del promotor y los cuales se encontraban en forma de operón, determinan que el gen que se expresará más es el que se encuentre más cercano al promotor y que la fuerza de expresión disminuirá conforme el gen se aleje, en la transconjugante Ab245p206ABC el orden de los genes son *phbA*, *phbB* y por último *phbC*, al estar tan alejado el *phbC* del promotor puede que su expresión sea débil, dando una mayor expresión de *phbA* y *phbB*, es por ello que la producción de PHB es muy similar en la transconjugante Ab245p206ABC y Ab245p206AB cuantificando 3.9269 y 4.1040 mg PHB/mg proteína respectivamente, sin diferencia significativa entre ellas. Caso contrario se obtuvo 15.34 % mayor cantidad de PHB de la cepa Ab245p206C al ser comparada con Ab245p206ABC registrando 4.7335 y 4.1040 mg PHB/mg proteína respectivamente.

Como se ha mencionado la PHB polimerasa es la que induce la vía de síntesis de PHB, esta enzima no participa en algún otro ciclo por lo que el acetil-CoA estará entrando al ciclo de Krebs y al ciclo del PHB entre otros. El *phbC* fue el único gen clonado en el pMMB206 en esta transconjugante y al no estar tan alejado del promotor como es en el caso de Ab245p206ABC en el que *phbC* está al final de los otros dos genes que fueron clonados, transcribiéndose prioritariamente, por ende mayor cantidad de la enzima PHB polimerasa y en consecuencia habrá mayor cantidad de PHB acumulado, por lo cual la transconjugante con mayor acumulación de PHB, sería la que expresara en mayor cantidad al *phbC* y no tanto a los *phbAB* es por ello que al comparar al Ab245p206ABC en los ensayos de inducción con los no inducidos no hay diferencia significativa, esto pasa también en Ab245p206AB y en el caso de la cepa Ab245p206C produjo un 46.23% más que la WT, al comparar a la misma transconjugante en los ensayos de inducción con los no inducidos, se obtuvo un 62.5% más en la Ab245p206C.

## **XI.- Conclusiones.**

- Se amplificaron y clonaron los genes *phbAB* y *phbC*, en el vector pBluescript SK(-).
- Los genes *phbABC* fueron subclonados en fase en el plásmido pMMB206 y transferidos a *A. brasilense* Sp245.
- Se cuantificó la producción de PHB, la Ab245p206C produce 46.23% más PHB que la cepa WT. En ensayos de inducción esta cepa produce 62.5% más en la inducida. La cepa Ab245p206ABC no presentan diferencia significativa, en ensayos con y sin inductor.
- Bajo estas condiciones de cultivo no se observa que la transcripción de los genes en una disposición de operón redunde en una mejor producción de PHB.

## **XI.- Perspectivas.**

Realizar los ensayos de cuantificación de PHB de la transconjugante Ab245p206C en medio MM con desbalance C/N.

Conjugar la construcción p206C en la cepa *A. brasilense* Sp245 que contiene el gen *phbZ* mutado.

Realizar una RT-qPCR para medir el incremento de los niveles de mRNA de la transconjugante Ab245p206C.

## XII.- Bibliografía.

**Anderson, A. J., y Dawes, E. A.** (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev*, 54, 450-472.

**Bashan, Y.** (1999). Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. *Biol. Fertil. Soils*, 29, 246-256.

**Bashan, Y., Holguin, G. y De-Bashan L. E.** (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental Advances (1997-2003). *Can J Microbiol*, 50, 521-577.

**Beijerinck, M. W.** (1925) über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann?. *Centralbl. Bakt. II Abt.*, 63, 353-357.

**Bernd, H. y Rehm, A.** (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *applied and industrial microbiology*, 8, 578-592.

**Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.

**Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartsburd, B., Hampel M. y Okon, Y.** (1998). Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. *Microbiology*, 144, 1989-1999.

**Caballero, J., López, L., y Bustillos, R.** (1999). Presence of 16S rRNA genes in multiples replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 178, 283-288.

**Didonet, M. C., Chubatsu, L., Souza, E., Kleina, M., Rego, F., Rigo, L., Yates, G. y Pedrosa, F.** (2000). Genome structure of the genus *Azospirillum*. *J. Bacteriol.*, 182 (14), 4113-4116.

**Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-Gonzalez, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J. F., Kapulnik, Y., S. Brener, Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S. y Okon, Y.** (2001). Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol*, 28 (9), 871-879.

**Döbereiner, J.** (1983). Ten years *Azospirillum*. En W. Klingmüller (ed.), *Azospirillum* II: Genetics, physiology, and ecology. (pp. 9-23). Birkhauser, Basel Switzerland.

**Hiroe, A., Tsuge, K., Nomura, C. T., Itaya, M. y Tsuge, T.** (2012). Rearrangement of Gene Order in the *phaCAB* Operon Leads to Effective Production of Ultrahigh-Molecular-Weight Poly[(R)-3- Hydroxybutyrate] in Genetically Engineered *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (9), 3177-3184.

- Holguin, G., Patten, C. y Glick B.** (1999). Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. *Biol. Fertil. Soils*, 29, 10-23.
- Itzigsohn, R., Yarden, O. y Okon, Y.** (1995). Polyhydroxyalkanoate analysis in *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol*, 41, 73-76.
- Jendrossek, D.** (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J. Bacteriol*, 191, 3195-3202.
- Kadouri, D., Burdman, S., Jurkevitch, E. y Okon Y.** (2002). Identification and isolation of genes involved in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of *phbC* mutant. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, 2943-2949.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E. y Okon Y.** (2003). Poly  $\beta$ -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. *Arch. Microbiol*, 180, 309-318.
- Kadouri, D., Jurkevitch, E., y Okon, Y.** (2005). Ecological and Agricultural Significance of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Critical Reviews in Microbiology*, 31, 55-67.
- Kamneva, A. A., Tugarovaa, A. V., Tarantilisb, P. A., Gardinerc, P. H. E., y Polissiou, M. G.** (2011). Comparing poly-3-hydroxybutyrate accumulation in *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245: The effects of copper (II). *Applied Soil Ecology*, 61 (2012) 213-216.
- Katzy, E., Borisov, I. y Scheludko A.** (2001). Effect of the integration of vector pJFF350 into plasmid 85-Mda of *Azospirillum brasilense* Sp245 on bacterial flagellation and motility. *Russ. J. Genet.*, 37 (2), 183-189.
- Law, J. H. y Slepecky R. A.** (1961). Assay of poly-beta-hydroxybutyric acid. *J Bacteriol*, 82, 33-36.
- Madison L. y Huisman G.** (1999). Metabolic Engineering of Poly-3-Hydroxyalkanoates: from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews.*, 63, 21-53.
- Martínez Cámara R.** (2014). Sobreexpresión del gen *phbC* y producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato en *Azospirillum brasilense*. (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Martínez Martínez M. de los A.** (2014). Análisis de la sobreexpresión de los genes *phbA* y *phbB* en *Azospirillum brasilense* Sp7. (Tesis de maestría). Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Massena, V., dos Santos, K. y Pedraza, R.** (2011). What is expected from the genus *Azospirillum* as a plant growth-promoting bacteria?. En D. K. Maheshwari (ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. (pp.123-138). Verlag Berlin Heidelberg.
- Meng, D., Wang, Y., Wu, L., Shen, R., Chen, Wu, J., y Chen, Q. G.** (2015). Production of poly(3-hydroxypropionate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) from glucose by engineering *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 29, 189-195.
- Miller, S. A., Dykes, D. D. y Polesky, H. F.** (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16 (3), 1215.
- Morales, V. M., Bickman, A. y Bagdasarian, M.** (1991). A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants. *Gene*, 97, 39-47.
- Nuti, M. P., De Bertoldi, M., y Lepidi, A. A.** (1972). Influence of phenylacetic acid on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) polymerization and cell elongation in *Azotobacter chroococcum* Beij. *Can. J. Microbiol.* 18, 1257-1261.
- Pereg, L., Gilchrist, K., y Kennedy, I.** (2000). Mutants with enhanced nitrogenase activity in hydroponic *Azospirillum brasilense* wheat associations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (5), 2175-2184.
- Phadnis, S. H. y Das, H. K.** (1987). Use of the plasmid pRK 2013 as a vehicle for transposition in *Azotobacter vinelandii*. *J. Biosci.*, 2, 131-135.
- Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. R., y Nicolaus, B.** (2011). Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea*, 1-13.
- Potter, M., y Steinbuchel, A.** (2005). Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules*, 6, 552-560.
- Rehm, B. H.** (2006). Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: the key role of polyester synthases. *Biotechnol. Lett.*, 28, 207-213.
- Rodríguez-Caceres E. A.** (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and environmental microbiology*, 44 (4), 990-991.
- Rosales Cruz A.** (2015). Mutación del gen *phbZ* de *Azospirillum brasilense* Sp245. (Tesis de licenciatura). Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

**Sambrook J, y Russell DW.** (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (3rd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. y D'Ari, R.** (2007). *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J. Bacteriol*, 189, 23.

**Shyan, D., Ting, Y. y Yin, C.** (2000). Rapid detection of polyhydroxyalkanoate accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR. *Microbiol*, 146, 2019-2025.

**Steenhoudt, O. y Vanderleyden, J.** (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 487-506.

**Steyert, S. R. y Pineiro, S. A.** (2007). Development of a novel genetic system to create markerless deletion mutants of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 4717-4724.

**Thirunavukkarasu, N., Mishra, M. N., Spaepen, S., Vanderleyden, J., Gross, C. A. y Tripathi A. K.** (2008). An extra-cytoplasmic function sigma factor and anti-sigma factor control carotenoid biosynthesis in *Azospirillum brasilense*. *Microbiology*, 154, 2096-2105.

**Trotsenko Y. y Belova L.** (1999). Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3- hydroxyvalerate) and its regulation in bacteria. *Microbiol*, 69, 753-763.

**Van der Walle, G.A., de Koning, G.J., Weusthuis, G., y Eggink, G.** (2001). Properties, modifications and applications of biopolyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 71, 263-291.

**Wu, Q., Wang, Y., y Chen, G. Q.** (2009). Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol*, 37, 1-12.

## XII.- ANEXOS.

### I.- Medio Luria Bertani (LB) (Sezonov *et al.* 2007).

Es el medio nutricionalmente rico más utilizado para el crecimiento de cepas recombinantes de *E. coli*. El medio contiene peptona que es el producto de la digestión de la caseína de la leche, extracto de la levadura y puede ser complementado con un antibiótico que permite la selección de clonas de *E. coli* que han sido transformadas con el plásmido que confieren la resistencia a tal antibiótico (Sezonov *et al.* 2007).

Componentes para 1 L de medio

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua	Aforar a 1 L

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1 N y Esterilizar a 15 lb durante 20 min.

### II.- LB modificado (LB+) (Sezonov *et al.* 2007).

Es una versión modificada del LB al que se le adiciona cloruro de calcio y sulfato de magnesio. Esta modificación permite el crecimiento de bacterias tanto de *E. coli* como de otras bacterias Gram negativas entre ellas *Azospirillum* spp. las cuales requieren de cloruro de calcio y de sulfato de magnesio para su crecimiento. Además, el medio contiene peptona que es el producto de la digestión de la caseína de la leche y extracto de la levadura (Sezonov *et al.* 2007).

Componentes para 1 L de medio

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.367 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.616 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua	Aforar a 1 L

Ajustar el pH a 7.0 con NaOH 1 N y Esterilizar a 15 lb durante 20 min.

### III.- Rojo Congo (RC) (Rodríguez, 1982).

El medio permite el crecimiento y diferenciación de *Azospirillum* spp. de otras bacterias del suelo debido a la presencia del colorante rojo Congo, el cual es absorbido por las células produciendo colonias de color rojo escarlata. Es un medio muy útil para analizar la pureza del cultivo y descartar la contaminación con *E. coli* después de un proceso de conjugación o en la construcción de curvas de crecimiento basado en la cuenta de unidades formadoras de colonias. En este medio las cepas de *Azospirillum* forman colonias de color rojo escarlata de 1-2 mm de diámetro después de 48 h de crecimiento a diferencia de otros géneros como *E. coli* las cuales suelen ser de color blanco (Rodríguez, 1982).

Componentes para 1 L de medio

Componentes	Cantidad
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.50 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Extracto de levadura	0.50 g
Ácido málico	5 g
KOH	3g

Ajustar pH a 6.8 con KOH 1 N y agregar la siguiente cantidad de rojo Congo al 0.25%.

rojo Congo 0.25%	15 ml
Agar bacteriológico	15 g

Esterilizar a 15 lb durante 20 min.

### IV.- Medio Mínimo (MM) (Burdman *et al.* 1998).

El medio mínimo con base K-Malato se utiliza para el crecimiento de cepas de *Azospirillum brasilense* debido a que el malato es la fuente preferida de carbono para la mayoría de las cepas (Burdman *et al.* 1998).

Preparar sales, oligoelementos y base K-Malato por separado. Componentes para 1 L de medio

➤ Preparación de Sales y Oligoelementos

Sales	Oligoelementos
CaCl <sub>2</sub> 2%	MnSO <sub>4</sub> 2.5 g
FeCl <sub>3</sub> 1%	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.7 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.2%	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.14 g
NH <sub>4</sub> Cl 20%	CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.125 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub> 0.03 g

Esterilizar 5 lb por 30 min.

➤ Base K-Malato

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.87 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.67 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
NaCl	0.1 g
Ácido málico	5 g
KOH	3 g

Ajustar pH a 6.8 con KOH al 10% y esterilizar a 5 lb durante 30 min. Una vez que se ha esterilizado la base, dejar enfriar y agregar las siguientes soluciones en condiciones de esterilidad:

➤ Solución de sales y oligoelementos utilizados para 1 L.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
CaCl <sub>2</sub> 2%	1 ml
FeCl <sub>3</sub> 1%	1 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0.2%	1 ml
NH <sub>4</sub> Cl 20%	5 ml
Sol. de oligoelementos	1 ml

Esterilizar 5 lb por 30 min.

## V.- Extracción de DNA genómico de bacterias Gram negativas (Miller *et al.* 1998).

### Buffers y soluciones:

- Buffer SET
- Etanol al 70%
- RNasa 1 µg/ml
- Isopropanol
- Etanol

### Metodología:

1. Inocular 5 ml de medio (LB, LB+, RC o MM) con una sola colonia bacteriana. Incubar durante 16-18 h a 37°C a 175 rpm.
2. En un tubo eppendorf centrifugar de 3 a 5 ml del cultivo a 10 000 rpm durante 2 min. Decantar y remover el resto de medio de cultivo mediante aspiración con una micropipeta.
3. Resuspender el paquete celular en 570 µl de buffer SET.

4. Agregar 30 µl de SDS al 30%. Homogeneizar con vórtex a máxima velocidad durante 1 a 2 min para lisar las células.
5. Incubar a 80°C por 5 min, dejar enfriar a temperatura ambiente.
6. Adicionar 200 µl de NaCl 5 M y mezclar.
7. Centrifugar a 14 000 rpm por 10 min.
8. Separar el sobrenadante en un nuevo tubo y agregar 0.6 volúmenes de isopropanol o bien 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Mezclar la solución invirtiendo el tubo varias veces y dejar precipitando durante 5 a 10 min a -20°C.
9. Recuperar el DNA centrifugando a 14 000 rpm durante 15 min a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante por decantación cuidando de no perder el DNA que se visualiza como un precipitado blanco al fondo del tubo.
11. Lavar el DNA agregando 800 µl de etanol al 70%. Mezclar por inversión durante 30 segundos y centrifugar a 14 000 rpm durante 5 min. Repetir este proceso una vez más.
12. Eliminar por decantación la mayor cantidad posible de etanol. Después de decantar el tubo centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min y eliminar el resto de etanol con ayuda de una micropipeta o con un palillo de madera.
13. Colocar el tubo con la tapa abierta en un thermoblock a una temperatura de 45 a 65°C durante 10 min hasta evaporar completamente el resto de etanol.
14. Resuspender el DNA en 50 µl de una solución de RNasa 1 µg/ml e incubar durante al menos 15 min a 37°C.
15. Realizar una electroforesis con 3 o 5 µl de muestra de DNA plasmídico. El resto de la muestra almacenarla a 4°C o a -20°C si se desea preservar durante varios meses.

### Soluciones:

- |  |  |
|--|--|
| <p>➤ <b>SDS 30%</b></p> <p>Para 20 ml de solución:</p> <p>6 g SDS<br/>20 ml de H<sub>2</sub>O inyectable o bidestilada</p>   | <p>➤ <b>Buffer SET</b></p> <p>Para 50 ml de solución:</p> <p>0.292 g de NaCl (100 mM)<br/>0.01861 g de EDTA (1 mM)<br/>0.06057 g de Tris (10 mM)</p> <p>Ajustar a pH 8.0 con HCl. Esterilizar a 15 libras por 20 min y almacenar a temperatura ambiente o a 4°C.</p> |
| <p>➤ <b>Etanol al 70 %</b></p> <p>Para 100 ml de solución:</p> <p>70 ml de alcohol etílico absoluto<br/>30 ml de H<sub>2</sub>O inyectable o bidestilada</p> <p>Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente en un frasco ámbar.</p> | <p>➤ <b>Solución de RNAsa</b></p> <p>Para 1 ml:</p> <p>996 µl de agua inyectable<br/>4 µl de una solución stock que se encuentra a 10 mg/ml de RNAsa</p> <p>Almacenar a -20°C.</p>   |

## **VI.- Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS (Sambrook y Russel, 2001).**

El proceso inicia con el crecimiento de las células bacterianas que contienen el plásmido de interés. Cuando las células alcanzan una  $DO_{600}$  de 1.5 a 1.8 son centrifugadas. El paquete celular es resuspendido en una solución amortiguadora preparada con Tris y EDTA. El Tris ayuda a amortiguar los cambios de pH mientras que el EDTA es un quelante de iones metálicos como el  $Mg^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$  los cuales son esenciales para el funcionamiento de las DNAsas, evitando que puedan degradar el DNA. Posteriormente las células son tratadas con una solución de lisis que contiene hidróxido de sodio y SDS. El SDS es un detergente aniónico que ayuda a la solubilización de la membrana celular, permitiendo la liberación del DNA al sobrenadante. El NaOH ayuda a romper la pared celular y rompe los puentes de hidrógeno del DNA genómico desnaturalizándolo a una sola cadena. Aunque el NaOH desnaturaliza el DNA genómico, el DNA plasmídico, es más resistente a la desnaturalización. El DNA genómico desnaturalizado forma complejo con el SDS y es precipitado tras la adición de acetato de potasio y eliminado junto con los restos celulares en la etapa de centrifugación quedando sólo el DNA plasmídico en el sobrenadante. Finalmente el DNA se lava con etanol al 70% para eliminar el exceso de sales y es resuspendido en una solución de buffer de Tris y EDTA con RNasa para eliminar el RNA (Sambrook y Russel, 2001).

### **Buffers y soluciones:**

- Solución de lisis alcalina I
- Solución de lisis alcalina II
- Solución de lisis alcalina III
- Etanol al 70%
- Fenol puro en buffer tris-HCl
- Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)

### **Metodología:**

1. Inocular 5 ml de medio (LB, LB+, RC o MM) con una sola colonia bacteriana. Incubar a 37°C, durante 16 a 18 h a 175 rpm.
2. En un tubo Eppendorf centrifugar 3 ml del cultivo a 10 000 rpm durante 2 min a 4°C.
3. Remover el resto de medio de cultivo mediante aspiración con una micropipeta.
4. Resuspender el paquete bacteriano en 200 µl de solución de lisis alcalina I.
5. Agregar 400 µl de solución de lisis alcalina II a la suspensión bacteriana. Mezclar suavemente el contenido invirtiendo el tubo varias veces. Colocar el tubo en hielo.
6. Agregar 300 µl de solución de lisis alcalina III fría. Mezclar el contenido invirtiendo el tubo varias veces. Mantener el tubo en hielo durante 5 min.
7. Centrifugar el lisado bacteriano a 12 000 rpm durante 8 min a 4°C. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
8. Agregar 200 µl de fenol y 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por inversión durante 30 segundos y centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min a 4°C.

9. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo y agregar 400  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico. Mezclar por inversión durante 30 segundos y centrifugar a 12000 rpm durante 5 min.
10. Separar el sobrenadante en un nuevo tubo y agregar 0.6 volúmenes de isopropanol o bien 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Mezclar la solución invirtiendo el tubo varias veces y dejar precipitando durante 5 a 10 min a temperatura ambiente.
11. Recuperar el DNA centrifugando a 14 000 rpm durante 12 min a 4°C.
12. Eliminar el sobrenadante por decantación, cuidando de no perder el DNA que se visualiza como un precipitado blanco al fondo del tubo.
13. Lavar el DNA agregando 800  $\mu$ l de etanol al 70%. Mezclar por inversión durante 30 segundos y centrifugar a 14 000 rpm durante 5 min. Repetir este proceso una vez más.
14. Eliminar por decantación la mayor cantidad posible de etanol. Después de decantar el tubo centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min y eliminar el resto de etanol con ayuda de una micropipeta o con un palillo de madera.
15. Colocar el tubo con la tapa abierta en un thermoblock de 45 a 65°C durante 10 min, hasta evaporar completamente el resto de etanol.
16. Resuspender el DNA en 50  $\mu$ l de una solución de RNasa a una concentración de 1  $\mu$ g/ml e incubar durante al menos 15 min.
17. Realizar una electroforesis con 3 o 5  $\mu$ l de muestra de DNA plasmídico. El resto de la muestra almacenarla a 4°C o a -20°C si se desea preservar durante varios meses.

### Buffers y soluciones:

#### ➤ Solución de lisis alcalina I:

Cálculos para 50 ml de solución:

0.3028 g de Tris 50 mM  
0.1861 g de EDTA 10 mM

Ajustar a pH 8 con HCl.

#### ➤ Solución de lisis alcalina II:

Cálculos para 50 ml de solución:

0.4 g de NaOH 200 mM  
0.5 g de SDS 1%

Disolver ambos componentes en 40 ml de agua inyectable o bidestilada y aforar a 50 ml.

#### ➤ Solución de lisis alcalina III:

Cálculos para 50 ml de solución:

14.721 g de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K (acetato de potasio) 3.0 M

Ajustar a pH 5.5 con C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (ácido acético) concentrado. Esterilizar la solución I, II y III a 15 lb durante 20 min. Almacenar a temperatura ambiente la solución II y la soluciones I y III a 4°C.

#### ➤ Cloroformo /Alcohol Isoamílico (24:1)

Para 50 ml de solución:

48 mililitros de Cloroformo  
2 mililitros de Alcohol Isoamílico

Almacenar a 4°C en un frasco ámbar.

➤ **Etanol al 70 %**

Para 100 ml de solución:

70 ml de alcohol etílico absoluto  
30 ml de H<sub>2</sub>O inyectable o bidestilada

Almacenar a 4°C o a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

➤ **Solución de RNAsa**

Para 1 ml:

996 µl de agua inyectable  
4 µl de una solución stock que se encuentra a 10 mg/ml de RNAsa

Almacenar a -20°C.

## **VII.- Preparación de células competentes de *E. coli* utilizando cloruro de calcio (Sambrook y Russel, 2001).**

### **Medios y soluciones:**

- CaCl<sub>2</sub> 0.2 M frío (preparar el mismo día).
- CaCl<sub>2</sub> 0.2 M con glicerol (preparar el mismo día).
- Medio LB para el crecimiento inicial del cultivo.

### **Metodología:**

1. Preparar un precultivo bacteriano de *E. coli* inoculando 50 µl en 5 ml de medio LB, incubándolo a 37°C, a 175 rpm, durante 16 a 18 h.  
Nota: Antes de comenzar los lavados es necesario mantener en frío la solución de CaCl<sub>2</sub> 0.2 M y los tubos eppendorf en los que se dispensaran las células quimiocompetentes.
2. Tomar 500 µl del precultivo e inocularlo en 100 ml de medio LB en un matraz de 500 ml de capacidad. Incubar el cultivo a 37°C con agitación constante durante 4 a 4.5 h, monitoreando el crecimiento del cultivo para evitar que no alcance una DO<sub>600</sub> mayor a 0.4.  
Nota: Para una transformación eficiente es necesario una DO<sub>600</sub> de aproximadamente 0.4.
3. Transferir las células bacterianas a tubos fríos de polipropileno de 250 ml de capacidad. Enfriar el cultivo a 0°C colocando los tubos en hielo de 10 a 20 min.  
Nota: mantener las células en frío en todos los pasos posteriores para evitar estresar las células.
4. Recuperar las células mediante centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C.
5. Decantar el sobrenadante y resuspender suavemente el paquete celular en 30 ml de una solución fría de CaCl<sub>2</sub> 0.2 M. Dejar el tubo con las células en hielo durante 30 min.
6. Recuperar las células mediante centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C.
7. Decantar el sobrenadante y resuspender el paquete suavemente en 30 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.2 M frío. Dejar en hielo por otros 30 min.
8. Recuperar las células mediante centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min a 4°C.
9. Decantar sobrenadante y resuspender las células en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.2 M con glicerol estéril.

10. Dispensar alícuotas de 120 µl de la suspensión bacteriana en tubos eppendorf de 1.5 ml fríos. El rendimiento es de aproximadamente de 18 a 20 tubos de células.

**Soluciones:**

➤ **CaCl<sub>2</sub> 0.2 M**

Cálculos para 100 ml de solución:

2.94 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.2 M)

Esterilizar a 5 libras por 30 min y almacenar a 4°C .

➤ **CaCl<sub>2</sub> 0.2 M con glicerol.**

Cálculos para 2 ml de solución:

1.4 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.2 M  
600 µl de glicerol

Esterilizar a 5 libras por 30 min y almacenar a 4°C.

**VIII.- Transformación de células quimiocompetentes de *E. coli***  
(Sambrook y Russel, 2001).

**Materiales y medios de cultivo:**

- Células quimiocompetentes de *E. coli* en tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Placas de LB con los antibióticos apropiado.
- Thermoblock precalentado a 42°C.
- Tubos con 5 ml de medio LB.

**Metodología:**

1. Para transformar las células tratadas con CaCl<sub>2</sub>, sacar los tubos que contiene las células quimiocompetentes del ultracongelador y colocarlas en hielo durante 5 min.
2. Agregar la mezcla de ligación vector-inserto en un volumen de 20 µl de células quimiocompetentes. Mezclar el contenido golpeando los lados del tubo suavemente.
3. Almacenar los tubos en hielo por 10 min.
4. Colocar los tubos en termobloc precalentado a 42°C. Dejar los tubos durante 45 segundos; No mezclar los tubos.
5. Transferir los tubos rápidamente en hielo. Permitir que las células se enfrien durante 10 min.
6. Pasar las células transformadas a un tubo de 1.5 ml con medio LB. Incubar por una o dos h en una incubadora mantenida a 37°C con agitación de 175 rpm para permitir que las bacterias adquieran y expresen los marcadores de resistencia a antibióticos codificados por el plásmido.  
Nota: Mientras las células están en incubación, preparar las placas de LB con el antibiótico de selección. Si el plásmido transferido a las células contiene el fragmento de *lacZ* agregar a las placas ya gelificadas 50 µl de X-Gal 20 mg/ml.
7. Trasferir de 50 a 200 µl del cultivo en una de las placas de agar LB preparadas como se indicó anteriormente y dispersar por la superficie del medio con ayuda de un triángulo de vidrio estéril. Se recomienda sembrar por lo menos dos placas con diferentes volúmenes para asegurar que al menos una de ellas contenga colonias bien separadas, 200 µl y el resto del cultivo concentrado por centrifugación.

8. Incubar las placas toda la noche a 37°C. Una reacción de clonación eficiente puede producir varios cientos de colonias.
9. Seleccionar la mayor cantidad posible de colonias y resembrarlas en una nueva placa de LB con los antibióticos apropiados, colocando una cuadrícula enumerada en la base de la placa para identificar las clonas.
10. Incubar toda la noche a 37°C.
11. Seleccionar las clonas y sembrarlas en tubos de cristal, con medio LB y adicionando los antibióticos apropiados e incubar de 16 a 18 h a 37°C en agitación de 175 rpm.  
Nota: Sembrar una clona por tubo o bien grupos de 5 clonas. Alternativamente, se puede hacer PCR de colonia para encontrar la clona que contiene el plásmido deseado.
12. Aislar el DNA plasmídico de cada una de las clonas.
13. Realizar un análisis de restricción con las enzimas apropiadas para confirmar la presencia y orientación correcta del inserto. Utilice una enzima de restricción o una combinación de enzimas que corte una en el vector y una en el inserto. Otra forma de comprobar la presencia del inserto es mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el inserto.
14. Una vez identificada la clona correcta que contenga el inserto, estriarla en una placa de agar de LB que contenga los antibióticos apropiados e incubar a 37°C durante toda la noche.
15. Aislar una sola colonia e inocular en un tubo con 5 ml de LB con antibiótico. Crecer el cultivo hasta una fase estacionaria.
16. Transferir 1 ml de cultivo a un criovial que contenga 0.5 ml de glicerol estéril, mezclar y almacenar a -80°C.

## **IX.- Extracción de DNA de geles de agarosa (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit).**

### **Soluciones:**

- Solución ADB
- Solución DNA Wash Buffer
- Solución DNA Elution Buffer

### **Metodología:**

1. Correr la muestra de DNA mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % o a la concentración deseada.  
Nota: La banda a extraer debe tener una concentración de DNA de al menos 200 ng o más debido a que durante el proceso de extracción se pierde alrededor de un 20 % de DNA.
2. Colocar el gel en el transiluminador de luz UV de baja intensidad y cortar la banda con un bisturí.  
Nota: Utilice mascarilla y guantes; El corte se debe hacer lo más rápido posible para no sobreexponer el DNA a la luz UV.
3. Pesar la banda extraída en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

4. Añadir 3 volúmenes de la solución ADB por cada miligramo que pesa la agarosa extraída del gel (por ejemplo, para 100 mg del segmento del gel de agarosa, debe añadirse 300 µl de la solución ADB).
5. Se incuba de 37 a 55°C de 5 a 10 min, hasta que el segmento de gel se haya disuelto completamente.
6. Transferir la solución de agarosa fundida a una columna Zymo-Spin™, que a la vez este colocada sobre el tubo de recolección.
7. Centrifugar a 10 000 rpm de 30 a 60 segundos.
8. Desechar el sobrenadante y colocar el resto de muestra, en el caso de que aun falte muestra por pasar a través de la columna.
9. Añadir 200 µl de la solución DNA Wash Buffer a la columna y centrifugar durante 30 segundos a 10 000 rpm. Deseche el sobrenadante.
10. Repita el paso de lavado.
11. Cambiar la columna a un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregar la solución de elución DNA Elution Buffer o agua.
12. Centrifugar de 30 a 60 segundos a 10 000 rpm.

#### **X.-Ligación de vector con inserto (T4 DNA Ligase-Thermo Scientific).**

La reacción se realizó en base al protocolo de la enzima T4 DNA Ligase, de la marca Thermo Scientific. La reacción de ligación se realizó a un volumen de 20 µl y variando la relación inserto–vector a 1:1, 3:1 y 5:1.

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
Vector linearizado	20 a 100 ng
DNA (inserto)	Relación 1:1 o 3:1 o 5:1
10X T4 DNA Ligase Buffer	2 µl
T4 DNA Ligase	0.5 a 1 µl
Agua libre de nucleasa	Llevar a 20 µl

#### **XI.- Protocolo de conjugación *Azospirillum* spp. – *Escherichia coli*.**

##### **Medios:**

- LB+
- MM

##### **Metodología:**

1. Preparar un precultivo como se indica a continuación:
  - Receptora** (*Azospirillum* sp): medio LB+ sin antibiótico, incubar a 30°C, 150 rpm de 18 a 20 h.
  - Donadora** (*E. coli* DH5α con el plásmido a trasferir): medio LB+ con antibiótico de selección, incubar a 37°C, 150 rpm de 16 a 18 h.
  - Helper** (*E. coli* S17.1 con el plásmido pRK2013): medio LB+ con antibiótico de selección, incubar a 37°C, 150 rpm de 16 a 18 h.
2. A partir del precultivo sembrar:

**Receptora:** 50 µl de precultivo en 5ml de medio LB modificado y llevar a incubación a 30°C con agitación a 150 rpm hasta alcanzar una DO600 de 0.5 a 0.6.

**Donadora y Helper:** 50 µl de precultivo en 5 ml de medio LB modificado con antibiótico de selección y llevar a incubación a 37°C con agitación a 150 rpm hasta alcanzar una DO600 de 1.0.

3. Centrifugar 1 ml de cada una de las cepas a 7 500 rpm por 3 min, lavar el paquete con 500 µl de LB+ (2 veces). Resuspender el paquete celular con 20 µl de medio LB+.
4. Mezclar todas las bacterias en un mismo tubo y con una micropipeta transferir todo el volumen en forma de punto a una placa de LB+ sin antibiótico. Incubar la placa durante 24 h a 30°C.
5. Pasado el tiempo de incubación, con ayuda de un asa redonda tomar todo el crecimiento del punto de contacto y pasarlo a un tubo de 13x100 con 1 ml de MM, agitar suavemente para disgregar la asociación bacteriana. Centrifugar el cultivo a 7 500 rpm por 3 min y lavar dos veces con 1 ml de MM. Resuspender el paquete celular en 1 ml de MM.
6. Tomar 100 µl del cultivo y dispersarlo en una placa de MM adicionado con el antibiótico de selección. Hacer al menos 4 diluciones a partir del concentrado. Incubar durante 24 a 48 h a 30°C, conservar el resto del cultivo a 4°C.
7. Las placas se deben revisar a las 24 h de crecimiento debido a que en este tiempo aparecen las primeras posibles transconjugantes, las cuales se deben seleccionar en una nueva placa con el antibiótico adecuado. Volver a incubar la placa hasta las 48 h y revisar el crecimiento. Después de las 72 h se suelen observar pequeñas colonias que se hicieron resistentes al antibiótico y por lo tanto no deben ser incluidas en el análisis.
8. Pasado el tiempo de incubación seleccionar las transconjugantes obtenidas y sembrarlas en placas de MM con antibiótico, poniendo una cuadrícula enumerada en la base de la placa. Incubar de 24 a 36 h a 30°C. Se recomienda hacer al menos dos pases consecutivos en MM para la eliminación de la cepa donadora.
9. Finalmente realizar ensayos de contra selección, PCR, hibridación, etc. para comprobar la transconjugante.

## **XII.- Protocolo de cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976).**

### **Reactivos y soluciones:**

- Buffer PBS
- Agua destilada
- NaOH 1N
- HCl 0.5 N
- Reactivo de Bradford

### **Metodología:**

1. Preparar un cultivo bajo la condición deseada.

2. Una vez que el cultivo ha alcanzado la  $DO_{600}$  o el tiempo de crecimiento deseado, tomar 200  $\mu$ l del cultivo y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
3. Centrifugar a 12 000 rpm por 6 min y decantar el sobrenadante.
4. Lavar la pastilla con 1 ml de PBS.
5. Centrifugar a 12, 000 rpm durante 5 min y decantar el sobrenadante; Remover el resto mediante la aspiración con una micropipeta.
6. Lavar la pastilla con 200  $\mu$ l de agua destilada.
7. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min y decantar el sobrenadante; Remover el resto de agua mediante aspiración con una micropipeta.
8. Agregar 200  $\mu$ l de NaOH 1 N.
9. Colocar los tubos en baño María o en termobloc y llevar a ebullición durante 5 min y dejar enfriar.
10. Agregar 400  $\mu$ l de HCl 0.5 N y mezclar.
11. Agregar 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford (BIORAD), homogenizar con vórtex. Preparar un blanco utilizando agua (800  $\mu$ l de agua y agregar 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford). Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
12. Pasar la mezcla a celdas de 1 ml. Leer la absorbancia a 595 nm.
13. Determinar los miligramos de proteínas totales/ml utilizando la fórmula de la curva estándar.

**Buffer:**

- Buffer PBS 1X

<b>Componentes</b>	<b>Cantidad</b>
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8 mM

**XIII.- Protocolo de cuantificación de PHB (Slepecky y Derecho, 1961).**

**Reactivos y soluciones:**

- MgSO<sub>4</sub> 10 mM
- NaHCl (hipoclorito de sodio)
- Agua destilada
- C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (Acetona)
- C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O (Etanol)
- Cloroformo
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Metodología:**

1. Realizar un preinóculo con 18 h de crecimiento a 30°C en agitación de 175 rpm en un tubo con 5 ml de medio mínimo utilizando los antibióticos de selección correspondientes.
2. Inocular usando el precultivo anterior ajustando la DO600 de 0.1, utilizando la fórmula de equilibrio de concentraciones ( $C_1V_1=C_2V_2$ ) a un matraz de 125 ml con 50 ml de MM utilizando los antibióticos de selección correspondientes e incubar a 30°C, 175 rpm por 24, 48 y 72 h.

3. En un tubo eppendorf de 1.5 ml, centrifugar 5 ml del cultivo a 10 000 rpm durante 3 min.  
Nota: Al tomar muestra de uno de los matraces, tomar al menos 6 ml del cultivo (5 ml para cuantificar PHB 1 ml para cuantificar proteínas).
4. Descartar sobrenadante.  
Nota: Remover el resto de medio de cultivo mediante aspiración con una micropipeta hasta tener sólo el paquete celular.
5. Lavar la pastilla con 1 ml de  $MgSO_4$  10 mM.
6. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min y decantar el sobrenadante.
7. Resuspender la pastilla con 1 ml de hipoclorito de sodio (NaHCl) marca comercial Cloralex , incubar 1:30 h a 37°C.
8. Centrifugar a 12 000 rpm durante 10 min y decantar el sobrenadante cuidadosamente.
9. Lavar la pastilla con 1 ml de agua destilada.
10. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min y decantar el sobrenadante; Remover el resto de agua mediante aspiración con una micropipeta.
11. Lavar la pastilla con 1 ml de Acetona.
12. Centrifugar a 12 000 rpm durante 10 min y decantar el sobrenadante.
13. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 100%.
14. Centrifugar a 12 000 rpm durante 20 min a 4°C.
15. Decantar el sobrenadante y remover el resto de etanol mediante aspiración con una micropipeta.
16. Dejar evaporar el etanol en termobloc precalentado a 45°C.
17. Resuspender la pastilla con 1 ml de cloroformo y pasar la solución a un tubo de vidrio de 12 ml.
18. Enjuagar nuevamente el tubo eppendorf con 1 ml de cloroformo y verterlo en el mismo tubo de vidrio.
19. Evaporar el cloroformo a 65°C.
20. Adicionar 5 ml de  $H_2SO_4$  concentrado.
21. Calentar a 95°C durante 30 min y dejar enfriar.
22. Leer absorbancia a 235 nm (luz UV) frente a una muestra blanco de  $H_2SO_4$  concentrado y calentarlo previamente durante 30 min a 100°C.

#### XIV.- Curva de calibración de BSA.

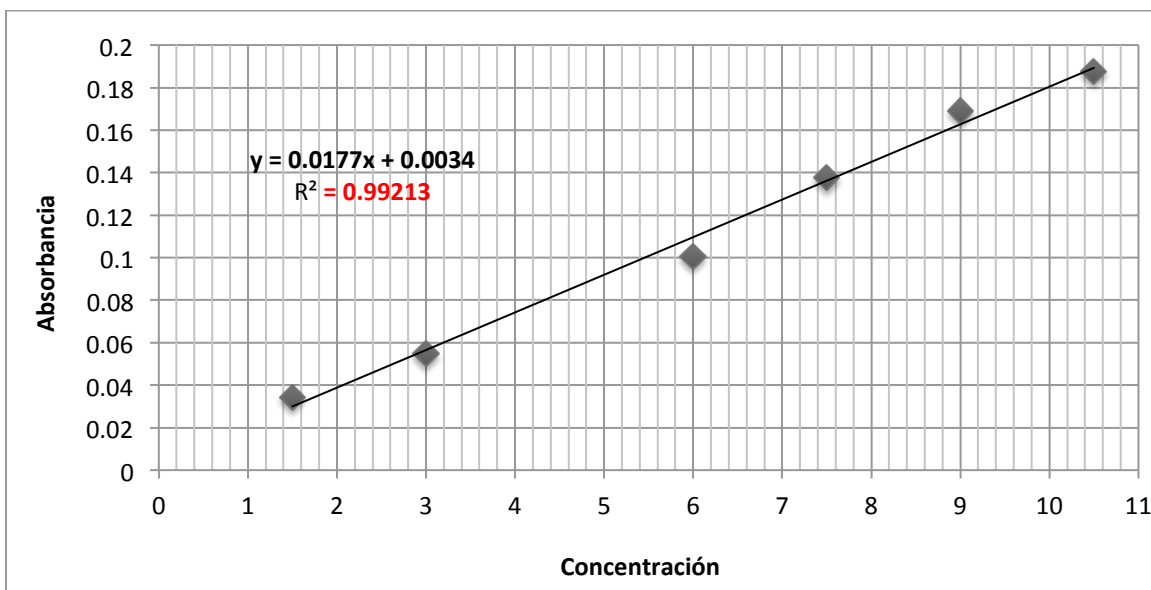


Figura A.- Curva de calibración de BSA por el método de Bradford.

Tabla A.- Datos tabulados de la concentración con respecto a la absorbancia.

Muestra	Concentración	Absorbancia
1	1.5 µg/ml	0.0343
2	3 µg/ml	0.0549
4	6 µg/ml	0.1005
5	7.5 µg/ml	0.1378
6	9 µg/ml	0.1691
7	10.5 µg/ml	0.1878

#### XIV.- Curva de calibración de PHB.

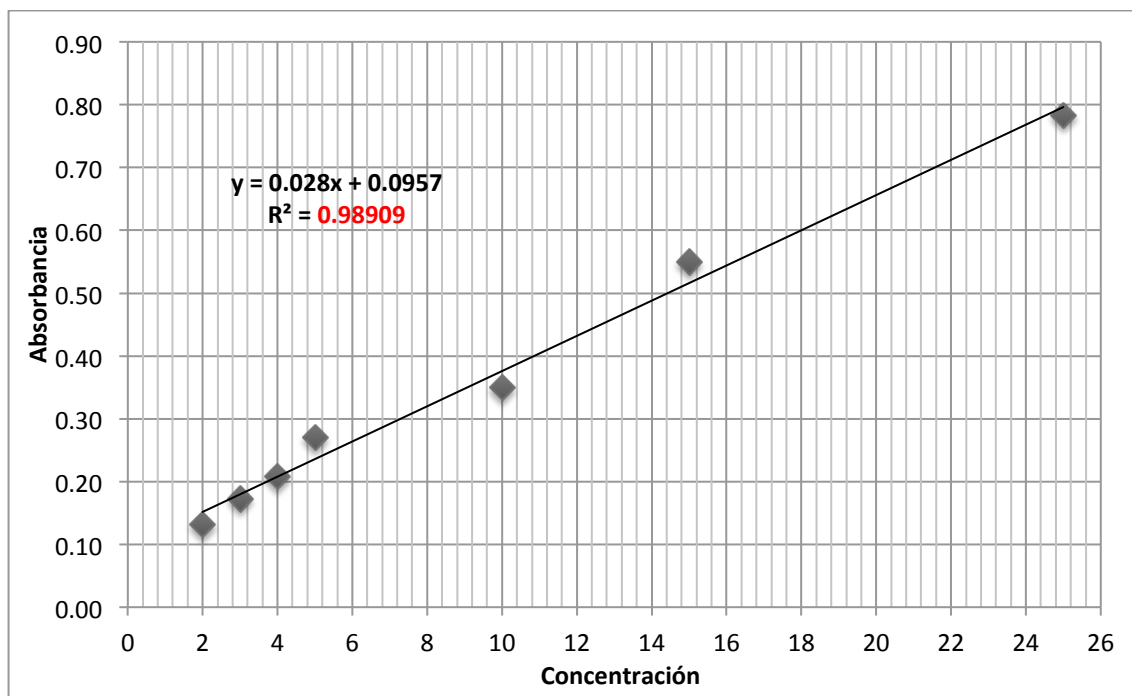


Figura B.- Curva de calibración de PHB por la técnica de Slepecky y Derecho, 1961.

Tabla B.- Datos tabulados de la concentración con respecto a la absorbancia.

Muestra	Concentración	Absorbancia
1	2 $\mu\text{g/ml}$	0.1318
2	3 $\mu\text{g/ml}$	0.1718
3	4 $\mu\text{g/ml}$	0.2082
4	5 $\mu\text{g/ml}$	0.2701
5	10 $\mu\text{g/ml}$	0.3498
6	15 $\mu\text{g/ml}$	0.5495
7	25 $\mu\text{g/ml}$	0.7825