

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS FERMENTADORAS TIPO ZYMONOMAS MOBILIS, MEDIANTE LA DETECCIÓN DEL GEN PDC Y SECUENCIACIÓN DE LOS GENES 16SRDNA Y RPOB.

ISOLATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FERMENTING BACTERIA ZYMONOMAS MOBILIS TYPE, BY DETECTING THE PDC GENE AND GENE SEQUENCING 15SRDNA AND RPOB.

Carlos Alberto Muñoz Cajiao,
Ing. Químico

Programa de Biotecnología, Biología Molecular e Ingeniería Genética,
Universidad de Guayaquil, ciudadela Salvador Allende, Av. Kennedy y Av.
Delta. Facultad de Ciencias Médicas. Teléfono 2281665 Guayaquil, Ecuador
email: dakarube@hotmail.com

RESUMEN

El presente trabajo se basa en la identificación y caracterización molecular de los genes pdc (piruvato decarboxilasa), impulsores en la producción de alcohol etílico que se encuentran en las cepas aisladas de las bacterias *Zymomonas mobilis*, obtenidas del agave, que es un lixiviado de la planta cabuya, de la Provincia del Tungurahua, Ecuador. Para este fin, se hizo uso de la secuenciación de los genes 16 SrDNA y rpoB. Para la caracterización de las cepas aisladas mediante técnicas de cultivo, se empleó iniciadores universales del gen 16S del ARN ribosómico (16S rRNAF/R) y del gen de la ARN polimerasa dependiente de ADN (rpoβF/R). Para confirmar si las cepas aisladas correspondían al género *Zymomonas* se secuenciaron los productos de amplificación obtenidos con los iniciadores 16SrRNA514F/805R; rpoβ 2041F/2063F/3202R; y pdcfw1/RV1 respectivamente. Con la ayuda del GenBank se pudo determinar que la secuencia obtenida correspondía al gen pdc de la bacteria *Zymomonas mobilis*.

PALABRAS CLAVES: genes pdc, 16SrDNA, rpoB y *Zymomonas mobilis*.

ABSTRACTS

The present paper is based on pdc (piruvato decarboxilasa) genes molecular characterization and identification, promoters in ethylic alcohol yield, found in *Zymomonas mobilis* bacterias isolated stream obtained them from agave that is a lixiviatc fluid of cabuya plant, provincial del Tungurahua, Ecuador. In order to obtain this proposal, it was used 16SrDNA y rpoB genes sequencing. To Characterization of isolated strains by culture thecniques, It was used ADN (rpoβF/R)genes and ADN' depending ARN polimerase (rpoβF/R) universal initiators. To confirm if isolated strains belongs to Lymomonas mobilis type, amplified samples (amplicon) obtained with initiators 16SrRNA514F/805R; rpoβ2041F/2063F/3202R and pdcfw1/RV1 were sequenced, respectively. By online Genbank assistance it could determined that obtained sequence corresponded to *Zymomonas mobilis* bacteria pdc genes.

KEY WORDS: pdc, 16SrDNA, rpoB y *Zymomonas mobilis* genes.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el interés de encontrar fuentes sustitutas de energía ha llevado a investigar nuevas alternativas que han confluído en la generación del biocombustible.

Los biocombustibles se presentan como una alternativa a los combustibles fósiles debido a su carácter renovable y a su menor impacto ambiental. De entre ellos, el etanol es uno de los combustibles alternativos con mayor crecimiento en producción en los últimos años (Ames J., Werner C., 2003).

La mayoría del etanol producido en la actualidad deriva de la fermentación de azúcares fácilmente extraíbles de los cereales (maíz, cebada, etc.), caña de azúcar y otras fuentes azucaradas. Recientemente se ha comenzado a cuestionar la producción de etanol a partir de estos vegetales ya que podría alterar el ecosistema.

Para evitar estos inconvenientes se están realizando investigaciones con el fin de encontrar fuentes naturales alternativas para la producción de etanol mediante la utilización de microorganismos. De entre las fuentes naturales alternativas para la producción de etanol, la biomasa lignocelulósica aparece como una de las más adecuadas. La biomasa lignocelulósica incluye residuos forestales y agroindustriales (serrines, restos molienda, fabricación papel, etc.).

Dentro de los principales microorganismos responsables de la fermentación en la producción de alcohol se encuentran las levaduras, mohos y bacterias, cada uno de estos microorganismos posee una característica propia sobre la fermentación que es capaz de provocar.

Una de las características de las bacterias del género *Zymomonas* no necesitan ser inmovilizadas para tener eficacias de fermentación alta. (Kim Ch. et al., 1992) Aunque la misma no puede ser empleada para la fermentación alcohólica de cerveza o sidra, debido a que produce sabores y olores desagradables.

No obstante posee una alta resistencia a sobrevivir a concentraciones elevadas de etanol, lo que la convierte en una bacteria ideal en la generación de etanol para usos no comestibles, como son los biocombustibles.

La presente investigación fue enfocada en el aislamiento y caracterización molecular de bacterias fermentadoras tipo *Zymomonas*

mobilis, mediante la detección del gen *pdC* y secuenciación de los genes *16SrDNA* y *rpoB*

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra

El aislamiento de las cepas de *Zymomonas mobilis* fueron obtenidas del laboratorio de la Facultad de Ingeniería Química, cedidas por los Ing. Ricardo Abarca Araúz y Verónica Navarrete.

Muestra control

La cepa de *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* E-82099 utilizada en este estudio como control positivo, fue adquirida a VTT Culture Collection, Finlandia. La cepa utilizada fue cultivada en caldo PYG (cantidades en gr/L: Glucosa 10, Extracto de levadura 2.5, Peptona 5, pH= 6.8) a 30°C durante 72 horas permitiendo la reactivación bacteriana y luego sub-cultivarla en caldo PYG y volverla a congelar a -80°C en presencia de 15% de glicerol para su conservación.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método de CTAB (Underwood SA, et al., 2002), como sigue: 3 ml de cultivo bacteriano fueron centrifugados a 10,000 rpm durante 1 minuto hasta obtener un sedimento del cultivo.

Luego se descartó el sobrenadante y se le suspendió en 567 µl de solución de lavado 1 más 30 µl de solución de lisis, homogenizándose por vórtex hasta obtener una suspensión homogénea, luego se adicionó 3 µl de Proteinasa K, homogenizándose e incubó a 37°C por 1 hora.

Una vez concluido el tiempo de incubación se adicionó 100 µl de solución de lisis 2 y mezcla nuevamente.

De ahí se añadió 80 µl de solución de lisis 3 (previamente calentada a 65°C) para incubar nuevamente a 65°C por 10 min., luego de esto se incubó con 1 µl de ARNasa por 1 hora a 37°C para la degradación del ARN contaminante en la extracción, a continuación se añadió 1 volumen de la mezcla de la solución de purificación 2a y 2b (proporción 24:1), se homogenizó durante 2 minutos hasta formar una emulsión y centrifugó a 12,000 rpm por 5 min, transfiriéndose la fase superior (500 µl) a un nuevo tubo y se añadió 250 µl de solución de

purificación 1 con 250 µl de la mezcla de la solución de purificación 2a y 2b (proporción 24:1), homogenizar durante 2 minutos hasta formar una emulsión y nuevamente se centrifugo 12000 rpm 5 min., transfiriéndose 400 µl de la fase superior a un nuevo tubo al cual se le adicionó para precipitar el ADN 0,6 vol.

De la solución de precipitación enfriada (240 µl) incubándose por 20 min a -20°C luego se centrifugo a velocidad máxima por 5 min., se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con 1000 µl de solución de lavado 2, se volvió a centrifugar por 5 min., eliminándose el sobrenadante y se dejó secar por 15 min. a temperatura ambiente para luego re suspender el pellet en 50 µl de re suspensión previamente calentada a 65°C.

Luego de la extracción, al ADN se le midió la concentración y pureza empleando un Biofotómetro marca Eppendorf mediante la medición de la absorbancia de la muestra de ADN extraído diluyendo 1 µl de la muestra extraída en 59 µl de la Solución de re suspensión.

Diseño de iniciadores para el gen piruvato decarboxilasa (pdc)

Los iniciadores fueron elaborados con la ayuda del software online Primer3 teniendo en cuenta las características estándar de diseño (200-500 nt; temperatura de 50-60°C, 40-80%GC) a partir de las secuencias del gen PDC (número de accesión: M20667.1) de un alineamiento múltiple en los programa MEGA 5 y ClustalW (on-line) de 25 secuencias de organismos diferentes que presentan el gen PDC (G. Huerta-Beristain, et al, 2004) con lo cual se permitió diferenciar *Zymomonas mobilis* de otros organismos que contenían el gen PDC (Alan D. Neale, et al., 1987).

De las secuencias diseñadas se evaluó su especificidad mediante el programa on-line Blast frente a la base mundial de secuencias.

Caracterización molecular de las colonias aisladas.

A partir del ADN extraído de las colonias (A y B) aisladas de las muestras de pulque, se procedió a amplificar y secuenciar los genes PDC, 16S rRNA y rpoβ empleando los iniciadores pdcfw1/RV1, 16SrRNA514F/805R y rpoβ 2041F/2063F/3202R, respectivamente (Case RI, Boucher Y, et al., 2007)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de los iniciadores

Para el diseño de iniciadores se alinearon 25 secuencias de organismos que contienen el gen PDC (Tabla N°.1), observándose que el gen PDC de *Zymomonas mobilis* presenta una homología de: 68% y 51% con los procariotas *Zymobacter palmae* y *Sarcina ventriculi*, respectivamente; un 95%, 64%, 55%, 53%, 51%, 49% con las levaduras *Pichia jadinii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Candida tropicalis* y *Candida dubliniensis* respectivamente; un 53% y 52% con los hongos basidiomycetos *Laccaria bicolor*, *Coprinopsis cinérea*, respectivamente; un 52%, 51%, 54%, 53%, 54%, y 51% con los hongos ascomicetos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Neosartorya fisheri*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Ajellomyces capsulatus*, *Penicillium marneffeii*, , respectivamente; y con las plantas *Pisum sativum*, *Ricinus communis* y *Nicotiana tabacum* 56%,52% y 54%, respectivamente.

Observando que la secuencia del gen PDC de *Zymomonas mobilis* muestra gran diferencia con las secuencias del gen PDC publicado en diferentes estudios pertenecientes a otros organismos y los iniciadores desarrollados presentaron homología del 95-100% con 6 secuencias de *Zymomonas mobilis* publicadas. (Tabla No.1)

Permitiendo así diseñar iniciadores que amplificaban una región del gen PDC, de los cuales los iniciadores pdcfw1/pdcVR1 fueron los que mejores condiciones termodinámicas presentaban logrando obtener un fragmento de 666 pb, los mismos presentaron una homología y cobertura del 100% con secuencias del gen PDC de *Zymomonas mobilis* (números de accesión: HM235920, AE008692, CP001722, AB359063, M15393, X59558, AF124349 M15368, M20667) y permitía diferenciarla de otras secuencias de genes PDC.

Tabla No. 1.- Alineamiento múltiple de 25 organismos empleados para el desarrollo de iniciadores específicos de *Zymomonas mobilis* para amplificación del gen *pdc*. Se incluye listado de secuencias, número de accesión y porcentaje de similitud de organismos alineados para el diseño de iniciadores específicos de *Zymomonas mobilis* para de detección del gen *pdc*.

Nº organismo	Número de accesión	Nombre científico	% de similitud
1	AF474145	<i>Zymobacter palmae</i>	68%
2	AF354297	<i>Sarcina ventriculi</i>	51%
3	AB489119	<i>Pichia jadinii</i>	95%
4	NM_001018196	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	64%
5	NM_001182021	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55%
6	XM_002492352	<i>Pichia pastoris</i>	53%
7	XM_002545405	<i>Candida tropicalis</i>	51%
8	XM_002420203	<i>Candida dubliniensis</i>	49%
9	XM_001875854	<i>Laccaria bicolor</i>	53%
10	XM_001835619	<i>Coprinopsis cinérea</i>	52%
11	XM_002374626	<i>Aspergillus flavus</i>	52%
12	XM_726388	<i>Aspergillus fumigatus</i>	51%
13	XM_001257350	<i>Neosartorya fischeri</i>	54%
14	XM_002795760	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	53%
15	XM_001542350	<i>Ajellomyces capsulatus</i>	54%
16	XM_002143931	<i>Penicillium marneffeii</i>	51%
17	Z66543	<i>Pisum sativum</i>	56%
18	XM_002514599	<i>Ricinus communis</i>	52%
19	X81854	<i>Nicotiana tabacum</i>	54%
20	M15393	<i>Zymomonas mobilis</i>	95%
21	AB359063	<i>Zymomonas mobilis</i>	95%
22	M15368	<i>Zymomonas mobilis</i>	95%
23	M20667	<i>Zymomonas mobilis</i>	100%
24	X59558	<i>Zymomonas mobilis</i>	95%
25	AF124349	<i>Zymomonas mobilis</i> ZM4	98%

Fuente: Elaboración propia

Extracción de ADN

El protocolo de extracción utilizando el kit proporcionado por el proveedor permitió la obtención de ADN de buena calidad, debido al empleo de pasos de purificación incluidos. Esto permitió que para las pruebas posteriores tener un ADN de óptima calidad. Se pudo obtener 142 µg/ml de ADN con pureza de 1.88 a partir de un cultivo bacteriano con una densidad óptica de 0.5, lo cual estaba dentro de los rangos óptimos para considerarse como una buena extracción. Adicionalmente el ADN extraído migrado en un gel de agarosa al 1% mostró una buena calidad del mismo (Figura 1).

Reacción en cadena de la polimerasa

Los iniciadores utilizados en el estudio, así como para las pruebas de sensibilidad y especificidad estaban dirigidos hacia una región de 666 pb. (Figura 2), de la secuencia del gen *pdc* de *Zymomonas mobilis*, gen esencial en el proceso de obtención de etanol a partir de soluciones azucaradas,

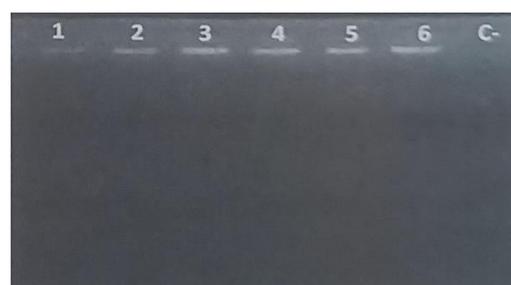


Figura 1.- Migración en gel de agarosa al 1% de ADN extraído mediante protocolo de CTAB. 1-2: ADN cepa B; 3-4: ADN cepa A; 5-6: Cepa control; C-: control negativo.

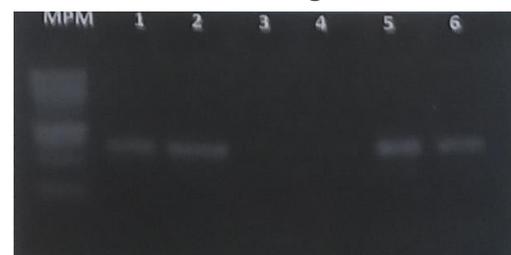


Figura 2.- Resultados de amplificación mediante PCR de muestras positivas de *Zymomonas mobilis*. MPM: Marcador de Peso Molecular; 1-2 muestra colonia A, 3 muestra colonia B; 4 control negativo; 5-6 controles positivos (cepa control de *Zymomonas mobilis*)

las condiciones de amplificación fueron estandarizados para ser empleados en una prueba de PCR con una temperatura de hibridación de 57°C, lo cual permitió obtener amplificación con la colonia A, mientras que de la colonia B no se pudo obtener amplificación con estos iniciadores.

Prueba de Sensibilidad

A partir de 540 µg/ml de ADN extraído se realizó las diluciones seriadas (factor 10) desde el tubo inicial (540 µg/ml) hasta una dilución 10-7 (54 pg/ml). En el análisis por PCR de las diluciones sucesivas realizadas a partir del ADN inicial extraído hasta una dilución 10-7 En el análisis por PCR de las diluciones sucesivas realizadas a partir del ADN inicial extraído hasta una dilución 10-7 se observa que la PCR es capaz de detectar hasta una dilución 10-5 (5.4 ng/ml; 5.4 pg/µl, no observable en la foto). Todos los productos obtenidos de las amplificaciones tuvieron el tamaño correspondiente aproximado para el fragmento que amplificarían los iniciadores pdcfw1/Revi, dando un fragmento de aproximadamente 666 pb. (Figura 3).

Prueba de Especificidad

Con el objeto de verificar que los iniciadores pdcfw1/VR1 solo detectaban las cepas de *Zymomonas* se procedió a evaluar su especificidad. Luego de haber realizado el alineamiento múltiple y observado que los iniciadores no detectarían ninguna de las secuencias alineadas con anterioridad debido a que las secuencias de *Zymomonas* mantenían una Similitud promedio con hongos del 52%, con levaduras en un 61% dentro de las cuales la más cercana era *Pichia jadinii* (95%) y que se asemejaba solo en un 55% con su principal organismo competidor etanologenico *Saccharomyces cerevisiae* esto permitió el diseño de iniciadores específicos de especie Para las pruebas de especificidad se evaluaron 5 cepas de bacterias para determinar la especificidad de los iniciadores pdcfw1/Rev1, con lo cual en 4 cepas evaluadas no se obtuvo amplificación, mientras que se obtuvo amplificación en una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) (aproximadamente 300 pb.), así como en las cepas de *Zymomonas* utilizadas como control positivo en las cuales se obtuvo el respectivo producto amplificado del tamaño esperado (666 pb. aprox.). (Figura 4)



Figura 3.- Resultados de amplificaciones con los iniciadores pdcfw1/rv1 en diluciones sucesivas para determinar la sensibilidad de la prueba. MPM: Marcador de peso molecular 1: dilución 10-1; 2: dilución 10-2; 3 dilución 10-3; 4 dilución 10-4; 5 dilución 10-5; 6 dilución 10-6; 7 dilución 10-7; 8-9 control negativo



Figura 4.- Resultados de prueba de especificidad de los iniciadores pdcfw1 / rv1. MPM: Marcador de peso molecular; 1: *Vibrio cholerae*; 2: *Shigella* sp.; 3: *Salmonella* entérica; 4: *Escherichia coli*; 5-6 *Zymomonas mobilis*; 7: *Streptococcus* sp.; 8-9 control negativo.

CONCLUSIONES

La PCR es considerada como uno de los métodos más sensibles para la detección de microorganismos que se encuentran presentes en pequeñas concentraciones y que no pueden ser detectados mediante técnicas de cultivo convencionales. Aunque la PCR puede ser utilizada sobre muestras medioambientales, los mejores resultados se obtienen a partir de cultivos puros, esto debido al sin número de compuestos inhibidores de la actividad de polimerización de la Taq. ADN polimerasa.

El método de extracción de ADN con CTAB proporciona un ADN de buena calidad que puede ser utilizado en pruebas moleculares que necesiten ADN de extrema pureza, debido al empleo de componentes que permiten eliminar contaminantes durante las etapas de la extracción.

Los iniciadores desarrollados para la detección del gen pdc permitían una correcta detección del mismo dentro de las cepas aisladas del medio ambiente como en la cepa control.

Para una correcta identificación de cepas bacterianas la amplificación y secuenciación de genes universales blanco como son el gen 16S rRNA, rpoβ y del gen mismo gen pdc son

necesarias ya que permiten confirmar los resultados obtenidos mediante técnicas convencionales.

De acuerdo a los resultados la secuenciación de estos tres genes permitió confirmar la presencia del género *Zymomonas* en los aislados obteniéndose similitudes de 86%, 100% y 100% para los genes 16S rRNA, *rpoB* y PDC respectivamente.

En el análisis de sensibilidad de la técnica de amplificación sin necesidad de pre-enriquecimiento de la muestra se observa que la sensibilidad de detección es de 5,4 ng/ml de ADN extraído después de 5 hrs. de cultivo y un OD de 0.4 (cantidad de colonias aproximada de 8×10^7),

lo cual con un mayor tiempo de cultivo hasta alcanzar una OD de 0.5 o más permitiría un mayor nivel de sensibilidad de la prueba.

Debido a la gran similitud con genes relacionados en otras especies etanológicas y su interés de poder por ingeniería genética modificar otras cepas bacterianas para que sean capaces de producir alcohol que pueda ser empleado como carburante, es necesario la búsqueda e implementación de técnicas que permitan la detección de otros genes que son de gran importancia en el proceso tanto de producción de alcohol como en la capacidad de poder soportar otros sustratos que naturalmente *Zymomonas* no es capaz de degradar para convertirlo en materia prima en el proceso de producción de alcohol.

REFERENCIAS

1. Ames J., Werner C. 2003. Reaching the environmental community: Designing an information program for the NREL biofuels program. National Renewable Energy Laboratory. Golden, CO, EEUU. 93 pp.
2. Kim Ch., Abidin Z., Ngee Ch., and Rhee SK. 1992. Pilot-Scale Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis* from Simultaneously Saccharified Sago Starch. *Bioresource Technology* 40: 1-6.
3. Underwood SA., Zhou S., Causey TB., Yomano LP., Shanmugam KT, and Ingram LO., 2002. Genetic Changes To Optimize Carbon Partitioning between Ethanol and Biosynthesis in Ethanologenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, No. 12., p. 6263-6272
4. G. Huerta-Beristain, J. Utrilla-Carreri, G. Hernández-Chávez, F. Bolívar, G. Gosset y A. Martínez, 2004. Metabolic engineering to increase the ethanol flux and yield in ethanologenic *Escherichia coli*
5. Alan D. Neale, et al., 1987 Nucleotide sequence of the pyruvate decarboxylase gene from *Zymomonas mobilis* Department of Biochemistry, La Trobe University Bundoora, Victoria 3083, Australia
6. Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF, Kjelleberg S (January 2007). "Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies". *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (1): 278-88. doi:10.1128/AEM.01177-06. PMC 1797146.PMID 17071787