

209  
Lej



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACION DEL MATERIAL GENETICO  
DE UNA BACTERIA CELULOLITICA:  
Cellulomonas Flavigena.

# TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A

**GUADALUPE BEATRIZ XOCONOSTLE CAZARES**

México, Cd. Universitaria

1987



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

|  |    |
|--|----|
| INDICE   | 1  |
| I. RESUMEN                                     | 3  |
| II. INTRODUCCION                               |    |
| III. REVISION BIBLIOGRAFICA                    |    |
| Cultivo mixto                                  | 6  |
| Desechos lignocelulósicos                      | 7  |
| Celulosa y sistema celulolítico                | 8  |
| Clonación molecular en sistemas celulolíticos. | 12 |
| Aislamiento del DNA                            | 16 |
| Endonucleasas de restricción                   | 17 |
| Plásmidos                                      | 18 |
| IV. OBJETIVOS                                  | 21 |
| V. MATERIALES y METODOS                        |    |
| Materiales                                     |    |
| Instrumentos                                   | 22 |
| Reactivos químicos                             | 23 |
| Enzimas  | 24 |
| Medios de cultivo                              | 24 |
| Colorantes                                     | 25 |
| Soluciones.                                    |    |
| Soluciones para aislar DNA total               | 25 |
| Soluciones para obtención de DNA por gradiente |    |

|   |    |
|---|----|
| isopícnico de CsCl                                    | 26 |
| Soluciones amortiguadoras para restricción            | 26 |
| Soluciones para electroforésis                        | 28 |
| Soluciones para cromatografía de exclusión molecular  | 29 |
| Soluciones para identificación de plásmidos por lisis |    |
| alcalina  | 29 |
| Soluciones para identificación de plásmidos por lisis |    |
| «in situ»   | 30 |
| Métodos   |    |
| 1. Cepas  | 30 |
| 2. Medios de cultivo                                  | 31 |
| 3. Conservación del cultivo                           | 32 |
| 4. Crecimiento del cultivo                            | 33 |
| 5. Protocolos   |    |
| Extracción de DNA de <u>Cellulomonas flavigena</u>    | 34 |
| Extracción de DNA por gradiente isopícnico de CsCl    | 35 |
| Restricción del DNA                                   | 37 |
| Separación del DNA por cromatografía de exclusión     |    |
| molecular   | 38 |
| Identificación de plásmidos por lisis alcalina        | 30 |
| Identificación de plásmidos por lisis in situ         | 39 |
| VI. RESULTADOS  | 40 |
| VII. DISCUSION  | 63 |
| VIII. CONCLUSIONES                                    | 67 |
| IX. BIBLIOGRAFIA.                                     | 69 |
| X. APENDICE.  | 76 |

## I. RESUMEN.

Se ha caracterizado el material genético de la bacteria Cellulomonas flavigena con enzimas de restricción, esta investigación pertenece al proyecto de Mejoramiento Genético del cultivo mixto bacteriano integrado por C. flavigena y Xanthomonas sp para aumentar la productividad y el rendimiento en la obtención de proteína de origen unicelular a partir de esquilmos agrícolas. Se determinó la cinética de crecimiento de C. flavigena en medio de cultivo BHI. Se adaptaron y montaron las técnicas de extracción y purificación del DNA de la bacteria. Se obtuvo mayor cantidad de DNA mediante el uso de gradientes isopícnicos de cloruro de cesio y de acuerdo a la densidad del DNA obtenido por este procedimiento se calculó la fracción molar de GC en 70.4 %. Se efectuaron restricciones del DNA con las enzimas Eco RI, Pst I, Hind III, Bgl II, Bam HI, Pst I y Hpa I; detectándose patrones electroforéticos de restricción correspondientes a DNA de cromosoma, además se efectuaron restricciones con los isoesquizómeros Hpa II y Msp I, detectando digestión con ambas enzimas, lo que señala que no hay modificación del DNA en la secuencia que reconocen ambas enzimas.

consecuencia un aumento en la obtención de proteína unicelular y a la vez un mejor aprovechamiento del sustrato.

El objetivo general del proyecto al que pertenece el presente trabajo es el mejoramiento genético del cultivo mixto bacteriano constituido por Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp para aumentar la productividad y el rendimiento en la obtención de PUC a partir de esquimos agrícolas.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### Cultivo Mixto.

En el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV se ha desarrollado un sistema de cultivo mixto bacteriano compuesto por Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp. para producir proteína unicelular a partir de esquilmos agrícolas. Estudios preliminares del cultivo mixto (De la Torre 1981, 1984; Lorencez, 1979) han demostrado que existe una interacción ecológica entre las poblaciones que lo forman, sin embargo la interacción puede cambiar si se modifican las condiciones del medio (Ponce N., 1982)

El tipo de interacción ecológica del cultivo mixto es un mutualismo cuando es crecido en bagazo de caña y sales minerales (Ponce N., 1982). C. flavigena que posee los genes para producir enzimas celulolíticas proporciona azúcares solubles y factores de crecimiento tales como metionina, ácido glutámico y ácido nicotínico; mientras que Xanthomonas sp. proporciona las vitaminas tiamina y biotina o precursores de ellas, aunque también compete por los azúcares solubles provenientes de la hidrólisis

enzimática de la celulosa presentes en el bagazo de caña

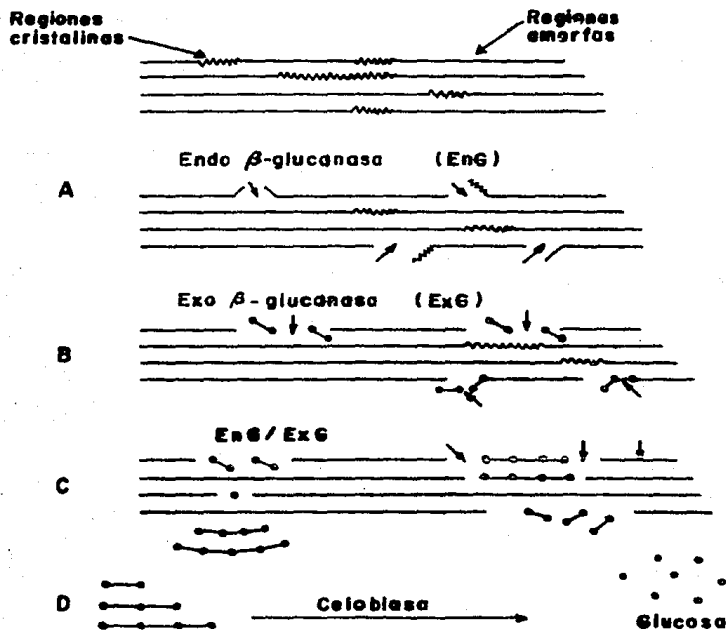
Las características morfológicas y de crecimiento de C. flavigena son: bacilos irregulares, rectos, angulares u curvos, formaciones en V, Gram positivas, no presentan flagelos. Las colonias son circulares, ligeramente elevadas, lisas, mucosas, con pigmento amarillo claro, anaerobio facultativo. Las características reportadas para el genero Yanthomonas son: bacterias alargadas que poseen un flagelo polar, aerobias, Gram negativas y forma colonias amarillas (Bergey, 1974).

#### Desechos Lignocelulósicos.

Los desechos lignocelulósicos (como el bagazo de caña, que es el sustrato que se proporciona a estos organismos para su crecimiento) están constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. Las hemicelulosas son polímeros de pentosa, sobre todo de D-Xilanos con enlace  $\beta(1-4)$  y poseen cadenas laterales de arabinosa y otros azúcares. La lignina es un polímero de alcoholes aromáticos, ésta última limita la acción enzimática de las celulasas por impedimento estérico, por lo que el sustrato se somete a un tratamiento alcalino para dejar a la celulosa accesible al ataque de las enzimas (De la Torre, 1981). La bacteria se arregla de



Figura 3 Esquema que muestra la acción de las enzimas celulolíticas .



- A) Las enzimas actúan sobre regiones amorfas y cristalinas, actuando primero la endo  $\beta$  glucanasa, produciendo extremos no reducidos, sobre los cuales actúa la exo  $\beta$  glucosidasa (celobiohidrolasa), produciendo celobiosa (B). Ambas enzimas actúan sinérgicamente (C). Sobre los fragmentos producidos (D) actúa la celobiasa ( $\beta$  glucosidasa), que produce glucosa libre. (Montenecourt 1979).

"CARACTERIZACION DEL MATERIAL GENETICO DE UNA BACTERIA  
CELULOLITICA: Cellulomonas flavigena".

II. INTRODUCCION

Debido al acelerado crecimiento demográfico del país y la consecuente insuficiencia de producción de alimento, México ha requerido importar cereales, granos, etc., para satisfacer las necesidades alimenticias del ganado, aunque este sistema de abastecimiento de la población resulte caro e insuficiente. Es por esto que surge la necesidad de diversificar las fuentes de proteína disponibles, tales como las proteínas de origen unicelular (PUC), aprovechando que algunos microorganismos crecen en sustratos que ahora no tienen un uso específico, como el bagazo de caña, y que por los volúmenes en que se produce ha llegado a ser contaminante del ambiente.

Los resultados obtenidos en cultivos de organismos unicelulares para la producción de proteínas son promisorios, sin embargo se ha propuesto que con modificaciones genéticas de estos organismos se puede lograr un incremento en la producción de enzimas degradadoras de sustratos celulósicos, para tener como

una manera regular a lo largo de la fibra de la celulosa para atacarla enzimáticamente.

#### Celulosa y sistema celulolítico.

En las figuras 1 y 2 se muestra la estructura de la celulosa, la cual es un polímero no ramificado que contiene unidades de glucosa con enlace  $\beta$  (1-4), debido a la configuración  $\beta$  las uniones glucosídicas están en el mismo plano pudiendo formar microfibrillas mediante la formación de puentes de hidrógeno entre ellas, resultando así la celulosa cristalina que es más resistente a las celulasas y a agentes químicos (Ryu y Mandels, 1982).

La degradación biológica de la celulosa a glucosa es un proceso complejo que requiere la participación de tres tipos de actividad enzimática: Exo  $\beta$  (1-4) glucanasa, ( $\beta$ -1-4, glucan celobiohidrolasa, Avicelasa EC 3.2.1.91), Endo B (1-4) glucanasa ( $\beta$ -1-4 glucan glucanohidrolasa CMCasa, EC 3.2.1.4), y R-glucosidasa (R-D-glucósido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21); este sistema posee isoenzimas (Bequin y Eisen, 1978).

El modelo más reciente que explica la degradación de la celulosa (Montenecourt y Eveleigh, 1979; Cuskey y cols, 1983) postula que la enzima que promueve el paso de celulosa cristalina a amorfa es endoglucanasa, que rompe los puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de

## ESTRUCTURA DE LA CELULOSA

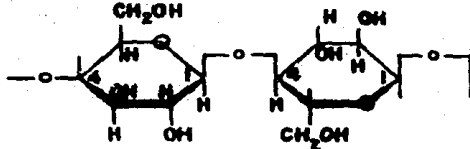


Figura 1 Representación esquemática de una cadena de celulosa, observe las unidades de glucosa con enlace  $\beta(1-4)$ , que producen un polisacárido lineal sin ramificaciones. LEHNINGER, 1984.

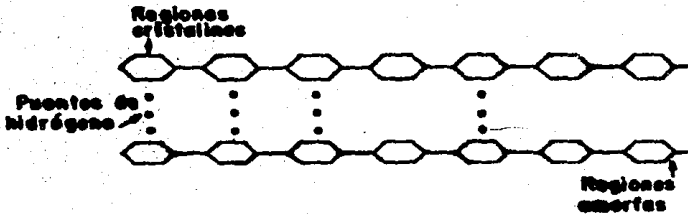


Figura 2 Ubicación de los puentes de hidrógeno entre microfibrillas, en donde no existen atracciones electrostáticas se forman regiones amorfas .

celulosa. También la endoglucanasa hidroliza azarosamente a la celulosa, produciendo fragmentos más cortos sobre los cuales actúa la exoglucanasa que produce unidades de celobiosa [dos glucosas unidas con enlace  $\beta(1-4)$ ] a partir del extremo no reducido de la cadena. Estas dos enzimas continúan trabajando sinérgicamente para degradar a la celulosa cristalina. Los oligosacáridos producidos son hidrolizados a glucosa por la acción de la  $\beta$ -glucosidasa. Monteneourt (1983), Kuskey & cols (1983), (Fig. 3).

Ponce N. (1982) demostró que la adición de celulasas en el cultivo mixto bacteriano incrementaba la biomasa de 1.25 a 3.25 g/l cuando era crecido en cultivo continuo, y con ello la concentración celular del cultivo mixto se logró en menor tiempo, por lo que la productividad se aumentó. Esto sugiere que el factor limitante es la disponibilidad de azúcares producidos en el proceso hidrolítico de la celulosa.

Las celulasas constituyen un sistema enzimático inducible. El mejor inductor conocido es la celulosa, aunque también se produce inducción con sacarosa y lactosa. Al acumularse el producto final, glucosa o celobiosa se reprime la síntesis de enzimas, este efecto es llamado represión por catabolito. La acumulación de

productos finales ejercen un efecto inhibitorio en la velocidad de reacción del sistema celulo lítico, el efecto producido por glucosa y celobiosa es de tipo inhibitorio competitivo. Ghose y Das (1971).

#### Clonación molecular en sistemas celulo líticos.

Una manera de incrementar la producción de celulasas en el sistema bacteriano es la clonación de los genes que codifican para las enzimas celulo líticas, esto puede realizarse en un vehículo de clonación apropiado como un plásmido o un fago y así amplificar la expresión de estos genes. Ya se han obtenido resultados promisorios en la clonación de celulasas de otros microorganismos. (Montenecourt, 1983).

Gilres, Whittle, Wakarchuk y cols. (1982, 1984) han caracterizado el sistema celulo lítico de Cellulomonas fimi, además han efectuado la clonación molecular de carboximetilcelulasas y B-glucosidasas en el plásmido pBR322 en Escherichia coli, desarrollando así un método de selección para recombinantes que tienen los genes de las celulasas. Finalmente han obtenido recombinantes que poseen actividad celulo lítica.

Collmer y Wilson (1983) efectuaron la clonación de genes de las endocelulasas de Thermomonospora YX en el plásmido pBR322 y lo insertaron en E. coli, obteniendo un

incremento de la actividad cerca de cincuenta veces con respecto a la cepa parental.

Cornet y cols. (1983) Además de caracterizar dos genes estructurales de Clostridium thermocellum que codifican para endoglucanasas lograron clonarlos en pBR322 y expresarlos en E. coli. Las clonas expresan actividad celulolítica, encontrándose las enzimas en el citoplasma.

Shoemaker y cols. (1983); Teeri y cols (1983), lograron la clonación y caracterización del gene que codifica para la exocelobiohidrolasa I del hongo Trichoderma reesei L27, clonado en pBR322 e introducido en E. coli. La cantidad de enzima producida representa el 60 % de la proteína extracelular.

Sashihara y cols (1984) reportaron la clonación y expresión de carboximetilcelulasas de un organismo alcalofílico: Bacillus sp. cepa N-4 en E. coli. Observaron producción de CMCasas acumuladas en el espacio periplásmico de la bacteria E. coli.

Koide y Nakamura (1986) lograron la clonación de una endoglucanasa de Bacillus subtilis en pBC5 y transformaron a la misma bacteria, además subclonaron el mismo fragmento en pBR322 y se introdujo en E. coli. Las enzimas producidas se encontraron en el espacio periplásmico de la bacteria y en el sobrenadante.

Nakamura y Misawa (1986) reportan la clonación de genes de  $\beta$ -glucosidasa de Cellulomonas uda CB4 en E.

es necesario caracterizar su DNA cromosómico. A la fecha se conoce la fracción molar de G-C del DNA de C. flavigena ATCC482, que se ha calculado por medio de la  $T_m$  del DNA, y se ha obtenido un valor de 72.7% y 74.6% (Yamada y Komataga, 1970). El valor representa la proporción de Guaninas + Citosinas (más 5-metil citosina cuando se presenta) en el DNA (Handbook of Biochem. 1976).

A partir del valor de  $T_m$ , que es un parámetro que indica la temperatura en la cual la mitad del DNA se encuentra de cadena sencilla, puede calcularse la fracción molar de G-C.

$$\% \text{ GC} = (T_m - .69.3) 2.44 \quad T_m = 83.69^\circ \text{C}.$$

(Mandel y cols., 1968)

La fracción molar de GC puede determinarse por la densidad de flotación del DNA en gradientes de equilibrio de Cloruro de Cesio (Wells y Brunk, 1970; Babykin y Zinčnikov, 1984), ya que la densidad de flotación es función directa del contenido de Guanina-Citosina.

Densidad a  $25^\circ \text{C}$  de la banda de DNA

$$\rho_{25^\circ \text{C}} = 1.8601 \text{ (nD)} - 13.4974.$$

nD: Índice de Refracción de la banda de DNA.

$$\% \text{ GC} = \rho - 1.669 / 0.008.$$

Mandel y cols.

(1968).



## i) Aislamiento del DNA.

Para la caracterización del DNA es necesario determinar las condiciones óptimas de lisis celular y purificación del DNA.

El procedimiento general para el aislamiento del DNA es el siguiente:

- Crecimiento del cultivo en fase logarítmica tardía, que es un punto en el que se obtiene un máximo de células que no han engrosado su pared celular.

- Remoción de la pared celular con lisozima.

- Lisis celular y desnaturalización de proteínas y lípidos con detergentes iónicos.

- Aislamiento de DNA a partir del lisado celular por medio de precipitaciones con etanol absoluto y acetato de sodio y extracción de proteínas y restos celulares mediante la emulsión de la muestra con soluciones orgánicas, tales como cloroformo y fenol.

Con el fin de eliminar el RNA, la muestra debe incubarse con Ribonucleasa. Es necesario determinar los tiempos de incubación y mantener una concentración adecuada del agente quelante EDTA, con el fin de inhibir la actividad de enzimas nucleasas que degradarían el DNA.

El DNA obtenido debe tener alta pureza, de manera que sea susceptible a ser digerido con endonucleasas de

restricción.

ii) Endonucleasas de restricción.

Para caracterizar el DNA es necesario usar endonucleasas de restricción. Estas enzimas pertenecen al mecanismo de modificación restricción del microorganismo.

La modificación es la alteración del DNA efectuada por la propia célula; para protegerse de las enzimas de restricción producidas por ella misma para degradar DNA exógeno.

La modificación por metilación se efectúa en ciertos restos de adenina efectuada por las metilasas restrictivas que transfieren los grupos metilo de la S-adenosil metionina a los restos de adenina de DNA de doble cadena, una de cada hebra en secuencias específicas (Boyer, 1971).

Las endonucleasas de restricción son enzimas de origen bacteriano cuya acción se limita a hidrolizar en secuencias nucleotídicas específicas, y de acuerdo a su reconocimiento pueden clasificarse en dos grupos: (Boyer y Roulland, 1971).

Enzimas tipo I: No cortan en secuencias específicas,

coli, la cantidad de la enzima expresada fue de 1.2 y 4 veces mayor que la cepa original, los mismos autores clonaron en E. coli el gene que codifica para una enzima que hidroliza carboximetilcelulosa, es decir, una endoglucanasa.

En los trabajos descritos se han clonado genes de celulasas de bacterias y hongos en E. coli, con excepción del trabajo realizado por Koide y Nakamura (1986), en el que la clonación se realizó en la misma bacteria. El objetivo común en los trabajos anteriores ha sido la clonación de celulasas para estudiar la expresión de los genes que codifican para estas enzimas, así como para comprender su regulación. Sin embargo, en relación al aspecto biotecnológico, solo ha sido utilizado el hongo Trichoderma reesei como fuente de celulasas y no se han reportado investigaciones enfocadas a la producción de biomasa, ya que algunos de los organismos, en los que se han clonado los genes de las celulasas, producen toxinas. Las ventajas que posee la biomasa constituida por C. flavigena y Xanthomonas sp. son: niveles altos de proteína (60%), carencia de toxinas y crecimiento del cultivo sobre desechos lignocelulósicos sin necesidad de factores de crecimiento (De la Torre, 1981).

Para clonar los genes de las celulasas de C. flavigena

(Broda, 1979).

1) El control de su replicación, que mantiene su número fijo de un ciclo a otro de división celular.

2) La capacidad de integrarse al cromosoma del huésped.

3) La transferencia de plásmidos (sexuales y de resistencia) a otras células mediante transducción por virus o mediante apareamiento a través de pili (transferencia por conjugación).

4) La promoción por los plásmidos sexuales de transferencia por conjugación del cromosoma del huésped después de integrarse a él.

5) La variedad de productos génicos de los plásmidos que confieren rasgos característicos a las células que los poseen; estos pueden ser (David, 1978):

- Resistencia a antibióticos: cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, sulfamidas, ampicilina, estreptomina, etc.

- Resistencia a metales pesados: mercurio, cromo, bismuto, zinc, cadmio, plomo, plata, iones arsenito y arseniato, etc.

- Producción de antibióticos.

- Producción de hemolisinas.

- Degradación de compuestos orgánicos complejos: xileno, tolueno, naftaleno, DDT, salicilatos, n-octano, etc.

requieren ATP, magnesio y S-adenosil metionina.

Enzimas tipo II: Son enzimas que cortan dentro de una secuencia de reconocimiento, requieren magnesio y producen extremos cohesivos o rasurados.

Existen enzimas con capacidad para reconocer una secuencia aún cuando esté modificada, y otras que reconociendo la misma secuencia no efectúan el corte si existe alguna modificación. Estas enzimas son isoesquizómeros, tal como Nsp I y Hpa II que reconocen la secuencia C C G G.

Nsp I tiene la capacidad de reconocer la secuencia aún metilada (Waalwijk, 1978).

### iii) Plásmidos.

Para clonar los genes es necesario emplear un vehículo de clonación adecuado, como puede ser un plásmido. Este término se aplica a material genético extracromosómico dispensable a la célula, que presenta replicación autónoma y puede variar de tamaño desde  $5 \times 10^3$  a  $10^6$  daltones, manteniendo un número alto de copias cuando es pequeño y de 1 a 3 copias por célula si es un megaplásmido (Novick y Hoppensteadt, 1981).

Los aspectos más notables en los plásmidos son:

- Fermentación de algunos azúcares.
- Producción de enterotoxinas.
- Inducción de tumores y nódulos en plantas.
- Control de la restricción y modificación en el huésped.

Una característica notable en los plásmidos es su capacidad de permanecer en círculos covalentes cerrados (ccc), estructura que les permite resistir condiciones de alcalinidad y temperatura elevadas sin desnaturalizarse. Esta propiedad privativa que no la posee el DNA cromosómico, es utilizada en técnicas de separación de plásmidos (Kado y Liu, 1981).

#### IV OBJETIVOS.

En el presente trabajo se caracteriza el material genético de C. flavigena, además de establecer las condiciones para la posterior clonación de los genes que codifican para las enzimas celulolíticas. Para lograr este objetivo, se han propuesto los siguientes objetivos particulares

1. Determinar la cinética de crecimiento de Cellulomonas flavigena en medio de Infusión Cerebro-corazón.
2. Establecer las condiciones óptimas para aislar el DNA de la bacteria.
3. Purificar el DNA mediante el uso de gradientes isopícnicos de Cloruro de Cesio-Bromuro de etidio.
4. Caracterizar el DNA con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.
5. Efectuar digestiones con los isoesquizómeros de enzimas de restricción Hpa II y Msp I para determinar si existe modificación en su secuencia de reconocimiento.

## V. MATERIALES Y METODOS.

### Materiales.

#### a) Instrumentos.

- 1) Agitadora New Brunswick Co. NBS-G-25
- 2) Balanza analítica METTLER H20.
- 3) Cámaras de Electroforesis vertical y horizontal.
- 4) Cámara fotográfica Polaroid (Mod. MP-4).
- 5) Centrífuga SORVALL SS-33, rotores GSA y SS-34.
- 6) Espectrofotómetro BECKMAN DU-5.
- 7) Espectrofotómetro PEPKIN-ELMER 35.
- 8) Estufa de Vacío 60 ° C, LAB-LINE Instruments.
- 9) Estufa 37 ° C Mod. DU 5.
- 10) Fuente de poder (Voltímetro) CINVESTAV-IPN.
- 11) Lámpara de luz ultravioleta onda corta.
- 12) Microcentrífuga 5415 EPPENDORF.
- 13) Película fotográfica 55 y 57 POLAPOID.
- 14) Potenciómetro FISHER 525 digital.
- 15) Refractómetro.
- 16) Transiluminador de luz ultravioleta ULTRAVIOLETS Products INC.
- 17) Ultracentrífuga BECKMAN, Rotores 50 Ti, 50 VTI.
- 18) Termoblock LAB-LINE Instruments, Mod. 2000.



b) Reactivos químicos.

|  |            |
|--|------------|
| 1) Acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )                      | MERCK.     |
| 2) Acido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )                  | BAKER.     |
| 3) Acido clorhídrico ( $\text{HCl}$ )                                  | BAKER.     |
| 4) Acido etilen diamino tetracético (EDTA)                             | SIGMA.     |
| 5) Agarosa Tipo IV   | SIGMA.     |
| 6) Albúmina sérica de bovino, fracc IX (BSA)                           | SIGMA.     |
| 7) Alcohol etílico absoluto ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )      | BAKER.     |
| 8) Alcohol Isoamílico  | BAKER.     |
| 9) Alcohol isopropílico absoluto ( $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ )      | BAKER.     |
| 10) B-mercaptoetanol $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$               | SIGMA.     |
| 11) Carboximetil celulosa (CMC)  | SIGMA.     |
| 12) Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ )                                     | BAKER.     |
| 13) Cloruro de cesio ( $\text{CsCl}$ )                                 | Bio-Rad.   |
| 14) Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) | BAKER.     |
| 15) Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )                                 | BAKER.     |
| 16) DNA Lambda, digerido con Hind III                                  | SIGMA.     |
| 17) DNA de salmón  | SIGMA.     |
| 18) Dodecil sulfato de sodio (SDS)                                     | BDH.       |
| 19) Fenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ )                          | MERCK.     |
| 20) Ficoll 400 800   | PHARMACIA. |
| 21) Glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$ )                   | BAKER.     |
| 22) Glucosa anhidra ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )            | BAKER.     |

|                                      |             |
|--------------------------------------|-------------|
| 23) Hidróxido de sodio (NaOH)        | BAKER       |
| 24) Sarkosyl NP-07.                  | CYBA GEIGY. |
| 25) Sepharose 4B                     | PHARMACIA.  |
| 26) Sulfato de magnesio (MgSO4 7H2O) | BAKER.      |
| 27) Trizma base                      | SIGMA.      |

c) Enzimas.

Enzimas de restricción:

|          |   |
|----------|---|
| Eco RI   | New England, BIOLABS.<br>I. I. B. UNAM. |
| Pst I    | New England, BIOLABS.<br>I. I. B. UNAM. |
| Hind III | New England BIOLABS.                    |
| Bam HI   | C. I. I. G. B.                          |
| Msp I    | New England BIOLABS.                    |
| Hpa II   | New England, Biolabs.                   |
| Hpa I    | New England, BIOLABS.                   |

|                                     |             |                |             |
|-------------------------------------|-------------|----------------|-------------|
| LISOZIMA:                           | Muramidasa: | Mucopeptidasa: | Mucopéptido |
| N-acetilmuramohidrolasa EC 2.2.1.17 |             |                | SIGMA.      |
| PPOTEASA, Proteinasa K Tipo XI      |             |                | SIGMA.      |
| RIBONUCLEASA A (RNAasa) Tipo II A   |             |                | SIGMA.      |

d) Medios de cultivo.

- |                                |         |
|--------------------------------|---------|
| 1) Bacto agar                  | DIFCO.  |
| 2) Bactotripton                | DIFCO.  |
| 3) Extracto de levadura        | DIFCO.  |
| 4) Infusión de cerebro-corazón | BIOXON. |

e) Colorantes.

- |                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| 1) Azul de bromofenol            | SIGMA. |
| 2) Bromuro de Etidio             | SIGMA. |
| 3) Xileno de Cianol              | SIGMA. |
| 4) Bis benzimide (Hoechst 33258) | SIGMA. |

f) Soluciones.

1.0 Soluciones para aislar DNA total

1.1 Solución amortiguadora

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Tris HCl pH 8.0 | 50 mM. |
| EDTA pH 8.0     | 50 mM. |

1.2 Solución de lisis (STEP)

|               |           |
|---------------|-----------|
| SDS           | 0.5 %     |
| Tris HCl pH 5 | 50 mM.    |
| EDTA          | 0.1 M.    |
| Proteinasa K  | 50 µg/ml. |

### 1.3 Fenol Saturado.

Al fenol bidestilado se le agrega 1 % de 8-hidroxiquinoleína que actúa como antioxidante e inhibidor de DNAsas) y se satura con Tris 1M, pH 8 y posteriormente con varios cambios de Tris 0.1 M hasta que la fase acuosa tenga pH 7.5.

### 1.4 Acetato de sodio 3N, 40.0 g

Ajustado a pH 5.2 con 6.0 ml de ácido acético en 100 ml.

### 1.5 Solución de cloroformo

Cloroformo:alcohol isoamílico 24:1.

## 2.0 Obtención de DNA total para Gradiente de Cloruro de Cesio.

### 2.1 Solución amortiguadora TE

Tris HCl pH 7.5            50 mM.

EDTA            pH 8.0            0.1 M

### 2.2 Preparación de CsCl saturado:

130 g CsCl en 70 ml Tris HCl 20 mM pH 8.5.

### 2.3 Alcohol isoamílico saturado

CsCl                            10.6 g

TE                                12.3 ml

Alcohol isoamílico        15 ml.

## 3.0 Soluciones amortiguadoras para restricción

(New England, BIOLABS).

- 3.1 Eco RI G↓AATTC
- |                   |            |
|-------------------|------------|
| NaCl              | 50 mM.     |
| Tris HCl pH 7.5   | 100 mM.    |
| MgCl <sub>2</sub> | 5 mM.      |
| BSA               | 100 µg/ml. |
- 3.2 Pst I CTGCA↓G
- |                   |            |
|-------------------|------------|
| NaCl              | 100 mM     |
| Tris HCl pH 7.5   | 10 mM.     |
| MgCl <sub>2</sub> | 10 mM.     |
| BSA               | 100 µg/ml. |
- 3.3 Hind III A↓AGCTT
- |                   |            |
|-------------------|------------|
| NaCl              | 50 mM.     |
| Tris HCl pH 8.0   | 50 mM.     |
| MgCl <sub>2</sub> | 10 mM.     |
| BSA               | 100 µg/ml. |
- 3.4 Bam HI C.I.I.G.B. G↓GATCC
- |                   |            |
|-------------------|------------|
| NaCl              | 150 mM.    |
| Tris HCl pH 7.9   | 10 mM.     |
| MgCl <sub>2</sub> | 6 mM.      |
| BSA               | 100 µg/ml. |
- 3.5 Msp I C↓CGG
- |                  |        |
|------------------|--------|
| KCl              | 6 mM.  |
| Tris HCl pH 7.4  | 10 mM. |
| B-mercaptoetanol | 1 mM.  |

|                   |            |
|-------------------|------------|
| BSA               | 100 µg/ml. |
| 3.6 Hpa II G↓GCC  |            |
| KCl               | 6 mM.      |
| Tris HCl pH 7.4   | 10 mM.     |
| MgCl <sub>2</sub> | 10 mM.     |
| B-mercaptoetanol  | 1 mM.      |
| BSA               | 100 µg/ml. |

#### 4.0 SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS DEL DNA.

##### 4.1 Colorante para electroforesis

|                    |        |
|--------------------|--------|
| Glicerol           | 50 %   |
| Tris HCl pH 8.0    | 0.1 M  |
| EDTA pH 8.0        | 60 mM  |
| Xileno de cianol   | 0.25 % |
| Azul de bromofenol | 0.25 % |

##### 4.2 Solución amortiguadora de corrida.

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Tris-acetato pH 7.5 | 40 mM |
| EDTA pH 8.0         | 2 mM  |

4.3 Colorante para observar el DNA al transiluminar con luz UV.

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Bromuro de Etidio | 5 µg/ml. |
|-------------------|----------|

##### 4.4 Agarosa Tipo IV

0.6 % y 0.7 % en solución amortiguadora de corrida.

## 5.0 SOLUCIONES PARA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR.

### 5.1 Solución I:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Tris HCl pH 7.5-8.0 | 25 mM. |
| EDTA pH 8.0         | 10 mM. |
| Glucosa             | 50 mM. |

### 5.2 Solución II (DE LISIS).

|      |        |
|------|--------|
| NaOH | 0.2 N. |
| SDS  | 1 %.   |

### 5.3 Solución amortiguadora de elución.

|                 |         |
|-----------------|---------|
| NaCl            | 0.5 mM. |
| Tris HCl pH 7.8 | 50 mM.  |
| EDTA pH 8.0     | 10 mM.  |

## 6.0 Soluciones para identificación de plásmidos por lisis alcalina.

### 6.1 Solución amortiguadora E.

|              |        |
|--------------|--------|
| Tris acetato | 40 mM. |
| EDTA pH 8.0  | 2 mM.  |

### 6.2 Solución de lisis

|     |     |
|-----|-----|
| SDS | 3 % |
|-----|-----|

Tris pH 12.6 50 mM.

6.3 Solución de corrida

3  $\mu$ l de solución 4.1

Glicerol 50 %

Tris acetato pH 7.9 0.05 M

7.0 Solución para identificación de plásmidos por lisis (in situ).

7.1 Solución de lisis.

Lisozima 5 mg/ml

NaOH 50 mM

SDS 5 %

EDTA 5 mM

PNasa A 500  $\mu$ g/ml

Bromocresol púrpura 4  $\mu$ l

Métodos.

1. Cepas.



Cellulomonas flavigena ATCC 482.

Genotipo: Thy<sup>-</sup>, Bio<sup>-</sup>, Km<sup>r</sup>.

Fuente CDRB-b-531, CINVESTAV, IPN.

Esta bacteria junto con Xanthomonas sp integran el cultivo mixto que degrada desechos lignocelulósicos. (De la Torre, 1981).

Escherichia coli C600.

Genotipo: F<sup>-</sup>, thi-1, Thr-1, leu B6, lac Y1, Ton A21, sup E44, λ<sup>-</sup>.

Esta bacteria es conocida también como CR34, (Appleyard, 1954) fue utilizada para comparar con el DNA cromosómico de E. flavigena.

Escherichia coli HB101 pBR322.

Genotipo: F<sup>-</sup>, hsdS20 (r<sup>-</sup> m<sup>-</sup>), rec A13, ara 14, proA2, lacY1, gal K2, rpsL20 (Sm<sup>r</sup>), Xyl-5, mtl-1, supE44, λ<sup>-</sup>. Ap<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>.

Esta cepa híbrida de E. coli K-12 y E. coli B es usada como hospedero en la transformación y como un hospedero de amplio rango para el crecimiento y purificación de plásmidos. (Boyer, 1969; Bolívar, 1979).

## 2. Medios de cultivo.

(Preparación de medios)

### a) Medio Luria (LB).

Contiene por cada litro:

- Bactotriptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- Cloruro de sodio 10 g
- Hidróxido de sodio 4.8 ml (2 %).

Esterilización en autoclave por 15 minutos, 15 lb/in<sup>2</sup> de presión.

b) Medio BHI (Infusión de cerebro corazón)

37 g de BHI aforados a 1 l de agua destilada, esterilización por autoclave.

c) Medio mineral

- NaCl 5.5 g
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 g
- PO<sub>4</sub> -3 3.5 g
- CaCl<sub>2</sub> 0.1 g
- MgCl<sub>2</sub> 0.1 g.

### 3. Conservación del cultivo.

Cellulomonas flavigena fue crecida junto con Xanthomonas sp en tubos inclinados con medio mineral, 2% de agar y 1% de carboximetil celulosa como única fuente de carbono y energía. Los tubos se incubaron a 37 °C por 48 horas, conservándose posteriormente a 4 °C. Se resembraron cada mes en el mismo medio.

#### 4. Crecimiento del cultivo.

a) Determinación de la cinética de crecimiento de *C. flavigena* en BHI.

Se inculó una colonia de la cepa en 50 ml del medio BHI en un matr az de 250 ml, se incubó a 37   C con agitación de 150 rpm durante 16 horas, posteriormente, se incul  al 5% en el mismo medio en un matr az nefelométrico, utilizando 1/5 parte de la capacidad del matr az. Se tomaron lecturas en el espectrofotómetro a 530 nm a diferentes tiempos.

b) Determinación de la curva de calibración (gramos de células por litro)

Se concentró un cultivo de 100 ml en una solución salina de 10 ml.

Se efectuaron diferentes diluciones para dar lecturas de absorbancia (530 nm) desde 0.05 - 0.6 D.O. Una alícuota de cada una de las diluciones (por triplicado) fueron secadas a 60   C en una estufa de vacío, sobre charolas individuales para determinar los gramos de células por litro a diferentes valores de densidad  ptica.

## 5. PROTOCOLOS

### EXTRACCION DE DNA DE CELLULOMONAS FLAVIGENA.

Se empleó el método reportado por Silhevy y Berman (1984) modificado.

Se inoculó un matr az conteniendo 50 ml de medio BHI con una colonia de la bacteria y fue crecido durante 16 horas a 37°C con agitación a 120 rpm. Este inoculo se agregó con una dilución del 5 % en un litro de BHI fresco, permitiendo el crecimiento hasta llegar a una densidad óptica de 0.7 (530 nm). Se colectaron las células por centrifugación a 6000 rpm, 15 min. Posteriormente fueron resuspendidas en 9 ml de la solución 1.1 y se congelaron a -20°C. Se agregaron 5mg/ml de lisozima en 0.25 M de tris HCl pH 8, posteriormente fueron descongeladas en un baño metabólico a temperatura ambiente y se incubaron a 4°C por 45 min.

Se agregó 1 ml de la solución de lisis (1.2) incubando a 65°C por 60 min. con agitación suave. La muestra fue desproteinizada con extracción orgánica de fenol saturado en proporción 1:1 (sol. 1.3), se emulsific  por 5 min. y centrifugó a 5000 rpm, recuperando la fase superior acuosa. Posteriormente se precipitó el DNA agregando 0.1 vol. de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 vols. de etanol absoluto a 20°C, en este paso, los ácidos nucleicos

## 5. PROTOCOLOS

### EXTRACCION DE DNA DE CELLULOMONAS FLAVIGENA.

Se empleó el método reportado por Silhavy y Berman (1984) modificado.

Se inoculó un matr az conteniendo 50 ml de medio BHI con una colonia de la bacteria y fue crecido durante 16 horas a 37°C con agitación a 120 rpm. Este inoculo se agregó con una dilución del 5 % en un litro de BHI fresco, permitiendo el crecimiento hasta llegar a una densidad óptica de 0.7 (530 nm). Se colectaron las células por centrifugación a 6000 rpm, 15 min. Posteriormente fueron resuspendidas en 4 ml de la solución 1.1 y se congelaron a -20°C. Se agregaron 5mg/ml de lisozima en 0.25 M de tris HCl pH 8, posteriormente fueron descongeladas en un baño metabólico a temperatura ambiente y se incubaron a 4°C por 45 min.

Se agregó 1 ml de la solución de lisis (1.2) incubando a 65°C por 60 min, con agitación suave. La muestra fue desproteinizada con extracción orgánica de fenol saturado en proporción 1:1 (sol. 1.3), se emulsific  por 5 min. y centrifugó a 5000 rpm, recuperando la fase superior acuosa. Posteriormente se precipitó el DNA agregando 0.1 vol. de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 vols. de etanol absoluto a 20°C, en este paso, los ácidos nucleicos

precipitan y se recuperan por centrifugación, la pastilla es secada con una corriente de aire o en un desecador y disuelta en 5 ml de sol. 1.1 con una concentración final de 200 µg/ml de RNasa A. Para desproteínizar nuevamente se emulsificó la muestra con cloroformo (sol. 1.5) y se centrifugó, recuperando la fase superior acuosa. Con el fin de concentrar se precipitó el DNA con acetato de sodio y etanol, en las proporciones ya descritas, incubando a -70 °C en una mezcla de hielo seco y acetona por 20 min. En este paso el DNA precipitó como hilos largos que fueron extraídos y disueltos en la sol. 1.1.

La cuantificación del DNA obtenido se hizo por el método de dilución en placas de agar-bromuro de etidio 5µg/ml. Las placas fueron iluminadas con una lámpara de radiación ultravioleta de onda corta, con la cual se puede comparar la intensidad de las diluciones del DNA problema contra las diluciones conocidas del DNA de salmón.

#### EXTRACCION DE DNA TOTAL POR GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO.

Se empleó el método de Babykin y Zinchekov (1984) modificado.

Se incubó 1 litro de cultivo hasta alcanzar un valor

de densidad óptica de 0.7 (530 nm), se cosecharon las células por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. en rotor GSA. Se resuspendió el botón en 5 ml de la solución 2.1 y se agregó lisozima a una concentración final de 5 mg/ml., se incubó a 4°C por 30 min., se ajustó la concentración de EDTA a 100mM y se agregó sarkosyl al 0.5%. Posteriormente la muestra fue incubada con 100 µg/ml de RNasa A a 37°C por 1 hora.

Para desproteínizar la muestra se utilizó la enzima proteinasa K, inmovilizada en un soporte de nylon; esta inmovilización se realizó bajo la asesoría del Dr. Ignacio Magaña Plaza del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, la cual fue reutilizada 3 veces con buena actividad. Esta mezcla se incubó a 65°C por 1 h. Para recuperar la enzima inmovilizada se centrifugó la muestra a 5000 rpm por 5 min. y se separó el nylon.

Al sobrenadante (donde se encuentra el DNA), se agregó el colorante Hoechst 33252 a 200 µg/ml. Este colorante tiene la particularidad de adherirse a la doble cadena de DNA por la parte expuesta, preferentemente en las adeninas y timinas (Müller, 1975). La muestra se colocó con la solución 2.2 en el tubo de centrifuga del rotor 50 Ti (Beckman) a 45000 rpm por 36 h y 20°C.

Al formarse en gradiente se visualizó al DNA con una lámpara de radiación ultravioleta. La banda de DNA se extrajo y se separó del colorante con alcohol isoamílico

saturado (sol 2.3) y se dializó la muestra en la solución 2.1 estéril con 4 cambios de 4 horas cada uno.

#### RESTRICCIÓN DEL DNA.

Maniatis y cols., 1982.

Se emplearon las enzimas Eco RI, Pst I, Hind III y Bam HI para la restricción del DNA.

Para el ensayo de modificación restricción se utilizaron los isoesquizómeros de enzimas de restricción Hpa II y Msp I, las cuales reconocen la secuencia CCGAG. En la restricción de 20 µl de volumen final se empleó 1 µg de DNA, 2 µl de solución amortiguadora (concentrada 10 veces) de cada enzima (sols. 3.0) y 2 unidades de enzima.

La incubación se hizo a 37 ° C durante 1 h. Para detener la reacción se adicionaron 3 µl del colorante 4.1 y las muestras fueron calentadas a 65 ° C por 5 min.

La restricción se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % para separar por peso molecular los fragmentos originados, las dimensiones del gel fueron 4.7 x 7.5 cm en solución amortiguadora de tris-acetatos (sol 4.2), con una diferencia de potencial fija de 60 Volts, se permitió la electroforesis hasta que el primer colorante migró a las 2/3 partes del gel, éste se tiñó con una solución de bromuro de etidio en sol. 4.2 a 5 µg/ml durante 10 min. La banda de DNA se visualizó con ayuda de una lámpara de luz UV. Las fotografías del gel fueron tomadas con una cámara Polaroid MP4 con



película instantánea 55 y 57 y filtro amarillo.

SEPARACION DE DNA POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR. Modificado Maniatis y cols., 1982.

Una vez obtenida la pastilla celular como se describió anteriormente, se lavó la muestra con 10 ml de sol 5.1, se centrifugó en frío y resuspendió en la misma solución con 5 mg/ml de lisozima, incubándose a 4°C por 30 min.

Se agregó posteriormente 10 ml de la solución 5.2 y se mezcló por inversión. Posteriormente a la muestra se le adicionó 15 ml de acetato de sodio (sol 1.4) a 4°C e incubó 20 min a la misma temperatura. Se centrifugó 1000 rpm por 40 min en rotor SS-34. El DNA fue precipitado del sobrenadante con 2 vols. de etanol a -20°C. El DNA se resuspendió en solución amortiguadora de columna (5.3).

La muestra fue desproteínizada con dos extracciones orgánicas: fenol-cloroformo y cloroformo (soluciones 1.3 y 1.5), se agregó RNAasa A a 50 µg/ml y se incubó a 37°C por 5 horas, ya desproteínizado el DNA fue precipitado (como ya se indicó anteriormente) y se disolvió en 500 µl de solución amortiguadora de columna.

Se empacó una columna de cromatografía con Sepharosa 4B que puede separar moléculas de peso molecular elevado, se lavó con la sol 5.3 y se eluyó la muestra tomando 36 fracciones de 500 µl.

Para detectar las diferentes especies de ácidos nucleicos eluidas se usó un gel de electroforesis (agarosa 0.7 %) con 5 µl de las diferentes muestras.

#### IDENTIFICACION DE PLASMIDOS POR LISIS ALCALINA.

Se empleó la técnica de Kado y Liu, (1981): la cual consiste en utilizar un cultivo de células crecidas a una densidad óptica de 0.6, se centrifugó y obtuvo el botón celular que se resuspendió en 50 µl de solución amortiguadora 6.1 y se agregaron 2 ml de solución de lisis 6.2, se incubó a 65°C por 20 min. en un baño metabólico, posteriormente se desproteinizó la muestra con 2 vols. de fenol-cloroformo saturado (sol. 1.3;1.5). Se centrifugó a 6000 rpm, transfiriendo la fase acuosa a un tubo limpio, a 35 µl de la muestra se le adicionaron 10 µl de la sol 6.3 para someterse a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % a 60 Volts, por 1:30 h. Se tiñó con bromuro de etidio (sol. 4.3) y finalmente se visualizó el DNA con ayuda de una lámpara de luz UV.

#### IDENTIFICACION DE PLASMIDOS POR LISIS (IN SITU)

Se tomó una colonia de la cepa y se colocó en un tubo con 25 µl de la solución 1, incubándose 1 hora. A la muestra se agregó 2.5 ul de Ficoll al 25 % y el lisado se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 %.

## VI. RESULTADOS.

Determinación de la cinética de crecimiento de C. flavigna.

Se establecieron los parámetros cinéticos bajo las condiciones descritas en la sección de métodos. La figura 4 muestra la cinética de crecimiento donde se observa la curva sigmoide típica, con la fase lag de duración aproximada de 2 horas, la fase exponencial y la fase exponencial tardía, ésta última ocurre a las 4:20 h. después de la adición del inóculo, alcanzándose una densidad óptica de 0.7 a 530 nm. El tiempo de duplicación ( $t_d$ ) calculado fue de 1:36 horas en medio BHI (ver apéndice).

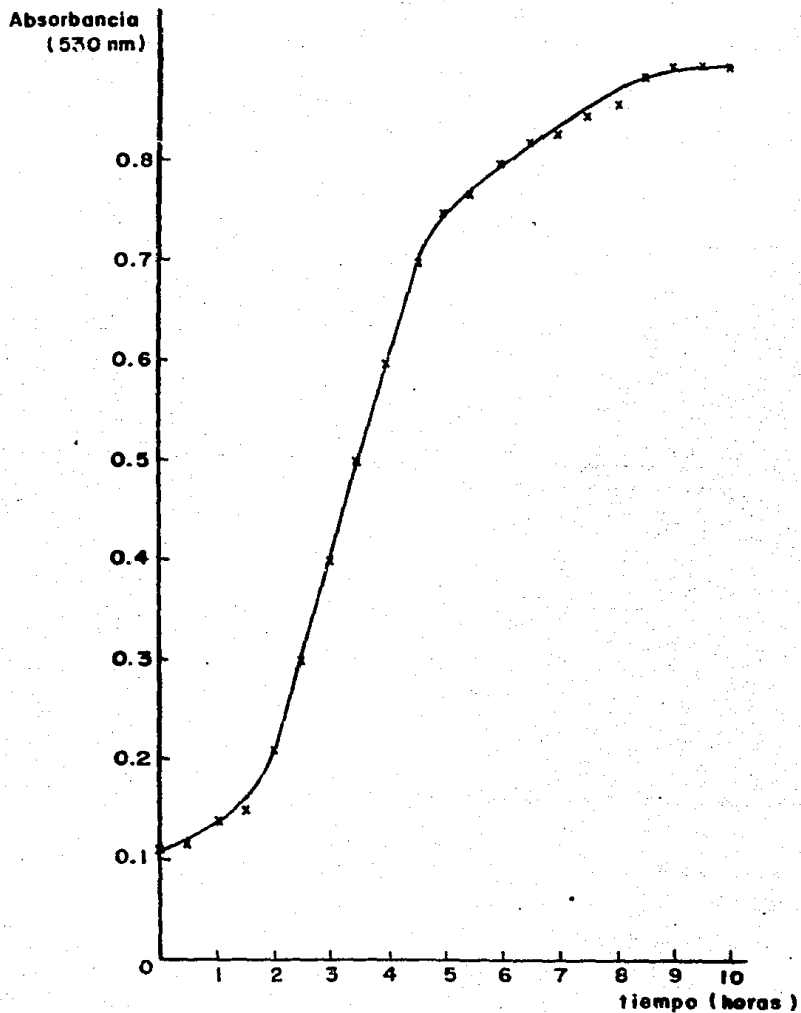
Para la determinación de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) se graficó el logaritmo de la absorbancia contra el tiempo, (figura 5) obteniendo la linealización de la fase exponencial de la curva de crecimiento, la pendiente de la recta es  $\mu$  con un valor de  $0.51 \text{ h}^{-1}$ , que fue calculada por regresión lineal.

El crecimiento celular se calculó por medio de una curva de calibración (Figura 6) en la que se grafica la absorbancia a 530 nm con respecto al peso seco de la biomasa.

Las células fueron cosechadas a una D.O. de 0.7 (punto en el cual se alcanza la fase exponencial tardía)

Figura 4

Cinética de Crecimiento de Cellulomonas flavigena  
en BHI .



**Figura 4. Se muestra la curva de crecimiento de C. flavigena en medio infusión cerebro-corazón-(BHI), la fase lag tiene duración aproximada de dos horas después de la adición del inóculo, se guía de la fase exponencial que termina a las- 4:20 horas.**

Figura 5 Curva semilogarítmica de crecimiento de Cellulomonas flavigena

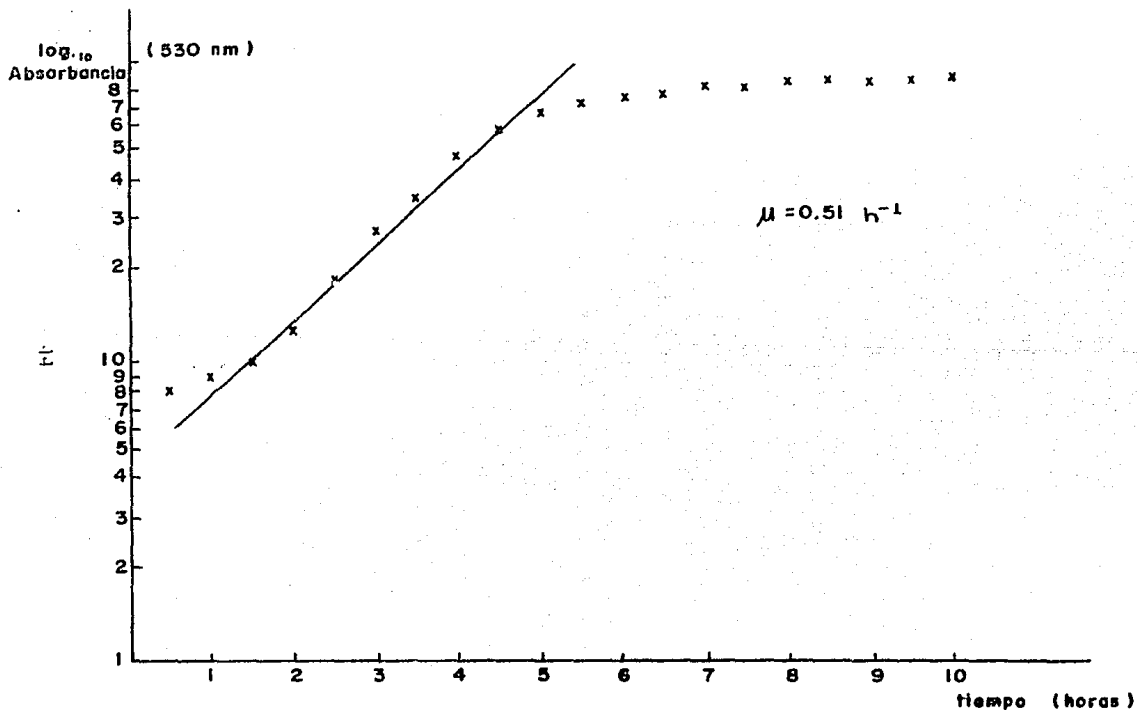


Figura 5. Se graficó el logaritmo de la absorbancia contra el tiempo, parámetros de la cinética de crecimiento. La pendiente de la recta es la velocidad específica de crecimiento  $\mu = 0.51 \text{ h}^{-1}$ --- calculada por regresión lineal. El tiempo de du--plicación fue de 1:36 horas.

obteniendo 0.4 g de células por litro de cultivo en peso seco, de acuerdo a la curva de calibración de la que se obtuvo la ecuación de la recta  $y=1.405x + 0.0814$ , con un coeficiente de correlación lineal de 0.99.

#### Obtención de DNA total.

El DNA de *C. flavigena* fue purificado mediante el uso de diferentes metodologías, mismas que fueron adaptadas, ya que no se han reportado técnicas de purificación de DNA en esta bacteria.

La técnica descrita por Babykin y Zinchekov (1984) se adaptó variando las condiciones de incubación (ver métodos) y concentración de lisozima, con el objeto de obtener una adecuada lisis celular. En esta técnica el lisado celular completo es sometido a ultracentrifugación, proceso en el cual el DNA es separado por diferencias en densidad. La banda obtenida por esta técnica se colectó por elución del gradiente, la densidad calculada para el DNA fue de 1.728 g/cm<sup>3</sup>.

Se calculó la densidad de los volúmenes colectados y se midió la absorbancia a 260 nm para determinar la cantidad de ácidos nucleicos presentes en cada uno (1 unidad de D.O. 260 nm = 50 µg de DNA). En la figura 7 se observa la elución del gradiente; en los primeros volúmenes se aprecia la elución de RNA, el cual es empastillado en el proceso de ultracentrifugación, posteriormente en los volúmenes 4.5 a 7 ml puede apreciarse la elución de la



Figura 6. Mediante una curva de calibración se determinó el crecimiento celular. Se graficó la absorbancia a 530 nm con respecto al peso seco de la biomasa.

Figura 6 Curva de calibración Cellulomonas flavigena

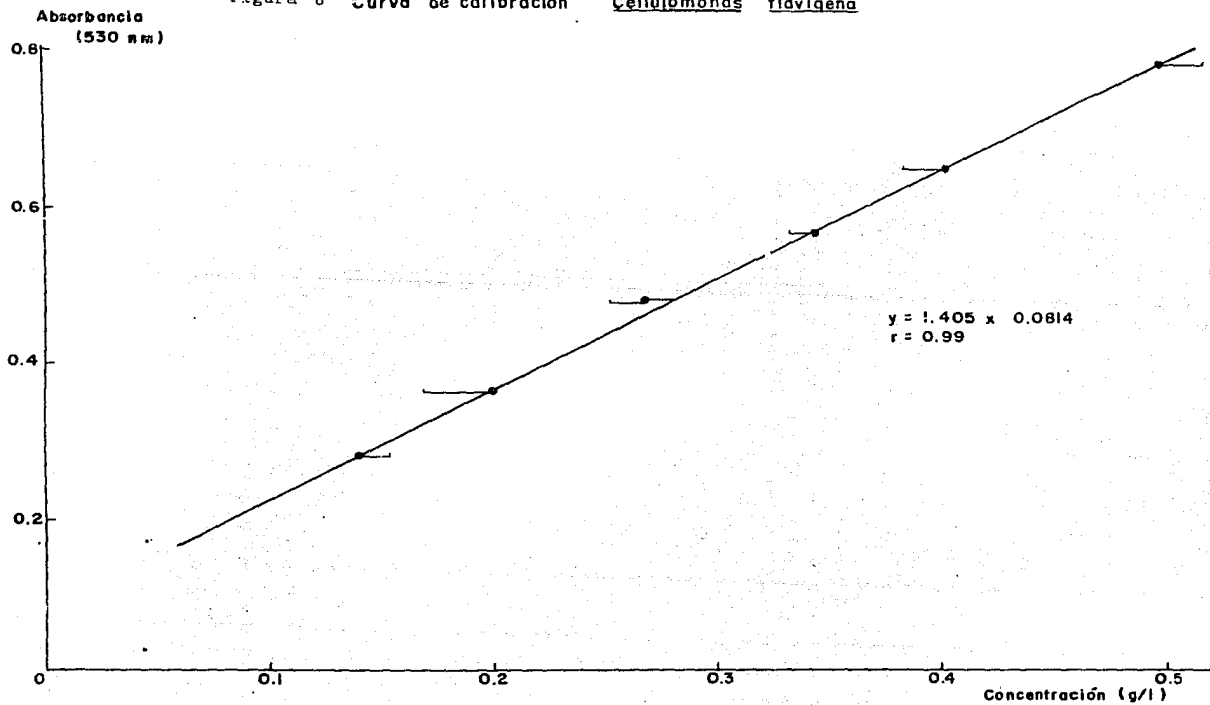


Figura 7. Se muestra la densidad del DNA de C. flavigena sometido a gradiente isopícnico de CsCl. Con círculos (●) se observa el gradiente de densidad generado, con triángulos (▲) se observa la cantidad de ácidos nucleicos medidos por absorbancia a 260 nm.

Densidad  
Óptica  
(260 nm)

Figura 7 Gradiente isopícnico de CsCl  
C. flavigena

Densidad  
(g/ml)

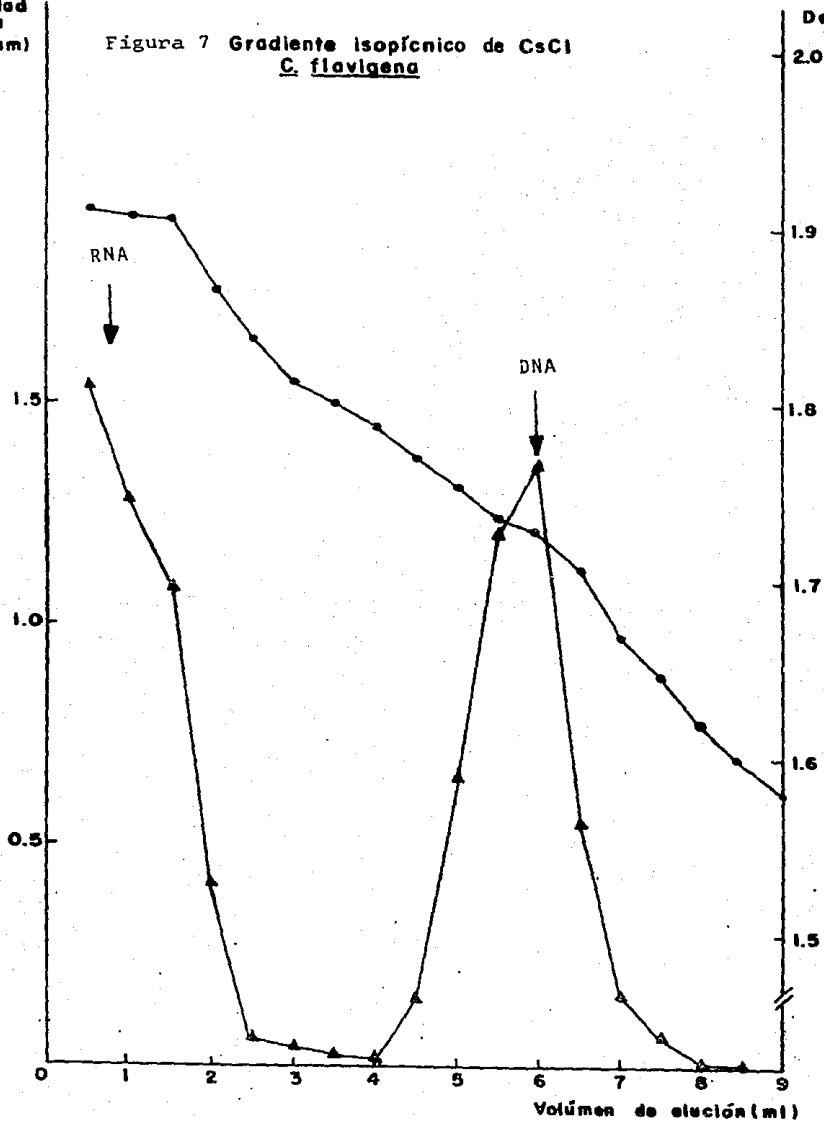
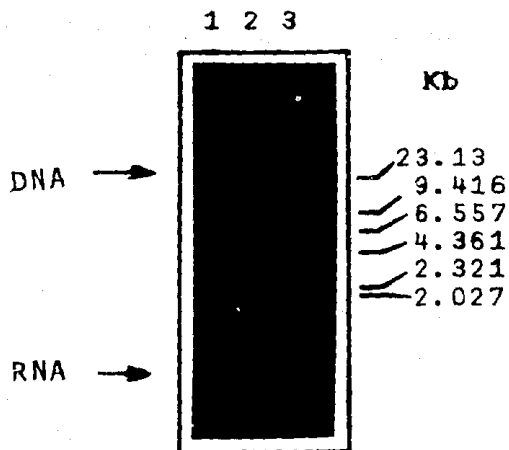


Figura 8 ELECTROFORESIS DEL DNA OBTENIDO EN GRADIENTE ISOPICNICO DE CsCl.



El DNA obtenido por la técnica de Gradiente Isopícnico de CsCl se sometió a electroforesis en gel de agarosa 0.7 %. Carriles 1 y 2 DNA de C. flavigena; 3, Control de peso molecular: Fago  $\lambda$  restringido con Hind III

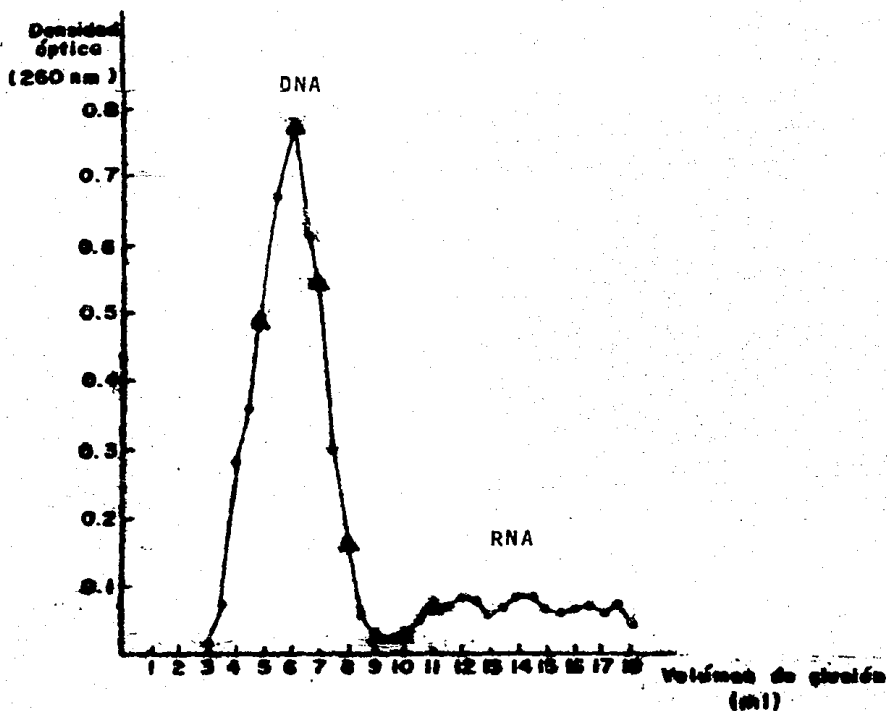
banda de DNA. El valor calculado de fracción molar de GC para el pico de DNA fue de 70.4 %. Las fracciones correspondientes al pico de DNA fueron unidas, la muestra fue posteriormente sometida a electroforesis en gel de agarosa, resultando una banda definida de alto peso molecular (Figura 8).

Se utilizó otra técnica para la obtención de DNA, variando de la técnica original (Silhavy, 1984) los tiempos de incubación y concentración de lisozima y EDTA.

Para adaptar esta técnica de purificación, se hicieron dos modificaciones importantes: se aumentó la concentración de lisozima de 2 a 5 mg/ml de concentración final, con el objeto de degradar eficientemente la pared celular bacteriana. La muestra obtenida tuvo elevada actividad de nucleasas que degradaban el DNA. Con el objeto de disminuir esta actividad, se aumentó la concentración de EDTA de 10 mM a 50 mM, para quelar los iones  $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  que actúan como cofactores de las nucleasas. El DNA obtenido se sometió a electroforesis, observándose un patrón electroforético semejante al obtenido por la técnica de gradiente de CsCl (dato no mostrado).

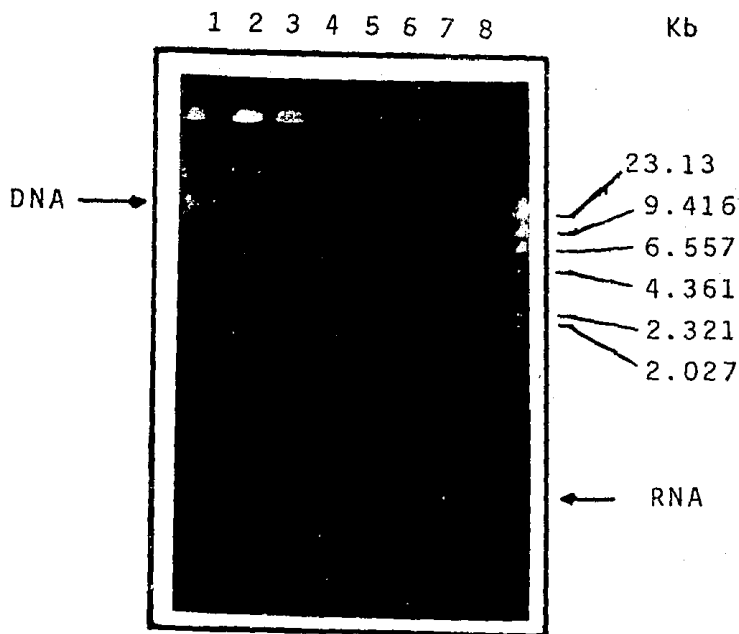
En las técnicas utilizadas se obtuvo una mezcla de DNA con RNA, aún cuando la muestra era incubada con RNasa A, por lo que se procedió a emplear una cromatografía de exclusión molecular, utilizando un soporte de Sepharosa

Figura 9. PERFIL DE ELUCION DE ACIDOS NUCLEICOS EN CROMATOGRAFIA DE EXCLUSION MOLECULAR (SEPHAROSA 4B).



Se observa la absorbancia a 260 nm en función del volumen de elución de la columna. En los volúmenes 3 a 8 ml se observa una región de DNA, seguida de la elución de RNA. Los triángulos (▲) muestran los volúmenes sometidos a electroforesis. -- (siguiente figura).

Figura 10. ELECTROFORESIS DE ACIDOS NUCLEICOS OBTENIDOS POR CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSA 4B.



Los carriles 1 a 7 corresponden a los volúmenes 5 a 11 de la cromatografía de ácidos nucleicos; en los carriles 1, 2, 3 y 4 se aprecia al DNA, - se sugiere que corresponde al cromosoma. En el carril 7 se observa la elución de RNA como una banda tenue y difusa de bajo peso molecular; carril 8, Fago  $\lambda$ /Hind III. (Gel de agarosa 0.7 % - teñido con bromuro de etidio).



48, esta cromatografía permite la filtración de moléculas grandes y retarda la elución de las pequeñas, el rango útil de fraccionamiento de este soporte es de  $60 \text{ } 000$  a  $2 \times 10^7$  d. En la figura 9 se observa el perfil de elución de la muestra que fue incubada por 5 horas con RNasa A (que degrada RNA monocatenario). El incremento en la absorbancia (260 nm) de los volúmenes de elución de 3 a 8 ml corresponden al DNA, seguida de la elución de RNA. Por este método se obtiene una sola población de DNA de elevado peso molecular que corresponde al cromosoma. El RNA que se aprecia en la elución corresponde al que no pudo ser degradado por la RNasa A, debido a que éste pudo haber adquirido estructura secundaria (formación de asa y tallo) sobre la cual la enzima no puede actuar.

En la figura 10 se muestra la electroforesis realizada con los volúmenes 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 ml de la cromatografía. En esta figura se observa la separación de DNA de elevado peso molecular (carriles 1 a 4), en los carriles 5 y 6 no se detectaron ácidos nucleicos, en el carril 7 que corresponde al volumen de elución de 11 ml aparece una banda tenue que corresponde a RNA no hidrolizado.

Los rendimientos obtenidos de las técnicas utilizadas para purificar DNA de C. flavigena se muestran en la tabla 1. Como puede apreciarse, del método de gradiente isopícnico de  $\text{CsCl}$  se obtiene la mayor cantidad de DNA,

TABLA 1. COMPARACION DE LOS METODOS DE  
EXTRACCION DE DNA UTILIZADOS.

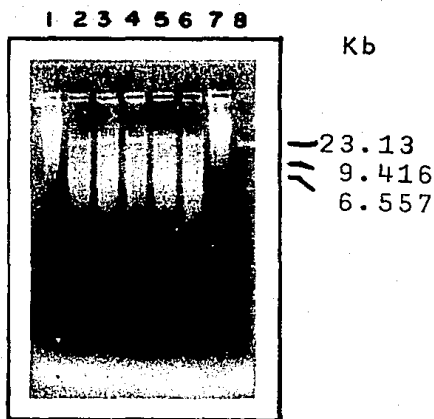
| METODO                                     | DNA OBTENIDO<br>mg/l de cultivo | D.O. 260/280 | REFERENCIA.     |
|--|---------------------------------|--------------|-----------------|
| Gradiente iso-<br>pícnico de CsCl          | 5.3                             | 1.78         | Babykin (1984)  |
| Extracción de<br>DNA total                 | 3.20                            | 1.75         | Silhavy (1984)  |
| Cromatografía<br>de exclusión<br>molecular | 0.58                            | 1.8          | Maniatis (1982) |

Se presenta la cantidad de DNA obtenido por litro de cultivo en las técnicas utilizadas, que fue calculado por absorbancia a 260 nm; 1 unidad de D.O. = 50 µg/ml de DNA. Cuando existe alta pureza en el DNA, el cociente D.O. 260/280 nm = 1.8

5.3 mg en un litro de cultivo, además de obtenerse una pureza aceptable. Con respecto al método de Silhavy se obtienen 3.29 mg con pureza también aceptable, finalmente de la técnica de purificación por cromatografía se obtiene 0.58 mg por litro de cultivo, valor diez veces menor que el obtenido por gradiente, sin embargo, posee elevada pureza.

Una vez aislado y purificado el DNA mediante las metodologías adaptadas, se procedió a caracterizarlo con enzimas de restricción, para lo cual se realizó una cinética de digestión con la enzima Eco RI, variando los tiempos de incubación con intervalos de 30 min. (Figura 11). A medida que aumentó el tiempo de digestión se originaron fragmentos de menor peso molecular. Desde los primeros 30 min. de incubación se originaron fragmentos de un rango de 23 a <1 Kb. Esta enzima reconoce una secuencia nucleotídica de 6 pares de bases y puede predecirse que la enzima encontrará una secuencia de reconocimiento cada  $4^6$  pares de nucleótidos, asumiendo que todas las bases son igualmente frecuentes. En la electroforesis se usó como marcador de referencia el cromosoma de E. coli C498 sin restringir, para compararlo con la migración de DNA de C. flavigena, como se observa, ambas muestras de DNA tienen un patrón electroforético semejante.

Figura 11 DIGESTION DE DNA DE  
C. flavigena CON Eco RI.



El DNA obtenido por el método de Silhavy se restringió con Eco RI a diferentes -- tiempos de digestión. Carril 1, DNA de -- C. flavigena sin restringir; carriles 2- al 6, digestiones a diferentes tiempos - de 30, 60, 90, 120 y 150 min., respecti- vamente; 7, cromosoma de E. coli C600 co mo control; 8, Fago  $\lambda$ /Hind III.

Esta cinética de digestión también fue llevada a cabo con la enzima Pst I, obteniendo un patrón electroforético similar (dato no mostrado).

El DNA de C. flavigena fue digerido también con otras enzimas, en la figura 12 se muestran los resultados de la digestión del DNA de C. flavigena con las enzimas Eco RI, Pst I, Hind III, Bam HI y Pal I, generándose en cada una fragmentos de un rango de peso molecular de > 23 Kb a < 1 Kb. La digestión con las enzimas Bgl II y Hpa I que también cortaron el DNA no es mostrada.

Con el objeto de ampliar la caracterización del DNA de la bacteria se emplearon dos enzimas isoesquizoméricas: Hpa II y Msp I, detectando digestión similar con ambas enzimas lo que señala que no existen modificaciones en su secuencia de reconocimiento (Figura 13).

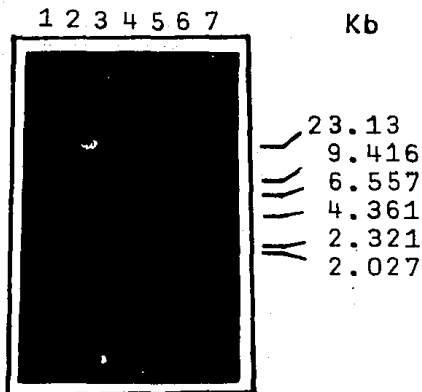
Por otra parte se determinó que C. flavigena no posee elementos extracromosómicos, ya que en las técnicas de extracción de DNA total no se evidenció la presencia de plásmidos.

Se utilizaron metodologías para detección de plásmidos por lisis alcalina (Kado y Liu, 1981), obteniendo el mismo material que el control sin plásmido E. coli C699, que al ser restringido originó fragmentos de tamaños diversos de 23 a 1 Kb (dato no mostrado).

Se efectuó la lisis <in situ> para descartar la presencia de plásmidos (Eckhart, 1984), obteniendo una

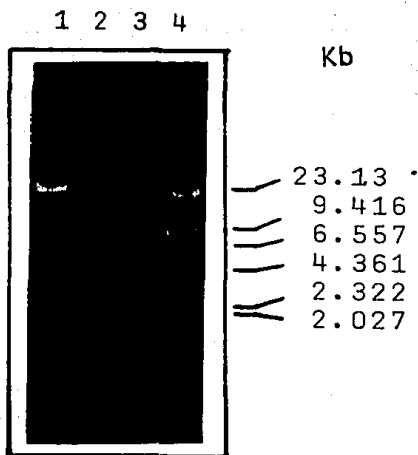
sola banda de alto peso molecular que corresponde al cromosoma, ya que aparece la misma banda en el control E. coli C600 que no posee plásmidos. (figura 14).

Figura 12 DIGESTION DEL DNA DE  
C. flavigena.



El DNA de C. flavigena obtenido por el método de Silhavy fue restringido. Carril 1, DNA sin restringir; 2, con Eco RI; 3, Pst I; 4, Hind III; 5, Bam HI; 6, Pal I; 7, Fago  $\lambda$ /Hind III como marcador de peso molecular. Gel de agarosa 0.7 %, teñido con bromuro de etidio.

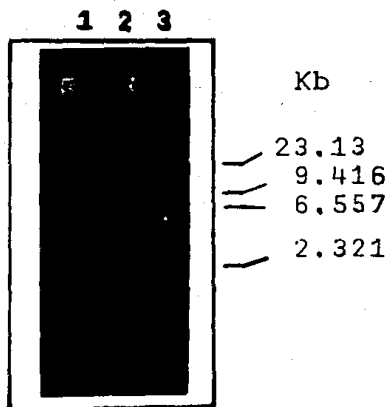
Figura 13 DIGESTION DE DNA CON ISO-  
ESQUIZOMEROS DE ENDONUCLEASAS DE --  
RESTRICCION.



El DNA obtenido por el método de Silhavy fue restringido con los isoesquizómeros Hpa II y Msp I. Carril 1, DNA sin restringir, 2, restringido con Hpa II; 3, restringido con Msp I 4, Marcador de peso molecular  $\lambda$  /Hind III. Gel de agarosa 0.7 %, teñido con bromuro de etidio.



Figura 14 LISIS<IN SITU>



La muestra obtenida por esta metodología -- (Eckhard, 1978) fue sometida a electroforesis. Carril 1, DNA de C. flavigena; 2, DNA cromosómico de E. coli C600; 3,  $\lambda$ /Hind III. Gel de Agarosa 0.7 %, teñido con Bromuro de Etidio.

## VII. DISCUSION.

Se establecieron las condiciones de cultivo de C. flavigena en medio BHI, obteniéndose una velocidad específica de crecimiento  $\mu=0.51 \text{ h}^{-1}$ , y un tiempo de duplicación (td) de 1.36 h, el cual se considera como un valor elevado ya que la bacteria se crece en un medio de cultivo completo.

Las células fueron cosechadas en la fase exponencial tardía, ya que en este estadio las bacterias aún no han engrosado su pared celular, lo que permite una óptima lisis celular, indispensable para extraer y purificar el DNA.

Las metodologías utilizadas para extraer el DNA fueron adaptadas a las condiciones del laboratorio. El método por el cual se obtiene mayor cantidad de DNA con una actividad nucleolítica mínima es el de Babykin (1984) que emplea gradientes isopícnicos de CsCl. En esta técnica no se descartan restos celulares, sino que toda la muestra es sometida a ultracentrifugación.

Por otra parte, en la técnica de extracción por lisado claro (Silhavy, 1984), se obtuvo menor cantidad de DNA ya que en proceso de purificación hay pérdida de material.

Se observa que la pureza del DNA es aceptable en las técnicas utilizadas, ya que el cociente  $D. O. 260/280$  es cercano a 1.8 (tabla 1). Cuando este cociente es cercano a 1.8 el DNA presenta pureza aceptable (Maniatis, 1982). El DNA obtenido por las metodologías utilizadas fue susceptible de ser digerido con endonucleasas de restricción, lo cual confirma la pureza.

La purificación de DNA por cromatografía de exclusión molecular mostró menor cantidad de proteínas, mientras que la obtención de DNA mediante el uso de las metodologías publicadas por Babykin (1984) y Sulhavy (1984) muestran valores de  $D. O. 260/280$  de 1.78 y 1.75 respectivamente, que revelan elevada pureza.

La cantidad de DNA obtenido fue mayor mediante el uso de gradientes isopícnicos de  $CsCl$ , mientras que la técnica de purificación por cromatografía de exclusión molecular mostró la cantidad mas baja de DNA.

En las técnicas montadas se aumentó la concentración final de lisozima, ya que esta bacteria posee una pared celular gruesa (es positiva a la tinción Gram), además debido a la gran cantidad de nucleasas se incrementó la concentración de EDTA, con el fin de inhibir la actividad nucleolítica.

La muestra obtenida del gradiente isopícnico de  $CsCl$  mostró una banda de DNA de densidad  $1.728 \text{ g/cm}^3$ , que corresponde a  $\% GC = 70.4$ ; valor menor al reportado por

Yamada y Komataga (1978) de 72.7 y 74.6 %, que fue calculado por Tm.

El DNA purificado fue restringido con las enzimas Eco RI, Pst I, Hind III, Bam HI, Bgl II, Pst I y Hpa I. Las enzimas utilizadas reconocen secuencias nucleotídicas de 6 pares de bases. Se determinaron las condiciones de restricción con el objeto de poder utilizar los fragmentos de 10 a 4 Kb en la clonación molecular de las celulasas.

Para caracterizar el DNA de C. flavigena también se efectuaron restricciones con las enzimas isoesquizoméricas Hpa II y Msp I, ambas enzimas restringieron el DNA, sugiriendo que la secuencia de reconocimiento no se encuentra modificada.

La frecuencia para encontrar la secuencia de reconocimiento para estas enzimas es más alta que las de las enzimas utilizadas anteriormente, ya que reconocen la secuencia con 4 pares de bases, teniendo la probabilidad de encontrar esta secuencia de  $1/4^4$  secuencias. Para determinar que el DNA de C. flavigena no está modificado es necesario efectuar mas ensayos con otras enzimas isoesquizoméricas.

Se presentan evidencias que sugieren que la bacteria no posee elementos extracromosómicos con las metodologías utilizadas, ya que no se detectaron en las técnicas de extracción de DNA total ni en las técnicas de

identificación y aislamiento de plásmidos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo servirán como base para la posterior clonación de los genes que codifican para las enzimas celulolíticas en C. flavigena con el fin de aumentar los rendimientos en la producción de proteína de origen unicelular.

Para la continuación del trabajo se sugiere que se efectúen mas ensayos de restricción con juegos de enzimas isoesquizoméricas con el objeto de determinar qué secuencias del DNA de C. flavigena se encuentran modificadas; determinar el tamaño del cromosoma; Transformar genéticamente a C. flavigena con vectores de clonación para bacterias Gram positivas. Asimismo desarrollar el método de selección de las clonas recombinantes y detectar la hiperproducción de enzimas celulolíticas.

## VII. CONCLUSIONES.

Se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento de C. flavigena en medio infusión cerebro-corazón.

Se adaptaron y modificaron metodologías para extracción y purificación de DNA en las condiciones de laboratorio. El DNA de C. flavigena es susceptible de restricción con las enzimas Eco RI, Pst I, Hind III, Bgl II, Pst I, Bam HI y Hpa I. La digestión con los isoesquizómeros Hpa II y Hsp I muestra que la secuencia que reconocen no se encuentra modificada por metilación en la citosina interna, por lo que ambas enzimas pudieron restringir.

Al emplear la técnica para detección de plásmidos (Kado, 1981) por lisis alcalina, se obtuvo una banda de alto peso molecular en gel de agarosa semejante a la obtenida en E. coli C600, que no posee plásmidos, además este material al ser digerido, originó un patrón de restricción típico del cromosoma.

Finalmente para descartar la posibilidad de que se eliminara el plásmido durante la extracción, se realizó

una lisis <in situ>, resultando una sola banda correspondiente al cromosoma bacteriano de C. flavigena.

No se evidenció la presencia de plásmidos naturales con las técnicas utilizadas por lo que no existe la posibilidad de problemas de incompatibilidad de plásmidos al transformar a la bacteria.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1) Applevard, R. K. (1954) Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from Escherichia coli K 12 Genetics 39:449.

2) Babykin M. M., Zinchekov V. V. (1984) Rapid Separation of DNAs by buoyant density in three-layer CsCl gradient. Analytical Biochemistry 97:196-191.

3) Barley, Ollis (1977) Biochemical engineering fundamentals Mc Graw Hill USA.

4) Beguin P., Eisen H. (1978). Purification and partial characterization of three extracellular cellulases from Cellulomonas sp. Eur. J. Biochem. 87:525-531.

5) Bergey D. H. (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Robert Earle & Norman Edwin Gibbons Eds. 8 Ed. Baltimore USA.

6) Bolivar F., Backman K. (1979) Plasmids of Escherichia coli as cloning vectors. Methods en Enzimology 68:245.

7) Boyer H. W., Roulland-Dussoix (1969) A complementation analysis of the restriction & modification of DNA in Escherichia coli Journal of Molecular Biology. 41:459.



8) Boyer H. W. (1971) DNA Restriction and Modification Mechanisms in Bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 25:153.

9) Broda P. (1979) Plasmids W. H. Freeman & Co. Oxford & San Francisco USA.

10) Collmer A., Wilson D. B. (1983) Cloning and Expression of a Thermomonospora YX Endocellulase Gene in E. coli. Bio/technology 1:7 594-601.

11) Cornet P., Miller J., Beguin P. Aubert J. P. (1983) Characterization of two cell (Cellulose Degradation) Genes of Clostridium thermocellum coding for endoglucanases. Bio/tecnology 1:7 589-593.

12) Cuskey S. M., Montenecourt B. S., Eveleigh D. E. (1983) Liquid Fuel Developments. Ed. Donald L. Wise. CRC Press USA 32-43 p.

13) David, S. (1978) Plasmid determined resistance to antimicrobial agents Ann. Rev. Microb. 32:469-518.

14) De la Torre M. M. (1981) Producción de proteínas alimenticias de origen unicelular en residuos lignocelulósicos. Tesis Doctoral ENCB IPN.

15) Eckardt Thomas (1978) A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid 1:584:588.

16) Gilkes N. R., Kilburn D. G. Langsford M. L., Miller R. C., Wakarchuk W. W., Warren R. A., Whittle D. J., Wong W. K. (1984) Isolation and Characterization of Escherichia coli Clones Expressing Cellulase Genes from Cellulomonas fimi. Journal of Gen. Microbiol. 139: 1377-1384.

17) Gilkes N.R., Langsford M.N. Kilburn D. G., Miller R. C., Warren R. A. (1984) Mode of action and substrate specificities of cellulase from clones bacterial genes. Journal of Biological Chemistry. 259:16,10455-10459.

18) Ghose T. K. & Das K. (1971) A simplified kinetic approach to cellulose-cellulase system. Advances in Biochemical Engineering V 1, Springer-Verlag N. Y. pp 55.

19) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. (1976). Nucleic Acid 3th. ed. V II G.D. Fassman Ed. CRC Press 419-425.

20) Kado C. I., Liu S. T. (1981) Rapid procedure for

detection and isolation of large and small plasmids, Journal of Bacteriology 145:3 1365-1373.

21) Koide Y., Nakamura A. Uozumi T., Beppu T. (1986) Molecular cloning of a cellulase gene from Bacillus subtilis and its expression in Escherichia coli. Agric. Biol. Chem. 59:1 233-237.

22) Langsford M. L., Gilkes N. R., Wakarchuk W. W., Kilburn D. G., Miller R. C., Warren R. A. (1982), The cellulase system of Cellulomonas fimi Journal of general Microbiology. 130:1367-1376.

23) Lehninger A. (1984) Bioquímica. 3a. Ed. Omega, Barcelona p. 289-293.

24) Lorencez G. I. (1979) Estudios sobre la degradación de celulosa por un cultivo mixto de bacterias. Tesis IBQ, IPN.

25) Mandel M., Schildkraut C. L., Marmur J. et al (1968) Use of CsCl density gradient analysis for determining the guanine plus cytosine content of DNA. Methods of enzymology 12 B:185-206.

26) Maniatis T., Fritsch E. F. et al (1982) Molecular

cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, (Ed) Cold Spring Harbor, NY.

27) Monteneourt B. S. (1983) Applications of recombinant DNA technology to cellulose hydrolysis. ASM Technology Report. Bio/technology 1:2 166

28) Monteneourt B. S. Eveleigh D. E. (1979) Production and characterization of high-yielding mutants of Trichoderma reesei. TAPPI 28:101.

29) Müller W., Gautier F. (1975) Interaction of Heteroaromatic compounds with nucleic acid. Eur. J. Biochem. 54:385-394.

30) Nakamura K., Misawa N., Kitamura K. (1986) Cellulase genes of Cellulomonas uda CB4. I Cloning and expression of B-glucosidase genes in Escherichia coli. Journal of Biotechnology 3:247-253.

31) Nakamura K., Misawa M., Kitamura K. (1986) Cellulase genes of Cellulomonas uda CB4. II Cloning and expression of a CM-Cellulose Hydrolyzing enzyme (endoglucanase) Gene in Escherichia coli. Journal of Biotechnology. 3:239-246.

32) Novick R., Hoppensteadt C. (1978) On plasmid

- incompatibility. Plasmid 1:4221-425.
- 33) Ponce-Noyola T. (1982) Estudio de la dinámica de un cultivo mixto (Cellulomonas flavigena y Xanthomonas sp) propagado en bagazo de caña. Tesis IBO, IPN.
- 34) Resse E. T., Siu R. G. (1950) The Biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanisms of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology* 59: 485.
- 35) Ryu D. O., Mandels N. (1982) Cellulases: Biosynthesis and Applications. *Enzyme Microb. Technol.* 5: 91-102.
- 36) Sashihara N., Kudo T., Horokoshi K. (1984) Molecular cloning and expression of cellulase genes of alkalophilic Bacillus sp strain N-4 in Escherichia coli. *Journal of Bacteriology* 158:2 503-506.
- 37) Shoemaker S., Schweickart B. Ladner M., Gelfand P., Kwok S., Myambo K., Innis M.k (1983) Molecular cloning of exo-cellobihydrolase I derived from Trichoderma reesei strain L 27. *BIO/TECHNOLOGY*. Oct. 691-695.
- 38) Silhavy T. J., Berman M. L. (1984) Experiments with gen fusions. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.

39) Teeri T., Salovuory I., Knowles J. (1983) The molecular cloning of the major cellulase gene from Trichoderma reesei. BIO/TECHNOLOGY. Oct. 696-699.

40) Waalwijk (1978) MspI, an isoschizomer of HpaII which cleaves both unmethylated and methylated HpaII sites. Nucleic Acids Res. 5: 3231-3236.

41) Wakarchuk W. W., Kilburg D. G., Warren R. A. (1984) The preliminary characterization of the B-glucosidases of Cellulomonas fimi. Journal of General Microbiology. 130:1385-1389.

42) Wells J. R., Brunk C. F. (1979) Rapid CsCl gradient using a vertical rotor. Analytical Biochemistry 97: 196-201.

43) Whittle D. J., Kilburn D. G., Warren R. A., Miller R. C. (1982) Molecular cloning of a Cellulomonas fimi cellulase gene in Escherichia coli. Gene 17: 139-145.

44) Yamada y Komagata (1978) Taxonomic studies on corynebacteria. III DNA base composition of coryneform bacteria. Journal Gen Appl Microbiol 16: 215-224.

## X. APENDICE.

### Crecimiento de población.

El crecimiento ocurre en razón exponencial y éste es consecuencia del crecimiento celular y de la división. El crecimiento es expresado por la ecuación diferencial:

$$dn/dt = \mu n$$

donde

$n$  = cantidad de células

$\mu$  = tasa específica de crecimiento.

Para determinar el tiempo de duplicación  $t_d$ , entendido como el tiempo requerido para que la población se duplique, se integra la ecuación desde los límites  $n_0$  y  $n_1$ ; y  $t_0$  a  $t$ .

$$\int_{n_0}^n dn/n = \mu \int_{t_0}^t dt$$

$$\ln n/n_0 = \mu(t-t_0)$$

cuando  $n = 2n_0$

$$\ln 2n_0/n_0 = \mu dt$$

$$t_d = t - t_0$$

$$t_d = \ln 2/\mu$$

Barley & Ollis (1977).

Para  $\mu = 0.51 \text{ h}^{-1}$  de C. flavigena en BHI:

$$t_d = 1:36 \text{ horas.}$$