



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**La Glucosa Deshidrogenasa (GDH) Membranal de  
*Gluconacetobacter diazotrophicus*. Su contribución a la  
respiración y la fijación de nitrógeno**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**LESLIE OLMEDO NIEVA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JOSÉ EDGARDO ESCAMILLA MARVAN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 esta 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.

1. Datos del alumno	
Apellido paterno	Olmedo
Apellido materno	Nieva
Nombre(s)	Leslie
Teléfono	58 41 09 18
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	303242503
2. Datos del tutor	
Grado	Dr.
Nombre(s)	José Edgardo
Apellido paterno	Escamilla
Apellido materno	Marván
3. Datos del sinodal 1	
Grado	Dr.
Nombre(s)	Heliodoro
Apellido paterno	Celis
Apellido materno	Sandoval
4. Datos del sinodal 2	
Grado	Dr.
Nombre(s)	Luis
Apellido paterno	Servín
Apellido materno	González
5. Datos del sinodal 3	
Grado	Dra.
Nombre(s)	Luisa Albarina
Apellido paterno	Alba
Apellido materno	Lois
6. Datos del sinodal 4	
Grado	Dr.
Nombre(s)	Salvador
Apellido paterno	Uribe
Apellido materno	Carvajal
7. Datos del trabajo escrito.	
Título	La Glucosa Deshidrogenasa (GDH) Membranal de <i>Gluconacetobacter</i> <i>diazotrophicus</i> . Su contribución a la respiración y la fijación de nitrógeno
Número de páginas	68 páginas
Año	2011



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

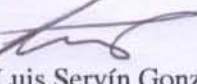
**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
Director General  
Dirección General de Administración Escolar  
**Presente**

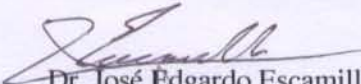
Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

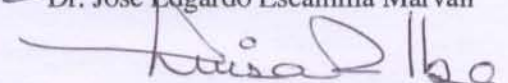
**La glucosa deshidrogenasa (GDH) membranal de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Su contribución a la respiración y la fijación de nitrógeno**

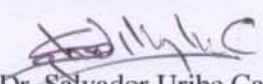
realizado por **Olmedo Nieva Leslie** con número de cuenta **3-0324250-3** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario  Dr. Heliodoro Celis Sandoval

Propietario  Dr. Luis Servín González

Propietario  Dr. José Edgardo Escamilla Marván  
Tutor

Suplente  Dra. Luisa Albarina Alba Lois

Suplente  Dr. Salvador Uribe Carvajal

Atentamente,  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D. F., a 02 de junio de 2011  
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.  
MAG/CZS/cigs

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Martha Contreras que colaboró arduamente con el presente trabajo en todo momento, proponiendo siempre ideas que enriquecían lo que hacía.

A mi tutor el Dr. Edgardo Escamilla que nos brindó, además de un valioso grupo de trabajo, una familia más y nos proporcionó verdaderas lecciones de vida.

A mis sinodales el Dr. Heliodoro Celis, el Dr. Luis Servín, la Dra. Luisa A. Alba y el Dr. Salvador Uribe, por hacer un tiempo en sus ocupaciones para revisar este trabajo, y sobre todo, por sus comentarios que me ayudaron a comprender muchas cosas.

## DEDICATORIA

Cada vez que escribía un fragmento de este trabajo o que sólo pensaba en el, una parte de mí se imaginaba como iba a expresar las cosas que siento por cada una de las personas que mencionaré en esta parte. Supongo que es difícil que pueda transmitir lo que siento, creo que más delicado que escribir un método, es hablar a las personas que quiero o que aprecio, por el tiempo que me brindaron para apoyarme, educarme o simplemente escucharme.

Primero que nada agradezco a mi mamá Lidia Nieva y mi papá Jorge Olmedo, por apoyarme en todo lo que quise hacer, y por esforzarse cada día de su vida por lograr que fuera lo que soy ahora. Por despertarme todos los días y cuidarme todas las noches. MIL GRACIAS!!

A mi hermano Jorge R. Olmedo por formar parte importante de mi vida y hacerme reír con todas sus ocurrencias.

A la Dra. Martha Contreras que siempre fue una guía en todos los aspectos de mi vida. Porque sus consejos y palabras de aliento me motivaron a seguir adelante frente a todo lo que pudo presentarse.

A Azucena, porque en todo momento se que está presente, para apoyarme, escucharme y recordarme los pequeños detalles de la vida que me hacen sonreír, porque sólo escucharla me da la tranquilidad que necesito y cuando más la necesito.

A Cristián que nos brinda momentos de alegría a todos en el laboratorio, y que me apoya siempre que lo necesito, ya sea en el trabajo o como mejor amigo ☺.

A Sury que es como mi hermana grande y que me enseñó muchas cosas desde que llegué al laboratorio. Porque siempre nos apoya y nos cuida, y nunca se olvida de ninguno de nosotros.

A mis tíos y primos, sobre todo a mi tío Rudy y su familia, que siempre se preocuparon por saber lo que hacía y apoyarme cuando lo necesitaba. Los quiero!

A Marco y los peques, porque me mostraron una parte de la vida y de mí que no conocía. A Marco porque siempre cuida de mí y me abre los ojos día a día.

También agradezco a mis amigos Gaby, Helga y Rolando, por acompañarme en muchos momentos, darme valiosos consejos o compartirme sus vidas y dejarme formar parte de ellas.

# Índice

Página

<b>I.</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1	Bacterias del ácido acético y la fermentación oxidativa .....	1
1.2	Sistemas respiratorios en bacterias ácido acéticas .....	4
1.3	Deshidrogenasas del espacio periplásmico: dependientes de PQQ .....	6
<b>II.</b>	<b>Antecedentes</b> .....	<b>9</b>
2.1	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	9
2.2	El sistema respiratorio de <i>Ga. diazotrophicus</i> .....	11
2.3	Glucosa deshidrogenasa .....	12
2.4	Importancia de la PQQ-glucosa deshidrogenasa en <i>Ga. diazotrophicus</i> .	15
2.5	Mutante <i>M3</i> .....	16
<b>III.</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>17</b>
<b>IV.</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>18</b>
4.1	Objetivo general .....	18
4.2	Objetivos particulares y Metas .....	18
	Objetivo 1	
	Metas asociadas	
	Objetivo 2	
	Metas asociadas	
<b>V.</b>	<b>Justificación</b> .....	<b>19</b>

<b>VI.</b>	<b>Material y métodos</b> .....	<b>20</b>
6.1	Material biológico .....	20
6.2	Medios de cultivo .....	20
6.3	Determinación de la sensibilidad a antibióticos de <i>Ga. diazotrophicus</i> WT .....	21
6.4	Condiciones para el crecimiento del material biológico .....	21
6.5	Extracción de DNA genómico .....	21
6.6	Identificación del gen <i>gdhA</i> para <i>Ga. diazotrophicus</i> PAL5 WT .....	23
6.7	Diseño de oligonucleótidos .....	23
6.8	Amplificación del gen <i>gdhA</i> .....	25
6.9	Extracción de plásmidos .....	26
6.10	Interrupción del gen <i>gdhA</i> con cassette de resistencia a antibiótico .....	27
	6.10.1 Extracción del cassette de resistencia a Km y restricción del gen <i>gdhA</i> .....	27
	6.10.2 Desfosforilación de cassette de resistencia .....	28
	6.10.3 Ligación de cassette con el gen <i>gdhA</i> .....	28
6.11	Construcción de plásmido con gen <i>gdhA</i> interrumpido .....	29
	6.11.1 Restricción de pSUP202 y <i>gdhA</i> interrumpido .....	29
	6.11.2 Ligación de pSUP202 y <i>gdhA</i> interrumpido .....	30
6.12	Transformación y clonación de la construcción en <i>E. coli</i> DH5α .....	30
	6.12.1 Competentes .....	30
	6.12.2 Transformantes .....	31
6.13	Mutante <i>M3</i> .....	32
	6.13.1 Actividad de oxidasas en células enteras .....	32
	6.13.2 Amplificación del gen <i>gdhA</i> de la mutante <i>M3</i> .....	32
6.14	Electroforesis .....	32
<b>VII.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>34</b>
7.1	Mutante de <i>Ga. diazotrophicus</i> deficiente en actividad de PQQ-GDH .....	34
	7.1.1 Cepa <i>M3</i> .....	34



7.2	Identificación del gen <i>gdhA</i> en el genoma de <i>Ga. diazotrophicus</i> PAL5	
	WT .....	35
7.3	Diseño de oligonucleótidos .....	37
7.4	Amplificación del gen <i>gdhA</i> .....	38
7.5	Determinación de la sensibilidad a antibióticos de <i>Ga. diazotrophicus</i>	
	WT .....	41
7.6	Elección de plásmidos .....	42
7.7	Interrupción del gen <i>gdhA</i> con el cassette de resistencia a antibiótico .....	44
	7.7.1 Ligación del cassette de resistencia y el gen <i>gdhA</i> .....	45
7.8	Clonación de <i>gdhA::Km</i> en el plásmido pSUP202 .....	47
7.9	Transformación de la construcción .....	48
<b>VIII.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>50</b>
<b>IX.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>53</b>
<b>X.</b>	<b>Perspectivas</b> .....	<b>55</b>
<b>XI.</b>	<b>Abreviaturas</b> .....	<b>60</b>
<b>XII.</b>	<b>Referencias</b> .....	<b>61</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo enfocamos nuestro estudio en generar una mutante para PQQ-GDH en *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Este organismo es una bacteria del ácido acético (BAC), que pertenece a la familia Acetobacteraceae, importante por su capacidad de producir ácido acético y otros ácidos orgánicos mediante un conjunto de reacciones de oxidación incompleta de alcoholes y azúcares llamadas Fermentación Oxidativa, que se llevan a cabo en el periplasma de la bacteria por algunas deshidrogenasas de unión a membrana. *Ga. diazotrophicus* se distingue de otras BAC por ser un diazótrofo facultativo, con la capacidad de fijar  $N_2$  en condiciones óxicas de crecimiento. De forma general su cadena respiratoria se acopla a distintas deshidrogenasas membranales, algunas orientadas hacia el periplasma (como PQQ-GDH, PQQ-ADH y PQQ-ALDH) y otras hacia el citoplasma, como deshidrogenasas para NADH y succinato. Todas dotan de electrones a la ubiquinona membranal del tipo UQ<sub>10</sub>, que a su vez los transfiere a las oxidasas terminales. Gracias a las tasas respiratorias sumamente altas de la bacteria, resultado de la presencia de las deshidrogenasas periplásmicas, se regula la concentración de O<sub>2</sub> libre en la célula, manteniendo su concentración citoplásmica muy baja, evitando la inactivación de la nitrogenasa, lo que se conoce como “Protección respiratoria”. En BACs no se encuentra actividad para enzimas importantes de la glucólisis y la vía de Entner-Doudoroff, por lo que la vía de las pentosas fosfato juega un papel importante en el metabolismo de la glucosa. A pesar de que en el citoplasma de la bacteria existe una NAD-GDH, ésta sólo posee del 10-17% de la actividad que se ha calculado para la PQQ-GDH membranal, que actúa en la oxidación directa de la glucosa en el espacio periplásmico, por lo que esta vía es la principal en el catabolismo de la glucosa en la bacteria. Ya que la PQQ-GDH membranal, como la enzima encargada de la oxidación de la glucosa, tiene un papel muy importante en el crecimiento, la respiración y la “Protección Respiratoria” a la nitrogenasa, una mutante en esta enzima deberá mostrar deficiencias importantes en estos procesos y nos permitirá estudiar de manera comparativa la eficiencia en la utilización de otros sustratos como única fuente de carbono. Esto nos llevó a querer generar una mutante que nos permita contestar las

preguntas acerca de la importancia fisiológica de la enzima en la bacteria. Como primera opción para una mutante PQQ-GDH<sup>-</sup>, se tomó en cuenta la mutante *M3*, obtenida en el laboratorio con la ayuda del minitransposón TN5. En dicha mutante se encuentra afectada la actividad de la PQQ-GDH y de toda la cadena respiratoria, por lo que se postula como pleiotrópica. Para analizar si el gen que codifica para la PQQ-GDH de esta mutante, mostraba la inserción del minitransposón, identificamos el gen que codifica la enzima en la cepa WT (GenBank No de acceso CAP57220.1), y amplificamos un fragmento que contenía el gen (*gdhA*), tanto en la cepa WT como en la mutante *M3* de *Ga. diazotrophicus*. Los resultados mostraron que ambos amplificados tienen el mismo tamaño (4069 pb), por lo que podemos afirmar que el gen *gdhA* de la mutante *M3* no está interrumpido por el transposón y se apoya la idea de que la mutante es pleiotrópica. La segunda opción para contestar la pregunta sobre la importancia de la PQQ-GDH en *Ga. diazotrophicus*, fue obtener una mutante en la que el gen estuviera interrumpido por un cassette de resistencia a antibiótico, garantizando una mutante PQQ-GDH<sup>-</sup>. En la presente tesis mostramos los problemas a los que nos enfrentamos y los resultados obtenidos.

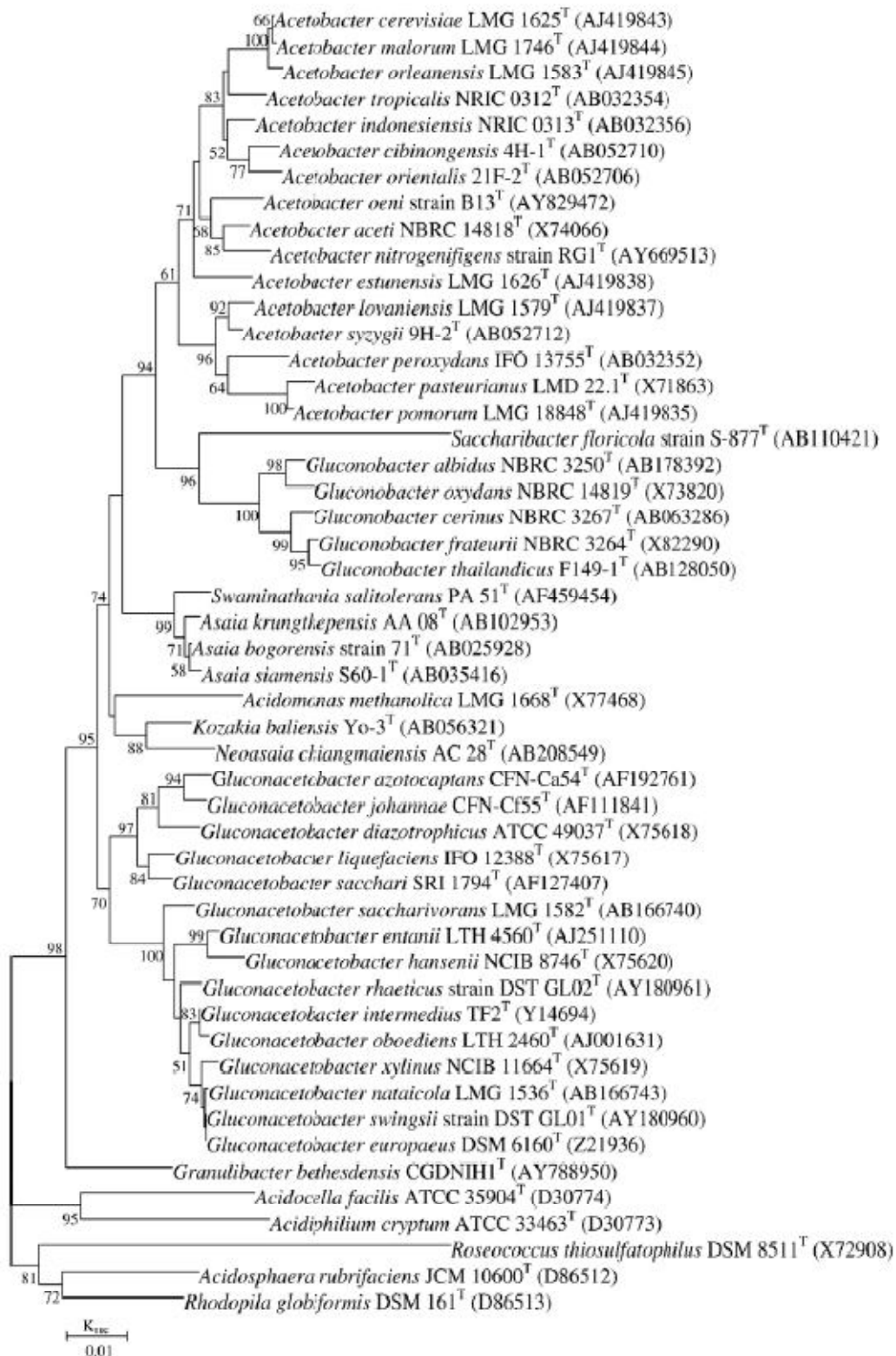
## I. Introducción

Las bacterias del ácido acético (**BAC**) han tenido desde tiempos remotos, un papel importante en la producción de algunos alimentos y bebidas, sin conocerse que agentes o procesos llevaban a los sabores que se obtenían. Actualmente se conoce que estos organismos poseen la capacidad de producir ácido acético a partir de la oxidación incompleta del etanol.

El uso que más comúnmente se da a las **BAC**, es la producción de vinagre, aunque también son utilizadas para elaborar bebidas fermentadas. Recientemente los beneficios ofrecidos por estos microorganismos han llegado a nivel industrial, dónde empresas biotecnológicas hacen uso de dicha capacidad para producción de distintos alimentos a gran escala.

### 1.1 Bacterias del ácido acético y la fermentación oxidativa

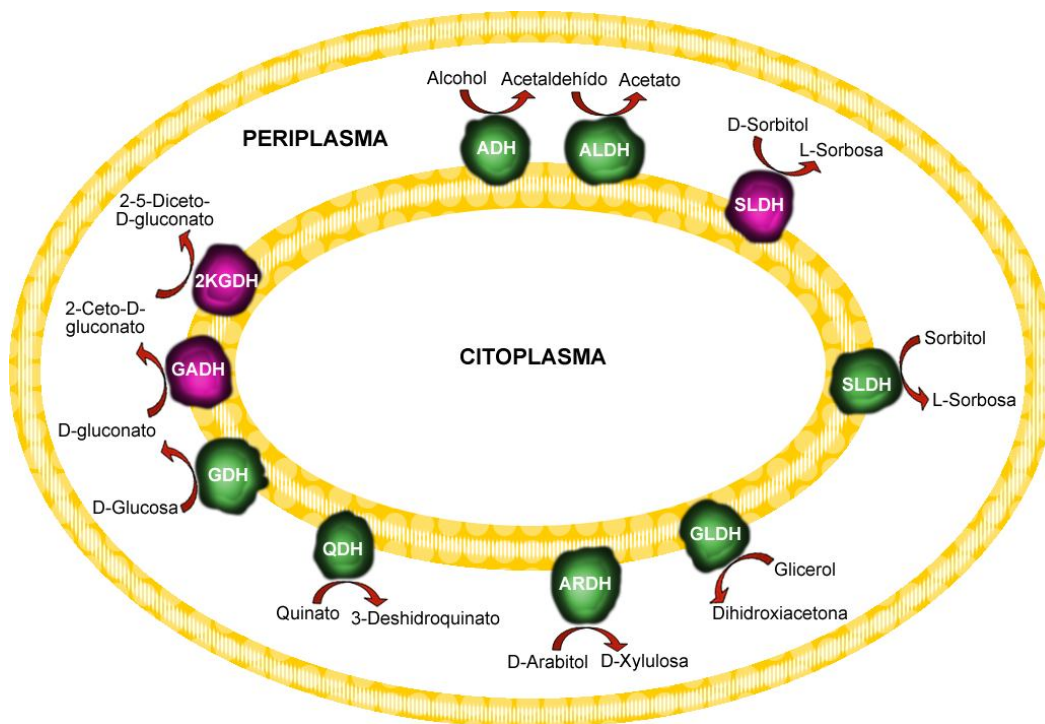
Las **BAC** conforman un grupo monofilético que se engloba en la familia Acetobacteraceae (Deppenmeier y Ehrebreich, 2009). Hasta 1994, Matsushita y col., mencionan que dentro de esta familia, se habían ubicado dos géneros: *Gluconobacter* y *Acetobacter*. La diferencia planteada entre dichos géneros fue su habilidad diferencial para oxidar alcoholes y/o azúcares. En *Gluconobacter* ambos tipos de sustratos son similarmente utilizados como fuente de carbono, mientras que en *Acetobacter*, el etanol se presenta como sustrato preferido (Matsushita y col., 1994). Más recientemente la familia Acetobacteraceae se ha dividido en varios géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* y *Granulibacter* (Figura 1). Para la separación de la familia en estos diez géneros, el principal criterio, fue su bioquímica diferencial (Yamada y Yukphan, 2008).



**Figura. 1.** Árbol filogenético para la familia Acetobacteraceae. El árbol fue construido con base en las secuencias 16S rDNA. (Imagen tomada de Yamada y Yukphan, 2008).

La familia Acetobacteraceae agrupa a bacterias Gram negativas, con una forma de vida ligada estrictamente al oxígeno, actuando éste como aceptor final de electrones en su cadena respiratoria (Kersters, y col., 2006). Son capaces de oxidar variados carbohidratos y alcoholes y la mayor parte de los géneros, soportan concentraciones muy altas (hasta 30%) de sacarosa, así como de fructosa y glucosa (Fuentes y col., 2003). Pueden localizarse en diversidad de frutas, néctar, alimentos en descomposición, etc. (Deppenmeier y Ehrebreich, 2009).

El conjunto de reacciones de oxidación por las que se lleva a cabo la producción del ácido acético y otros ácidos orgánicos, son llamadas Fermentación Oxidativa (Matsushita y col., 1994). Estas reacciones de oxidación incompleta de azúcares y alcoholes, son llevadas a cabo por diversas deshidrogenasas unidas a la membrana plasmática de la bacteria (Figura 2), proceso que provee electrones a la cadena respiratoria (Matsushita y col., 1994; Deppenmeier y Ehrebreich, 2009).



**Figura 2.** Algunas deshidrogenasas periplásmicas presentes en diversas bacterias acéticas. Las enzimas verdes son dependientes de PQQ y las moradas de FAD.

El ácido acético se genera a partir del etanol por dos enzimas; la alcohol deshidrogenasa (**ADH**) y la aldehído deshidrogenasa (**ALDH**), ambas ancladas a la membrana plasmática del microorganismo. Dichas enzimas llevan a cabo dos reacciones, en secuencia, para la producción del ácido acético (Matsushita y col., 1994). Se ha observado que el género *Asaia* no posee la habilidad para oxidar etanol (Katsura y col., 2001; Yamada y col., 2000).

Hasta hace poco, en el grupo de las **BAC** no se habían reportado especies patógenas, pero en el 2006, Greenberg y col., mencionan a una cepa aislada de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, *Granulibacter bethesdensis* (Greenberg y col., 2006).

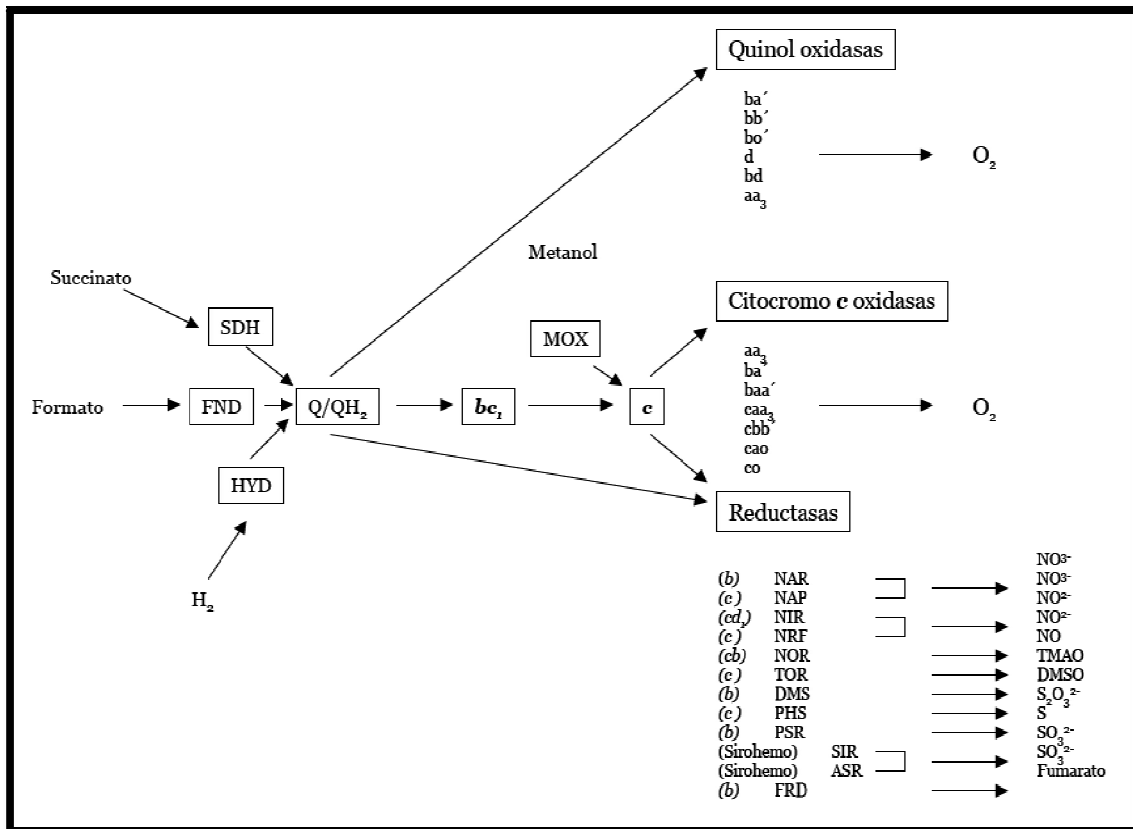
Dentro de la industria biotecnológica las **BAC** han sido de gran utilidad, gracias a la amplia variedad de productos que se pueden obtener a partir de la oxidación incompleta de diversos carbohidratos y alcoholes (Deppenmeier y Ehrebreich, 2009). Por ejemplo, especies de los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* principalmente, se utilizan en la producción de chocolate ayudando en la fermentación de los granos de cacao (Cleenwerck y col., 2007). *Gluconobacter oxydans* se utiliza para la producción industrial de L-sorbosa, ácidos 5-ceto y 2-cetoglucónico, D-ácido glucónico, y dihidroxiacetona (Gupta y col., 2001). Otra bacteria con amplias expectativas biotecnológicas es *Gluconacetobacter xylinus*, que produce celulosa cristalina de alta pureza en medios sólidos o líquidos (Chávez y col., 2004).

## 1.2 Sistemas respiratorios en bacterias ácido acéticas

En las cadenas respiratorias bacterianas, para que los electrones puedan llegar hasta el aceptor final, éstos se transfieren a través de distintos componentes o acarreadores redox, como pueden ser: flavoproteínas, quinonas, citocromos y proteínas de hierro-azufre. Los electrones son transportados desde un potencial redox bajo o negativo hasta un potencial alto o positivo. Dicho transporte lleva a la formación de un gradiente protón motriz a través de la membrana, que finalmente servirá para la formación de ATP gracias al complejo  $F_1F_0$  de la ATP-sintetasa (Escamilla y col., 1999).

En el sistema general de cadenas respiratorias para bacterias aeróbicas, una vez que los electrones han llegado a la poza de quinonas, se transfieren hasta el oxígeno por medio de diversos citocromos (Figura 3). Estos citocromos también forman parte, en distintas combinaciones, de oxidasas que de manera general se ubican en dos grupos: las quinol oxidasas y las citocromo-c oxidasas (Escamilla y col., 1999).

Al hablar de quinol oxidasas, se entiende, que éstas reciben los electrones directamente de la quinona. Ahora bien, las citocromo-c oxidasas, reciben dichos electrones a través de una cadena más larga, que incluye un citocromo  $bc_1$  y un citocromo  $c$  libre, en orden: ubiquinona  $\rightarrow$  citocromo  $bc_1 \rightarrow$  citocromo  $c \rightarrow$  citocromo-c oxidasa (Escamilla y col., 1999).



**Figura 3.** Composición de las distintas cadenas respiratorias que pueden presentarse en las bacterias. Imagen tomada de Antúnez, 2007. SDH, succinato deshidrogenasa; FDN, formato deshidrogenasa; HYD, hidrogenasa; MOX, metanol deshidrogenasa; NAR, nitrato reductasa membranal; NAP, nitrato reductasa periplásmica; NIR, nitrito reductasa; NRF, nitrito reductasa dependiente de formato; NOR, óxido nítrico reductasa; TOR, óxido trimetilamina reductasa; DMS, DMSO reductasa; PHS, tiosulfato reductasa; PSR, polisulfuro reductasa; SIR, sulfito reductasa; ASR, sulfito reductasa II; FRD, fumarato reductasa.



En las bacterias acéticas, la oxidación incompleta de azúcares y alcoholes por deshidrogenasas membranales (Fermentación Oxidativa), provee grandes cantidades de electrones a la cadena respiratoria. Algunas de las deshidrogenasas más relevantes por los sustratos que oxidan o los productos que generan son: alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, glucosa deshidrogenasa, glicerol deshidrogenasa, arabitol deshidrogenasa y gluconato deshidrogenasa (Matsushita y col., 1994). Cada deshidrogenasa transfiere dos electrones a la ubiquinona (**UQ**) membranal (Escamilla y col., 1999) de dónde pasan a los citocromos.

En general, la cadena de transporte de electrones en las **BAC** se conforma de citocromo *c*, de alto potencial, asociado a distintas deshidrogenasas, ubiquinol y una ubiquinol oxidasa terminal de tipo *bo*<sub>3</sub> y/o *bd*. Se ha observado que las especies del género *Acetobacter* poseen de forma adicional una ubiquinol oxidasa de tipo *ba*<sub>3</sub>, también conocida como *a*<sub>1</sub>. *Acidomonas methanolica*, en contraste con las demás bacterias acéticas, cuenta con una citocromo-*c* oxidasa terminal y esto, solo cuando se le crece en metanol (Matsushita y col., 1994; Sievers y Swings, 2005; Deppenmeier y Ehrebreich, 2009).

La ubiquinona encontrada en estas bacterias es del tipo **UQ**<sub>10</sub>, aunque en especies del género *Acetobacter* se localiza una de tipo **UQ**<sub>9</sub> (Yamada y col., 1997; Kersters y col., 2006). Recientemente se ha visto que las bacterias equipadas con ubiquinona **UQ**<sub>10</sub> poseen pequeñas cantidades de ubiquinona **UQ**<sub>9</sub>, y que *A. pasteurianus*, *A. pomorum* y *A. aceti*, con ubiquinona **UQ**<sub>9</sub>, cuentan en menor cantidad, con ubiquinona **UQ**<sub>8</sub> (Sievers y Swings, 2005).

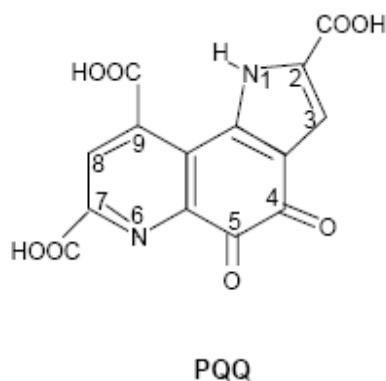
### 1.3 Deshidrogenasas del espacio periplásmico: dependientes de PQQ

Casi todas las deshidrogenasas que se encuentran involucradas en las cadenas de oxidación de alcoholes o azúcares, son enzimas de unión a membrana, y se pueden extraer de ésta gracias al uso de detergentes (Matsushita y col., 1994).

Dentro de las deshidrogenasas de unión a membrana, pueden distinguirse dos tipos; las quinoproteínas, que poseen como grupo prostético a la pirroloquinolina quinona (**PQQ**) y las flavoproteínas, las cuales tienen unión covalente a flavín adenín dinucleótido (**FAD**) funcionando como grupo prostético. Las quinoproteínas pueden oxidar alcohol, aldehído, D-glucosa, D-fructosa, glicerol, etc., mientras que las flavoproteínas se encargan de oxidar D-gluconato, 2-keto-D-gluconato. D-sorbitol y L-sorbosa (Matsushita y col., 1994).

En 1980, Duine y col., determinaron la identidad del grupo prostético presente en la metanol deshidrogenasa, una ortoquinona (*o*-quinona). Las *o*-quinonas no se restringen a la metanol deshidrogenasa, sino que se han localizado en otras enzimas en forma de **TTQ** (Quinona de triptofil-triptofano), **TPQ** (Topa-quinona) y **LTQ** (Quinona de tirosil-lisina), además de **PQQ** (Flores y col., 2004). En base a esto, Duine y col., (1980) sugirieron una clasificación para enzimas con *o*-quinonas como grupo prostético, nombrándolas quinoproteínas (Duine y col., 1980).

Para la *o*-quinona presente en la metanol deshidrogenasa, Duine y col. (1980) propusieron el nombre sistemático de pirroloquinolina quinona (**PQQ**), cuya nomenclatura química es: ácido 4,5-dihidro-4,5-dioxo-1*H*-pirrolo-[2,3-*f*]-quinolina-2,7,9-tricarboxílico (Puehringer y col., 2008).



**Figura 4.** Estructura del grupo PQQ o pirroloquinolina quinona. Imagen tomada de Flores y col., 2004.

La posición C5 del **PQQ**, en su forma oxidada, es muy reactiva y susceptible al ataque nucleofílico (Flores y col., 2004). El **PQQ** puede formar complejos con  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  en solución, y se ha observado que un  $\text{PQQ-Ca}^{2+}$  puede catalizar la oxidación de alcoholes, por lo que se puede pensar que todas las enzimas con **PQQ** contengan un ion metálico divalente en sus sitios activos (Goodwin y Anthony, 1998). El potencial redox de este grupo prostético se localiza alrededor de los +90 mV (Puehringer y col., 2008).

El **PQQ** (Figura 4) se une de forma no covalente a enzimas que catalizan reacciones en el periplasma de bacterias Gram negativas (Goodwin y Anthony, 1998). Dicho grupo se forma a partir de glutamato y tirosina pero la vía de biosíntesis no está totalmente esclarecida. Puehringer y col., proponen en el 2008 una ruta biosintética en la que se involucran distintas enzimas que catalizan la formación del **PQQ** a partir del péptido PqqA.

Para que las deshidrogenasas dependientes del **PQQ** puedan ser funcionales, el **PQQ**, que se sintetiza independientemente, debe ser transportado al periplasma e incorporado dentro de la estructura de la apoenzima. La mayor parte de las quinoproteínas poseen un grupo hemo como segundo grupo prostético, formándose de esta manera las **quinohemoproteínas** (Goodwin y Anthony, 1998).

Algunas de las **PQQ**-deshidrogenasas de unión a membrana más importantes son: alcohol deshidrogenasa tipo III (**ADH**), aldehído deshidrogenasa (**ALDH**), **glicerol deshidrogenasa** (**GLDH**) y glucosa deshidrogenasa (**GDH**) (Goodwin y Anthony, 1998; Flores y col., 2004).

## II. Antecedentes

### 2.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Dentro de las **BAC**, encontramos a un organismo que se distingue por su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en condiciones óxicas de crecimiento: *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Dentro de las bacterias acéticas, sólo tres especies se conocen hasta ahora como fijadoras de nitrógeno, y todas incluidas dentro del género *Gluconacetobacter*: *Ga. johanae*, *Ga. azotocaptans* y *Ga. diazotrophicus* (Fuentes y col., 2001; Sievers y Swings, 2005).

*Ga. diazotrophicus*, es una bacteria endófitas que se aisló inicialmente por Cavalcante y Döbereiner (1988) de los tallos y raíces de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en Brasil. Observaron que la nueva bacteria fijaba nitrógeno atmosférico en medios semisólidos, y que también lo hacía en medios líquidos cuando se le proporcionaba una pequeña dosis inicial de compuestos con nitrógeno reducido, en el caso más simple, sales de amonio. Otra característica importante es que crece en concentraciones altas de sacarosa (30%) en las que otras **BAC** no son capaces de desarrollarse. Por oxidación de distintos sustratos forma ácidos que llevan el pH a valores por debajo de 3.0. Estas y otras características orillaron a los autores a sugerir una nueva especie, *Saccharobacter nitrocaptans*, que al no encajar dentro de alguno de los géneros existentes para bacterias fijadoras de nitrógeno bautizaría un nuevo género (Cavalcante y Döbereiner, 1988). Poco más de un año después, Gillis y colaboradores (1989) presentaron evidencias genómicas, fenotípicas y taxonómicas que demostraban que la bacteria no representaba a un nuevo género, sino que podía ser englobada dentro de *Acetobacter*, proponiendo el nombre *Acetobacter diazotrophicus* (Gillis y col., 1989). En 1997, Yamada, Ishikawa y Hoshino llevaron a cabo un estudio en el que analizaron secuencias 16S de rRNA de diversas **BAC**. Dicho estudio arrojó claros resultados que elevaban de nivel al subgénero *Gluconacetobacter*, ubicado dentro de *Acetobacter*. *Gluconacetobacter* se convertía ahora en un género que agrupaba a las bacterias del género *Acetobacter* que poseían una ubiquinona Q<sub>10</sub>,

por lo que desde entonces y hasta ahora, el nombre de la bacteria es *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Yamada y col., 1997).

*Ga. diazotrophicus* es una bacteria Gram negativa. Posee forma de bacilo, aunque algunas veces se aprecia casi redondo. Mide entre 0.7 y 0.9  $\pm$ 2  $\mu$ m de longitud y se mueve gracias a flagelos laterales o peritricos. La temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C. El comportamiento de la bacteria según el pH es algo extraño. El pH óptimo es de 5.5, no crece a pH 7.0, pero en condiciones de fijación de nitrógeno crece hasta en pH 3.0. Puede utilizar como fuentes de carbono variados sustratos, como son sacarosa, glucosa, galactosa, fructosa, etanol, manitol, glicerol, etc. (Gillis y col., 1989; Stephan y col., 1991; Sievers y Swings, 2005).

Esta bacteria puede excretar a los tejidos de la planta hospedera, aproximadamente la mitad del nitrógeno que fija, de forma tal que es de utilidad para el metabolismo del vegetal (Flores y col. 1999). Lo anterior ha convertido a *Ga. diazotrophicus* en un modelo sumamente estudiado como endófito de la caña de azúcar, pues genera expectativas agroeconómicas espectaculares. Se han hecho numerosos estudios genéticos y fisiológicos en los últimos años, que han generado hasta la fecha conocimiento de gran utilidad biotecnológica (James y col., 2001; Lee y col., 2000; Perlova y col., 2003).

Se sabe que las nitrogenasas son sensibles al oxígeno y requieren de una alta cantidad de ATP para su funcionamiento (Dong y col., 2002). Ésta energía, en los diazótrofos aeróbicos, puede obtenerse de la respiración. En base a esto, es posible plantearse la siguiente pregunta: ¿Cómo la nitrogenasa puede fijar nitrógeno sin inactivarse, mientras el oxígeno está siendo utilizado para la síntesis de ATP en la Fosforilación Oxidativa? Es evidente pensar en algún tipo de resguardo para proteger a la nitrogenasa de la inactivación por el oxígeno.

Drozd y Postgate (1970) hablan de una “Protección respiratoria”. Gracias a las tasas respiratorias sumamente altas de las células, se regula la concentración de O<sub>2</sub>

libre en la célula, manteniendo niveles muy bajos de oxígeno, que no dañan a la nitrogenasa (Drozd y Postgate, 1970; Dong y col., 2002; Flores y col., 1999; Gonzalez y col., 2006).

Entonces podemos observar que se requiere de una intensa participación del sistema respiratorio para dos objetivos: a) Proteger a la nitrogenasa de la inactivación por oxígeno y b) Generar por fosforilación oxidativa las grandes cantidades de ATP que se requieren para la fijación de N<sub>2</sub>.

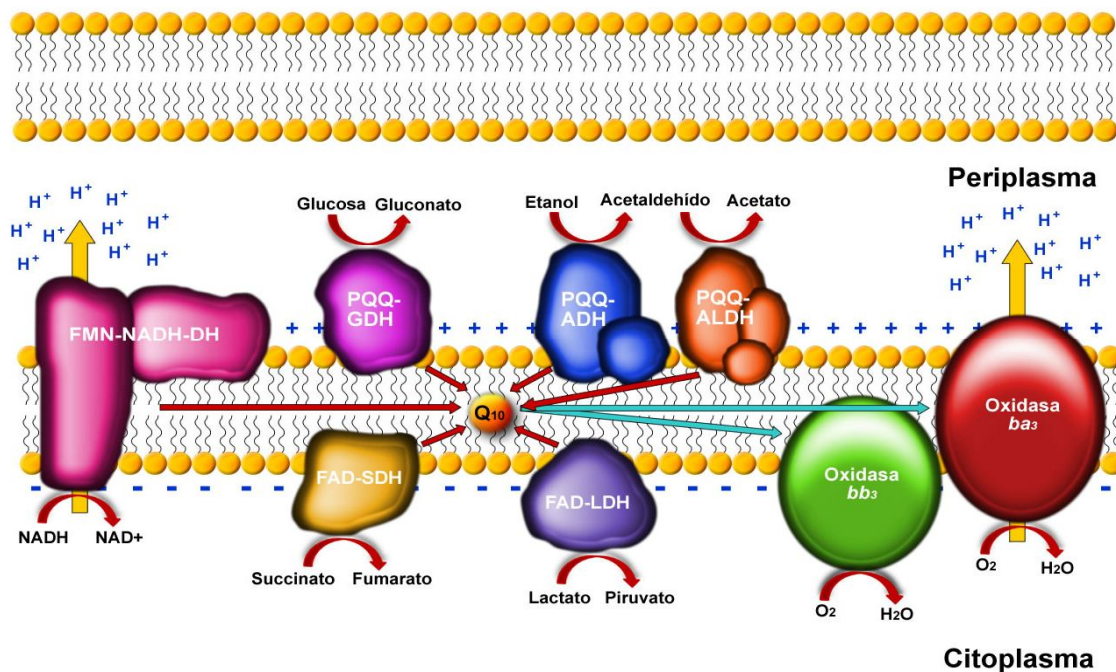
## 2.2 El sistema respiratorio de *Ga. diazotrophicus*

En *Ga. diazotrophicus*, al igual que en otras bacterias acéticas, las deshidrogenasas alimentan a la cadena respiratoria con altas cantidades de electrones, suficiente para la síntesis del ATP requerido y la utilización del oxígeno. Es interesante observar que algunas de dichas enzimas presentan casi siete veces más actividad en condiciones de fijación de nitrógeno, que cuando el medio posee amonio en exceso (Flores y col., 1999), pues se refleja la alta necesidad energética en crecimiento dependiente de N<sub>2</sub>.

Durante el crecimiento aeróbico dependiente de N<sub>2</sub> (en condiciones de fijación de nitrógeno), la bacteria muestra una oxidasa terminal *ba*<sub>3</sub> (*a*<sub>1</sub>), resistente a **KCN**, además de una oxidasa *bb*<sub>3</sub> sensible a **KCN**. En cambio, cuando la bacteria crece con amonio en exceso (40 mM), puede observarse una oxidasa *bd*, como la principal (González y col., 2006).

Esto es evidencia de que la concentración de amonio en el medio es determinante en la composición del sistema respiratorio de la bacteria. Tanto las deshidrogenasas periplásmicas como las oxidasas terminales se expresan de forma diferencial según el amonio inicial en el medio de crecimiento (Flores y col., 1999), mostrando a *Ga. diazotrophicus* como un diazótrofo facultativo.

De forma general la cadena respiratoria (Figura 5) se acopla a distintas deshidrogenasas membranales, algunas de estas orientadas hacia el periplasma (como **PQQ-GDH**, PQQ-ADH y PQQ-ALDH) y otras hacia el citoplasma, como deshidrogenasas para **NADH** y succinato. Todas estas dotan de electrones a la ubiquinona membranal del tipo **UQ<sub>10</sub>**, que a su vez los transfiere a las oxidasas terminales presentes (Flores y col., 1999; González y col., 2006).



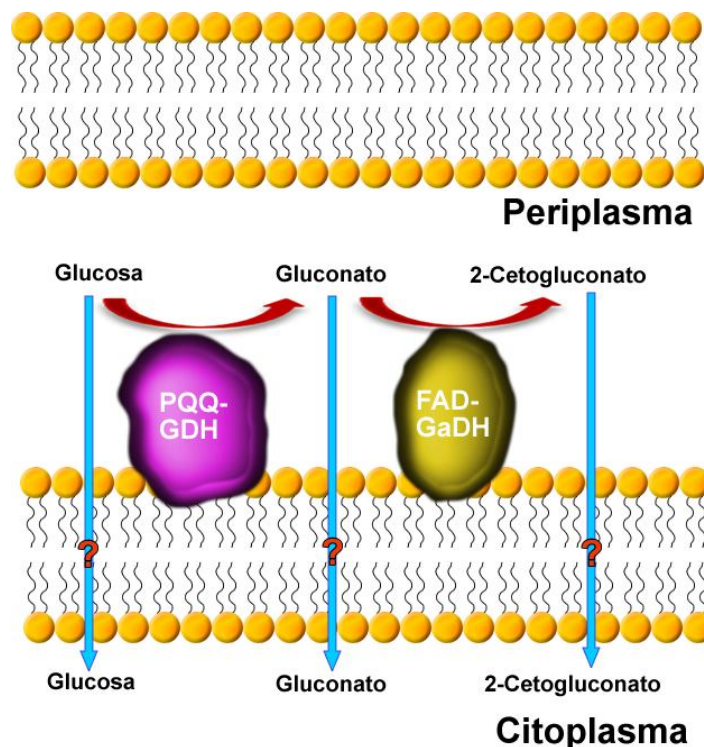
**Figura 5.** Cadena respiratoria en *Ga. Diazotrophicus*. Se observan distintas deshidrogenasas membranales que dotan de electrones a la ubiquinona  $Q_{10}$ . Esta ubiquinona transfiere los electrones a las oxidasas terminales. En este esquema solo se muestran las oxidasas  $ba_3$  y  $bb_3$  presentes en condiciones de fijación de nitrógeno.

### 2.3 Glucosa deshidrogenasa

El carbono representa un elemento indispensable para el crecimiento, y la glucosa constituye probablemente la mejor fuente de carbono para la mayoría de los organismos. En las bacterias acéticas, el metabolismo del carbono ha sido activamente estudiado desde hace muchos años (De Ley, 1961).

En las **BAC** la oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico, puede ser el primer paso en el metabolismo de este carbohidrato. La glucosa también puede ser fosforilada y metabolizada por: glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la vía de Entner-Doudoroff. Estas dos últimas rutas son capaces de metabolizar el ácido glucónico una vez fosforilado (Attwood y col., 1991).

En *Ga. diazotrophicus*, la utilización de la glucosa se da de forma distinta, pues faltan algunas enzimas importantes en estas rutas catabólicas. La bacteria posee actividad insignificante para hexocinasa, por lo que el metabolismo de la glucosa por vías fosforilantes no es notable. No se encontró actividad para fosfofructocinasa (**PFK1**), clave en la glucólisis. Tampoco parece haber 6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto 3-deoxigluconato aldolasa, de suma importancia en la vía de Entner-Doudoroff. En cambio, se observaron altas actividades para la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzima de la vía de las pentosas fosfato (Attwood y col., 1991; Luna y col. 2006). Esto sugiere que dicha vía si juega un papel importante en el metabolismo de la glucosa (Attwood y col., 1991; Álvarez y Martínez-Drets, 1995).



**Figura 6.** Ruta de oxidación directa de la glucosa en *Ga. diazotrophicus*.



Además de estas rutas, en el citoplasma de *Ga. diazotrophicus*, hay una glucosa deshidrogenasa dependiente de **NAD**, la cual muestra solo del 10-17% de la actividad registrada para **PQQ-GDH** membranal, también presente en la bacteria. Esto hace pensar que la deshidrogenasa dependiente de PQQ juega el mayor papel en la oxidación de glucosa a ácido glucónico (Figura 6), que además es la principal vía de utilización del carbohidrato (Attwood y col., 1991).

En *Acinetobacter calcoaceticus* además de la **PQQ-GDH** membranal (**mGDH**) se ha podido localizar una **PQQ-GDH** soluble (**sGDH**). La sGDH purificada se ha identificado como un dímero capaz de oxidar disacáridos y monosacáridos. Las enzimas son distintas una de otra (Tabla 1) y sólo la mGDH se encuentra acoplada a la cadena respiratoria (Matsushita y col., 1989)

**Tabla 1.** Propiedades de las PQQ-GDHs soluble y membranal. Tabla tomada de Cerqueda 2010.

	GDH membranal <sup>a</sup>	GDH soluble <sup>b</sup>
<b>Tamaño</b>	Monómero 80-86 kDa	2 monómeros 50-57 kDa
<b>Estructura</b>	Superbarril con 8 propelas de 4 beta plegadas	Superbarril con 6 propelas de 4 beta plegadas
<b>pl</b>	7.0	9.5
<b>pH óptimo</b>	6	7
<b>Km glucosa</b>	0.63mM	20 mM
<b>Vmax glucosa</b>	24.8 <sup>c</sup>	4610 <sup>c</sup>
<b>Sustratos oxidables</b>	Glucosa, monosacáridos,	Glucosa y disacáridos
<b>Aceptores de electrones</b>	UQ.	Desconocido
<b>Termoestabilidad</b>	Inactivación térmica a 55°C en 20 min.	Inactivación térmica a 40°C en 25 min.

<sup>a</sup>*Ga. diazotrophicus*,

<sup>b</sup>*A. calcoaceticus*,

<sup>c</sup> μmol de DCPIP reducidos por min. mg.

A partir de la **PQQ-GDH** membranal purificada, de *Ga. diazotrophicus*, [Cerqueda \(2010\)](#) realizó diversos análisis por métodos electroforéticos. Dichos estudios revelaron una banda única de 86 kDa, aún después de utilizar electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE), lo que mostraba una naturaleza monomérica para la enzima. Estudios zimográficos, confirmaron que dicha banda estaba asociada a la actividad de una glucosa deshidrogenasa ([Cerqueda, 2010](#)).

El [Dr. Mendoza](#) de la [Facultad de Medicina](#) secuenció por espectrofotometría de masas, cinco péptidos internos a partir de la banda obtenida en SDS-PAGE:

- 1) IEHHKNFQHMT
- 2) IFLPTDDGR
- 3) TGNIFWLDRR
- 4) PLPLPFK
- 5) LPAGGKSTPMTYEAGGRQYIVTVDGGHGSFGTR

#### **2.4 Importancia de la PQQ-Glucosa deshidrogenasa en *Ga. diazotrophicus***

La **PQQ-GDH** membranal de *Ga. diazotrophicus*, actúa en la oxidación directa de la glucosa en el espacio periplásmico. Ésta vía, es la principal en el catabolismo de la glucosa en la bacteria ([Attwood y col., 1991](#); [Luna y col., 2006](#)). A pH's muy ácidos (2.5 - 3.5) y pH neutros (7.5), la glucosa deshidrogenasa no se expresa de forma completa. A pH's entre 4.5 y 6.0 la enzima se expresa de forma completa, mientras la **NAD-GDH** no funciona óptimamente. Ya que a *Ga. diazotrophicus* se le encuentra viviendo en la naturaleza dentro de éste último rango de pH, el funcionamiento de las enzimas según estos valores, reafirma la idea de que la fermentación oxidativa de la glucosa es la principal vía en su metabolismo ([Luna y Boiardi, 2007](#)).

La **PQQ-GDH** se expresa de forma constitutiva ([Luna y col., 2006](#)), y es responsable de convertir casi toda la glucosa presente en el medio, en gluconato ([Luna y col., 2006](#)).

Cuando la bacteria crece en condiciones de fijación de N<sub>2</sub>, la oxidación de la glucosa aumenta, satisfaciendo de éste modo el costo del proceso. El aumento respiratorio lleva a que el O<sub>2</sub> intracelular disminuya. Esta disminución del O<sub>2</sub>, hace pensar que la **PQQ-GDH** membranal pueda tener un papel importante en la protección a la nitrogenasa ([Menéndez, 2004](#))

## 2.5 Mutante **M3**

En nuestro laboratorio fue obtenida, con la ayuda del minitransposón TN5, la cepa mutante **M3**, por la estudiante de doctorado [Marcela Zuleta](#) ([Tesis doctoral en preparación](#)). Más tarde, [Daniel Cerqueda \(2010\)](#) caracterizó la mutante en relación a su cinética de crecimiento y a sus actividades respiratorias. Los resultados mostraron que la actividad respiratoria de **PQQ-GDH** en **M3**, medida como deshidrogenasa (**WT** 1954.6; **M3** 256), y como oxidasa (enzima donadora de electrones a la cadena respiratoria) (**WT** 74; **M3** 5.2) está muy por debajo de la obtenida para la **PQQ-GDH** en la cepa **WT**.

No sólo se encuentra afectada la actividad de la **PQQ-GDH** en ésta mutante, las actividades de otras PQQ-deshidrogenasas también están afectadas. La PQQ-ADH aumentó su actividad en 0.5 veces, y la PQQ-ALDH la aumento en 10 veces. Aun con el evidente aumento en la actividad de las deshidrogenasas, las actividades de oxidasas asociadas disminuyeron. Con esto notamos que la mutación afectó toda la cadena respiratoria. Posiblemente se haya afectado la síntesis de la ubiquinona o de la oxidasa terminal, ésto tomando en cuenta que la actividad de deshidrogenasas aumentada, no aumenta la de oxidasas terminales.

Con ésta evidencia la mutante **M3** se postuló como una mutante pleiotrópica. Al hablar de pleiotropía nos referimos a que la mutación de un gen, en este caso probablemente el gen codificante de la PQQ-GDH, influye en múltiples características fenotípicas de la bacteria.

### III. Hipótesis

Ya que *Gluconacetobacter diazotrophicus* es una bacteria diazótrofa, aerobia y endófito de la caña de azúcar, la **PQQ-GDH** membranal, como la enzima encargada de la oxidación de la glucosa, debería tener un papel muy importante en el crecimiento, la respiración y la Protección Respiratoria a la nitrogenasa. Una mutante en esta enzima deberá mostrar deficiencias importantes en estos procesos y nos permitirá estudiar de manera comparativa la eficiencia en la utilización de otros sustratos como única fuente de carbono.

## IV. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Analizar la importancia de la **PQQ-GDH** membranal de *Ga. diazotrophicus*, en el crecimiento, la respiración y la Protección Respiratoria a la nitrogenasa, además, observar la contribución de la oxidación de otros sustratos como única fuente de carbono a estos procesos.

### 4.2 Objetivos particulares y Metas.

#### Objetivo 1

Se espera identificar si la mutante obtenida con el minitransposón *Tn5* (mutante **M3**), posee alguna inserción en el gen codificante para la **PQQ-GDH** membranal.

#### Metas asociadas

- 1) A partir de la secuencia de los péptidos internos obtenidos de la enzima purificada, identificar en el genoma de *Ga. diazotrophicus*, el gen(es) que codifique(n) para la **GDH** membranal, su organización y localización.
- 2) Amplificar el ó los genes correspondientes tanto en la cepa **WT** como en la mutante **M3**, en búsqueda de una secuencia de inserción.

#### Objetivo 2

Si la mutación en **M3** no es específica del gen(es) codificante(s) para la **PQQ-GDH**, se necesitará obtener una mutante carente de actividad para dicha enzima.

#### Metas asociadas

- 1) Determinación de la sensibilidad a antibióticos en *Ga. diazotrophicus* **WT**.
- 2) Clonación del gen codificante de la subunidad catalítica de la **PQQ-GDH** en un vector.
- 3) Interrupción del gen codificante, con un cassette de resistencia a antibiótico.
- 4) Clonación de la construcción en *E. coli* DH5 $\alpha$ .
- 5) Obtención de la mutante GDH<sup>-</sup> por recombinación homóloga de la construcción en *Ga. diazotrophicus*.

## V. Justificación

La **PQQ-GDH** tiene gran importancia en la producción de energía, ya que es la principal vía en la oxidación de glucosa y funciona como una deshidrogenasa primaria para la cadena respiratoria. También se ha observado que la oxidación de glucosa aumenta cuando la bacteria fija  $N_2$ , por lo que la respiración se eleva y el  $O_2$  interno disminuye. Con base en estos resultados se puede postular que la **PQQ-GDH** posee un importante papel en la Protección Respiratoria a la nitrogenasa. El desarrollo de mutantes carentes de **PQQ-GDH** nos permitirá comparar su eficiencia en el crecimiento, respiración y fijación de nitrógeno con la capacidad de otras enzimas que oxidan distintos sustratos que funcionan como única fuente de carbono y así definir la importancia metabólica de ésta enzima en *Ga. diazotrophicus*

## VI. Material y métodos

### 6.1 Material biológico

Para la obtención de algunos plásmidos se utilizaron cepas de *Escherichia coli*. Una de estas contiene el plásmido pSUP202, mientras que otra el plásmido pBSL98. La cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  también será utilizada. *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 **WT** (cepa silvestre) y la mutante **M3** carente de actividad para **PQQ-GDH** formaran parte del material biológico de trabajo. La cepa **M3** fue obtenida en el laboratorio por una estudiante de doctorado en el 2004.

### 6.2 Medios de cultivo

El medio **LGI** modificado descrito por Flores y col. (1999), fue utilizado para el crecimiento de *Ga. diazotrophicus* **WT**. Dicho medio contiene diversas sales como: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g/L, MgCl<sub>2</sub> 0.2 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g/L, FeCl<sub>3</sub> 0.01 g/L y citrato de sodio industrial 5 g/L. También posee sacarosa al 3% y un pH final que es llevado a 5.5.

La mutante **M3** de *Ga. diazotrophicus* se cultivó en medio LGI adicionado con kanamicina a una concentración de 120  $\mu$ g/ml. Dicho antibiótico fue esterilizado por filtración con filtros de membrana (**Millex Millipore**<sup>®</sup>).

Todas las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio rico Luria-Bertani (**LB**), conteniendo 10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl. El pH final de este medio se llevó a 7.0. Algunas de las cepas se crecieron con antibióticos previamente esterilizados por filtración. La cepa contenedora del plásmido pSUP202 se creció con ampicilina a 100  $\mu$ g/ml. El medio para crecer a la cepa con pBSL98 fue adicionado con kanamicina a 25  $\mu$ g/ml.

Cada uno de los medios fue hecho disolviendo los distintos componentes en agua destilada. Todos fueron esterilizados durante 20 min, antes de que se adicionara cualquier antibiótico.

### 6.3 Determinación de la sensibilidad a antibióticos de *Ga. diazotrophicus* WT

Para determinar la sensibilidad de la bacteria a los antibióticos que posiblemente se puedan utilizar durante el trabajo de biología molecular, *Ga. diazotrophicus* se creció en medio **LGI** adicionado con los siguientes antibióticos: Espectinomicina a 100 µg/ml, neomicina a 60 µg/ml, estreptomina a 200 µg/ml, tetraciclina a 25 y 50 µg/ml, cloranfenicol a 25 y 50 µg/ml, ampicilina a 200 µg/ml, gentamicina a 30 µg/ml y kanamicina a 50, 100 y 250 µg/ml.

### 6.4 Condiciones para el crecimiento del material biológico

Tanto la cepa **WT** como la **M3** de *Ga. diazotrophicus* fueron crecidas en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de 50 ml de medio LGI, con o sin antibiótico. Los medios eran inoculados con 1 ml de cultivo activo en el caso de **WT** y con un glicerol conservado a -70°C para la cepa **M3**. La temperatura de crecimiento en ambos casos fue de 30 °C, con agitación constante a 200 rpm. La cepa **WT** se dejaba crecer durante 24 horas mientras que **M3** cinco días.

Todas las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en tubos de ensayo con rosca. La agitación se mantuvo constante y la temperatura de cultivo fue de 37 °C. La rosca de los tubos se dejó un poco suelta para permitir la aireación del cultivo.

### 6.5 Extracción de DNA genómico

Cada extracción de DNA genómico se realizó a partir de 10 mL de cultivo de *Ga. diazotrophicus*. El método de extracción por **CTAB** es descrito por [Chachaty y Saulnier](#) en el [2000](#). Algunas modificaciones fueron hechas a dicho protocolo como sigue:

El amortiguador **TE** se preparó con 50 mM de Tris y 20 mM de ácido etilendiaminotetraacético (**EDTA**), disuelto en agua desionizada. La lisozima (**Sigma**<sup>®</sup>) y la Proteinasa K (**Invitrogen**<sup>®</sup>) se preparaban cada vez que se requería una extracción, pues se necesitaba que estuviera fresca al momento del uso. Cada una de estas se



hizo a una concentración de 10 mg/ml. La lisozima se disolvía en agua desionizada, mientras la proteinasa K en el amortiguador especificado por el distribuidor. El dodecilsulfato sódico (**SDS**), se preparó al 10% en agua desionizada. El NaCl se disolvía también en agua a una concentración 5 M. En una solución de NaCl 0.7 M se disolvió el bromuro de cetiltrimetilamonio (**CTAB**) al 10%. La proporción del cloroformo-alcohol isoamílico fue de 24:1 correspondientemente. El fenol-cloroformo-alcohol isoamílico se agregaba en proporción 25:24:1. El etanol fue preparado al 70% con agua destilada. El amortiguador **TE**, el **SDS**, el NaCl 5M y el **CTAB** se esterilizaron durante 20 min para su posterior uso.

Una vez que se tenían preparados todos los reactivos para la extracción se siguió este método: En un tubo Eppendorf, se agregaron 1.5 ml de cultivo y se centrifugó a 10 000 rpm durante 40 segundos, repitiendo el paso las veces necesarias hasta obtener una pastilla de células cercana a los 100 µL. Se agregaron 500 µL de amortiguador **TE** y después de que las células se homogenizaran con el vortex se centrifugaron a 10 000 rpm durante 40 segundos. Una vez hecho esto el sobrenadante se retiró y la pastilla nuevamente se resuspendió en 450 µL de **TE** para su posterior centrifugación a 10 000 rpm durante 40 segundos. Después de esto se agregaron 50 µL de lisozima, se homogenizó y se incubó a 37 °C por 30 min. Pasado este tiempo se adicionaron 50 µL de proteinasa K, nuevamente se utilizó el vórtex para homogenizar y se incubó a 37 °C durante 30 min. 50 µL de **SDS** fueron agregados, se agitó e incubó a 37 °C por 15 min. 100 µL de NaCl 5 M se adicionaron, se agitó e incubó a 65 °C por 10 min. Luego se agregaron 80 µL de solución **CTAB**, se agitó e incubó de 15-20 min a 65 °C. Una vez fría la solución, se adicionó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se mezcló y centrifugó 10 min a 10 000 rpm. La mezcla se separó en dos fases. La fase acuosa (la que se encontraba arriba) fue transferida a un nuevo tubo Eppendorf y se le agregaron 0.6 volúmenes de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se mezcló y centrifugó nuevamente a 10 000 rpm por 10 min. Después de esto se observan otra vez dos fases. La fase acuosa se separó en un nuevo tubo Eppendorf y se agregaron 0.6 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló y centrifugó 10 min a 10 000 rpm. La nueva fase acuosa fue transferida a otro tubo Eppendorf para adicionarle 0.6

volúmenes de isopropanol, mezclar y centrifugar 10 min a 10 000 rpm. El sobrenadante obtenido fue desechado y la pastilla se lavó de dos a tres veces con 1 mL de etanol al 70%, para después centrifugar a 10 000 rpm durante 5 min. El tubo se dejó secar a temperatura ambiente o en una incubadora para deshacerse de todos los restos de alcohol. La pastilla se resuspendió en 55 µL de agua MIQ. Finalmente se agregó 1 o 2 µL de RNAsa (Quiagen) y se incubó a 37 °C por 30 min para eliminar cualquier RNA presente. El DNA extraído se almacenó a -20 °C.

### 6.6 Identificación del gen *gdhA* para *Ga. diazotrophicus* PAL5 WT

Utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (**BLAST**), de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (**NCBI**), se realizó un análisis utilizando los péptidos secuenciados para la **PQQ-GDH** de *Ga. diazotrophicus* (**Dr. Guillermo Mendoza, Fac. de Medicina, UNAM**). Inicialmente fue analizado solo el péptido más grande: (LPAGGKSTPMTYEAGGRQYIVTVDGGHGSFGTR), pues su mayor tamaño asignaba especificidad superior a la búsqueda. Una vez localizada la secuencia completa para **PQQ-GDH**, se pudieron ubicar los cinco péptidos internos cuya secuencia había sido determinada.

Ya que se tenía la secuencia completa de aminoácidos para la **PQQ-GDH**, se procedió a la identificación del gen correspondiente, y a su ubicación dentro del genoma completo de *Ga. diazotrophicus*.

### 6.7 Diseño de oligonucleótidos

Una vez ubicado el gen *gdhA* dentro de la secuencia nucleotídica de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, se procedió al diseño de oligonucleótidos que amplificaran el gen *gdhA* en su totalidad.

Las siguientes características fueron tomadas en cuenta para el diseño de los oligonucleótidos:

*Tamaño del oligonucleótido.* Se buscaron oligonucleótidos que poseyeran una longitud entre 17 y 28 nucleótidos aproximadamente. De esta manera se puede obtener un primer lo suficientemente específico como para que no se anille en muchos sitios de la secuencia, pero no tan grande como para que pueda formar múltiples estructuras secundarias.

*Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>).* Ésta depende principalmente del contenido de G+C de la secuencia, de las condiciones físico-químicas de la solución y de la longitud del primer. Entonces, entre más pequeña sea la secuencia más baja es su T<sub>m</sub> y cuando el contenido de G+C es bajo, la T<sub>m</sub> también lo será. En este caso, es importante tomar en cuenta que en la reacción de PCR para la amplificación, se utilizan dos primers distintos, y que dichos fragmentos poseen T<sub>m</sub>'s que difieren entre sí. Por esto, es necesario que las T<sub>m</sub>'s de ambos oligonucleótidos sean cercanas, y que se encuentren en un rango entre 55 y 72 °C (dependiendo del contenido de C+G en el genoma). (Pinzón, 2007;[http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers\\_anagrande.htm](http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers_anagrande.htm)).

*Especificidad.* Esta característica es importante para obtener productos únicos en el momento de la amplificación. Es necesario que la secuencia del primer no se encuentre en ningún otro sitio del genoma más que a partir de donde se ha diseñado para amplificar el fragmento deseado. En este caso, se corroboró que las secuencias de los primers diseñados para la amplificación del gen *gdhA* no se encontraran presentes dentro de la secuencia codificante para dicho gen.

*Secuencias complementarias.* Es conveniente que los primers no posean homología intra-oligonucleótido, pues este caso puede llevar a la formación de estructuras dobles en el mismo oligonucleótido que interfieran con la hibridación a la cadena deseada. Otro punto a tomar en cuenta es la homología entre ambos primers. Si ésta es elevada, se pueden formar dímeros que no permitirán la amplificación del producto deseado. En este caso, las estructuras que pudieran formarse entre ambos oligonucleótidos o en cada uno de estos, fueron evaluadas utilizando el programa PrimerSelect.

*Contenido en G+C y polibases.* Se recomienda que el porcentaje de G+C en la secuencia del primer esté entre un 45 y un 55%. También debe tomarse en cuenta que no existan zonas poliG, poliC, poliA, poliT o polipirimidinas y polipurinas, es decir, la secuencia deberá contener una mezcla de nucleótidos más o menos azarosa ([http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers\\_anagrande.htm](http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers_anagrande.htm)).

*Secuencia terminal 3'.* Es conveniente que el extremo 3' del primer o cebador contenga G o C, pues esto aumenta la hibridación de dicho extremo con la cadena de ADN blanco. Esto se debe a los triples enlaces que se presentan entre dichas bases al anillarse ([http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers\\_anagrande.htm](http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers_anagrande.htm)). En este caso, todos los oligonucleótidos diseñados terminan en G o en C.

## **6.8 Amplificación del gen *gdhA***

Una vez elegidos los oligonucleótidos se procedió a estandarizar un programa de PCR para la amplificación del gen.

Se utilizó la mezcla *Pfx SuperMix*, que incluye una recombinante de DNA polimerasa de especies de *Thermococcus*, Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8.4), proteínas termoestables AccuPrime, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub> y dNTPs.

El protocolo inicial para PCR que se recomendaba para la AccuPrime *Pfx SuperMix*, con un amplificado de aproximadamente 1500 pb, es el siguiente:

1. Desnaturalización      95 °C            5 min (Inicial)
2. Desnaturalización      95 °C            15 seg
3. Alineamiento            55-65 °C        30 seg
4. Elongación                68 °C            1 min/Kb
5. Repetición de 35 ciclos desde el paso 2

Con respecto a este protocolo se hicieron las modificaciones necesarias hasta obtener un programa para PCR (mostrado en resultados), que amplificara satisfactoriamente el fragmento deseado.

## 6.9 Extracción de plásmidos

Para la extracción tanto del plásmido pBSL98 como el pSUP202 de *E.coli*, se usó el kit QIA spin miniprep (**QIAGEN**<sup>®</sup>). El protocolo utilizado se basó en el indicado por el fabricante para el uso de este kit y se describe a continuación:

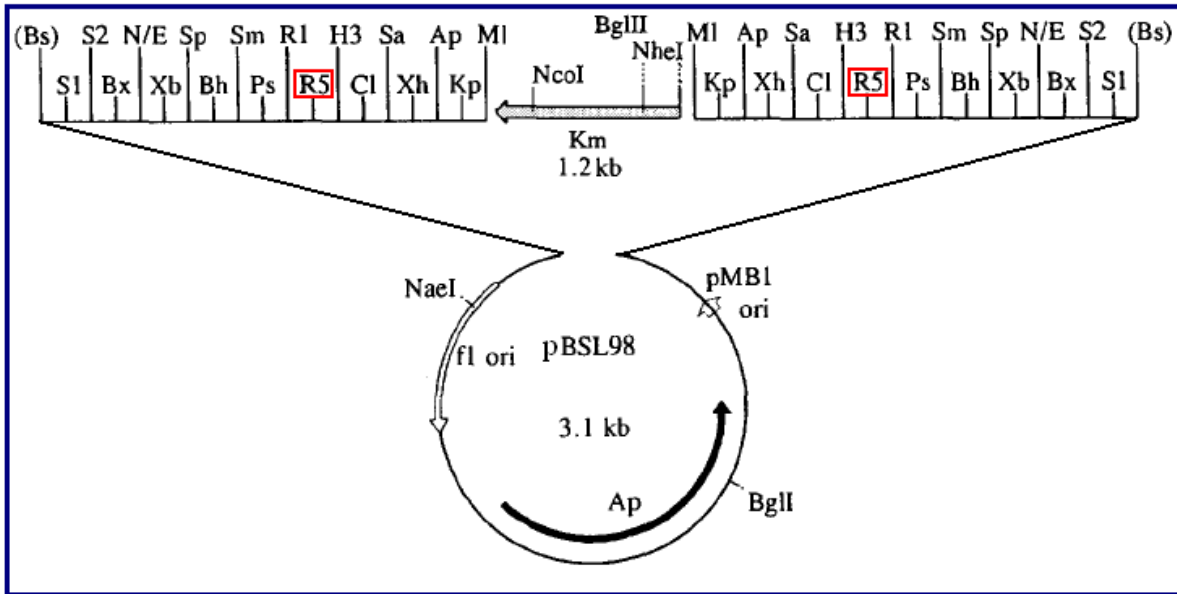
Se tomaron 1.5 ml del cultivo bacteriano crecido de 12-16 horas, se colocaron en un tubo Eppendorf y se centrifugaron a 9,000 rpm durante tres minutos. Dicha centrifugación se repitió las veces necesarias hasta obtener una pastilla de aproximadamente 50 µl.

La pastilla de células fue resuspendida en 250 µl de amortiguador P1 (que contiene la RNasa A) hasta que no se observaron grumos. Posterior a esto, se adicionaron 250 µl de amortiguador P2 y se mezcló invirtiendo el tubo de 4-6 veces, hasta que la solución se observaba clara y viscosa. Este paso nunca fue dejado más de 5 min. Se agregaron 350 µl de amortiguador N3 e inmediatamente el tubo fue invertido varias veces hasta observar que la solución se volvía turbia. Todo se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido en la centrifugación fue transferido a una columna QIAprep cuidadosamente. La columna fue centrifugada un minuto y el sobrenadante obtenido se descartó. Después de esto se procedió al lavado con 500 µl de amortiguador PB, centrifugando nuevamente un minuto y descartando el sobrenadante. Un segundo lavado se llevó a cabo con 750 µl de amortiguador PE (al cual se agregaron 24 ml de etanol) y se centrifugó durante un minuto. Dos centrifugaciones posteriores se hicieron después del lavado con PE, para eliminar cualquier cantidad de amortiguador. Finalmente la columna se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y se agregaron **20** µl de agua estéril en el centro de la membrana. Una última centrifugación se llevó a cabo, en la que el sobrenadante obtenido contenía el plásmido extraído.

## 6.10 Interrupción del gen *gdhA* con cassette de resistencia a antibiótico

### 6.10.1 Extracción del cassette de resistencia a Km y restricción del gen *gdhA*

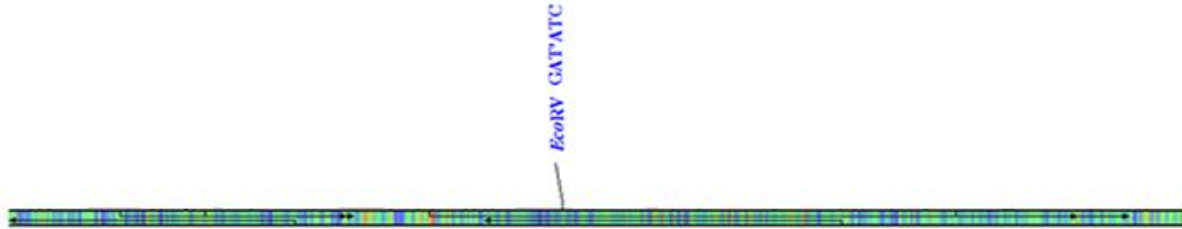
El plásmido pBSL98 (Figura 7) extraído de *E. coli* fue digerido para la obtención del cassette de resistencia a Km. Dicha restricción fue hecha con *EcoRV*.



**Figura 7.** Mapa del plásmido pBSL98. El plásmido es de 3100 pb y cuenta con un cassette de resistencia a Km de 1200 pb. En un recuadro rojo se muestran los sitios de corte para *EcoRV*. Los sitios de corte se encuentran abreviados de la siguiente manera: Ap, *Apal*; Bh, *BamHI*; Bs, *BssHII*; Bx, *BstXI*; Cl, *Clal*; E, *EagI*; H3, *HindIII*; Kp, *KpnI*; M1, *MluI*; N, *Nod*; Nh, *NheI*; Ps, *PstI*; R1, *EcoRI*; R5, *EcoRV*; S1, *SacI*; S2, *SacII*; Sa, *Sall*; Sm, *Sinai*; Sp, *SpeI*; Xh, *XbaI*; Xh, *XhoI* y Bs, *BssHII*. Imagen modificada de Alexeyev, y col., 1995.

El gen *gdhA* amplificado por PCR también fue digerido con *EcoRV* (Figura 8). La enzima de restricción *EcoRV* (Invitrogen®), fue utilizada tomando en cuenta el protocolo proporcionado por el fabricante. La digestión se llevó a cabo a 37 °C durante dos horas, utilizando el amortiguador REACT®2 incluido en el kit de la enzima.

El amortiguador REACT®2 contiene 10 mM de Tris-HCL (pH 7.4), 50 mM de KCl, 0.1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 200 µg/ml de BSA, 50% de glicerol y 0.1% de triton®X-100. Cada reacción contenía 13.2 ml, de los cuales 1.2 µL eran de amortiguador, 2 µL de la enzima y 10 µL del DNA a cortar.



Amplificado de *gdhA*

4069 bp

**Figura 8.** Esquema de restricción del gen *gdhA* con *EcoRV*. El esquema muestra el sitio de corte del amplificado de 4069 pb; *EcoRV* corta a los 1913 pb.

### 6.10.2 Desfosforilación de cassette de resistencia

El cassette de resistencia a Km obtenido a partir del plásmido pBSL98 fue desfosforilado con ayuda de fosfatasa alcalina (**Invitrogen**<sup>®</sup>). Dicha fosfatasa es suspendida en NaCl 3 M, cloruro de magnesio 1 mM, cloruro de zinc 0.1 mM y trietanolamida 30 mM a pH 7.5. Para que se lleve a cabo la reacción es necesario utilizar un amortiguador apropiado para la desfosforilación, el cual debe ser preparado con Tris-HCL 500 mM pH 8.5 además de **EDTA** 1 mM.

El volumen para la reacción de desfosforilación se ajustó a 20 µL, conteniendo 13 µL del fragmento de DNA, 2 µL de amortiguador, 3 µL de fosfatasa alcalina y 2 µL de agua miliq. La reacción se dejó incubar a 37 °C por dos horas.

### 6.10.3 Ligación de cassette con el gen *gdhA*

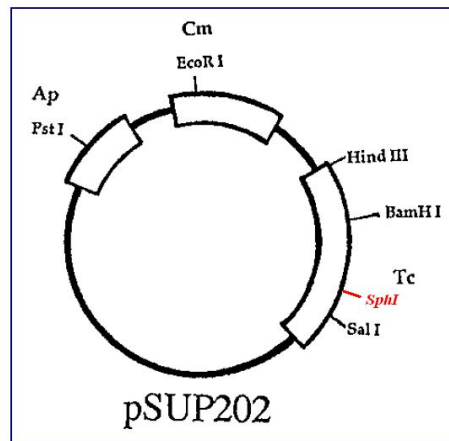
La ligación se llevó a cabo utilizando la enzima **ligasa T<sub>4</sub>** (**Invitrogen**<sup>®</sup>), en el amortiguador correspondiente. El amortiguador contiene Tris-HCl 250 mM a pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM y 25 % de polietilen glicol-3000. La enzima se encuentra disuelta en Tris-HCl 10 mM a pH 7.5, KCl 50 mM, DTT 1 mM y 50 % de glicerol.

Para cada reacción se agregó el cassette de Km en proporción 3:1 con respecto al amplificado de *gdhA*, ambos previamente digeridos con *EcoRV*; por ejemplo, se adicionaron 5 µl del amplificado y 15 µl del cassette. También se adicionaron 4 µl de ligasa T<sub>4</sub> y 6 µl del amortiguador. La reacción se dejó toda la noche a 14°C.

## 6.11 Construcción de plásmido con gen *gdhA* interrumpido

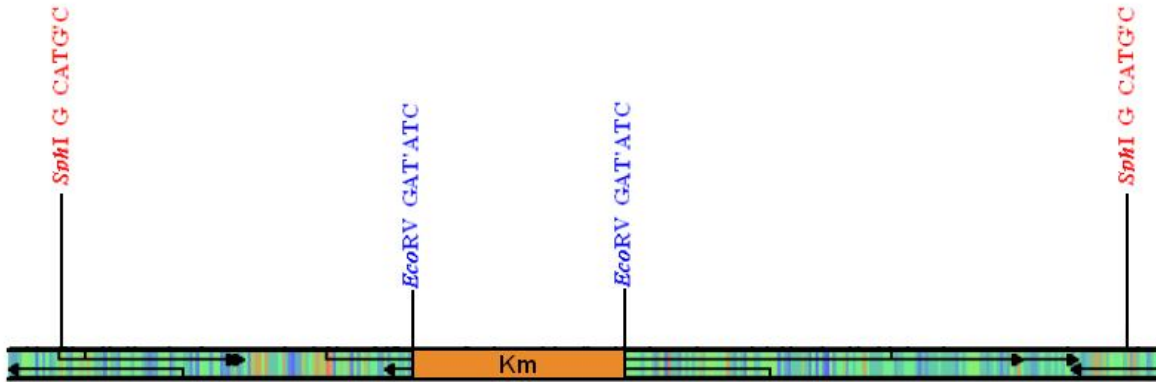
### 6.11.1 Restricción de pSUP202 y *gdhA* interrumpido

El plásmido pSUP202 (Figura 9), extraído de *E.coli* y el gen interrumpido con el cassette de resistencia a Km (*gdhA::Km*) mostrado en la figura 10, fueron digeridos con *SphI* (Invitrogen®), utilizando el amortiguador REACT®6 que se recomienda para la enzima. Dicho amortiguador contiene de Tris-HCL 50 mM (pH 7.4), MgCl<sub>2</sub> 6 mM, NaCl 50 mM y KCl 50 mM.



**Figura 9.** Mapa del plásmido pSUP202. Dicho vector posee resistencia a Ap, Cm y Tc. El plásmido posee un sitio de corte para *SphI* (marcado en rojo) que interrumpe su resistencia a Tc. Imagen modificada de Archambault, 1998.





**Figura 10.** Mapa de restricción para *EcoRV* y *SphI*. Se muestran los sitios de corte de las enzimas sobre el amplificado interrumpido con el cassette de resistencia a Km.

Cada reacción contenía 13.2  $\mu\text{L}$ , de los cuales 1.2  $\mu\text{L}$  eran de amortiguador, 2  $\mu\text{L}$  de la enzima *SphI* y 10  $\mu\text{L}$  del DNA a cortar. Cada digestión se llevó a cabo incubando la reacción a 37 °C durante dos horas.

### 6.11.2 Ligación de pSUP202 y *gdhA* interrumpido

Una vez digerido el plásmido pSUP202 y el fragmento ***gdhA::Km*** con *SphI*, ambos fueron ligados con ligasa T<sub>4</sub> (Invitrogen®).

Para cada reacción se agregó el inserto ***gdhA::Km*** en proporción 3:1 con respecto al plásmido pSUP202, ambos previamente digeridos con *SphI*; por ejemplo, se adicionaron 5  $\mu\text{l}$  del plásmido y 15  $\mu\text{l}$  de *gdhA::Km*. También se adicionaron 4  $\mu\text{l}$  de ligasa T<sub>4</sub> y 6  $\mu\text{l}$  del amortiguador. La reacción se dejó toda la noche a 14°C.

## 6.12 Transformación y clonación de la construcción en *E. coli* DH5 $\alpha$

### 6.12.1 Competentes

Se inocularon 10 ml de medio **LB** con 50  $\mu\text{l}$  de un cultivo activo de *E. coli* DH5 $\alpha$ . El cultivo se creció a 37 °C en agitación constante hasta que la densidad óptica medida a 560 nm se encontraba entre 0.6 y 0.8.

Una vez que el cultivo había crecido lo suficiente, se enfrió en hielo a 4 °C y se centrifugó 10 minutos a 6,000 rpm. Los tubos fueron decantados y se mantuvieron en hielo, a lo largo del proceso. La pastilla formada se resuspendió en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM y se dejó en hielo durante 60 minutos. Después de esto se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 6,000 rpm y el contenido se decantó. La pastilla fue resuspendida en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM.

### 6.12.2 Transformantes

El DNA a transformar (Tabla 2) se colocó en tubos Eppendorf y se dejó en hielo durante 10 minutos. A cada uno de los tubos se agregaron 200 µl de las células competentes. Inmediatamente después, los tubos fueron volteados cuidadosamente para homogenizar la mezcla y se colocaron en hielo durante 30 minutos, invirtiendo esporádicamente. Durante 90 segundos se calentaron en un termoblock a 43 °C para posteriormente ponerlos en hielo por dos minutos. Pasados los dos minutos se agregó a cada tubo un mililitro de medio **LB** con glucosa al 0.3 % (100 µl de solución de glucosa al 3 % en 900 µl de medio **LB**). Los tubos se incubaron a 37 °C y en agitación durante 1:30 hs y después se centrifugaron.

**Tabla 2.** Placas sembradas. Puede observarse la cantidad de DNA que se agregó a cada placa de LB, además del antibiótico que fue utilizado en cada caso para la selección de las transformantes. Cada caja se hizo por duplicado.

Placas sembradas	
Antibiótico de selección	DNA agregado
<b>Ap</b> (100 µg/ml)	0 µl DNA
	2 µl de pSUP202
<b>Ap</b> (100 µg/ml) <b>Km</b> (25 µg/ml)	0 µl DNA
	2 µl de ligación pSUP202- <i>gdhA</i> ::Km
	4 µl de ligación pSUP202- <i>gdhA</i> ::Km
	6 µl de ligación pSUP202- <i>gdhA</i> ::Km

Finalmente las pastillas se resuspendieron en 80 µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se sembraron en cajas de **LB** con agar. Cada caja contenía distintos antibióticos de selección (Tabla 2).

Todas las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

## 6.13 Mutante **M3**

### 6.13.1 Actividad de oxidasas en células enteras

Para corroborar que la cepa **M3** de la que se extrajo el DNA fuera realmente mutante en glucosa deshidrogenasa, se midieron las actividades de oxidasas. Esto se hizo con la ayuda de un oxímetro con electrodo tipo Clark, a una temperatura de 30 °C de acuerdo al protocolo sugerido por [Escamilla y col.](#) en 1987.

La mezcla total se llevó a 2 ml conteniendo 1.9 ml de amortiguador de fosfatos pH.6, 5 mg/ml de células enteras de *Ga. diazotrophicus* **M3** y 10 mM del sustrato (aldehído o glucosa en este caso, disueltos en agua a una concentración de 1 M).

El amortiguador de fosfatos se preparó con fosfato de potasio dibásico a una concentración de 50mM, se disolvió en agua destilada y el pH se ajustó a 6.0.

### 6.13.2 Amplificación del gen *gdhA* de la mutante **M3**

Utilizando el mismo programa de PCR, además del mismo par de oligonucleótidos usados para la amplificación del gen *gdhA* de *Ga. diazotrophicus* **WT**, se amplificó el gen *gdhA* de la cepa mutante **M3** a partir de DNA genómico de dicha cepa .

## 6.14 Electroforesis

Todas las extracciones, restricciones, amplificaciones, construcciones y demás técnicas de DNA llevadas a cabo, fueron corridas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

Cada 25 mg de agarosa se disolvieron en 25 ml de amortiguador **TBE** 1X. Dicho amortiguador se preparó en una solución stock a 10X y se disolvía 10 veces cada que se utilizaba. La solución de **TBE** stock contiene tris 1M, ácido bórico 0.9 M y **EDTA** 0.01 M, a un pH 8.0 final.

Como marcador de peso molecular se utilizó el 1 Kb DNA ladder (**New England Bio Labs**<sup>®</sup>) en todos los casos. El voltaje utilizado para correr cada gel varió entre 80 y 90 volts, con una resistencia cercana a la mitad del voltaje.

Los electroforamas resultantes se revelaron con bromuro de etidio bajo luz UV. El bromuro de etidio se preparó en una solución stock a 5 mg/ml. Para el revelado de los geles se diluía 1 ml de la solución stock preparada en 200 ml de agua desionizada. Cada gel era sumergido en la solución durante 5 minutos para posteriormente colocarlo en un transiluminador para poder observar las bandas obtenidas por fluorescencia del colorante en la luz UV.

## VII. Resultados

### 7.1 Mutante de *Ga. diazotrophicus* deficiente en actividad de PQQ-GDH

#### 7.1.1 Cepa *M3*

Como se menciona en la introducción, la fermentación oxidativa (oxidación directa de sustratos en el espacio periplásmico), es la vía más importante para la utilización de glucosa en *Ga. diazotrophicus* (Stephan y col., 1991; Attwood y col., 1991). En esta bacteria las enzimas claves de las rutas de Embden-Meyerhof-Parnas (6-fosfofructocinasa y 1-fosfofructocinasa) y Entner-Doudoroff (6-fosfogluconato deshidratasa y 2-ceto-3-desoxifosfogluconato aldolasa) están ausentes (Álvarez y Martínez-Drets, 1995; Attwood y col., 1991).

Por esta razón, es muy importante determinar cuál es la importancia fisiológica de la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal.

En el laboratorio, como parte de la tesis doctoral de Marcela Zuleta (Tesis doctoral en preparación), se obtuvo por medio de la utilización del mini-transposón TN5, una mutante incapaz de acidificar el medio; la falta de acidificación en el medio puede ser atribuida a la ausencia de actividad de la glucosa deshidrogenasa, lo que ocasionaría que no se produjera el ácido glucónico. Esta mutante era una buena candidata para ser PQQ-GDH<sup>-</sup> y fue nombrada *M3*. La mutante fue caracterizada en cuanto a crecimiento y actividades asociadas con la fermentación oxidativa (Cerqueda, 2010).

Los resultados obtenidos por Cerqueda (2010), confirmaron la casi nula actividad de PQQ-GDH en la mutante *M3*. Sin embargo, es muy importante destacar que las otras actividades de deshidrogenasas dependientes de PQQ también se vieron afectadas. La PQQ-ADH y también la PQQ-ALDH, aumentaron su actividad 0.5 y 10 veces respectivamente. A pesar de ello, las actividades de oxidasas asociadas a estas deshidrogenasas disminuyeron apreciablemente. Estos resultados nos muestran que como resultado de la mutación no solo la PQQ-GDH, sino aparentemente toda la

cadena respiratoria se vio afectada en su función. La falta de actividad a nivel de oxidasas, aún con actividades de deshidrogenasas aumentadas, nos sugiere una posible afectación a nivel de la síntesis de la ubiquinona o de la oxidasa terminal. Estos resultados nos llevan a postular a la cepa PQQ-GDH<sup>-</sup> obtenida, como una mutante pleiotrópica.

Tratando de explicar los resultados obtenidos con la caracterización de la cepa **M3**, decidimos analizar si el gen que codifica para la **PQQ-GDH** de esta mutante, mostraba la inserción de alguna secuencia que estuviera afectando su expresión.

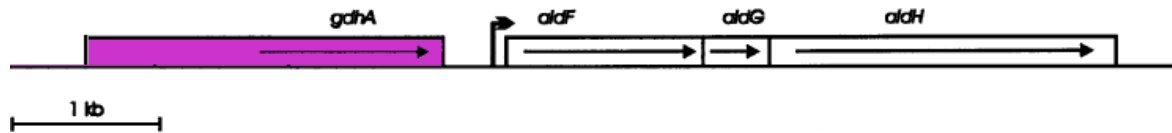
## 7.2 Identificación del gen *gdhA* en el genoma de *Ga. diazotrophicus* PAL5 WT

La **PQQ-GDH** había sido purificada y caracterizada en la tesis doctoral de [Martín Sará](#) ([Tesis doctoral en preparación](#)). A partir de la única banda obtenida del análisis electroforético en condiciones desnaturalizantes de la proteína purificada por Sará, se obtuvieron las secuencias de aminoácidos de varios péptidos internos de la enzima.

Empezamos por localizar los péptidos secuenciados en el genoma de *Ga. diazotrophicus*. Inicialmente se utilizó sólo la secuencia del péptido interno más grande de la **GDH** purificada. Con esto logramos identificar la secuencia completa de la proteína (GenBank No. de acceso [ACI52819](#); [CAP57220](#)), que tiene una alta homología con las **PQQ-GDH** de *G. oxydans* (98% de homología; [YP\\_190704.1](#)) y *A. pasteurianus* (98% de homología; [YP\\_003187162.1](#)), bacterias que también forman parte de la familia de BAC.

Una vez localizada la secuencia completa de la proteína, se identificaron en ella todos los péptidos internos secuenciados de la enzima purificada (Figura 12).

Hecho esto, se procedió a la identificación del gen correspondiente, y a su ubicación dentro del genoma completo de *Ga. diazotrophicus* (GenBank No. de acceso [NC\\_010125.1](#); [NC\\_011365.1](#)).



**Figura 11.** Organización y localización del gen *gdhA* en el genoma de *Ga. diazotrophicus* (No de acceso GenBank AM889285 del 3367325 al 3374500). Se muestra la ubicación del gen *gdhA* con respecto al operón codificante de la enzima ALDH.

La **PQQ-GDH** es codificada por un solo gen, el gen *gdhA* que se localiza entre el nucleótido 3367325 y el 3369742 (GenBank No de acceso CAP57220.1), y tiene una longitud de 2418 pb. Se encuentra río arriba del operón que codifica para la **ALDH** de esta bacteria (Figura 11).

```

1   MNIKQGLRPVLAITAVVYALVGLYLLAGGIWLTALGGSLYYLIAGALLLVTAVLLRRRQ
61  EALWVYAALLIGTMVWAVGEVGLDFWALAPRGDILVPLGIWLMLEPPITRNLGTRNLGTRD
121 LAPPSRAAQVPLGLAVGAAVVVVVAALTQDPQDIAGSLPQVAQNAPTQGDAGEIPDEDWQ
181 AYGRTGFGDRFSPLKQITPDNVHNLKVAWTFRTGDVKGPHDPGEFTDETTPIKIRDTVYL
241 CSPHQILFALDAATGKLGKWFDPKLTYNSTFQHMTCRGVSYHETAQGAETIDGAQAPVDC
      IEHHKNFQHMT
      : : : . . . * * * * *
301 GHRIFLPTNDGRLFALDAETGERCHNFGDDGMVDLKAGEVVKTAGFFEATSPPVVTDKMV
      IFLPTDDGR
      * * * * * : * * *
361 IVSGAVMDNYSTHEPSGVTRGFDVYTGRLVWVFDAGNPDNEMPSDTHHFVGNSPNSWIW
421 SSYDPKLNLIIFIPMGVQTPDIWGGNRGADAERYASSILALNADTGKLAWSYQTVHHDLWD
481 MDIPAQPSLVDVRTAGGDIVPALYAPAKTGNIFVLDRRTGTPIVPAPETRVPPQGPAPGDH
      TGNIFWLDRR
      * * * * * * * * *
541 LSPTQPFSELTFRPKNNLTGADMWGGTMTFDQLMCRIMFHQLRYDGPFTPPSLQGTLVFPG
601 NLGMFEWGGLAVDPVRQIAIANPIAIPFVSRLIPRGPNNPASPDASQPSGSETGVQPMFQ
661 VPYGVTLSPFLSPLGLPCKKPAWGF MAGIDLKTNTIVWMHRNGTIRDSAPLPIPFKLGVP
      PLPLPFK
      * * * : * * *
721 SLGGPLTTAGGVAFLTSTADFYIRAYDVTTGRQLWQDRLPAGGQSTPMTYAVGGRQFIVT
      LPAGGKSTPMTYEAGGRQYIVT
      * * * * * : * * * * * . * * * * : * * *
781 ADGGHGSFGTKLGDYVVAYALPEAH
      VDGGHGSFGTR
      . * * * * * * * * * :

```

**Figura 12.** Localización de los péptidos internos secuenciados a partir de la **PQQ-GDH** pura, en la secuencia de aminoácidos de la **PQQ-GDH** de *Ga. diazotrophicus*. (\*)=identidad, (:)=sustitución conservativa; (.)=sustitución semiconservativa.

### 7.3 Diseño de oligonucleótidos

Una vez identificada la secuencia de nucleótidos que codifica para la **PQQ-GDH**, procedimos a diseñar los oligonucleótidos que nos permitieron amplificar el gen. Los oligonucleótidos diseñados fueron probados utilizando el programa PrimerSelect de DNAMan. En la tabla 3 se muestran algunas de las características obtenidas para cada uno de los oligonucleótidos diseñados.

**Tabla 3.** Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación del gen *gdhA*. Estos resultados se obtuvieron con la ayuda del programa **PrimerSelect**.

Nombre	Secuencia	Longitud	Tm °C	G+C %	H	D	LA pb
<b>Par 1</b>							
<b>gdhR2</b>	5' GATGCGTCCGATCACGATTGTCCTG 3'	25 b	65.2	56.0	13	13	3,535
<b>gdhF2</b>	5' GAACAGGTGGGCGTGCTGTTTAC 3'	23 b	62.4	60.9	5		
<b>Par 2</b>							
<b>gdhR2</b>	5' GATGCGTCCGATCACGATTGTCCTG 3'	25 b	65.2	56.0	13	13	3,806
<b>gdhF3</b>	5' GTCCTGCGACAACCTGCCACATAAC 3'	25 b	62.4	56.0	8		
<b>Par 3</b>							
<b>gdhR2</b>	5' GATGCGTCCGATCACGATTGTCCTG 3'	25 b	65.2	56.0	13	10	4,069
<b>gdhF4</b>	5' GTCATCGGCTCGATCGTGAATACCTG 3'	27 b	66.1	55.6	10		

**H=Hairpins D=Dímeros entre primers LA=Longitud del amplificado**

Como puede observarse la tabla, ninguno de los pares constituye una pareja perfecta tomando en cuenta las características ideales. Probablemente encontrar pares que tengan Tm's cercanas o una longitud dentro del mejor rango, no es tan difícil como el hecho de localizar algún par que no forme estructuras secundarias cuando se trabaja con una bacteria con alto contenido en G+C como lo es *Ga. diazotrophicus*.



Teniendo esto en cuenta, para la amplificación del gen *gdhA*, se eligió el par de oligonucleótidos número tres: *gdhR2* y *gdhF4*, que amplifican 4,069 pb. Dicha decisión fue tomada por dos criterios principales: Poseen la menor diferencia entre  $T_m$ 's y forman menos dímeros que los otros pares.

#### 7.4 Amplificación del gen *gdhA*

Utilizando los oligonucleótidos *gdhR2* y *gdhF4* se amplificó el fragmento que contenía el gen *gdhA*, tanto en la cepa **WT** como en la **M3** de *Ga. diazotrophicus*.

Debido al alto porcentaje de G+C presente en el genoma de *Ga. diazotrophicus* (66.19 %; Bertalan y col. 2009) y al tamaño del fragmento que se quería amplificar, la polimerasa de elección es la Accuprime *px*. Las cantidades para cada componente de la reacción de PCR sugeridas por el fabricante de esta enzima, fueron tomadas en cuenta. Además, a la reacción se adicionó **DMSO** para minimizar la formación de estructuras secundarias, ya que la amplificación de fragmentos ricos en contenido de G+C algunas veces resulta en productos no esperados o nulos. Para ello se utilizó entre 5 y 10% de este reactivo (Frackman y col. 1998).

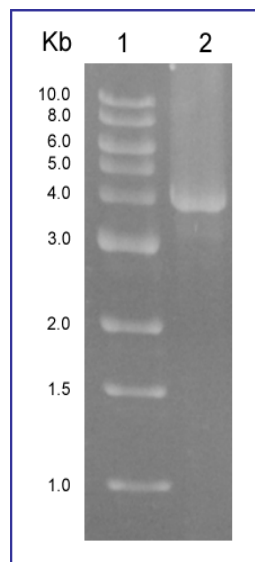
El protocolo para la reacción de amplificación se muestra a continuación:

- 22.5  $\mu$ L AccuPrime *Pfx* SuperMix (Invitrogen®)
- 1  $\mu$ L *gdhR2* (43.2 pmoles)
- 1  $\mu$ L *gdhF4* (43.2 pmoles)
- 0.5  $\mu$ L DNA genómico de *Ga. diazotrophicus* (40-50 ng aprox.)
- 2  $\mu$ L **DMSO**

Para crear un programa de PCR específico, se tomó en cuenta que el amplificado esperado es de 4,069 pb, además de las Tm's de los oligonucleótidos diseñados. Se amplificó con un gradiente de temperatura de alineamiento entre 55 °C y 68 °C., para obtener la temperatura óptima. El programa que cubrió satisfactoriamente las expectativas del amplificado deseado fue:

1	Desnaturalización	95 °C	10 min (Inicial)
2	Desnaturalización	95 °C	1 min
3	Alineamiento	65.4 °C	1 min
4	Elongación	68 °C	5 min
5	Repetición de 35 ciclos desde el paso 2		
6	Elongación	68 °C	10 min (final)
7	Hold	4 °C	

Los resultados de cada uno de los PCR's se observaron por electroforesis en agarosa al 1%. En la figura 13 se muestra un electroforama representativo.

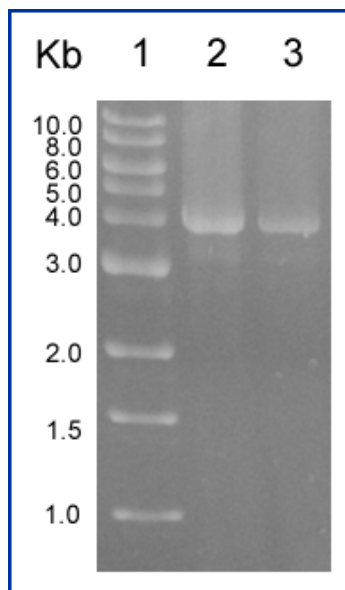


**Figura 13.** Electroforama de la amplificación del fragmento que contiene el gen *adhA*. En el carril 2 se observa el fragmento obtenido en la amplificación en la cepa WT, y en el carril 1 el marcador de peso molecular (1Kb DNA Ladder **New England BioLabs®**).

En el electroforama podemos ver una banda cercana a los 4,000 pb, lo que corrobora que el fragmento amplificado es el que se esperaba. La banda se observa bastante limpia, sin otras bandas inespecíficas.

Para determinar si existía algún tipo de inserción en el gen ortólogo de la mutante **M3**, el gen fue amplificado utilizando los oligonucleótidos diseñados para la cepa **WT**.

En la figura 14 se observa la amplificación del gen *gdhA*, tanto de la mutante **M3** como de la cepa **WT** de *Ga. diazotrophicus*.



**Figura 14.** Electroforama de los fragmentos amplificados en las cepas WT y M3 de *Ga. diazotrophicus*. En el carril dos se muestra la amplificación del gen *gdhA* en WT y en el carril número tres la amplificación del gen en M3. Se puede ver que ambos fragmentos tienen el mismo tamaño (4069 pb). El carril uno corresponde al marcador 1Kb DNA Ladder (**New England BioLabs**<sup>®</sup>).

Los resultados nos muestran que ambos amplificados tienen el mismo tamaño (4069 pb), por lo que podemos afirmar que el gen *gdhA* de la mutante **M3** no está interrumpido por el transposón; este resultado apoya nuestra idea inicial de que la mutante **M3** es el resultado de una mutación pleiotrópica.

Entonces, la pregunta original sobre la importancia de la **PQQ-GDH** en *Ga. diazotrophicus* seguía sin contestarse. Para tratar de hacerlo decidimos obtener una

mutante en la que el gen estuviera interrumpido por la secuencia de un cassette de resistencia a antibióticos, lo que efectivamente garantizaría que el fenotipo obtenido es resultado de una deficiencia en la expresión de esta enzima.

### 7.5 Determinación de la sensibilidad a antibióticos de *Ga. diazotrophicus* WT

Iniciamos el trabajo buscando cual era el cassette de antibióticos más adecuado, corroborando la sensibilidad natural de *Ga. diazotrophicus* a los antibióticos usados comúnmente.

**Tabla 4.** Sensibilidad de *Ga. diazotrophicus* WT a antibióticos. Los antibióticos fueron agregados en concentraciones usualmente utilizadas: en el caso de que se presentó crecimiento a estas concentraciones, éstas fueron aumentadas. Las "X" indican el crecimiento cualitativo. 0 indica que la bacteria no creció, mientras que XXXX corresponde al máximo crecimiento.

Antibiótico	Concentración en µg/mL	Crecimiento de la cepa WT
Ausente	-	XXXX
Espectinomicina	100	XXXX
Neomicina	60	XXXX
Estreptomycin	200	XXX
Tetraciclina	25	XXX
Tetraciclina	50	X
Cloranfenicol	25	XXX
Cloranfenicol	50	XX
Ampicilina	200	X
Gentamicina	30	0
Kanamicina	50	XXXX
Kanamicina	100	XX
Kanamicina	250	0

La bacteria fue inoculada en cultivos líquidos a los que se les añadió el antibiótico correspondiente. Después de incubar a 30 °C durante 24 horas, los cultivos se observaron cuidadosamente. El cultivo crecido en medio **LGI** sin antibiótico nos indicó cual podría ser el máximo crecimiento. Los resultados obtenidos pueden observarse en la tabla 4.

Como puede verse en la tabla 4, *Ga. diazotrophicus* es una bacteria que posee resistencia natural a casi todos los antibióticos que fueron probados. Esta característica hace muy difícil la selección de mutantes cuando éstas se obtienen por interrupción del gen con un cassette de antibióticos.

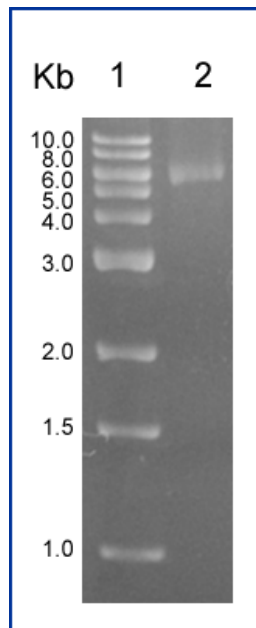
Con base en estos resultados, se diseñó un protocolo para la mutación, tomando en cuenta las resistencias o sensibilidades a antibióticos que posee la bacteria.

## 7.6 Elección de plásmidos

Al revisar la bibliografía nos encontramos con que los plásmidos que podíamos utilizar eran muy pocos. La mayoría de los plásmidos comerciales están diseñados para ser utilizados en bacterias con un bajo contenido en G+C, como *Escherichia coli*. Sus sitios únicos de clonación tienen restricciones que son adecuadas para este tipo de bacterias, pero que son poco útiles en bacterias como *Ga. diazotrophicus*; además, bacterias como *E. coli* son sensibles a los antibióticos cuyos cassette de resistencia se encuentran en este tipo de plásmidos y como determinamos anteriormente, *Ga. diazotrophicus* es resistente a la mayoría de ellos.

Al momento de realizar el presente trabajo contábamos con los plásmidos pSUP202 y pBSL98 que se encontraban en *E. coli*. Los plásmidos fueron extraídos de esta bacteria utilizando el procedimiento mencionado en el apartado de métodos.

En la figura 15 puede observarse el resultado de la extracción del plásmido pBSL98:



**Figura 15.** Extracción del plásmido pBSL98. El segundo carril corresponde a la extracción del plásmido pBSL98 de 4300 pb. El peso del plásmido parece mayor ya que se encuentra cerrado y no corre de la misma forma en el gel de agarosa que un fragmento lineal. En el carril uno se muestra el marcador (1Kb DNA Ladder de **New England BioLabs®**).

A pesar de que el tamaño real del plásmido es de 4,300 pb, en el gel puede observarse un tamaño mayor, cercano a los 6,000 pb. Esto se debe a que el plásmido se encuentra cerrado por lo que corre de forma distinta en la agarosa. Lo mismo sucede para el plásmido pSUP202 no mostrado. Éste segundo plásmido tiene un tamaño real de 7,820 pb, pero al realizarse el análisis electroforético la banda se observa arriba de los 10,000 pb.

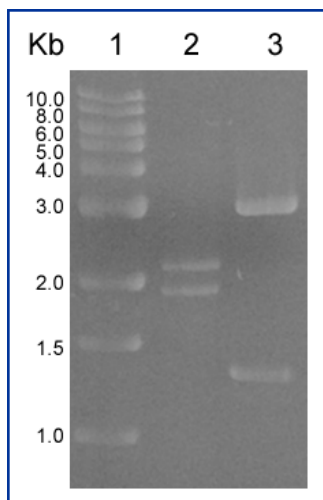
El plásmido pBSL98 posee un cassette de resistencia a Km y será utilizado para la interrupción del gen *gdhA*. Para asegurar la selección de mutantes en *Ga. diazotrophicus*, la kanamicina se utilizará a una concentración de 250 µg/ml. El plásmido pSUP202 se utilizó como vector de clonación.

## 7.7 Interrupción del gen *gdhA* con el cassette de resistencia a antibiótico

Como se mostró en el apartado 7.4, habíamos sido capaces de amplificar un fragmento de 4,069 pb conteniendo el gen *gdhA*, a partir del DNA cromosomal de *Ga. diazotrophicus*. El procedimiento ideal para interrumpir este gen sería que el fragmento fuera clonado en un plásmido y transformado en *E. coli*, para así obtener una cantidad adecuada del fragmento y llevar al cabo la interrupción del gen con el cassette de resistencia al antibiótico. Como mencionamos, el cassette con el que contábamos era el de resistencia a Km y sería extraído del plásmido pBSL98. Los patrones de restricción del plásmido pBSL98 y del gen *gdhA* nos mostraron que la única enzima que podíamos utilizar para la inserción del cassette en el gen era *EcoRV*. Sin embargo, al obtener el patrón de restricción del plásmido pSUP202, en el que íbamos clonar el fragmento, nos percatamos que este plásmido también era cortado con *EcoRV*. Por esta razón, decidimos interrumpir el gen con el cassette de Km primero y después clonarlo en el plásmido pSUP202, esperando que la cantidad de la construcción clonada fuera suficiente para transformar después a *E. coli* DH5 $\alpha$

Para ello, tanto el plásmido pBSL98 como el amplificado que contiene el gen *gdhA* fueron digeridos con *EcoRV*. De la restricción del plásmido se obtuvieron dos bandas, una correspondiente al cassette de resistencia a Km con un tamaño de 1,200 pb, y otra que pertenece al resto del plásmido, de 3100 pb. El amplificado cortado con la misma enzima también muestra dos bandas, de 1,913 y 2,156 pb. Los resultados de estas restricciones se muestran en la figura 16.

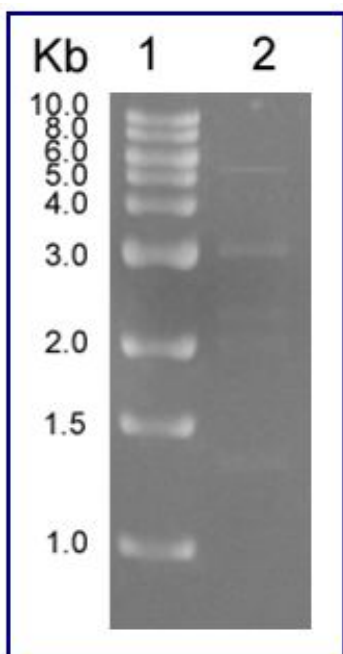
Los cortes que se obtuvieron gracias a la digestión con *EcoRV* (GAT↓ATC) fueron romos. Para evitar que el cassette se ligara a sí mismo en la reacción de ligación con el amplificado, se hizo una desfosforilación. Éste paso da más oportunidades de que el cassette de Km se ligue al amplificado digerido.



**Figura 16.** Restricciones con *EcoRV* del fragmento de PCR y el plásmido pBSL98. El carril 2 corresponde a la restricción del amplificado de PCR y el carril número 3 corresponde a la restricción del plásmido pBSL98. El carril 1 corresponde al marcador (1Kb DNA Ladder de **New England BioLabs®**).

### 7.7.1 Ligación del cassette de resistencia y el gen *gdhA*

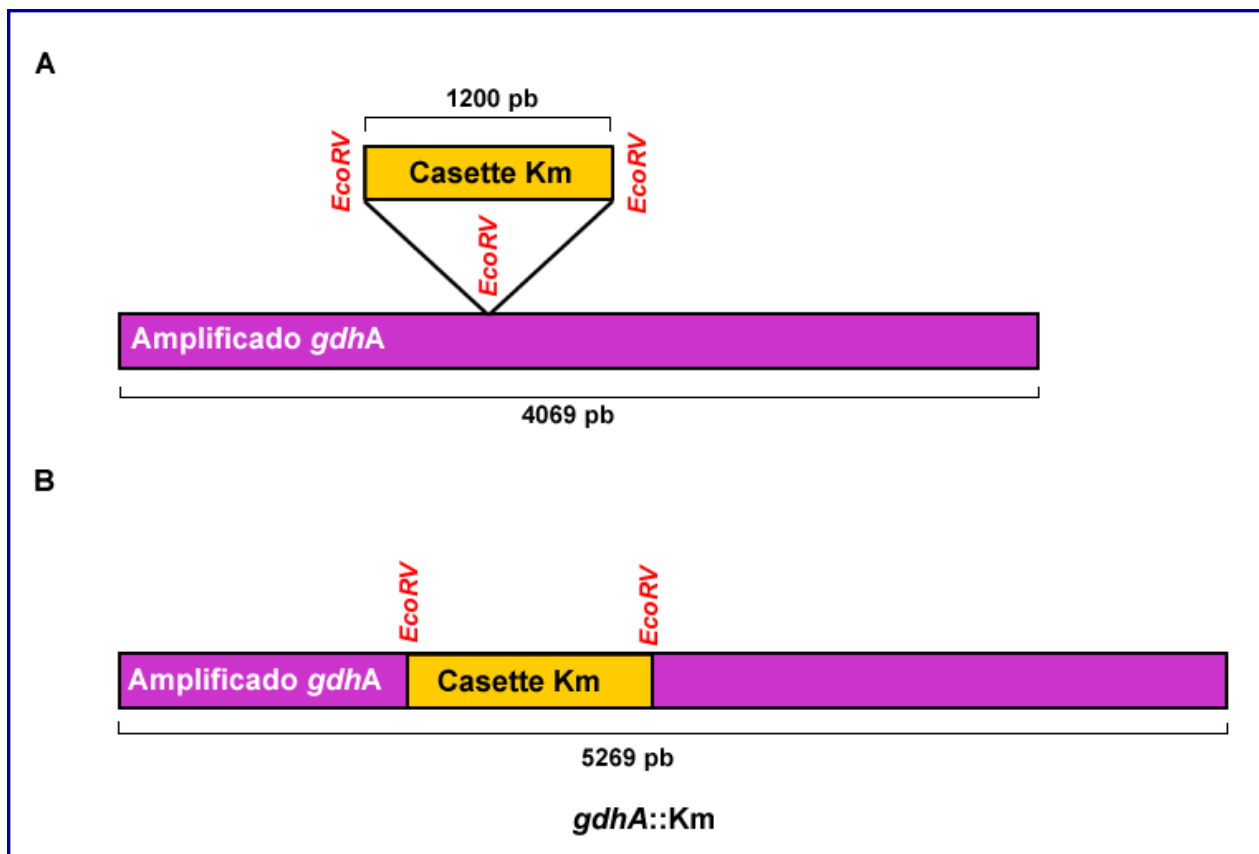
La digestión del fragmento con *EcoRV* nos permite ligar el cassette de resistencia a kanamicina (Km) aproximadamente a la mitad del gen *gdhA* (Figura 18). Los resultados de esta ligación pueden verse en la figura 17.



**Figura 17.** Interrupción del fragmento que contiene el gen *gdhA* con el cassette de Km. El carril 2 corresponde a 5  $\mu$ l de la reacción de ligación. Se observa una banda delgada arriba de los 5000 pb que corresponde a la ligación de ambos fragmentos del amplificado de PCR con el cassette de resistencia a Km. A 3000 pb se ubican restos del plásmido, a 2000 pb ambas partes del amplificado *gdhA* digerido y a 1200 pb el cassette de Km. El carril 1 muestra el marcador (1Kb DNA Ladder de **New England BioLabs®**).



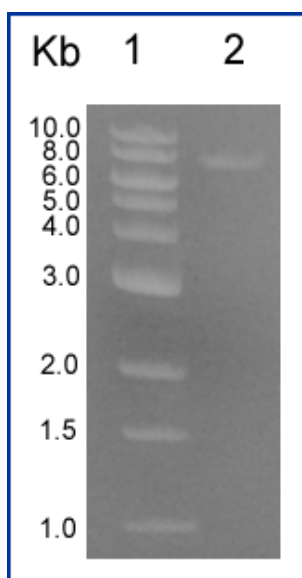
Una ligación es difícil de observar en un electroforama, ya que muchas veces la cantidad de DNA que se liga es muy poca. En este caso se observa una banda delgada arriba de los 5000 pb. Ésta banda corresponde a la ligación de ambos fragmentos del amplificado de PCR (4069 pb) con el cassette de resistencia a Km (1200 pb), por lo que el tamaño de la banda esperado es de 5269 pb (Figura 18), que corresponde con la banda superior en el electroforama. Las otras cuatro bandas en el gel, son los DNA digeridos con *EcoRV* que no se ligaron (a 3000 pb restos del plásmido; a 2000 pb ambas partes del amplificado *gdhA* digerido; a 1500 pb el cassette de Km).



**Figura 18.** Esquema de la interrupción del gen *gdhA*. A) Sitio de inserción del cassette de resistencia a kanamicina en el amplificado que contiene el gen. B) En esta imagen se observa *gdhA::Km*, donde se ligaron el cassette de Km y el amplificado *gdhA*. El tamaño final fue de 5269 pb.

### 7.8 Clonación de *gdhA::Km* en el plásmido pSUP202.

Una vez obtenido el gen con el inserto *gdhA::Km*, se procedió a ligarlo a un vector de clonación, el plásmido pSUP202. Para ello, tanto el plásmido pSUP202 como *gdhA::Km* fueron cortados con *SphI*. En la figura 19 se puede observar la restricción del plásmido.

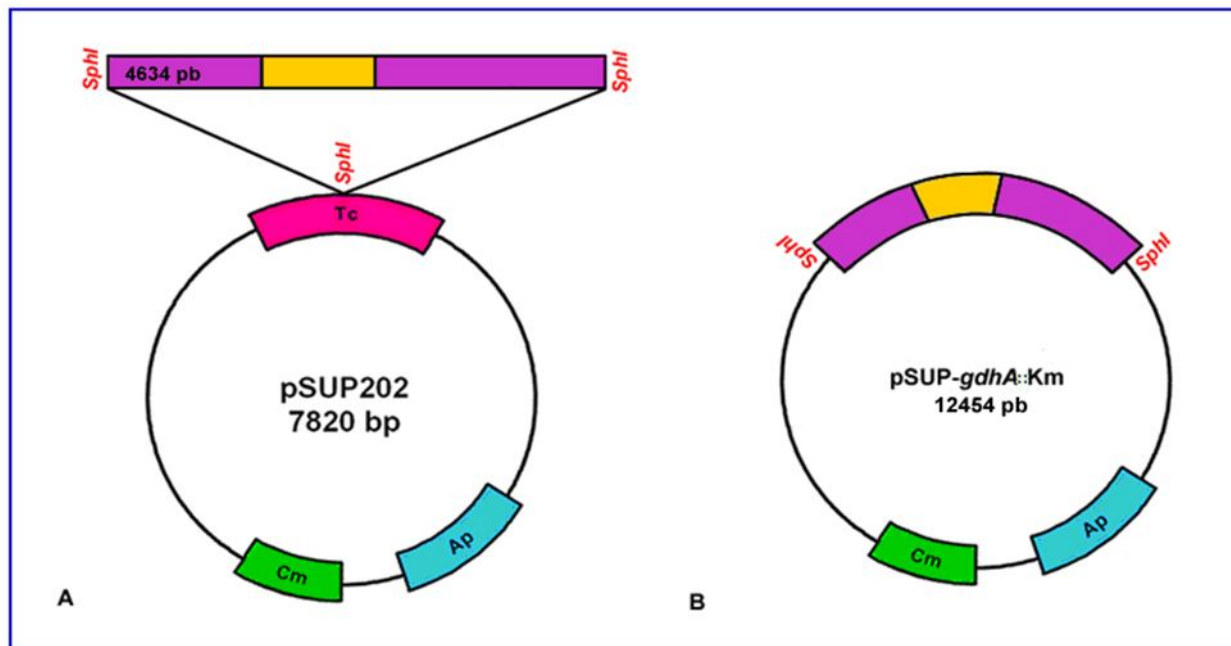


**Figura 19.** Restricción del plásmido pSUP202 con *SphI*. En el carril dos se corrieron 3  $\mu$ l de la reacción de restricción del plásmido pSUP202 de 7820 pb con *SphI*. El carril uno corresponde al marcador (1Kb DNA Ladder de **New England BioLabs**<sup>®</sup>).

El plásmido pSUP202 solo fue linearizado al ser tratado con *SphI*, por lo que el tamaño no cambia (7820 pb). Éste corte interrumpe la resistencia a Tc, dejando solamente dos resistencias en la secuencia del plásmido: Ap y Cm.

La construcción *gdhA::Km* se cortó en dos sitios por la enzima. Inicialmente el tamaño de *gdhA::Km* era de aproximadamente 5269 pb, con ambos cortes se pierden 635 pb por lo que el tamaño final es de 4634 pb.

El corte con *SphI* se da en la secuencia GCATG↓C, dejando cortes pegajosos o cohesivos tanto en el vector como en el gen interrumpido. Ambos fragmentos fueron ligados dando como resultado el **pSUP-*gdhA*::Km** (Figura 20).



**Figura 20.** Esquema del gen *gdhA*::Km introducido en el plásmido pSUP202. A) Se observan los sitios de corte para *SphI* tanto en *gdhA*::Km como en el plásmido pSUP202. B) Se esquematiza la construcción final pSUP2002-*gdhA*::Km con un tamaño de 12,454 pb (4,634 de *gdhA*::Km + 7,820 del plásmido).

### 7.9 Transformación de la construcción

La construcción clonada **pSUP-*gdhA*::Km**, fue transformada en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Como controles se sembraron células de la bacteria a las que no se adicionó DNA externo y por lo tanto son sensibles a los antibióticos utilizados (Ap y Km) además de células que habían sido transformadas con el plásmido pSUP202 y por tanto serían resistentes solo a ampicilina. Las transformantes se seleccionarían por su sensibilidad a ampicilina (casette que lleva el plásmido) y kanamicina (casette con el que se interrumpió el gen). Las células fueron sembradas en medio LB con los antibióticos mencionados y se incubaron a 37 °C. Después de 24 horas de incubación se observó crecimiento sólo en las placas con ampicilina, donde se sembraron células transformadas con el plásmido. Para estar seguros de que la falta de crecimiento no era porque faltó tiempo de

incubación, las placas se dejaron incubar otras 24 horas. Pasado este tiempo, el crecimiento fue revisado nuevamente y se observó como se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Transformación de pSUP-*gdhA*::Km. El crecimiento positivo se muestra con ✓ y el negativo con una ✗.

Crecimiento de Placas de LB		
Antibiótico de selección	DNA agregado	Crecimiento
<b>Ap</b> (100 µg/ml)	0 µl DNA	✗
	2 µl de pSUP202	✓
<b>Ap</b> (100 µg/ml)	0 µl DNA	✗
	2 µl de ligación pSUP202- <i>gdhA</i> ::Km	✗
Y	4 µl de ligación pSUP202- <i>gdhA</i> ::Km	✗
<b>Km</b> (25 µg/ml)	6 µl de ligación pSUP202- <i>gdhA</i> ::Km	✗

Como puede verse en la tabla 5, Las células donde no se adicionó DNA externo no crecieron, como era de esperarse ya que son sensibles a ambos antibióticos. Las células que fueron transformadas con el vector crecieron de manera adecuada, mostrando como era de esperarse resistencia a ampicilina, por lo que podemos afirmar que la transformación fue eficiente. Las células transformadas con la ligación no crecieron en las placas que contenían ambos antibióticos. Con esto pensamos que al no haber sido clonado el amplificado *gdhA* antes de interrumpirlo con el cassette de Km, la concentración posiblemente no fue suficiente para transformar.

## VIII. Discusión

La importancia de la fermentación oxidativa, como vía para utilizar la glucosa en *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Stephan y col., 1991; Attwood y col., 1991), hace significativo determinar el papel fisiológico de la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal en ésta bacteria.

Por ésta razón quisimos generar una mutante PQQ-GDH<sup>-</sup>, que ayudara a conocer el papel de la enzima en la fisiología de la bacteria.

La mutante **M3**, que presenta una actividad muy disminuida de **PQQ-GDH**, parecía una buena opción para esta investigación. Sin embargo, al ser caracterizada en cuanto a crecimiento y actividades asociadas con la fermentación oxidativa por Cerqueda en el 2010, se encontró que no solo estaba afectada la actividad para **PQQ-GDH**, sino que las actividades de PQQ-ADH y PQQ-ALDH aumentaron, mientras las actividades de las oxidasas asociadas disminuyeron. Por tanto, en la mutante **M3** toda la cadena respiratoria está afectada, posiblemente a nivel de ubiquinona o de la oxidasa terminal, lo que postulaba a la mutante como pleiotrópica.

Para explicar estos resultados decidimos localizar el gen codificante de la glucosa deshidrogenasa membranal, tanto en la cepa **WT** como en la mutante **M3** de *Ga. diazotrophicus*, para determinar si existía alguna secuencia que interrumpiera el gen, y que afectara la expresión de la glucosa deshidrogenasa membranal en la cepa mutante.

Basándonos en las secuencias de péptidos internos obtenidos a partir de la **PQQ-GDH** purificada por Sará, localizamos el gen *gdhA* (GeneID:5790698), que codifica para la **PQQ-GDH** en *Ga. diazotrophicus*. Establecimos que la enzima es codificada por un solo gen, que se ubica río arriba del operón codificante para ALDH, como ha sido reportado también para *Ga. europeus* (Turner y col., 1997) (**Figura 11**).

Como resultado de que la mutante fue obtenida por la utilización del minitransposón Tn5, podría esperarse que hubiera alguna secuencia insertada en el gen *gdhA*, que fuera la causante de la drástica disminución en su actividad. El análisis por electroforesis de la amplificación del gen *gdhA* tanto de **WT** como de **M3**, mostró el mismo tamaño en ambas cepas (4,069 pb) (**Figura 14**), indicando que en la cepa mutante, el gen codificante de la glucosa deshidrogenasa membranal no posee la secuencia del transposón que lo interrumpa y por tanto afecte su expresión.

De acuerdo a estos resultados, aun no se tenía una mutante específica para la **PQQ-GDH**. Por tanto, la pregunta que se planteó inicialmente sobre la importancia de la glucosa deshidrogenasa membranal en *Ga. diazotrophicus*, no podía ser contestada con la ayuda de **M3**.

Para tratar de contestar ésta interrogante, decidimos obtener una mutante que tuviera el gen *gdhA* interrumpido con un cassette de resistencia a antibiótico. Dicha mutación garantizaría que el fenotipo obtenido en la mutante se deba exclusivamente a la falta de expresión de la **PQQ-GDH**.

Para conseguir la mutante mencionada tuvimos que hacer uso de plásmidos, tanto para obtener el cassette de resistencia a antibiótico, como para clonar el gen. En general, los sitios únicos de clonación presentes en dichos plásmidos poseen restricciones comunes, que muchas veces no se localizan en *Ga. diazotrophicus*. El alto contenido en G+C de esta bacteria tiene como consecuencia que los sitios de restricción que posee, son en su mayoría inespecíficos o raros, como mencionan [Martins y col. \(2008\)](#) en su estudio para generar un mapa genético de la bacteria. Esta característica del genoma, dificulta el diseño adecuado de protocolos para clonación, ya que muchos de los sitios de restricción localizados en los polilinkers de los plásmidos, no se encuentran en la secuencia de *Ga. diazotrophicus*. Además, los cassettes de estos vectores normalmente otorgan resistencias a antibióticos a los cuales la bacteria ya es resistente de manera natural, por lo que la selección de mutantes obtenidas por interrupción del gen con cassette de antibiótico, se vuelve complicada.

Al comienzo de éste trabajo se contaba con los plásmidos pSUP202 y pBSL98 que se encontraban en *E. coli*. El primero de éstos confiere resistencias a Tc, Cm y Ap, mientras el segundo posee un cassette de resistencia a Km.

El análisis de restricción de los plásmidos y del gen *gdhA*, nos mostró que solamente podíamos usar el cassette de Km y que debíamos interrumpir el gen antes de clonarlo. Esto es, el gen *gdhA* sólo se corta por dos enzimas, que a su vez se encuentren presentes en el polilinker y nos permitan obtener el cassette de Km del plásmido pBSL98. Estas dos enzimas fueron *BstXI* y *EcoRV*; como la primera es sumamente inespecífica, la única opción convincente para sacar el cassette fue interrumpir el gen con *EcoRV*. Sin embargo, existía un problema con la utilización de esta enzima de restricción, *EcoRV* corta también en la secuencia del pSUP202, por lo que el gen no podía ser clonado en este plásmido antes de ser interrumpido.

A partir del fragmento amplificado por PCR que contenía al gen *gdhA*, obtuvimos el gen ***gdhA::Km***, donde el gen se interrumpe con el cassette de resistencia a Km.

Dado que las restricciones presentes tanto en los plásmidos como en el gen *gdhA*, no permitieron que el fragmento conteniendo al gen fuera clonado antes de ser interrumpido, la concentración del gen con el inserto fue muy baja y por tanto a partir de su clonación en el vector pSUP202 se obtiene baja concentración del plásmido **pSUP-*gdhA::Km***.

La baja concentración del plásmido **pSUP-*gdhA::Km*** da como resultado una muy poco eficiente transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$  de la construcción, ocasionando que no pudiera ser seleccionada alguna mutante.

## IX. Conclusiones

- La secuencia de los péptidos internos de la **PQQ-GDH** purificada nos permitió identificar en el genoma completo de *Ga. diazotrophicus* el gen codificante de la **PQQ-GDH**. Dicho gen (*gdhA*) se localiza entre el nucleótido 3,367325 y el 3,369742 (GeneID:5790698), y tiene una longitud de 2,418 pb.
- El par de oligonucleótidos *gdhR2* y *gdhF4* diseñados para la amplificación del gen *gdhA*, amplifican 4,069 pb dentro de los cuales se localizan las 2,418 pb del gen *gdhA*.
- Las amplificaciones del gen *gdhA* tanto para **WT** como para **M3**, con los oligonucleótidos mencionados, mostraron el mismo tamaño (4,069 pb) en ambas cepas. Dichas amplificaciones confirman que el gen *gdhA* no se encuentra interrumpido en la mutante **M3**.
- El hecho de que el gen *gdhA* no esté interrumpido en **M3** aunado a los resultados bioquímicos obtenidos por [Cerqueda \(2010\)](#) apoya la propuesta de que **M3** es una mutante pleiotrópica.
- *Gluconacetobacter diazotrophicus* posee resistencia natural a la mayoría de los antibióticos que fueron probados: a espectinomicina (100 µg/ml), neomicina (60 µg/ml), estreptomycin (200 µg/ml), tetraciclina (25 y 50 µg/ml), cloranfenicol (25 y 50 µg/ml) y ampicilina (200 µg/ml). *Ga. diazotrophicus* es sensible a gentamicina a una concentración de 30 µg/ml y a kanamicina a una concentración de 250 µg/ml. A falta de un cassette adecuado se utilizó Kanamicina a 250 µg/ml.
- El amplificado *gdhA* en la cepa **WT** fue interrumpido con un cassette de resistencia a Km, obtenido del plásmido pBSL98 con la ayuda de *EcoRV*. El gen interrumpido (***gdhA::Km***) contiene 5,269 pb. 4,069 pb corresponden al amplificado y 1,200 pb al cassette de Km.



- El gen ***gdhA::Km*** se utilizó para interrumpir la resistencia a Tc del vector pSUP202 (**pSUP-*gdhA::Km***) . La cual es resistente a Ap y Cm, propias del vector pSUP202 y a Km por la interrupción del gen.
- No se logró transformar la construcción **pSUP-*gdhA::Km***.

## X. Perspectivas

Explorando nuevas opciones para obtener la mutante *gdhA*<sup>-</sup> se plantea como alternativa el uso del vector **Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup>** de **invitrogen<sup>®</sup>** (Figura 21).



**Figura 21.** Mapa del vector TOPO del kit **Zero Blunt<sup>®</sup> TOPO<sup>®</sup>** (**invitrogen<sup>®</sup>**). Imagen tomada del manual provisto por el fabricante.

Este vector provee una alta eficiencia en la clonación de fragmentos de PCR con terminaciones romas. Tomando en cuenta el protocolo descrito por el fabricante, podría plantearse un nuevo protocolo para la clonación del gen *gdhA* y su interrupción con un cassette de antibiótico (**Figura 22**).



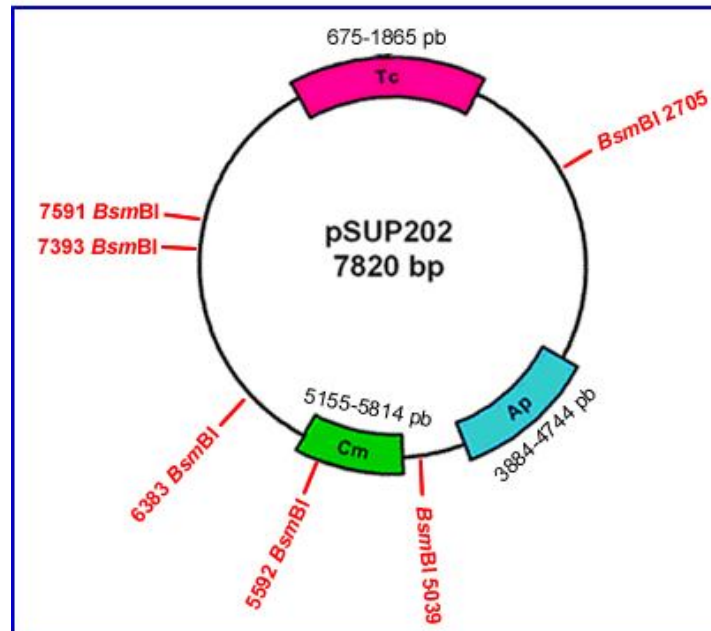
**Figura 22.** Metodología general para la clonación del amplificado de *gdhA* y su interrupción con cassette de antibiótico.

Inicialmente deberá ser amplificado por PCR el gen *gdhA* con la ayuda de los oligonucleótidos *gdhR2* y *gdhF4*, utilizando el protocolo descrito en el apartado 6.8 de los métodos de este trabajo. Una vez hecho esto se clonará el amplificado en el vector TOPO (**invitrogen®**) para obtener la construcción **TOPO-*gdhA*** y se seleccionarán las colonias transformantes. La nueva construcción deberá ser interrumpida con una resistencia distinta a kanamicina o zeocina, presentes en el vector (**Figura 21**).

Haciendo distintos análisis de restricción tanto en el plásmido pBR322 como en el pSUP202, observamos que a partir del plásmido pSUP202 es posible obtener tanto un cassette de resistencia a Tc como uno de resistencia a Ap con la ayuda de la enzima *BsmBI*; esta enzima cumple con las características necesarias para la obtención de un cassette de antibiótico y la posterior interrupción del gen *gdhA* con dicho cassette,

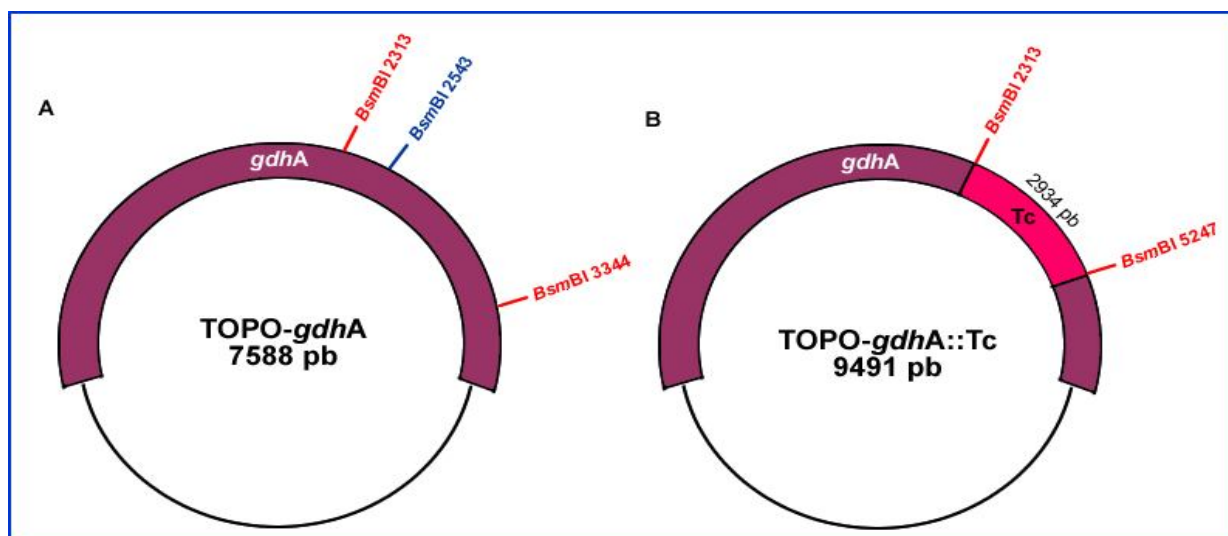
cortando la secuencia del gen para su interrupción y además sin cortar en la secuencia del vector TOPO, punto esencial para mantener la construcción.

Al tratar el plásmido con ésta endonucleasa se obtienen seis fragmentos correspondientes a los siguientes tamaños: 198, 553, 791, 1,010, 2,334 y 2,934 pb. Dentro del fragmento de 2,334 pb se encuentra el cassette de Ap y dentro del fragmento correspondiente a 2,934 pb está localizado el cassette de Tc (**Figura 23**).



**Figura 23.** Esquema de la restricción del plásmido pSUP202 con la enzima *BsmBI*. En la figura puede observarse que se obtendrán seis fragmentos del plásmido. Dos de estos fragmentos poseerán resistencias a antibiótico, uno a Tc y otro a Ap.

La construcción **TOPO-*gdhA*** se cortará en tres fragmentos al digerirla con *BsmBI*. Los tamaños a obtener son: 230, 801 y 6,557 pb. Se espera que el cassette de Tc se ligue al fragmento de 6,557 pb, para obtener una construcción final **TOPO-*gdhA*::Tc** de 9,491 pb (**Figura 24**). En dicha construcción el gen *gdhA* estará interrumpido por el cassette de Tc.



**Figura 24.** Esquema de las restricciones de *BsmBI* en las construcciones TOPO-*gdhA* y TOPO-*gdhA::Tc*. A) Se observa que en la construcción TOPO-*gdhA*, *BsmBI* corta tres veces, dejando tres fragmentos de 230, 801 y 6557 pb. B) Se muestra un esquema del cassette de Tc ligado al fragmento de 6557 pb, en el que TOPO se encuentra completo y el fragmento *gdhA* interrumpido por la resistencia a antibiótico.

Tomando en cuenta las resistencias naturales de *Ga. diazotrophicus*, decidimos utilizar la resistencia a Tc y no la de Ap, pues la bacteria crece aun cuando este segundo antibiótico es adicionado a altas concentraciones (200 µg/mL).

El clonar una construcción del gen codificante de la **PQQ-GDH** interrumpido con el cassette de antibiótico, será un paso inicial para la futura transformación a *Ga. diazotrophicus* para la obtención de una mutante carente de la actividad de esta enzima por recombinación homóloga.

La obtención de esta mutante nos permitirá conocer las consecuencias fisiológicas de la falta de la enzima en las capacidades metabólicas de la bacteria.

Es importante mencionar que estudios recientes realizados en el laboratorio nos han permitido saber que *Ga. diazotrophicus* crece bien en gluconato y sobre todo en glicerol. El hecho de que el crecimiento de la bacteria en un medio que contiene como única fuente de carbono glicerol y baja concentración de amonio (1mM; condición de fijación de N<sub>2</sub>), alcance DO mayores que el crecimiento en sacarosa, nos podría indicar

que el glicerol está siendo usado como fuente de carbono y no obstante la fijación de  $N_2$  no se ve limitada por falta de energía, es decir, no está condicionada por el uso de la sacarosa (glucosa). En cuanto a la respiración, los resultados aun no son del todo claros. A pesar de que el glicerol es bastante mejor fuente de carbono, su utilización como sustrato respiratorio es de solo el 40% de la capacidad que tiene la célula para utilizar glucosa.

No es claro si existe una glicerol deshidrogenasa (Gly-DH) encargada de la oxidación del glicerol en *Ga. diazotrophicus*. Los estudios realizados en la familia de las bacterias ácido acéticas, indican la existencia de una poliol deshidrogenasa inespecifica que oxida de manera preferencial al gluconato, pero que también puede oxidar al glicerol con una baja eficiencia (Deppenmeier y Ehrebreich, 2009). Por otro lado, Rolando Gazca Licea (Tesis de doctorado en proceso) obtuvo en el laboratorio resultados que parecen indicar que el glicerol está siendo oxidado por la misma glucosa deshidrogenasa, pues las actividades para ambos sustratos aparecen siempre asociadas a lo largo de la purificación. Martín Sará demostró en su tesis doctoral en el laboratorio, que la **PQQ-GDH** es bastante inespecífica, aunque no probó el glicerol como sustrato. Por tanto, además de tratar de explicar la importancia de la **PQQ-GDH** como parte del conjunto de deshidrogenasas periplásmicas en la fijación de nitrógeno, el crecimiento y la obtención de energía en *Ga. diazotrophicus*, una mutante en esta enzima nos permitirá definir si la glucosa participa en la oxidación del glicerol.

Utilizando una mutante seleccionada en el laboratorio que carece de actividad para PQQ-ADH, hemos descartado que la oxidación del glicerol sea llevada a cabo por la PQQ-ADH. Por tanto, sería muy valioso contar con una mutante específica en PQQ-GDH, para poder establecer si la oxidación de glicerol está asociada a la glucosa deshidrogenasa o se trata de una enzima independiente cuya purificación se facilitaría usando una mutante GDH<sup>-</sup>.

## XI. Abreviaturas

**ADH-** Alcohol Deshidrogenasa

**ALDH-** Aldehído Deshidrogenasa

**BAC-** Bacteria del Ácido Acético

**BLAST-** Basic Local Alignment Search Tool

**CTAB-** Bromuro de cetiltrimetilamonio

**DMSO-** Dimetil sulfóxido

**EDTA-** Ácido etilendiaminotetraacético

**FAD-** Flavín adenín dinucleótido

**GDH-** Glucosa Deshidrogenasa

***gdhA::Km***- Amplificado *gdhA* donde se interrumpió el gen con un cassette de resistencia a Km

**GLDH-** Glicerol Deshidrogenasa

**KCN-** Cianuro de potasio

**LB-** Medio de cultivo rico

**LGI-** Medio de cultivo

**LTQ-** Quinona de tirosil-lisina

***M3***- Cepa mutante de *Gluconacetobacter diazotrophicus* carente de actividad para PQQ-GDH.

**mGDH-** PQQ-GDH membranal

**NAD-** Nicotidamina adenina dinucleótido (forma oxidada)

**NADH-** Nicotidamina adenina dinucleótido (forma reducida)

**NAD-GDH-** Glucosa Deshidrogenasa dependiente de NAD

**NCBI-** National Center for Biotechnology Information

**PAL5-** Cepa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

**PFK1-** Fosfofructocinasa 1

**PQQ-** Pirroloquinolina quinona.

**PQQ-GDH-** Glucosa Deshidrogenasa dependiente de PQQ

**pSUP-*gdhA::Km***- Construcción en la que se clona *gdhA::Km* en el vector pSUP202

**SDS-** Dodecil sulfato sódico

**sGDH-** PQQ-GDH soluble

**TBE-** Amortiguador con tris, ácido bórico y EDTA

**TE-** Amortiguador con tris y EDTA

**Tm-** Temperatura de fusión

**TOPO-*gdhA***- Construcción en la que se clonó el amplificado *gdhA* en el vector TOPO

**TOPO-*gdhA::Tc***- Construcción en la cual se interrumpió a TOPO-*gdhA* con un cassette de resistencia a Tc

**TPQ-** Topa-quinona

**TTQ-** Quinona de triptofil-triptofano

**UQ-** Ubiquinona

**WT-** Cepa silvestre de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5

## XII. Referencias

1. **Alexeyev M., I. Shokolenko y T. Croughan.** 1995. Improved antibiotic/resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* **160**: 63-67.
2. **Álvarez B. y G. Martínez-Drets.** 1995. Metabolic Characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Can. J. Microbiol.* **41**(10): 918-924.
3. **Antúnez E.** 2007. Función y Biogénesis de la Pirroloquinolina-quinona Alcohol-deshidrogenasa (PQQ-ADH) de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Caracterización de una mutante PQQ-ADH. Facultad de Ciencias, UNAM, Tesis de Licenciatura.
4. **Archambault J.** 1998. Building an Improved Suicide Vector for Creating Mutations in Specific Genes. University of Wisconsin, La Crosse. *Journal of Undergraduate Research.* **1**: 1-8.
5. **Attwood M.M., Van Dijken J.P. y Pronk J.T.** 1991. Glucose Metabolism in Gluconic Acid Production by *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering.* **72**(2):101-105.
6. **Bertalan M., R. Albano, V. de Pádua, L. Rouws, C.Rojas, A. Hemerly, K. Teixeira, S. Schwab, J. Araujo, A. Oliveira, L. França, V. Magalhães, S. Alquéres, A. Cardoso, W. Almeida, M. Martins Loureiro, E. Nogueira, D. Cidade, D. Oliveira, T. Simão, J. Macedo, A. Valadão, M. Dreschsel, F. Freitas, M. Vidal, H. Guedes, E. Rodrigues, C. Meneses, P. Brioso, L. Pozzer, D. Figueiredo, H. Montano, J. Junior, G. de Souza Filho, V.M. Quintana, B. Ferreira, A. Branco, P. Gonzalez, H. Guillobel, M. Lemos, L. Seibel, J. Macedo, M. Alves-Ferreira, G. Sachetto-Martins, A. Coelho, E.**



- Santos, G. Amaral, A. Neves, A.B. Pacheco, D. Carvalho, L. Lery, P. Bisch, S. C Rössle, T. Ürményi, A.R. Pereira, R. Silva, E. Rondinelli, W. von Krüger, O. Martins, J.I. Baldani y P.CG Ferreira.** 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*. **10**:450
7. **Cavalcante V. y J. Döbereiner.** 1988. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant Soil* **108**:23-31.
8. **Cerqueda D.** 2010. Estudio "in silico" de la PQQ-glucosa deshidrogenasa membranal de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Facultad de Ciencias, UNAM, Tesis de Licenciatura.
9. **Chachaty E. y P. Saulnier.** Isolating Chromosomal DNA from Bacteria. En: RAPPLEY, R. The Nucleic Acid Protocols Handbook. *Humana Press*. 2000. pp. 29-32.
10. **Chávez J., S. Martínez, M. Contreras y E. Escamilla.** 2004. Celulosa Bacteriana en *Gluconacetobacter xylinum* Biosíntesis y aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **7**(1): 18-25.
11. **Cleenwerck I., N. Camu, K. Engelbeen, T. De Winter, K. Vandemeulebroecke, P. De Vos y L. De Vuyst.** 2007. *Acetobacter ghanensis* sp. Nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1647-1652.
12. **De Ley J.** 1961. Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **24**: 31-50.

13. **Deppenmeier U. y A. Ehrebreich.** 2009. Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. **16**: 69-80
14. **Dong Z., D. Zelmer, M. Canny, M. McCully, B. Luit, B. Pan, R. Faustino, G. Pierce y J. Vessey.** 2002. Evidence for Protection of Nitrogenase from O<sub>2</sub> by Colony Structure in the Aerobic Diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Microbiology*. **148**: 2293-2298.
15. **Drozd J. y R. Postgate.** 1970. Effects of Oxygen on Acetylene Reduction, Cytochrome Content and Respiratory Activity of *Azotobacter chroococcum*. *Journal of General Microbiology*. **63**: 63-73
16. **Duine J., J. Frank and E. Verwiel.** 1980. Structure and Activity of the Prosthetic Group of Methanol Dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **108**: 187-192.
17. **Escamilla E., M. Contreras, M. Flores-Encarnación y L.M. Flores.** 1999. Los Sistemas Respiratorios Bacterianos. *Mensaje Bioquímico*. **23** (1999): 67-97
18. **Escamilla J.E., R. Ramírez, I.P. Del Arenal, G. Zarzoza y V. Linares.** 1987. Expression of Cytochrome Oxidases in *Bacillus cereus*: Effects of Oxygen Tension and Carbon Source. *Journal of General Microbiology*. **133**: 3549-3555.
19. **Flores M., M. Contreras, I. Soto, G. Aguilar, B. Baca y E. Escamilla.** 1999. The Respiratory System and Diazotrophic Activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *Journal of Bacteriology*. **181**(22): 6987-6995.
20. **Flores M., M. Sánchez y F. Ortiz.** 2004. Las PQQ-deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de quinoproteínas bacterianas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **46** (1-2): 47-59.

21. **Frackman S. G. Kobs, D. Simpson y D. Storts.** 1998. Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes.* **65:** 27-30.
22. **Fuentes L., A. Tapia, T. Jiménez, M. Mscarúa, Y. Santoyo, L. Caso, H. Romero, M. del Rayo Cajica y D. León.** 2003. Bacterias acéticas: diversidad e interacción con las plantas. *Elementos.* **49:** 47-51.
23. **Fuentes L., R. Bustillos, A. Tapia, T. Jiménez, E. Tao, E. Martínez y J. Caballero.** 2001. Novel Nitrogen-fixing Acetic Acid Bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. Nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. Nov., Associated with Coffee Plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **51:** 1305-1314.
24. **Gazca R.** IFC, UNAM. Tesis doctoral en preparación.
25. **Gillis M., K. Kersters, B. Hoste, D. Janssens, R. Kroppenstedt, M. Stephan, K. Teixeira, J. Dobereiner y J. De Ley.** 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology* **39(3):** 361-364.
26. **Goodwin P., y C. Anthony.** 1988. The Biochemistry, Physiology and Genetics of PQQ and PQQ-containing Enzymes. *Advances in Microbial Physiology.* **40:** 1-80.
27. **González B., S. Martínez, J.L. Chávez, S. Lee, N.A. Casro, M.A. Domínguez, S. Gómez, M.L. Contreras, C. Kennedy y J.E. Escamilla.** 2006. Respiratory system of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Evidence for cyanide-sensitive cytochrome *bb* and cyanide-resistant cytochrome *ba* quinol oxidases. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1757** (2006): 1614-1622.

28. **Greenber D., S. Porcella, F. Stock, A. Wong, P. Conville, P. Murray, S. Holland y A. Zelanzny.** 2006. *Granulibacter bethesdensis* gen, nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family Acetobacteraceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2609-2616.
29. **Gupta A., V. Singh, G. Qazi y A. Kumar.** 2001. *Gluconobacter oxydans*: Its Biotechnological Applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**(3): 445-456.
30. **James E., F. Olivares, A. de Oliveira, F. dos Reis, L. da Silva y V. Reis.** 2001. Further observations on the Interaction Between Sugarcane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* Under Laboratory and Greenhouse Conditions. *Journal of Experimental Botany.* **52**(357): 747-760.
31. **Katsura K., H. Kawasaki, W. Potacharoen, S. Saono, T. Seki, Y. Yamada, T. Uchimura y K. Komagata.** 2001. *Asaia siamensis* sp. Nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **51**: 559-563.
32. **Kerstens K., P. Lisdiyanti, K. Komagata y J. Swings.** 2006. The Family Acetobacteraceae. The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. *Prokaryotes* **5**:163-200.
33. **Lee S., A. Reth, D. Meletzus, M. Sevilla y C. Kennedy.** 2000. Characterization of a Major Cluster of *nif*, *fix*, and Associated Genes in a Sucarcane Endophyte, *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Bacteriology.* **1982** (24): 7088-7091.
34. **Luna M.F., C.E. Bernardelli, M.L. Galar y J.L. Boiardi.** 2006. Glucose Metabolism in Batch and Continuous Cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL3. *Current Microbiology.* **52**: 163-168.

35. **Luna M., y J.L. Boiardi.** 2007. Growth Yields and Glucose Metabolism of N<sub>2</sub>-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus* at different culture pH values. *World J. Microbiol Biotechnol.* **24** (4): 587-590
36. **Martins M., M. Bertalan, A. da Silva, L. Mega, V. Muniz, J. Ivo, O. Martins, y P. Cavalcanti.** 2008. Physical and Genetic Map of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 Chromosome. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* **50** (1 y 2): 19-28.
37. **Matsushita K., H. Toyama y O. Adachi.**1994. Respiratory Chains and Bionergetics of Acetic Acid Bacteria. *Advances in Microbial Physiology.* **36**: 248-301
38. **Matsushita K., E. Shinagawa, O. Adachi and M. Ameyama.** 1989. Quinoprotein D-Glucose Dehydrogenase of the *Acinetobacter calcoaceticus* Respiratory Chain: Membrane-Bound and Soluble Forms Are Different Molecular Species. *Biochemistry.* **28**: 6276-6280.
39. **Menéndez C.** 2004. Identificación, caracterización molecular y expresión recombinante del gen de la exolevanasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Tesis doctoral. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Departamento de plantas.
40. **Perlova O., A. Ureta, S. Nordlund y D. Meletzus.** 2003. Identification of Three Genes Encoding P<sub>II</sub>-Like Proteins in *Gluconacetobacter diazotrophicus*: Studies of Their Role(s) in the Control of Nitrogen Fixation. *Journal of Bacteriology.* **185** (19): 5854-5861.
41. **Pinzón A.** 2007. Guía del Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia y del Laboratorio de Micología y Fitopatología.

42. **Puehringer S., M. Metlitzky y R. Schwarzenbacher.** 2008. The pyrroloquinoline quinone biosynthesis pathway revisited: A structural approach. *BMC Biochem.* 2008; **9**: 8.
43. **Sará M.** IFC, UNAM. Tesis doctoral en preparación.
44. **Sievers M. y Swings J.** Family II. *Acetobacteraceae*; En: GARRITY G., BRENNER DJ., KRIEG N.R., STALEY J.T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer New York. 2005. vol **2**. pp, 41-95.
45. **Stephan M., M. Oliveira, K. Teixeira, G. Martinez y J. Döbereiner.** 1991. Physiology and Dinitrogen Fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters.* **77** (1): 67-72.
46. **Thurner C., C. Vela, L. Thöny-Meyer, L. Meile y M. Teuber.** 1997. Biochemical and genetic characterization of the acetaldehyde dehydrogenase complex from *Acetobacter europaeus*. *Arch. Microbiol.* **168**: 81-91
47. **Yamada Y. y P. Yukphan.** 2008. Genera and Species in Acetic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* **125** (2008): 15-24.
48. **Yamada Y., K. Katsura , K. Kawasaki , Y. Widyastuti , S. Saono , T. Seki , T. Uchimura y K. Komagata.** 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **50**: 823-829.
49. **Yamada Y., K. Hocino y T. Ishikawa.** 1997. The Phylogeny of Acetic Acid Bacteria Based on the Partial Sequences of 16S Ribosomal RNA: The Elevation of the Subgenus *Gluconacetobacter* to the Generic Level. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** (8): 1244-1251.
50. **Zuleta M.** IFC, UNAM. Tesis doctoral en preparación.

## **Páginas electrónicas consultadas**

51. [http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers\\_anagrande.htm](http://www.bioxeo.com/bioinfo/primers_anagrande.htm)