

EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DEL PLÁSMIDO pTN312 DEL *Bacillus pumilus* TN312 AISLADO DE NEJAYOTE.

Luis Rivera-Amador, Rosa María Oliart-Ros y Mario Ramírez-Lepe
Instituto Tecnológico de Veracruz. A.P. 1420 Veracruz, Ver. E mail: lepe@itver.edu.mx

Palabras clave: *Extremófilo*, *Termófilo*, *Plásmido*

Introducción.

Existen microorganismos que están bien adaptados a medios ambientes que son considerados como inhabitables por el hombre a los que se les conoce como extremófilos. De estos, los más estudiados son los termófilos, que tienen temperaturas óptimas de crecimiento mayores de 50°C⁽¹⁾. La investigación de estos microorganismos termófilos se ha ampliado a diferentes áreas, tales como la bioquímica, enzimología, ingeniería genética y biología molecular, con el fin de aprovechar las ventajas que ofrecen, principalmente para la producción de enzimas termoestables. Existen bacterias que además del DNA cromosomal contienen plásmidos, que son moléculas extracromosomales con genes que codifican propiedades adicionales que no son vitales para la bacteria, pero sí le confieren características fenotípicas para sobrevivir en ambientes adversos. Plásmidos obtenidos y caracterizados de termófilos han reunido los requisitos para ser utilizados como vectores de clonación, así mismo se han obtenido genes de gran interés que codifican para enzimas termoestables. En el Instituto Tecnológico de Veracruz se aisló la bacteria termófila *Bacillus pumilus* TN312 de las aguas residuales de la nixtamalización⁽²⁾, que contiene al plásmido pTN312 que dio origen al presente trabajo.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue el de caracterizar parcialmente al plásmido pTN312, mediante un análisis de restricción y comprobando si es el responsable de dar termofilia a la bacteria.

Metodología

La bacteria *B. pumilus* TN312 se cultivó en medio Luria Bertani (LB) pH 9.0 a una temperatura de 54 °C y con agitación constante de 250 rpm durante 12-15 horas.

El plásmido pTN312 se aisló realizando miniprep por el método de lisis alcalina⁽³⁾ y observándolo en un gel de agarosa al 0.5 % en luz ultra violeta. Se hicieron digestiones del plásmido utilizando las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*R1 en las condiciones recomendadas por el proveedor. Mediante Cloruro de Calcio se obtuvieron células competentes de *E. coli* XL-Blue y se transformaron con el plásmido pTN312. Se utilizaron Naranja de Acridina y Bromuro de Hidio como agentes de curación de la cepa *B. pumilus* TN312.

Resultados y Discusión

El plásmido pTN312 que se aisló y purificó es de aproximadamente 20 kilobases. Al hacer su análisis de restricción presentó 6 sitios de restricción con *Hind*III (Fig.

1) y 2 sitios de restricción con *Eco*R1, ya que se presentan 6 y 2 bandas de DNA respectivamente al hidrolizar el plásmido con estas enzimas.

Se logró transformar con el plásmido pTN312 a la cepa de *E. coli* XL-Blue, verificándolo a través de miniprep a las células transformadas. Hasta el momento no se han podido encontrar células curadas de la bacteria *B. pumilus* TN312 con la utilización de Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio como agentes de curación. La figura 1 presenta el plásmido pTN312 y al mismo plásmido cortado con *Hind*III, utilizando DNA de fago λ como marcador.

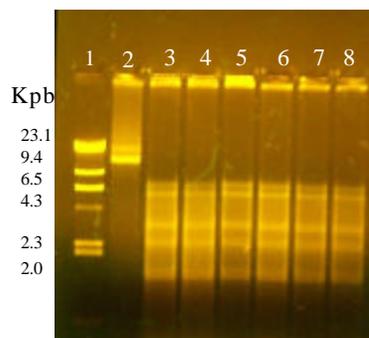


Fig. 1 Gel de agarosa que presenta en la calle 1 DNA λ *Hind*III, calle 2 pTN312 y en las calles del 3 al 8 pTN312 *Hind*III.

Conclusiones

El plásmido pTN312 es un plásmido que está constituido aproximadamente por 20,000 pares de bases que presenta sitios de restricción con *Hind*III y *Eco*R1. A pesar de ser un plásmido considerado como grande, fue posible ser utilizado para transformar la cepa de *E. coli*. La cepa de *E. coli* XL-Blue transformada fue capaz de crecer a 50 °C lo cual podría indicar la participación del plásmido

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo de CONACYT por otorgar la beca a Luis Rivera Amador y al Cosnet por el financiamiento para el proyecto.

Bibliografía

- 1.- Sharp R.J. and Munster M.J., 1986. Biotechnological implications for microorganisms from Extreme Environments. En: *Microbes in Extreme Environments*. Special Publications of the Society for General Microbiology. pp 215-236.
- 2.- Bueno J., 1998. Detección de Plásmidos en Bacterias Termófilas Aerobias Aisladas de Nejayote. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz.
- 3.- Alonso J.C. and Espinosa M., 1993. Plasmids from Gram-positive bacteria. En: *Plasmids A Practical Approach*. Hardy K.G. Oxford University Press. United States. pp. 39-63.