

CLONACIÓN DE GENES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA A CROMO HEXAVALENTE Y EVENTUAL MEJORA DE CEPAS FÚNGICAS NATIVAS DE SITIOS CONTAMINADOS (OBTENCIÓN DE ESFEROPLASTOS DE LA CEPA AMBIENTAL ED8 DE *ASPERGILLUS NIGER* VAR. *TUBINGENSIS*)

Luis F. Acosta Diosdado¹, Pamela Romo Rodríguez² y J. Félix Gutiérrez Corona²

¹Licenciatura en Biotecnología, Universidad Autónoma de Querétaro

²Departamento de Biología, DCNyE, Universidad de Guanajuato, Campus Guanajuato. Noria Alta s/n, Guanajuato, Gto.

RESUMEN

La cepa Ed8 de *A. niger* var. *tubingensis* es nativa de suelos contaminados con cromo hexavalente, posee resistencia al metal y la capacidad de transformarlo en Cr(III). En el laboratorio se han clonado los genes *m1pd* y *gox* de la cepa Ed8, codificantes de la Manitol 1 fosfato deshidrogenasa (M1PD) y Glucosa oxidasa (GOX), respectivamente. También, se han obtenido construcciones moleculares para interferir con la función de dichos genes en la cepa Ed8, mediante la estrategia de silenciamiento génico por RNA de interferencia, con el fin de conocer el papel de los correspondientes productos en la resistencia a cromo hexavalente y/o la capacidad de reducirlo a Cr(VI) de la cepa. Con el objetivo de contar con un protocolo para introducir de manera eficiente las mencionadas construcciones en el genoma de la cepa Ed8, en este proyecto de verano se avanzó en el establecimiento de un protocolo de transformación de esferoplastos. Se determinaron las condiciones para la obtención de esferoplastos mediante tratamiento con una enzima lítica y se estableció la concentración mínima inhibitoria de higromicina, tanto para los esferoplastos (300 μ M) como para conidias (70 μ M). También, se realizó un experimento de transformación de esferoplastos de la cepa Ed8 con DNA del vector p-Silent-1, seleccionando en medio con higromicina. Se obtuvieron 30 presuntos transformantes, de los que 5 mostraron resistencia a 70 μ M de higromicina a partir de conidias. Como trabajo futuro de este proyecto, deberá establecerse la presencia de moléculas del vector p-Silent-1 en el DNA de los presuntos transformantes, mediante PCR.

INTRODUCCIÓN

El cromo es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica, que posee múltiples estados de oxidación de los cuales las formas más estables encontradas en la naturaleza son el cromo trivalente Cr(III) y el cromo hexavalente Cr(VI). Este último, que se encuentra comúnmente en forma de cromatos (CrO_4^{2-}) y dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), se puede encontrar como parte de los desechos de muchas industrias como las de minería, las curtidoras y las de fabricación de productos textiles, lo que ha contribuido a la contaminación ambiental por el metal. El Cr(VI) es un fuerte agente oxidante que es considerado la forma más tóxica del metal, debido a que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado al interior de las

células por medio del transportador de sulfato (Borst- Pauwels, 1981). Se conoce que el Cr(VI) es altamente tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y carcinogénico en humanos y mutagénico en bacterias (Losi y col., 1994). Se ha propuesto que la toxicidad del Cr(VI) se debe a que dentro de las células se generan intermediarios reducidos de cromo que en presencia de H_2O_2 funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, generando Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), con el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ácidos nucleicos (Ercal y col., 2001; Liu y Shi, 2001).

La influencia negativa de la acumulación del cromo sobre las poblaciones de microorganismos del suelo ha sido ampliamente descrita, así como la consecuente aparición de poblaciones de organismos adaptados (tolerantes) al ambiente hostil (Cervantes y col., 2001). Para esta tolerancia, los microorganismos han desarrollado mecanismos activos o pasivos que les permiten remover o destoxificar el metal. En ciertas especies se conocen con detalle dichos mecanismos, algunos de los cuales son de interés básico y de importancia biotecnológica, esto último en el contexto del desarrollo de nuevas tecnologías para el tratamiento de efluentes industriales y para la biorremediación de sitios contaminados.

Los hongos son organismos ubicuos en la naturaleza, que predominan en el suelo, poseen propiedades fundamentales como biotransformadores y juegan un papel importante en los ciclos geoquímicos de los metales (Gadd, 1993; Burford y col., 2003). Se ha descrito el aislamiento de cepas fúngicas resistentes a Cr(VI), tanto de sitios contaminados con el metal como en el laboratorio por tratamiento de cepas de colección con agentes mutagénicos (Cervantes y col., 2001).

Por estudios previos del grupo de trabajo, se aislaron cepas de hongos filamentosos nativas de sitios contaminados con cromo hexavalente, algunas de las cuales eran resistentes al ión y mostraban la capacidad de transformarlo en Cr(III) (Espino Saldaña, 2002; Acevedo Aguilar y col., 2006). Entre dichas cepas esta Ed8, cuya identificación mediante estudios moleculares y morfofisiológicos indicó que es un aislado de *Aspergillus niger* var *tubingensis* (Fernández Perrino y col. 2007; Coreño Alonso y col., 2009). Dado que en la cepa Ed8 la reducción del Cr(VI) parece ocurrir en el medio extracelular (Acevedo Aguilar y col., 2006) se ha hipotetizado que parte de la fuente de electrones para ello podría implicar la participación de reservas intracelulares de poder reductor y de proteínas translocadoras de electrones (posiblemente del tipo de las NADPH oxidasas membranales), de una oxido-reductasa extracelular que transfiere los electrones al Cr(VI) y/o por la producción de metabolitos reductores. Se ha observado que en la cepa Ed8 incubada con Cr(VI) ocurre incremento en la producción de metabolitos como el manitol y el ácido glucónico (Acevedo Aguilar, 2008; Coreño Alonso, 2009). Se ha demostrado que el manitol en otros hongos funciona como regenerador de poder reductor por la producción de NADPH (Hult y col., 1980) y como protector contra el estrés oxidativo (Ruijter y col., 2003), por lo que en la cepa Ed8 su producción pudiera ser importante para contrarrestar el estrés oxidativo causado por el Cr(VI) y/o que constituya parte de las fuentes de electrones necesarios para la reducción del Cr(VI). En el caso del ácido glucónico, este es

producido a partir de la oxidación de la glucosa, por acción de la actividad enzimática de glucosa oxidasa (GOX), enzima que en algunas especies de los géneros *Aspergillus* (Clarke y col., 2006) y *Penicillium* (Mikhailova y col., 2000) ha sido descrita como secretable al medio extracelular. Interesantemente, se ha observado que la GOX purificada de origen comercial de *A. niger* es capaz de causar la reducción de Cr(VI) *In vitro* (Acevedo Aguilar, 2008; Coreño Alonso, 2009; Romo Rodríguez, 2010).

La evidencia sobre relación de los cambios bioquímicos mencionados con las características fenotípicas de resistencia a Cr(VI) y/o la capacidad de su transformación a Cr(III) por la cepa Ed8, puede provenir de estudios de manipulación de la producción de los metabolitos mencionados por procedimientos de genética molecular. Con este fin, en el laboratorio se ha avanzado en la clonación de los genes *m1pd* [codificante de la Manitol 1-Fosfato Deshidrogenasa (M1PD), implicada en la síntesis de manitol] (Castillo Nava, 2009) y *gox* [codificante de la Glucosa Oxidasa (GOX) implicada en la síntesis de ácido glucónico] de la cepa Ed8 (Rodríguez Preciado, 2010) y se han obtenido construcciones moleculares para interferir con la función de dichos genes en la cepa Ed8, mediante la estrategia de silenciamiento génico por RNA de interferencia (Romo Rodríguez, 2010).

JUSTIFICACIÓN

La introducción de construcciones moleculares en la cepa Ed8 de *A. tubingensis* requiere de la implementación de un procedimiento de transformación genética, por lo que en este proyecto se realizaron experimentos sobre la formación de esferoplastos de la cepa Ed8 y su transformación con el vector de silenciamiento pSilent-1 (Nakayashiki y col., 2005).

METODOLOGIA

MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó la cepa resistente a cromato de *Aspergillus niger* var. *tubingensis* Ed8, aislada previamente (Espino Saldaña, 2002; Acevedo Aguilar y col., 2006). El medio de crecimiento para la obtención de conidias es el medio mínimo Lee (Lee y col., 1975) al que se le añade dextrosa al 0.25%. Para la obtención de germinulas a ser usadas para la obtención de esferoplastos se usó el medio de cultivo YED (extracto de levadura, 1 %; Dextrosa, 1 %; Hepes, 20 mM y ajustando el pH a 8 con NaOH 1M)

OBTENCION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DE HIGROMICINA PARA ESFEROPLASTOS

La obtención de la CMI de higromicina para esferoplastos se realizó mediante la adición de aproximadamente 10^5 de estas células mezcladas con top agar a cajas de medio mínimo; después de 12 horas de incubación se agregó una capa de top agar con diluciones del antibiótico que iban desde los 260 hasta los 320 µg/ml. Después de 5-7 días de incubación, se registraron los resultados de ausencia o presencia de colonias en las cajas. Se determinó como CMI la concentración en donde no había crecimiento aparente en las cajas.

PREPARACION DE ESFEROPLASTOS

Se siguiò el procedimiento de Buxton y col. (1985), con algunas variaciones de acuerdo a como se describe a continuaciòn. Se obtuvieron germìnulas mediante la inoculaciòn de 5×10^5 conidias/ml en medio YED, incubando los cultivos en agitaciòn durante 8 horas a 29 °C a 200 rpm . Las germìnulas se colectaron por filtraciòn en un filtro monodur recogiendo las mismas del filtro y se suspendieron en 20 ml de soluciòn OM (1.2 M MgSO_4 + 0.1 M Na_2HPO_4); a la soluciòn anterior se agrego la enzima digestora (obtenida de *Rhizoctonia Solani*) al 2.5 %; se agitó el tubo a 60 rpm durante 3 horas a 30°C; pasada esta incubaciòn se filtro la soluciòn en filtro monodur y el filtrado se colecto y se centrifugo a 4°C y 3000 rpm durante 20 minutos. Se resuspendio la pastilla en 2 ml de SCT (Sorbitol 15% + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.75% + 2 ml de Tris HCl pH 7.5 1M), 10 % de PEG (PEG4000 60% + MOPS 12.5%) y 1% de DMSO. Se alícuotò y una de las alícuotas fue teñida con Calcofluor-white al 0.1 % y se realizaron observaciones en un microscopio Carl Zeiss Mod Axioskop 40 FL equipado con accesorio de epifluorescencia.

Para el conteo de los esferoplastos, se centrifugan los tubos en que estaban contenidos a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C, para después resuspender la pastilla de células en 1 ml de soluciòn STC. A continuaciòn se hizo una diluciòn 1/100 (990 µl STC + 10 µl de esferoplastos) y se realizò el conteo al microscopio.

TRANSFORMACION DE ESFEROPLASTOS

Para la transformaciòn de esferoplastos, primeramente estos (alrededor de 10^7 esferoplastos/ml) se incubaron sobre hielo durante 20 min. Mientras transcurre el tiempo de la incubaciòn, se prepararon de 5 a 10 µg de DNA transformante (plàsmido pSilent-1) al que se le ańadieron 10 µl de Acido aurintricarboxilico (ATA, 0.1 M) y soluciòn TEC (Tris-HCl 1M pH 7.5, EDTA 0.5M, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1M) hasta un volumen final de 60 µl. Se preparò de igual forma un tubo control sin DNA. Los tubos se incubaron durante 20 min en hielo para posteriormente centrifugarse y obtener el sobrenadante, que se adicionò al tubo que contenía los esferoplastos e incubando en hielo por 20 min. A continuaciòn se adicionaron 160 µl de PEG y se incubò por 15 min a temperatura ambiente; enseguida se agregò 1ml de STC, se centrifugò a 3000 rpm por 10 min y se resuspendió la pastilla de células en 200 µl de STC. Del tubo control sin DNA se tomaron 100 µl y se adicionaron a 2 ml de top agar (1g/L KH_2PO_4 + 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0.5 g/L KCl + 2g/L NaNO_3 + 20 g/L glucosa + 200 g/L sacarosa + 0.4% agar) y se adicionaron los 2 ml a una caja de medio mìnimo (1g/L KH_2PO_4 + 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 0.5 g/L KCl + 2g/L NaNO_3 + 20 g/L glucosa + 200 g/L sacarosa + 1.25% agar), este será el control de resistencia al antibiótico. Los 100 µl restantes se mezclaron con 900 µl de SCT, de esta diluciòn se pasaron 200 µl a 2 ml de top agar y se vaciaron en una caja de medio mìnimo (control de regeneraciòn de esferoplastos); de la misma diluciòn 200 µl se mezclaron con 800 µl de H_2O (control de regeneraciòn de germìnulas no convertidas en esferoplastos) y otros 200 µl se mezclaron con 800 µl de SCT (control de regeneraciòn de esferoplastos); de las diluciones anteriores se pasaron 200 µl de cada una a 2 ml de top agar y se vaciaron a cajas de medio minimo. De la alícuota que contenía DNA se pasaron 50 µl a 2

ml de top agar y se vacio a medio minimo; el paso anterior se repitió hasta terminarse la solución. Después de 12 h de incubación a 29°C, tanto a la caja control de antibiótico como a las cajas de DNA+esferoplastos, se adiciono una capa de top agar con 300 µg/ml de higromicina. Finalmente, después de 5-7 dias de incubación se contó el numero de colonias individuales obtenidas en el medio con higromicina, tanto en las mezclas de esferoplastos transformados como sin transformar, así como el numero de esferoplastos regenerados en cajas control sin higromicina.

RESULTADOS

Producción de esferoplastos

Para la obtención de esferoplastos, se obtuvieron germinulas en medio YED y se sometieron a tratamiento con la enzima lítica comercial de *Rhizoctonia Solani*. Se corroboró la presencia de esferoplastos mediante la tinción con Calcofluor white y observación por microscopia de fluorescencia. Dicha tinción permite observar y distinguir las esporas y los esferoplastos, para corroborar si en realidad hubo una buena digestión de la pared

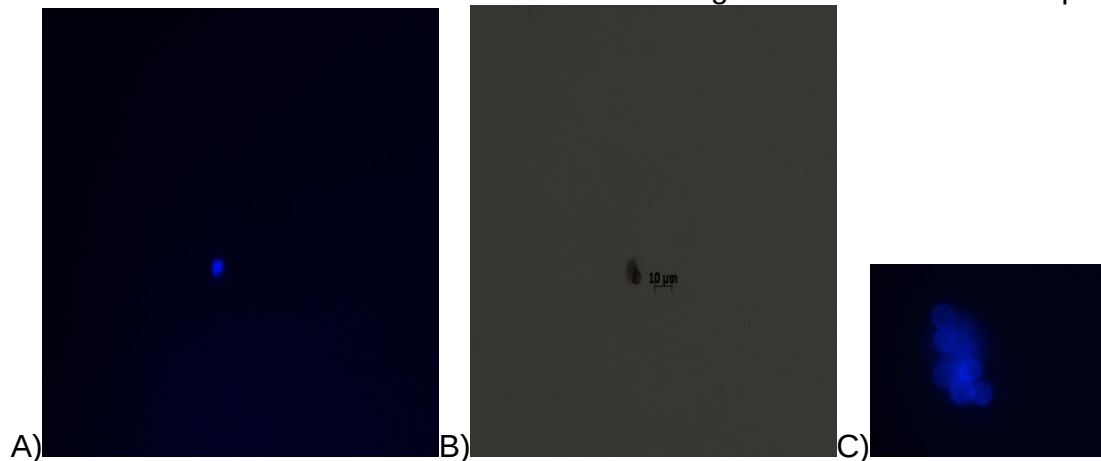


Fig. 1. A) Esferoplasto teñido con Calcofluor white y observado con microscopia de fluorescencia. B) Esferoplasto y spora observados con campo claro. C) Esferoplastos teñidos con calcofluor observados con mayor aumento.

celular. En la Fig 1 A) puede observarse que tras la tinción con calcofluor, la presencia de fluorescencia difusa solo se aprecia en el esferoplasto, pero no en las conidias, las cuales si estan presentes, como se muestra en la microscopia de campo claro (Fig 1B). En la Fig. 1 C), puede observarse una imagen con un mayor aumento de esferoplastos teñidos con calcofluor, en la que se muestra la fluorescencia difusa que presentan dichas células.

Determinación de la CMI para higromicina en esferoplastos

Se sembraron alrededor de 10^5 protoplastos en cajas de medio mínimo conteniendo como soporte osmótico sacarosa y suplementado con diferentes concentraciones de higromicina. Como se muestra en la Fig. 2B, a 250 µg/ml de higromicina el crecimiento disminuye, hasta que es completamente inhibido en medio con 300 µg/ml (Fig. 2C). En base a estas observaciones, la

concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina se eligió como la CMI para realizar experimentos de transformación.

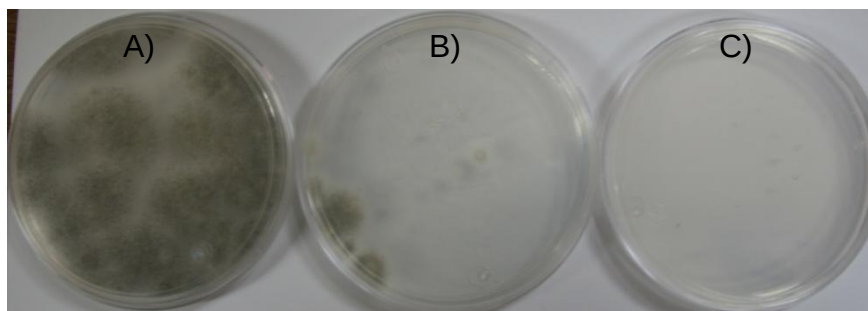


Figura 2. CMI de higromicina para esferoplastos de Ed8. Fotografías representativas del efecto de la concentración de higromicina sobre el crecimiento. A) Medio sin higromicina; B) Medio con 250 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina; C) Medio con 300 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina.

Transformación de esferoplastos de la cepa Ed8 con el plásmido pSilent-1

Alrededor de 10^7 esferoplastos de la cepa Ed8 fueron sometidos a transformación con 5 μg del plásmido pSilent-1, seleccionando los transformantes en medio con 300 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina. La Fig. 3A muestra que solo con las células tratadas con el plásmido pSilent-1 se obtuvieron colonias capaces de crecer en medio con higromicina, de las que se obtuvo un total de 30. De estas colonias se obtuvieron conidias, las cuales fueron sembradas en medio mínimo Lee suplementado con 70 $\mu\text{g/ml}$; como se muestra en la Fig. 3B, solo las conidias de 5 de las 30 colonias mostraron capacidad de crecer en estas condiciones, mientras que las conidias de la cepa Ed8 sin transformar son incapaces de crecer en medio con 70 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina (Fig. 3C).

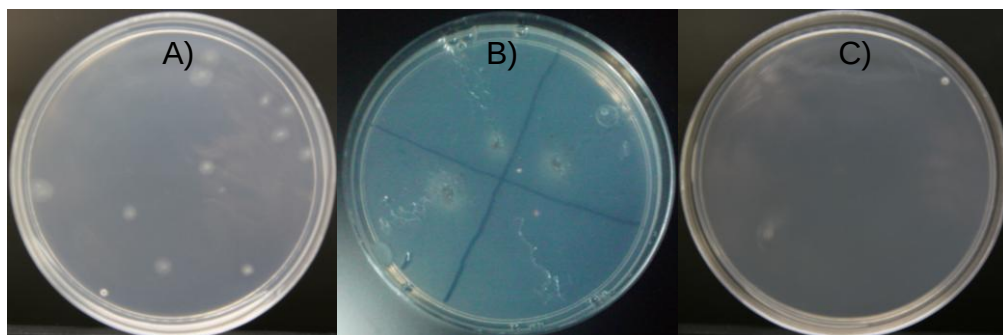


Figura 3. Transformación de la cepa Ed8 con el vector pSilent-1. A) esferoplastos tratados con pSilent-1; B) conidias de presuntas transformantes expuestas a 70 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina; C) conidias de Ed8 expuestas a 70 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina.

Estas observaciones sugieren que se logró transformar a la cepa Ed8 con el plásmido pSilent-1. Sin embargo, se tendrá que obtener evidencia molecular de la presencia del mencionado plásmido en el genoma de las 5 cepas cuyas conidias son capaces de crecer en medio con 70 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina.

CONCLUSIONES

1. Es factible la obtención de esferoplastos de la cepa Ed8 de *A. tubingensis* mediante tratamiento con la enzima lítica de *Rhizoctonia Solani*.
2. Los esferoplastos tratados con el plásmido pSilent-1 dan lugar a colonias resistentes a higromicina, lo que sugiere que en ellos está presente el referido plásmido

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo-Aguilar, F.J. (2008). Estudio analítico de la reducción de cromo hexavalente y sus implicaciones en sistemas biológicos. Tesis doctoral, Posgrado Institucional en Química, Universidad de Guanajuato.

Acevedo-Aguilar, F.J., Espino-Saldaña, A.E., Leon-Rodriguez. I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodriguez, M., Wrobel, K., Wrobel, K., Lappe, P., Ulloa, M. y Gutierrez-Corona, J.F. (2006). Hexavalent chromium removal in vitro and from industrial wastes using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous from contaminated wastes. *Can J Microbiol* 52:809-815.

Borst- Pauwels, G.W.F.H. (191). Ion transport in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 650: 88-127.

Burford, E.P., Fomina, M. y Gadd, G.M. 2003. Fungal involvement in bioweathering and biotransformation of rocks and minerals. *Miner Mag* 67:1127-1155.

Buxton, F.P., Gwynne, D.I. y Davies, R.W. (1985). Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 37:207–214.

Castillo Nava, R. (2009). Aislamiento del gen que codifica para una manitol 1-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus* sp. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato

Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C. y Moreno-Sánchez R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25:335-347.

Clarke, K.G., Johnstone-Robertson, M., Price, B., y Harrison, S.T. (2006). Location of glucose oxidase during production by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:72-77

Coreño Alonso, A. (2009). Caracterización del sistema de reducción de Cr(VI) de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger* resistente a cromato. Tesis doctoral, Posgrado en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H. y Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress Part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr Top Med Chem* 1:529-539.

Espino Saldaña, A.E. (2002). Aislamiento y caracterización de hongos resistentes a cromato nativos de desechos industriales. Tesis de Licenciatura, Universidad de Guanajuato.

Fernández Perrino, F.J., Hernández Ramírez, L. y Gutiérrez Corona, J.F. (2007). Tipificación molecular de cepas de hongos filamentosos resistentes a cromato. Proyecto de Servicio Social, Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa e IIBE, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato

Gadd, G. M. (1993). Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytol* 124:25-60.

Hult, K., Veide, A. y Gatenbeck, S. (1980). The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species. *Archives of Microbiology* 128:253–255.

Lee, K.L., Buckley, H.R. y Campbell, C.C. (1975). An aminoacid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 13:148-153

Liu, K. y Shi, X. (2001). In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem* 222:41-47.

Losi, M.E. Amrhein, C. y Frankenberger, W.T.J. (1994). Environmental biochemistry of chromium. *Rev Environ Contam Toxicol*. 136:91-131.

Mikhailova, R.V., Logbanok, A.G., Shishko, Zh.F. y Iasenkov, M.I. (2000). Effect of conditions of culturing *Penicillium funiculosum* G-15 on production of extracellular glucose oxidase. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya* 36:199-203.

Nakayashiki, H., Hanada, H., Quoc B. N., Kadotani, N., Tosa, Y. y Mayama, S. (2005). RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet Biol* 42:275–283.

Romo Rodríguez, P. (2010). Alteración genética de posibles moléculas involucradas en la tolerancia y/o reducción de Cromo VI en la cepa Ed8 de *Aspergillus niger* var. *tubingensis*. Tesis doctoral (en proceso). Posgrado en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato

Ruijter, G.J.G., Bax, M., Patel, H., Flitter, S.J., van de Vondervoort, P.J.I. de Vries, R.P., vanKuyk, P.A. y Visser, J. (2003). Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryotic Cell* 2: 690-698.