

Comodoro Rivadavia, 17 de agosto de 2006.-

VISTO:

La nota entrada a FCN. N° 2399/06 presentada por el Dr. Héctor M. Álvarez, mediante la cual eleva el proyecto de Práctica Profesional a elección para la carrera de Bioquímica, y

CONSIDERANDO:

- Que la misma ha sido avalada por el Comité de Carrera del Departamento de Bioquímica.
- Que ha seguido el camino crítico correspondiente.
- Que cumple con las Resoluciones CAFCN. N° 234/92 y 057/99.
- Que el tema fue tratado en la IV sesión ordinaria del año en curso.

POR ELLO, EL CONSEJO ACADÉMICO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
R E S U E L V E

Art. 1°) Aprobar la **Práctica Profesional** propuesta por el Dr. Héctor M. Álvarez y la Dra. María Luján Flores, en el marco de la Práctica Profesional a elección de la carrera de Bioquímica que se detalla a continuación: **“Análisis de la sustancia polimérica extracelular en la bacteria *Rhodococcus sp. RHA1*”** cuyos contenidos figuran en el Anexo que forma parte integrante del presente despacho.

Art. 2°) Regístrese, cúrsense las comunicaciones pertinentes, notifíquese a quien corresponda y cumplido, archívese.-

RESOLUCIÓN CAFCN. N° 435/06.-



MSC. SUSANA PERALES
Sec. Académica
Facultad de Ciencias Naturales
U.N.P.C.J.B.



Lic. ADOLFO GENINI
DECANO
Fac. De Ciencias Naturales
U.N.P.S.J.B.

Práctica Profesional a Elección de Bioquímica - 2006

Cátedra Genética – Dpto. de Bioquímica

Cátedra de Farmacognosia – Dpto. de Farmacia

Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (CRIDECIT)

Responsables: Dr. Héctor M. Álvarez (Prof. Adjunto Cátedra de Genética)

Dra. María Luján Flores (Prof. Adjunto Cátedra de Farmacognosia)

Colaboradores: Bioq. Roxana A. Silva (Jefe de Trabajos Prácticos Cátedra de Genética)

Farm. Graciela Pinto Vitorino (Prof. Adjunto Cátedra de Química Medicinal)

Título: **Análisis de la sustancia polimérica extracelular en la bacteria *Rhodococcus* sp. RHA1.**

Objetivos:

Objetivo formal: el objetivo del presente trabajo es que el alumno realice sus prácticas utilizando razonamientos y las metodologías aplicadas durante el desarrollo del proyecto de investigación en curso en la Cátedra de Genética.

Objetivo específico: Analizar y caracterizar la sustancia polimérica extracelular producida por la cepa *Rhodococcus* sp. RHA1 bajo condiciones de estrés ambientales.

Palabras claves: *Rhodococcus* sp. RHA1, sustancia polimérica extracelular, desecación.

Introducción

Las bacterias del género *Rhodococcus* son reconocidas por su amplia versatilidad metabólica para degradar diferentes tipos de compuestos; muchos de ellos contaminantes del ambiente y por su capacidad de producir compuestos de interés biotecnológico. El conocimiento de su fisiología, bioquímica y genética contribuirá al diseño de estrategias adecuadas para su utilización en actividades de aplicación. En este contexto, nuestro grupo investigó recientemente los mecanismos morfológicos y fisiológicos que permiten a la bacteria *Rhodococcus opacus* PD630 tolerar la desecación por largos períodos de tiempo. Entre las respuestas celulares detectadas frente al estrés hídrico, se observó la producción de una sustancia polimérica extracelular (SPE) que cubre la superficie de las colonias (Álvarez *et al.*, 2004. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **50**: 75-86). La acumulación de SPE fue evidente a las 24 h de tratamiento y se intensificó con el tiempo. Esta sustancia extracelular podría reducir la pérdida de agua por parte de las células y aislar a las mismas del medio externo. La producción de SPE podría suministrarle tiempo adicional a las células para realizar los ajustes fisiológicos, metabólicos y genéticos necesarios para la supervivencia del microorganismo en ambientes áridos.

La cepa *Rhodococcus* sp. RHA1 ha despertado el interés de los investigadores en general por su capacidad de degradar PCB y otros hidrocarburos aromáticos. La Universidad de British Columbia de Vancouver, Canadá, ha realizado el secuenciamiento del genoma completo de este

ANEXO CPDE. CAFCN. N° 435/06.-

microorganismo, a fin de incrementar el conocimiento de su bioquímica, fisiología y genética. En este contexto, recientemente se ha iniciado una colaboración científica entre el grupo de trabajo de la UBC y nuestro grupo de la UNPSJB a fin de realizar en conjunto estudios de genoma funcional e investigar aspectos básicos particulares en este microorganismo. Uno de los aspectos bajo estudio es la respuesta de la cepa RHA1 frente a la desecación a nivel genético y molecular. Estudios genéticos han demostrado que la cepa RHA1 se encuentra estrechamente relacionada a la especie *Rhodococcus opacus*, por lo que los resultados de las investigaciones realizadas con la cepa *R. opacus* PD630 son extrapolables a la cepa RHA1. Los resultados preliminares obtenidos del estudio de transcriptoma en la cepa RHA1 bajo condiciones de desecación, han corroborado los obtenidos por nuestro grupo con la cepa PD630.

En el presente trabajo se iniciarán los estudios tendientes a la caracterización de la sustancia polimérica extracelular en la bacteria *Rhodococcus* sp. RAH1 bajo condiciones de desecación, a fin de correlacionarlos con los datos obtenidos en los estudios de transcriptoma. Se pretende identificar de esta manera los genes relevantes para el proceso de síntesis y acumulación de SPE.

Bibliografía

Las Cátedras involucradas en el presente trabajo disponen de la bibliografía necesaria, que aportará la base para la temática de estudio. Además se cuenta con bibliografía específicamente relacionada con el trabajo propuesto representada por artículos científicos de revistas tales como: *Applied and Environmental Microbiology*, *Journal of Bacteriology*, *Archives of Microbiology*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, *Journal of Carbohydrate Research*, *Drug Discovery Today*, entre otros.

Metas

- 1- Caracterizar químicamente la SPE producida por *Rhodococcus* sp. RHA1 durante su incubación bajo condiciones de desecación.
- 2- Determinar las enzimas y genes involucrados en la síntesis y acumulación de la SPE en la cepa RHA1 a partir de los datos del genoma y transcriptoma.
- 3- Analizar los resultados y establecer conclusiones.

Actividades

- 1- Lectura y análisis de la temática a desarrollar en la bibliografía correspondiente.
- 2- Ensayos preliminares con diferentes métodos de coloración de polímeros extracelulares.
- 3- Estudio preliminar de la síntesis y acumulación de SPE por la cepa RHA1 para determinar las condiciones óptimas de producción para estudios posteriores de caracterización química.
- 4- Ensayos químicos generales para el análisis de la SPE.
- 5- Obtención y análisis de los perfiles cromatográficos específicos en función de los resultados obtenidos en el punto anterior.
- 6- Búsqueda y análisis de los genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis y acumulación del SPE en función de la caracterización química.
- 7- Análisis de los resultados, conclusiones y preparación del informe.

ANEXO CPDE. CAFCN. N° 435/06.-

Materiales y Métodos

Materiales

Las Cátedras involucradas en el presente trabajo cuentan con los materiales, equipos y soporte financiero necesarios para su realización. La presente Práctica será financiada con los subsidios obtenidos por los grupos involucrados para la realización de los proyectos de investigación en curso.

Métodos

- *Condiciones de cultivo y tratamiento de las células bajo condiciones de desecación.* Para los ensayos de desecación se utilizará una metodología desarrollada en trabajos anteriores del grupo (Alvarez *et al.*, 2004. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **50**: 75-86). Se cultivarán las células en 10 ml de medio nutritivo (NB) a 28° C durante 24 h con agitación orbital, se recolectarán por centrifugación, se lavarán con solución fisiológica estéril (SF) y finalmente se resuspenderán en SF a una $DO_{436\text{ nm}}$ de 8. Esta suspensión de células sirve de inóculo para los ensayos de desecación posteriores, depositando las mismas sobre soportes sólidos inertes, como el vidrio o los filtros de nitrato de celulosa de 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Alemania).

- *Ensayos preliminares con diferentes métodos de coloración de polímeros extracelulares.* Las células serán sujetas a condiciones de desecación (28° C- 20 % HR) en un portaobjetos de vidrio y a diferentes tiempos se realizarán coloraciones con colorantes específicos para diversos tipos de polímeros extracelulares. A continuación se mencionan algunos de ellos y su especificidad:

1) Tinción con lugol:

Especificidad: amilosa y amilopectina en citoplasma; y amiloides en paredes celulares.

2) Tinción con Rojo de Rutenio, $[(\text{NH}_3)_5\text{RuORu}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_6$:

Especificidad: polisacáridos con grupos aniónicos.

3) Tinción con azul de toluidina:

Especificidad: las pectinas (y polisacáridos aniónicos en general), se colorean de rosa a púrpura; los ácidos nucleicos u otros compuestos con ésteres fosfato, de púrpura verdoso; la lignina y los taninos se tiñen de verde, azul verdoso o azul brillante. Entonces las paredes primarias se teñirán de rosa a púrpura, y las secundarias, de azul. Se trata pues de un colorante metacromático, es decir aquél que puede teñir de distintas tonalidades los materiales de acuerdo a la composición química de los mismos.

4) Tinción de PA-Schiff:

Especificidad: polisacáridos con oxhidrilos adyacentes no sustituidos.

5) Tinción con Fluorocromo Calcoflúor white:

Especificidad: polisacáridos de tipo fibrilar β -(1→4) o β -(1→3).

ANEXO CPDE. CAFCN. N° 435/06.-

6) Coomassie brilliant blue G²⁵⁵:

Especificidad: proteínas.

- *Estudio preliminar de la síntesis y acumulación de SPE por la cepa RHA1 para determinar las condiciones óptimas de producción para estudios posteriores de caracterización química.* Una vez establecido el/los métodos de tinción con mayor afinidad por las células, se realizarán tinciones a diferentes tiempos de incubación de las células bajo condiciones de desecación.

- *Ensayos generales de reacción cualitativos para el análisis de la SPE.* Se utilizarán reacciones generales cualitativas para la determinación del/los grupos químicos constituyentes de la SPE. Para ello se prepararán extractos con agua a temperatura ambiente y a 70 °C, los que serán llevados a seco por liofilización. Además se probará la solubilidad de la SPE en solventes de distinta polaridad. Los extractos nativos serán analizados mediante las reacciones de Molisch, Fehling, Seliwanoff y Bial (para la identificación de hidratos de carbono); ninhidrina y Millon (para aminogrupos, péptidos y proteínas); cloruro férrico y gelatina (para fenoles); yodo (para lípidos); Liebermann-Bouchard (para esteroides y/o triterpenos glicosilados). Eventualmente podrán efectuarse ensayos para otros grupos químicos según los resultados obtenidos.

- *Análisis del perfil cromatográfico específico de la SPE.* Una porción de cada extracto acuoso será sometido a hidrólisis mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) 2 M o concentrado (según los resultados generales obtenidos al analizar cualitativamente los hidratos de carbono) durante 90 min a 121°C. Los productos de la hidrólisis al igual que los extractos nativos serán analizados mediante distintos sistemas de cromatografía planar sobre papel Whatmann N° 1 y Silicagel a fin de establecer los perfiles correspondientes. Alternativamente productos hidrolizados y nativos serán derivatizados a los correspondientes aldononitrilos peracetilados y analizados mediante cromatografía gaseosa (CGL).

Los perfiles cromatográficos de sustancias de naturaleza proteica serán efectuados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Si el análisis químico preliminar evidenciara la presencia de sustancias fenólicas, esteroidales y/o triterpénicas, se efectuarán los perfiles cromatográficos mediante sistemas planares.

De corresponder, el análisis de lípidos será realizado mediante cromatografía planar bidimensional en un sistema de TLC sobre Sílicagel, previa saponificación a reflujo con una solución de KOH al 2 % y posterior liberación de los ácidos grasos constituyentes. Alternativamente podrá complementarse con un estudio mediante CGL de los ácidos grasos previamente metilados.

-*Búsqueda y análisis de genes en la cepa RHA1.* Las secuencias de los genes y proteínas de interés serán obtenidas de la base de datos del Proyecto Genómico de *Rhodococcus* sp. RHA1. Se analizará la presencia de los genes de interés en el contexto de clusters u operones en el programa respectivo. Para el análisis de las secuencias, comparación de las secuencias con otros microorganismos, alineamientos y búsqueda de secuencias conservadas o motivos específicos, se

ANEXO CPDE. CAFCN. N° 435/06.-

utilizarán programas disponibles en Internet o programas específicos disponibles en la Cátedra de Genética. Para el análisis de los genes, se prevé una búsqueda bibliográfica y análisis detallado de publicaciones específicas para cada tipo de gen a investigar.

Cronograma:

Duración: 16 semanas.

| Actividades | Semanas | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 |
| 1 | x | x | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | x | x | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | x | x | x | x | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | x | x | x | x | x | x | | | | |
| 5 | | | | | | | | | x | x | x | x | x | x | x | |
| 6 | | | | | | | | | | | x | x | x | x | x | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | x | x |

Cantidad de alumnos: 1 (uno).

Cuatrimestre: segundo cuatrimestre.
