



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
CLEMENTE ESTABLE



**FACULTAD DE
CIENCIAS**
UDELAR | fcien.edu.uy

Trabajo de Grado, Licenciatura en Bioquímica:

EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UNA POSIBLE MANGANESO OXIDASA BACTERIANA DE ORIGEN ANTÁRTICO

Florencia Pucurull

Orientador: Vanesa Amarelle; Co- orientador: Elena Fabiano

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Diciembre 2016

CONTENIDO

Lista de abreviaturas utilizadas.....	6
INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Manganeseo	9
1.2 Óxidos de Manganeseo.....	10
1.3 Bacterias oxidadoras de Manganeseo	11
1.3.1 Hábitats.....	11
1.3.2 Distribución filogenética	13
1.3.3 Beneficios de los óxidos de Mn para las BOM	14
1.3.4 Mecanismos bacterianos de oxidación de Mn.....	15
1.3.5 Aplicaciones ambientales de las BOM y los OxMn.....	17
1.4 Antecedentes	20
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	24
2.1 Hipótesis	24
2.2 Objetivo general.....	24
2.3 Objetivos específicos	24
3 MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1 Material de partida	25
3.2 Mini preparación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina	25
3.3 Amplificación del gen que codifica para la citocromo c peroxidasa	27
3.3.1 Cebadores	27
3.3.2 Puesta a punto de las condiciones de amplificación por PCR.....	27
3.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	29
3.5 Purificación de productos de PCR	29
3.6 Clonado del gen <i>citC</i> en el vector pBSK	30
3.7 Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5 α con el plásmido pBSK-CitC.....	32
3.7.1 Preparación de células competentes	32
3.7.2 Transformación de células competentes.....	32
3.8 Clonado del gen <i>citC</i> en un vector de expresión	33
3.9 Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 α con pET14b-CitC	35
3.10 Transformación de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS con pET14b-CitC.....	35
3.11 Secuenciación	36
3.12 Evaluación de la actividad MnOx en medio sólido.	36
3.13 Expresión heteróloga de la proteína CitC recombinante	37
3.13.1 Inducción de la expresión de CitC a pequeña escala.....	37

3.13.2	Electroforesis de proteínas por SDS- PAGE	37
3.13.3	Inducción de la expresión de CitC a mayor escala.....	38
3.14	Localización celular de la proteína recombinante	39
3.14.1	Obtención de la fracción soluble e insoluble.....	39
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Extracción del fósforo 18E5.....	42
4.2	Amplificación del gen que codifica para la citocromo C peroxidasa	42
4.3	Construcción del plásmido pBSK-CitC.....	43
4.4	Construcción del plásmido pET14b-CitC.....	45
4.5	Evaluación de la actividad MnOx en medio sólido.	47
4.6	Expresión de la proteína	47
4.6.1	Ensayo a pequeña escala.....	48
4.6.2	Ensayo a mayor escala.....	49
4.7	Obtención de extractos solubles e insolubles	50
5	DISCUSIÓN.....	51
6	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	54
6.1	Conclusiones	54
6.2	Perspectivas	54
7	BIBLIOGRAFÍA.....	56
8	ANEXO.....	62
8.1	Medios de cultivo.....	62
8.2	Lisis alcalina	62
8.3	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida SDS	62

Índice de Tablas

Tabla 1. Secuencias de ácidos nucleicos y Tm de los cebadores utilizados.....	27
Tabla 2. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de amplificación.....	28
Tabla 3. Condiciones de ciclado para la amplificación del gen citocromo c peroxidasa.....	28
Tabla 4. Concentraciones y volúmenes de los reactivos para la digestión del pBSK con la enzima EcoRV.....	31
Tabla 5. Concentraciones y volúmenes de los reactivos para la reacción de ligación del gen <i>citC</i> al vector pBSK.....	31
Tabla 6. Doble digestión de los plásmidos pET14b y pBSK-CitC con las enzimas de restricción NdeI y XhoI.....	33
Tabla 7. Ligación del gen <i>citC</i> al vector de expresión pET14b.....	35
Tabla 8. Diferentes condiciones de inducción ensayadas.....	39

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo del manganeso mediado por oxidaciones bióticas y abióticas.....	10
Figura 2. Hábitats de bacterias oxidadoras de manganeso.....	13
Figura 3. Árbol filogenético del dominio bacteria donde se muestra las bacterias oxidadoras de manganeso.....	14
Figura 4. Esquema conceptual del modelo de oxidación de EE2 catalizada por óxidos de Mn.....	20
Figura 5. Identificación del clon oxidador de Mn 18E5 en medio suplementado con MnCl ₂	20
Figura 6. Confirmación de la actividad manganeso oxidasa (MnOx).....	21
Figura 7. Representación de los contigs obtenidos de la secuenciación del fósido 18E5.....	21
Figura 8. Resultados para la búsqueda de ORFs y la asignación de COG mediante el servidor WebMGA.....	23
Figura 9 . Mapa del vector de Clonado pBSK.....	30
Figura 10. Mapa del vector de expresión pET14b.....	34
Figura 11. Esquema de la estrategia metodológica utilizada.....	41
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción del fósido 18E5.....	42
Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen citocromo c peroxidasa.....	43
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la confirmación de la construcción pBSK-CitC mediante PCR de colonia.....	44
Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de la preparación plasmídica de pBSK-CitC.....	44
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión del vector pET14b con	

Ndel y XhoI.....	45
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de la preparación plasmídica de pET14b-CitC.....	46
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos mediante PCR de colonia.....	47
Figura 19. SDS PAGE de proteínas totales de la inducción de la expresión de la proteína CitC a pequeña escala.....	48
Figura 20. Inducción de la proteína en presencia de hemina.....	49
Figura 21. Inducción de la proteína en ausencia de hemina.....	49
Figura 22. Extractos celulares solubles e insolubles.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

1. ADN: Acido desoxirribonucleico
2. ADNAsas: Desoxirribonucleasa
3. Amp: Ampicilina
4. APS: Persulfato de amonio
5. Ara: Arabinosa
6. ARNasa: Ribonucleasa
7. ATP: Adenosin trifosfato
8. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
9. BOM: Bacterias oxidadoras de Mn
10. Cm: Cloranfenicol
11. dNTP's: Desoxinucleótidos trifosfato
12. DO: Densidad óptica
13. EDTA: Ácido etilendiaminotetraacetico
14. EtOH: Etanol
15. IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
16. Kb: Kilopares de bases
17. LB: Luria-Bertani
18. LBB: Azul de Leucoberbelina
19. MCO: Multicobre oxidasa
20. MnOx: Manganeso Oxidasa
21. NCBI: National Center for Biotechnology Information
22. ORF: Open Reading Frame (Marco Abierto de Lectura)
23. OxMn: Óxidos de manganeso
24. pb: pares de bases
25. PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
26. SDS: Dodecilsulfato sódico
27. TAE: Solución tampón Tris, Acetato, EDTA
28. Tm: Temperatura de desnaturalización

RESUMEN

Las bacterias oxidadoras de manganeso (BOM) así como los óxidos de manganeso que producen son de interés biotecnológico dada su capacidad de oxidar compuestos orgánicos contaminantes en suelos y aguas. Son capaces además de adsorber iones, entre ellos metales potencialmente tóxicos, pudiendo ser utilizados en biorremediación. Actualmente los óxidos de manganeso se utilizan en el tratamiento de aguas residuales y en procesos de purificación de aguas.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo se construyó una metagenoteca funcional a partir del ADN total presente en una muestra de deshielo obtenida en la península Antártica. En el análisis funcional de la metagenoteca se identificó un clon capaz de oxidar manganeso. Con la finalidad de determinar el gen responsable de la actividad manganeso oxidasa se secuenció el fósido 18E5, responsable del fenotipo observado. El análisis bioinformático no evidenció ninguna secuencia con homología con las enzimas más comúnmente reportadas para esta actividad, las multicobre oxidasas y las hemo peroxidasas. Se identificó sin embargo, una posible citocromo c peroxidasa. Dado que esta enzima es también una hemo peroxidasa y que, por otro lado, se ha reportado la participación de una citocromo c oxidasa en la oxidación de manganeso, nuestra hipótesis de trabajo fue que la citocromo c peroxidasa podría ser capaz de oxidar manganeso.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la citocromo c peroxidasa es la enzima responsable del fenotipo de oxidación de manganeso observado en el clon de la metagenoteca. Con este propósito, nos planteamos como aproximación la amplificación, clonado y expresión heteróloga de esta proteína.

Partiendo del clon de la metagenoteca, se aisló el fósido 18E5, se diseñaron cebadores específicos para amplificar el gen citocromo C peroxidasa y éste se clonó en el vector de expresión pET14b. El plásmido pET14-CitC, fue introducido en la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y se evaluó la capacidad de la cepa recombinante de oxidar manganeso luego de inducir la expresión. Las colonias no presentaron la coloración rojiza-amarronada característica de la formación de óxidos de manganeso y

tampoco reaccionaron al aplicar el sustrato Azul de Leucoberbelina (LBB), el cual se oxida en presencia de óxidos de Mn, cambiando de incoloro a azul.

Se indujo la expresión de la proteína con la intención de determinar su correcta expresión, su localización celular y posteriormente purificarla y ensayar su capacidad de oxidar manganeso *in vitro*. Se pudo confirmar, mediante perfiles de proteínas totales, la inducción de la expresión de la proteína a 25 °C y 30 °C. Se obtuvieron los extractos celulares, detectándose la totalidad de la proteína en la fracción insoluble.

No se pudo comprobar que el gen *citC* sea el responsable de la oxidación de manganeso con la estrategia utilizada. Sin embargo tampoco se puede descartar su participación dado que la citocromo c peroxidasa no se estaría expresando en el compartimento correcto (periplasma).

Planteamos como perspectiva, realizar estrategias de expresión alternativas que nos permitan obtener la proteína en la fracción soluble, así como estrategias de solubilización para la proteína que actualmente se ubica en la fracción insoluble. De esta manera podremos determinar su actividad (manganeso oxidasa o citocromo c peroxidasa) *in vitro*. Por otro lado, considerando la posibilidad de que esta enzima no sea la responsable de la oxidación de manganeso o que requiera de factores adicionales proponemos realizar mutagénesis *in vitro* del fósido 18E5 y zimogramas para identificar el gen o los genes responsables de la oxidación de manganeso.

INTRODUCCIÓN

1.1 Manganese

El manganeso comprende aproximadamente el 0,1 % de la masa total de la Tierra [1], es el quinto metal de transición más abundante en la corteza terrestre y el segundo metal traza más común después del hierro [2]. Los estados de oxidación más relevantes en el medioambiente son el Mn (II), Mn (III) y Mn (IV) [3]. La biodisponibilidad del manganeso está fuertemente influenciada por los factores que determinan su estado de oxidación. El Mn (II) es generalmente soluble y su presencia se ve favorecida a pHs bajos y ausencia de oxígeno, mientras que los óxidos de Mn (III) y Mn (IV) son muy poco solubles y se forman a pHs altos y en presencia de oxígeno. El estado de oxidación intermedio Mn (III), es inestable en condiciones normales a menos que forme complejos con ligandos orgánicos o inorgánicos [4].

El ciclo biogeoquímico del Mn está mediado por reacciones de oxidación y reducción, absorción biológica y formaciones minerales (Fig. 1) [2]. La oxidación abiótica de Mn (II) puede ser catalizada por condiciones ambientales extremas y por la adsorción de iones a superficies minerales como óxidos de Fe y silicatos, mientras que la reducción del Mn (IV) es favorable en presencia de agentes reductores bajo condiciones anaeróbicas, pH bajo o en presencia de agentes quelantes de Mn (II) [5]–[8].

Desde el punto de vista biológico, el Mn es un micronutriente esencial para la vida de la mayoría de los organismos [3]. Su capacidad de participar en reacciones redox lo hacen un elemento central en un gran número de procesos biológicos. Es cofactor de numerosas enzimas, incluyendo manganeso superóxido dismutasa, manganeso catalasa y ribonucleotido reductasa dependiente de manganeso [9]. Es particularmente importante para las plantas y microorganismos fotosintéticos ya que el Mn forma parte del centro de reacción fotosintético [10], [11].

Si bien la oxidación abiótica de Mn (II) es termodinámicamente favorable, sucede a muy baja velocidad. La oxidación biótica de Mn (II) puede aumentar hasta cinco órdenes de magnitud la velocidad a la que se forman los óxidos de Mn (OxMn) [12], [13]. La diferencia de velocidad de la oxidación de Mn (II) biótica y abiótica sugiere que la oxidación biológica domina en el medioambiente y que la mayor cantidad de OxMn

que se encuentran en la naturaleza derivan directamente de la oxidación biológica [2]. Este proceso es llevado a cabo por microorganismos oxidadores de Mn (II), que incluyen una variedad de bacterias y hongos [14].

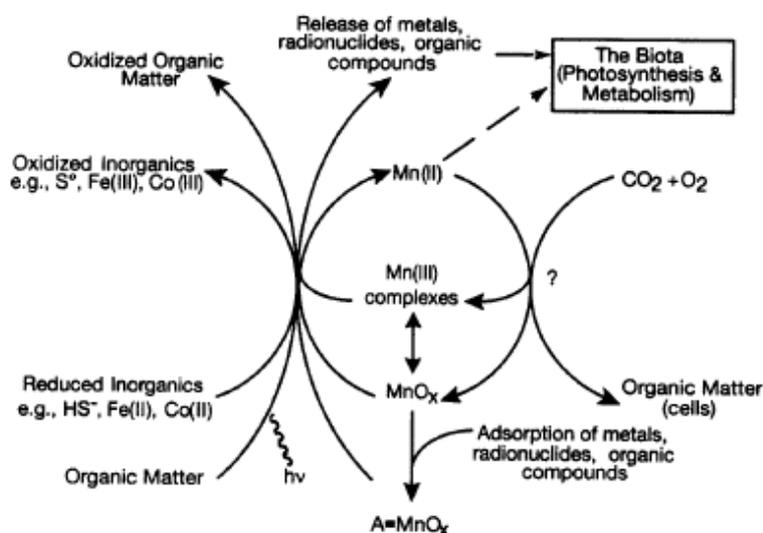


Figura 1. Ciclo del manganeso mediado por oxidaciones bióticas y abióticas. Se pueden apreciar los estados de oxidación de Mn más comúnmente encontrados en la naturaleza Mn (II), Mn (III) y Mn (IV). La forma más oxidada, es insoluble y forma óxidos con una fuerte capacidad oxidante, capaces de oxidar compuestos inorgánicos y orgánicos. El estado de oxidación intermedio, Mn (III), es inestable como un ion en condiciones ambientales normales a menos que forme complejos con ligandos orgánicos o inorgánicos. Tomado de Tebo *et al.* 2007 [2].

1.2 Óxidos de Manganeso

Se conocen más de 30 minerales diferentes de óxidos de manganeso los cuales se producen en una amplia variedad de entornos geológicos. Son los principales componentes de los nódulos de Mn que pavimentan enormes áreas del fondo del océano y fondos de muchos lagos de agua dulce. Están ampliamente distribuidos en suelos y sedimentos y participan en una variedad de reacciones químicas que afectan el agua subterránea y la composición del suelo [15].

Los óxidos de Mn en fase sólida se caracterizan por tener estructuras cristalinas abiertas y grandes superficies con altas cargas negativas. Las unidades estructurales básicas para los óxidos de Mn son octaedros de MnO₆, que se ensamblan para construir estructuras de túneles y estructuras de capas [16]. Tanto los óxidos de manganeso de estructura de túnel como de capa pueden alojar una gran variedad de cationes o moléculas de agua para compensar su carga negativa con la unión reversible

de estos cationes. En general, la reactividad (por ejemplo, la capacidad de adsorción o velocidad de transferencia de electrones) de los minerales de óxido de Mn varían directamente con sus áreas superficiales, que aumentan a medida que la cristalinidad disminuye [17]. Estas características estructurales de los OxMn les otorga una gran capacidad de adsorción de metales cargados positivamente como Pb (II), Zn (II), Co (II) y Ni (II) [18].

Después del oxígeno, los OxMn son los agentes oxidantes más abundantes que se producen de forma natural en el medio ambiente. Además de servir como aceptores terminales de electrones para la respiración bacteriana, participan en numerosas reacciones redox y de adsorción [14]. Consecuentemente tienen un importante rol en la biodisponibilidad y el ciclo geoquímico de muchos elementos esenciales o tóxicos [4]. Participan en el ciclo de elementos abundantes como C y S, y también en los ciclos de elementos traza como Fe, Co, Pb, Cu, Cd y Cr [19].

Por otro lado, los OxMn son capaces de transformar un amplio rango de substratos orgánicos, incluyendo numerosos contaminantes tales como agentes antibacterianos, fenoles, anilinas y pesticidas [20]–[23].

La participación de los OxMn en la degradación de contaminantes orgánicos, así como en la adsorción de metales pesados los convierten en un interesante insumo con diversas aplicaciones industriales. Actualmente se utilizan los OxMn en el tratamiento de aguas residuales y en procesos de purificación de aguas [17], [18]

1.3 Bacterias oxidadoras de Manganese

1.3.1 Hábitats

Las bacterias oxidadoras de manganese (BOM) están ampliamente distribuidas en la naturaleza en suelo, agua, sedimentos y rocas. Se han identificado en ambientes tan diversos como nódulos de manganese en aguas profundas [24], en respiraderos hidrotermales [25], en la interface óxica/anóxica en los fiordos [26], en barniz desértico [27], en depósitos de manganese en tuberías de agua [28], [29], en films

superficiales ricos en manganeso de lagos poco profundos, en sedimentos de lagos de agua dulce y en depósitos de ferromanganeso [30]–[32].

Una característica común a muchos de estos hábitats es un suministro continuo de Mn (II), que se producen típicamente de dos diferentes maneras (Fig. 2). El primero (Fig. 2 a) es en la conjunción de las interfaces óxica/anóxica. En condiciones anaeróbicas los óxidos de Mn (III) y Mn (IV) se pueden reducir rápidamente por una variedad de mecanismos directos e indirectos, tales como la excreción de agentes reductores orgánicos o inorgánicos, o por la respiración bacteriana [33]. Esto resulta en una solubilización del Mn, que puede difundirse en la zona óxica, haciendo una condición ideal natural de enriquecimiento para las BOM. Tales interfaces son comunes en casi todos los sedimentos que contienen Mn y en los lagos estratificados y fiordos [26], [34].

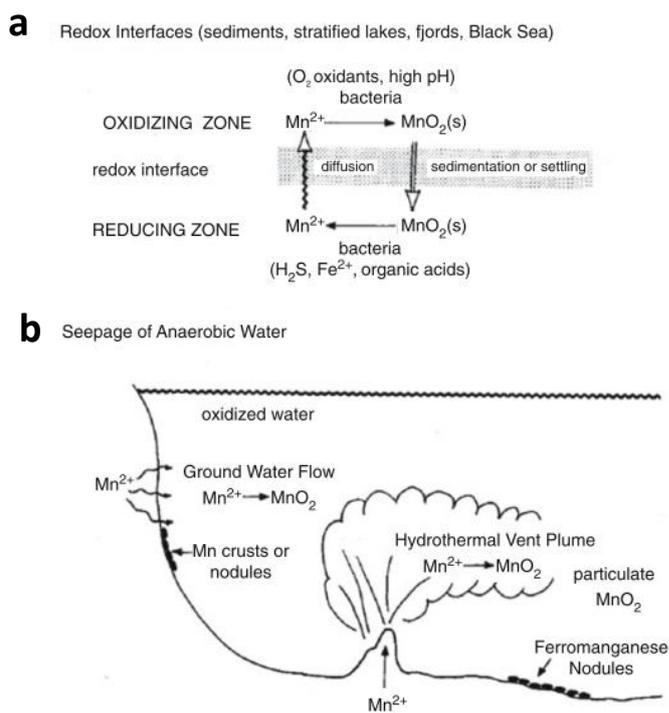


Figura 2. Hábitats de bacterias oxidadoras de manganeso. Se muestran los dos entornos generales mejor caracterizados en los que se podría esperar encontrar enriquecimiento natural de BOM. **(a)** en la conjunción de las interfaces óxica/anóxica; **(b)** ambientes anaerobios, plumas hidrotermales de aguas profundas. Tomado de Neelson *et. al.* 2006 [33].

El Mn (II) también es suministrado continuamente en ambientes anaerobios (Fig. 2b). Esto ocurre en plumas hidrotermales de aguas profundas en los cuales el Mn (II) es

introducido en las profundidades del mar o a través de aguas subterráneas [25]. En ambientes acuáticos estratificadas (Fig. 2 b), la oxidación microbiana de manganeso puede ser un proceso de gran importancia en el ciclo biogeoquímico de este elemento. Los óxidos de Mn producidos se devuelven como precipitados sólidos a los sedimentos o pueden mantenerse en forma particulada en el agua donde pueden ser utilizados para la oxidación anaeróbica de otros agentes, incluyendo Fe (II), H₂S, y materia orgánica [33].

1.3.2 Distribución filogenética

Dentro del dominio bacteria, las BOM se encuentran presentes en linajes filogenéticos divergentes tales como Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacterias (Figura 3). En Firmicutes se ha reportado la oxidación de Mn en bacterias del género *Bacillus* [35], mientras que en Proteobacterias se ha determinado esta capacidad en algunos representantes de los géneros *Pseudomonas* (γ -Proteobacteria)[36], *Leptothrix* (β -Proteobacteria) [37] y *Erythrobacter* (α -Proteobacteria) [3], [38].

También se ha descrito la capacidad de oxidar Mn en *Pedomicrobium* sp. ACM 3067 (α -Proteobacteria) que, en contraste con otras cepas que oxidan Mn en fase estacionaria, realiza la oxidación en fase logarítmica (temprana y media) [39]. Dentro de Actinobacteria los géneros *Brevibacterium* y *Rhodococcus* también se han descrito como oxidadoras de Mn [40].

A medida que se incrementan las estrategias para cultivar microorganismos oxidadores de Mn (II), un número creciente de linajes filogenéticos divergentes comienzan a ser identificados.



Figura 3. Árbol filogenético del dominio bacteria donde se muestra las bacterias oxidadoras de manganeso. Las secuencias de 16S rDNA alineadas se obtuvieron de la base de datos del Ribosomal Database Project. Las cepas oxidadoras de Mn para las que las secuencias aparecen en el RDP se muestran en negrita. Filos entre comillas se consideran como taxones de afiliación incierta y tienen pocos (si los hay) miembros cultivados. Tomada de Tebo et al 2004 [4].

1.3.3 Beneficios de los óxidos de Mn para las BOM

A pesar de que el conocimiento de la oxidación de Mn por bacterias es ya extendido, se conoce muy poco sobre el porqué de este fenómeno y de los mecanismos involucrados [41]. Sin embargo, la gran diversidad de BOM hace presumir que podría haber fundadas razones evolutivas para poseer esta habilidad.

Muchos estudios se han preguntado si estas bacterias podrían crecer con Mn (II) como fuente de energía. Dado que la reacción de oxidación de Mn (II) en presencia de O₂ ($Mn^{2+} + 1/2 O_2 + H_2O \rightarrow MnO_2 + 2H^+$) tiene como consecuencia un cambio de energía libre de 70 kJ mol⁻¹ a pH=7, en principio las bacterias podrían sostener un crecimiento quimiolitotrófico a partir de la oxidación de Mn [42]–[44]. Sin embargo, aunque la oxidación de Mn (II) a Mn (III) o Mn (IV) es termodinámicamente favorable, no existe

evidencia inequívoca que vincule directamente la oxidación de Mn (II) a la conservación de la energía.

A los óxidos de manganeso producidos por BOM se les ha atribuido funciones protectoras. Podrían proteger las células de daño ocasionado por la radiación UV o, debido a su gran capacidad de adsorción, evitar la toxicidad ocasionada por metales pesados. Se ha propuesto también que los OxMn producidos por las bacterias podrían defenderlas de la predación o de ataques virales [45].

En algunos microorganismos se ha demostrado que el Mn (II) intracelular actúa como un antioxidante, protegiendo a la célula de especies reactivas del oxígeno (ROS), tales como superóxido, incluso en células que no poseen la superóxido dismutasa [46]. La reacción de Mn (II) con superóxido puede producir óxidos de Mn (III) o Mn (IV) Esta reacción es probable que se produzca en la membrana interna, donde las ROS se producen como subproductos de la respiración. La interrogante que se plantea para las BOM que precipitan Mn extracelularmente, es si la oxidación de Mn (II) está relacionada con este “barrido” intracelular de ROS, o si las bacterias están aprovechando de una química similar para protegerse de oxidantes en el medio ambiente [47].

Se ha demostrado que los óxidos de Mn oxidan sustancias húmicas, convirtiéndolas en compuestos orgánicos con menor peso molecular que podrían servir como sustratos para el crecimiento de la bacteria [48]. Esto implica que las BOM podrían sobrevivir en ambientes con pocos nutrientes mediante la producción OxMn, que confiere a estos microorganismos la capacidad de degradar biológicamente fuentes de carbono recalcitrantes. [3]. En este sentido, las BOM pueden ser comparadas con hongos degradadores de madera, los cuales secretan peroxidasas y lacasas capaces de degradar la lignina y posteriormente por acción de enzimas que oxidan Mn se forman complejos de Mn (III), los cuales pueden subsecuentemente oxidar compuestos fenólicos [3].

1.3.4 Mecanismos bacterianos de oxidación de Mn.

La oxidación de Mn mediada por bacterias puede llevarse a cabo a través de mecanismos directos o indirectos. Los mecanismos indirectos se dan a causa de la

modificación del pH o de las condiciones redox del ambiente donde se encuentran o mediante la producción de productos de desecho que oxidan químicamente el Mn (II) [49], [50]. Ejemplos de mecanismos indirectos incluyen la producción de O₂ por bacterias fotosintéticas, y la producción y liberación de metabolitos alcalinos u oxidantes. La oxidación directa de Mn involucra la producción por parte de los microorganismos de macromoléculas específicas como polisacáridos [51]–[53] o proteínas que catalizan el proceso. En varios géneros bacterianos se ha demostrado que hay enzimas que están implicadas en la oxidación de manganeso. ([36], [37], [54]–[56]).

A pesar de la diversidad de organismos con esta capacidad, hay puntos comunes en el mecanismo de la oxidación bacteriana de Mn (II) [57]. El producto es principalmente dióxido de manganeso (IV), y la oxidación ocurre a través de dos pasos secuenciales [Mn (II) → Mn (III) → Mn (IV)] que requieren O₂ [58]. Los organismos comúnmente inician la oxidación de Mn (II) al comienzo de la fase estacionaria y depositan los óxidos en su superficie exterior [59].

Las enzimas responsables de la oxidación de Mn (II) han sido identificadas en muchas especies y se pueden dividir en dos categorías generales. La mayoría de las manganeso oxidasas estudiadas pertenecen al grupo de las multicobre oxidasas (MCO), aunque algunas hemo peroxidasas también han sido reportadas. Las MCO son una familia de proteínas caracterizadas por la presencia de sitios de unión a cobre y un mecanismo catalítico que implica la oxidación de sustratos tan diversos como el Fe (II) y la lignina, y como último paso la transferencia de electrones con la correspondiente reducción de O₂ en H₂O. La identificación de las MCO es a través de la conservación de los sitios de unión a cobre, identificados tanto a nivel de secuencia como por sus características espectroscópicas [60], [61]. Como representantes de las MCO se han identificado la enzima MofA producida por *Leptothrix* sp. [42], MnxG producida por *Bacillus* sp. [46], así como las enzimas MnxG y McoA producidas por *Pseudomonas putida* GB-1 [62]

Las manganeso oxidasas del tipo hemo peroxidasa se caracterizan por la presencia de uno o dos dominios de unión a hemo conservados y múltiples motivos de unión a Ca del tipo repeat-in-toxin (RTX), caracterizados por ser regiones ricas en aspartato y

glicina. Estos motivos se localizan hacia el carboxilo terminal respecto al dominio de unión a hemo. Dentro de las hemo peroxidasas se han identificado las enzimas MopA producidas por las α -Proteobacterias *Aurantimonas manganoxydans* SI85-9A1 y *Erythrobacter* sp. 77 SD21 [63], [64]. También se ha reportado para *Roseobacter* sp. AzwK-3b la capacidad de oxidar manganeso mediante la acción de una hemo peroxidasa. Se ha propuesto que una o más de sus hemo peroxidasas secretadas oxidan indirectamente Mn (II) a través de la producción de superóxido y la remoción de peróxido de hidrogeno [65].

Recientemente se ha identificado en *Pseudomonas putida* GB-1 la presencia de ambos mecanismos de oxidación de Mn (II), mediados por las MCO MnxG y McoA y por la hemo peroxidasa MpoA, siendo hasta el momento el único microorganismo en el que se ha reportado esta capacidad [66].

1.3.5 Aplicaciones ambientales de las BOM y los OxMn

Aunque se ha conocido por más de un siglo la existencia de microorganismos con el potencial de cambiar el estado de oxidación de metales, recientemente se ha prestado particular atención debido a que estos procesos abren una ventana hacia nuevas aplicaciones biotecnológicas. Los metales biogénicos ofrecen prometedoras e interesantes perspectivas para varias aplicaciones como la eliminación de contaminantes recalcitrantes en condiciones anaeróbicas [67], la generación de electricidad a partir de sedimentos y corrientes de aguas residuales [68], la recuperación de metales en combinación con la formación de nuevos biocatalizadores [69] y la remediación de metales contaminantes de suelos y aguas [70]. Las ventajas de los metales biogénicos son varias: no requieren químicos caros para su producción, tienen una gran superficie específica y una alta energía de unión por superficie de área, además de una fuerte capacidad oxidativa y una alta reactividad catalítica. Sumado a esto, las matrices bacterianas mejoran el contacto entre el contaminante y los metales [18].

Los OxMn son frecuentemente usados en tratamientos de aguas en sistemas de distribución para remover el manganeso y el hierro disuelto, los cuales alteran el gusto

y la coloración del agua [71]. Estos sistemas típicamente utilizan OxMn comerciales o arenas complementadas con OxMn [23]. Sin embargo, las características presentadas por los OxMn biogénicos sugiere una tendencia hacia la sustitución de los OxMn comerciales por BOM o por los óxidos producidos por estas. Se ha determinado que los OxMn biogénicos tienen una mayor área de superficie específica (98 m²/g para *Pseudomonas putida* y 224 m²/g para *Leptothrix discophora SS-1*) que los óxidos sintéticos δ -MnO₂ (58 m²/g) y el OxMn pirolusita comercial (4,7 m²/g), y consecuentemente tienen una mayor capacidad de adsorción. Los OxMn producidos por *Leptothrix discophora SS-1* absorben hasta cinco veces más Pb (II) por mol de manganeso que un óxido de Mn (IV) abiótico [72] y esta alta afinidad por el Pb (II) también se demostró en *Pseudomonas putida* MnB1 [73]. Estos últimos autores sugieren que la mayor energía de unión por unidad de superficie que presentan los óxidos biogénicos se debe a la interacción específica de los microorganismos con los óxidos de Mn, que afecta indirectamente la unión del Pb (II) [74]. Los OxMn biogénicos mostraron altas capacidades de adsorción también para Zn (II) [75], Ni (II) y Co (II), con una eficiencia en algunos casos diez veces más alta que los OxMn sintetizados químicamente [76].

Además de sus fuertes capacidades de adsorción, los OxMn también sirven como un fuerte oxidante de compuestos inorgánicos. La contaminación con arsénico del agua potable es uno de los más importantes problemas ambientales, por ejemplo en Japón, algunas regiones de USA, Argentina y Chile, entre otros [77]. El As (III) es más tóxico que el As (V) y generalmente se necesita una etapa preliminar de oxidación de As (III) a As (V) para poder removerlo mediante técnicas fisicoquímicas. Se demostró la capacidad de los OxMn biogénicos formados por *Acremonium* KR21-2 de oxidar As (III) y adsorber As (III/V) [76].

Debido a su alta reactividad, los OxMn también podrían ser utilizados para remover trazas recalcitrantes de contaminantes orgánicos en procesos de tratamiento de agua. Reactores basados en OxMn biogénicos podrían oxidar contaminantes selectos sin el alto costo energético requerido por la luz ultra violeta, técnica actualmente utilizada, o la adición de químicos peligrosos. Se ha comprobado la capacidad de los OxMn para

oxidar claritromicina, clorofenol, diclofenac, 17 α -etinilestradiol (EE2), sulfametoxazol y triclosán en biorreactores de membrana y columna a escala de laboratorio [78]–[80].

El EE2 ha demostrado ser el causante de feminización de peces machos y otros organismos acuáticos expuestos a efluentes de aguas residuales que contenían este compuesto. El potencial de los OxMn para oxidar EE2 se estudió en un reactor de flujo continuo con gránulos de MnO₂ mineral. Se logró remover el 81,7% de la actividad estrogénica y el EE2 no sólo se adsorbió sobre los gránulos de MnO₂ sino que también fue degradado a compuestos que carecían de actividad. A su vez los autores sugieren que el Mn (II) resultante fue re-oxidado microbiológicamente a Mn (IV) por la comunidad de BOM (Figura 4) [80]. La capacidad de las BOM de regenerar los óxidos dentro del reactor mejoraría los costos del proceso comparado con la regeneración abiótica [17]. Sin embargo, la regeneración biótica requiere una fuente de carbono suficiente [78] y además puede verse limitada por la presencia de otros constituyentes disueltos (por ejemplo amonio) [79].

Aunque la utilización de OxMn como una etapa del tratamiento para la eliminación de contaminantes es prometedora, su aplicación enfrenta varios retos. En primer lugar, los OxMn sólo son capaces de oxidar determinados contaminantes y por lo tanto los reactores basados OxMn deberían acoplarse a procesos de tratamiento adicionales. En segundo lugar, la velocidad de oxidación es dependiente del pH, el cual puede tener que ser ajustado a fin de mantener la tasa deseada de eliminación de contaminantes. Por último, los reactores actuales necesitarían disminuir en un factor de 10 su tamaño con el fin de ser competitivos con los procesos de oxidación basados en ozono empleados actualmente. Estos retos deben superarse antes de que los reactores en base a OxMn puedan alcanzar un amplio uso en aplicaciones de tratamiento de agua [17].

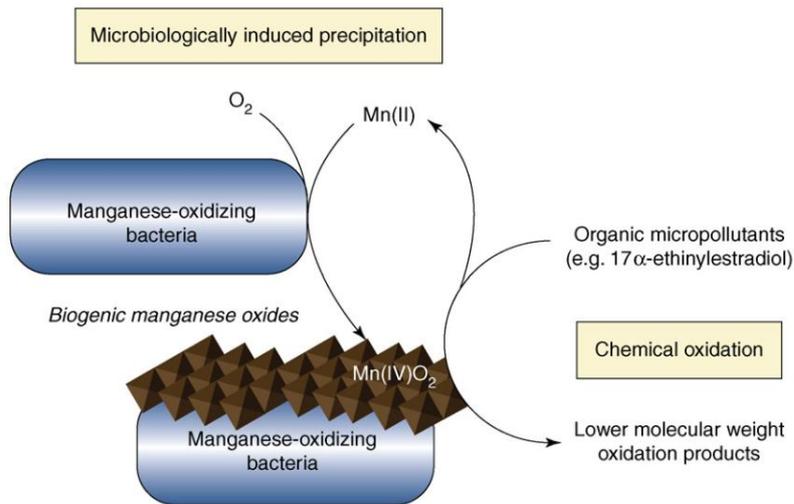


Figura 4. Esquema conceptual del modelo de oxidación de EE2 catalizada por óxidos de Mn. Las BOM son capaces de re-oxidar Mn (II), permitiendo así la re-deposición de óxidos de manganeso biogénicos. Tomado de Henebel *et. al.* 2009 [18].

1.4 Antecedentes

En el marco de un proyecto sobre el estudio de comunidades bacterianas antárticas, se colectaron muestras de diferentes ambientes incluyendo agua de lago, agua de deshielo de glaciares, sedimento, matas microbianas y rocas de la península Antártica. Con la finalidad de identificar funciones de potencial interés biotecnológico para la producción de biocombustibles se realizó una aproximación de metagenómica funcional así como una aproximación microbiológica clásica [81], [82].

A partir de una muestra de deshielo de la península Antártica se construyó una metagenoteca funcional en fósidos utilizando *Escherichia coli* EPI300 como cepa hospedera. Mediante esta aproximación se identificó un clon (denominado 18E5) que formó precipitados rojizo-amorronados en presencia de MnCl₂ (Figura 5) [83].

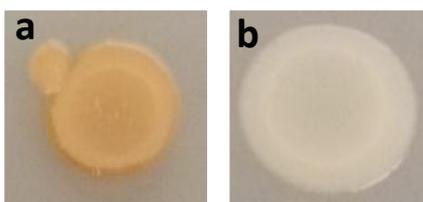


Figura 5. Identificación del clon oxidador de Mn 18E5 en medio suplementado con MnCl₂. (a) Clon positivo MnOx; (b) Clon negativo MnOx. Tomado de Ferrés *et. al.* 2015 [83].

Se confirmó que el fenotipo se debía a la presencia de óxidos de Mn según el ensayo de la Leucoberbelina (Figura 6) [84], sugiriendo que el inserto codifica para una manganeso oxidasa [81].



Figura 6. Confirmación de la actividad manganeso oxidasa (MnOx). Se muestran colonias de clones MnOx crecidas en medio sólido con el agregado de $MnCl_2$. A la colonia inferior se le agrega una gota de LBB y se observa como dicho reactivo se torna azul al contacto con la colonia. Tomado de Ferrés *et. al.* 2015 [83].

Se secuenció el fósmino completo utilizando la tecnología de secuenciación masiva Ion Torrent y se lograron ensamblar cinco contigs de 18.232 pb (C_1), 6.954 pb (C_2), 7.194 pb (C_3), 1.316 pb (C_4), y 1.472 (C_5) sumando un total de 35.168 pb. (Figura 7) [85]



Figura 7. Representación de los contigs obtenidos de la secuenciación del fósmino 18E5. Tomado de Ferrés 2015 [85].

De las 23 secuencias identificadas ninguna mostró características clásicas de MCO, la clase de enzimas más comúnmente reportada para la oxidación de Mn. Las posibles funciones encontradas, inferidas por homología de secuencia aminoacídica se muestran en la figura 8.

Dentro de las secuencias identificadas que resultaron interesantes se encuentra el ORF 1.18 el cual codificará una posible citocromo c peroxidasa. Si bien las citocromo c peroxidases no han sido reportadas como enzimas con actividad MnOx, otras hemo peroxidases sí han sido caracterizadas. Por otro lado, Caspi y colaboradores [41] demostraron la pérdida de la actividad MnOx en mutantes de *Pseudomonas putida* MnB1 incapaces de sintetizar citocromo c y que perdían por completo la actividad citocromo c oxidasa. El parecido en las reacciones de oxidación y reducción llevadas a cabo por ambos tipos de enzimas puede ser un indicio de una vía común de oxidación del Mn.

ORF	Hit	E-valor	Identidad	Score	Query- start	Query- end	Query- length	Hit- start	Hit- end	Hit- length	Descripción	clase	Homología (aa) – BLASTp	ID %
18E5_C_1.02	COG3777	4.0E-56	37	211	1	276	280	1	273	273	Proteína conservada no caracterizada	S	<i>Roseobacter litoralis</i>	68
18E5_C_1.10	COG0404	4.0E-22	35	97.6	1	149	152	233	376	379	Proteína T del sistema de clivaje de Glycina (aminometiltransferasa)	E	<i>Sediminimonas glacihouensis</i>	76
18E5_C_1.12	COG1653	1.0E-35	22	144	4	432	437	10	433	433	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente periplásmico	G	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	86
18E5_C_1.14	COG1175	1.0E-24	40	105	1	134	137	158	290	295	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente permeasa	G	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	96
18E5_C_1.15	COG3839	1.0E-127	53	448	1	343	350	1	338	338	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente ATPasa	G	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	88
18E5_C_1.18	COG1858	3.0E-37	30	149	25	360	449	37	322	364	Citocromo c peroxidasa	P	<i>Roseobacter</i> sp. CCSZ	97
18E5_C_1.23	COG2301	6.0E-47	41	181	9	264	268	1	274	283	Citrato liasa, subunidad beta	G	<i>Rhodobacteriaceae bacterium</i> HTCC2083	60
18E5_C_1.24	COG0451	2.0E-15	17	76.5	34	258	321	1	265	314	Azúcar nucleosido-difosfato epimerasa	MG	<i>Roseobacter</i> sp. CCSZ	61
18E5_C_1.27	COG0404	3.0E-19	31	86.8	1	117	118	70	187	379	Proteína T del sistema de clivaje de Glycina (aminometiltransferasa)	E	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	70
18E5_C_1.41	COG1804	6.0E-44	28	172	1	394	402	11	396	396	Predicted acyl-CoA transferases/carnitine dehydratase	C	<i>Rhodobacteriaceae bacterium</i> HTCC2083	84
18E5_C_1.50	COG0665	2.0E-40	27	160	3	360	474	29	386	387	GlicinaD-aminooxido oxidasa (deaminación)	E	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	80
18E5_C_1.50	COG0404	3.0E-14	43	73.4	388	474	474	1	68	379	Proteína T del sistema de clivaje de Glycina (aminometiltransferasa)	E	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	80
18E5_C_1.53	COG1175	4.0E-11	29	59.9	2	88	98	1	87	295	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente permeasa	G	<i>Roseovarius</i> sp. MCTG156(2b)	90
18E5_C_1.54	COG0395	3.0E-54	37	205	1	274	278	3	276	281	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente permeasa	G	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	96
18E5_C_1.69	COG0583	1.0E-20	31	93.1	12	157	200	1	145	297	Regulador transcripcional	K	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	82
18E5_C_1.76	COG0583	5.0E-29	26	122	8	298	350	1	295	297	Regulador transcripcional	K	<i>Rhodobacter</i> sp. SW2	60
18E5_C_1.92	COG4286	8.0E-70	35	257	1	301	305	2	305	306	Proteína conservada no caracterizada relacionada a la familia MYG1	S	<i>Octadecabacter arcticus</i>	84
18E5_C_2.04	COG4845	6.0E-48	36	183	8	214	219	5	213	219	Cloranfenicol O-acetiltransferasa	V	<i>Clostridium scindens</i> ATCC 35704	100
18E5_C_2.27	COG1192	1.0E-36	27	147	109	388	391	2	259	259	ATPasa involucrada en partición celular	D	<i>Escherichia coli</i> K-12	100
18E5_C_2.36	COG4974	4.0E-10	34	56.4	19	79	110	221	276	300	recombinasa sitio-especifica XerD	L	<i>Acinetobacter venetianus</i>	100
18E5_C_2.40	COG5527	2.0E-16	25	80.1	52	242	251	34	219	342	Proteína involucrada en la iniciación de la replicación plasmídica	L	<i>Escherichia coli</i> K-12	100
18E5_C_2.42	COG1475	1.0E-09	22	57.6	79	248	323	18	186	240	Regulador transcripcional	K	<i>Escherichia coli</i> K-12	100
18E5_C_5.02	COG2963	4.0E-08	26	50.6	6	108	143	1	106	116	Transposasa y derivados inactivos	L	<i>Shigella sonnei</i>	88

Figura 8. Resultados para la búsqueda de ORFs y la asignación de COG mediante el servidor WebMGA

En rojo se muestra el ORF 1.18, que codificaría para una citocromo c peroxidasa y que se planteó como el posible responsable de la actividad MnOx. Tomado de Ferrés 2015 [85].

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Dada la existencia de hemo peroxidasas capaces de llevar a cabo la oxidación de Mn y el hecho que la citocromo c peroxidasa sea una hemo peroxidasa, nuestra hipótesis de trabajo es que ésta última podría ser capaz de oxidar Mn

2.2 Objetivo general

Basándonos en los antecedentes expuestos, plateamos como objetivo general de este trabajo determinar si la citocromo c peroxidasa es responsable de la oxidación de Mn previamente identificada.

2.3 Objetivos específicos

1. Expresar la citocromo c peroxidasa de forma heteróloga en *E. coli*
2. Determinar si la cepa transformada puede oxidar Mn (II)

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material de partida

Como material de partida se utilizó la cepa *E. coli* EPI300 conteniendo el fósido 18E5, la cual presentó actividad manganeso oxidasa en un screening funcional de una biblioteca metagenómica previamente construida. La metagenoteca se creó a partir del ADN metagenómico obtenido de un charco de deshielo antártico y se utilizó el kit CopyControl™ Fosmid Library Production de Epicentre diseñado para la construcción de bibliotecas metagenómicas en fósidos. Este kit utiliza como hospedero la cepa EPI300™-T1R de *Escherichia coli* y como vector el fósido pCC1FOS. El pCC1FOS contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (Cm) como marcador de selección y dos orígenes de replicación, uno de ellos de copia única (*ori2*) y otro de multicopia (*oriV*). Este último origen de replicación requiere el producto del gen *trfA*, que está codificado en la cepa hospedera EPI300™-T1R bajo control de un promotor inducible por L-arabinosa. El sistema permite la estabilidad de los fósidos dentro de *E. coli* EPI300™-T1R en copia simple, y la posibilidad de aumentar el número de copias al inducir la expresión del gen *trfA* con arabinosa (Ara).

3.2 Mini preparación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina.

A partir de una colonia aislada de la cepa *E. coli* EPI300 + 18E5 se realizó un cultivo primario en 5 ml de LB suplementado con 12,5 µg/ml de Cm y se incubó durante 16 hs a 37 °C y 200 rpm. Se sembraron 100 µl del cultivo primario en 5 ml de LB suplementado con Cm 12,5 µg/ml y se incubó a 37° C y 200 rpm hasta alcanzar una DO_{600 nm} = 0,2 -0,3. Se indujo un aumento en el número de copias del fósido con el agregado de L-Ara 0,01% (m/V) e incubando a 37 °C y 200 rpm durante 4 hs. Una vez inducido el número de copias se purificó el fósido mediante el método de lisis alcalina.

Se cosecharon 4 ml de cultivo por centrifugación a 12.000 rpm durante 30s. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet bacteriano en 200 µl de solución I (anexo), cuya función es mantener las células en una solución isotónica y evitar la acción de ADNAsas. Para provocar la lisis celular y la desnaturalización del ADN se

agregaron 200 μ l de solución II (anexo) y se mezcló por inversión. Esta solución contiene SDS y NaOH, favoreciendo la ruptura celular y la generación de un ambiente alcalino donde el ADN liberado es desnaturalizado. Para promover la re-naturalización del ADN se neutralizó el medio con el agregado de 200 μ l de solución III (anexo). Se mezcló por inversión y se colocó en hielo por 5 min. El fundamento teórico del método se basa en que al ser el fósido un ADN relativamente pequeño y encontrarse cerrado covalentemente, al neutralizar la solución el fósido se re-naturaliza fácilmente mientras que el ADN genómico no. El ADN genómico desnaturalizado forma precipitados con las proteínas y son fácilmente separados del fósido que se mantiene en solución. Posteriormente, se realizó una extracción orgánica con 200 μ l de cloroformo y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. Se separó la fase orgánica y la interface, donde se encuentran las proteínas y el ADN, de la fase acuosa donde se encuentra el ADN fosmídico en solución. Se precipitó el ADN con 2 volúmenes de EtOH 100% y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente para deshidratar y precipitar el ADN. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ADN para eliminar sales remanentes con 500 μ l de EtOH 70% (V/V). Se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet de ADN mediante centrifugación al vacío en SpeedVac con el fin de eliminar los posibles restos de EtOH. El pellet obtenido se re-suspendió en 50 μ l de H₂O miliQ, se le agregaron 2 μ l de ARNasa (10 μ g/ml) y se incubó 15 min a 37 °C. La purificación se guardó a -20 °C.

Paralelamente se realizó la purificación del fósido con el kit comercial Quick Plasmid Miniprep Kit, Pure Link (Invitrogen). Este kit también se basa en el método de lisis alcalina. La diferencia con el protocolo anteriormente descrito radica en el método de recuperación del ADN en solución. Este kit, en lugar de precipitar el ADN utiliza una columna de sílica para recuperarlo. El ADN se adhiere a la sílica debido a la alta concentración de sales caotrópicas presente en las soluciones del kit. Posteriormente se lava la columna para remover posibles contaminantes y se eluye el ADN con una solución baja en concentración de sal.

Se comprobó la calidad y cantidad de ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa como se detalla más adelante. En esta oportunidad se sembraron 5 µl de cada una de las preparaciones plasmídicas.

3.3 Amplificación del gen que codifica para la citocromo c peroxidasa

3.3.1 Cebadores

Con el objetivo de amplificar el gen que codifica para la citocromo c peroxidasa (*citC*) se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con esta finalidad se diseñaron cebadores específicos basados en la secuencia nucleotídica del gen. Para facilitar el clonado del producto de PCR una vez obtenido, los cebadores directo y reverso fueron diseñados adicionando el sitio de reconocimiento de las enzimas de restricción NdeI y XhoI respectivamente. Se calculó la temperatura de desnaturalización (T_m) correspondiente a cada cebador mediante el programa Perl Primer V1.1.21. En la Tabla 1 se detallan las secuencias y la T_m para los cebadores diseñados.

Tabla 1. Secuencias de ácidos nucleicos y T_m de los cebadores utilizados.

Gen amplificado	Cebador	Secuencia de Ácidos Nucleicos*	T _m (°C)
citC	Directo	5'-GGAATTC CATATG CTAACAATTTACCCAAGAAG-3'	57,59
	Reverso	5'-CCG CTCGAG TTAACGCTGTTCGGTCAAC-3'	56,37
ADNr16s	27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	53,0
	1492R	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	55,0

* Para los cebadores directo y reverso se resalta en rojo el sitio de corte para las enzimas de restricción NdeI y XhoI respectivamente.

3.3.2 Puesta a punto de las condiciones de amplificación por PCR

Se puso a punto la amplificación utilizando un gradiente de temperaturas de hibridación de manera de obtener un amplicón único y del tamaño esperado (1346 pb). Se realizaron 10 condiciones de amplificación distintas en un gradiente de temperaturas de 45 °C a 55 °C, debido a que se recomienda que la temperatura de hibridación sea cinco grados menos que la T_m. Se utilizó como ADN molde el fósido

18E5 extraído previamente. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l según se muestra en la Tabla 2. El programa de PCR utilizado se detalla en la Tabla 3.

Tabla 2. Concentraciones y volúmenes de los reactivos utilizados en la reacción de amplificación.

Reactivo	Concentración en stock	Volumen (μ L)
Buffer	10x	2,5
dNTP's	0,2 mM	1
Primer directo	10 μ M	1
Primer reverso	10 μ M	1
ADN molde 18E5	20 ng/ μ l	1
Dream Taq (Thermo Fisher)	5 U/ μ l	0,125
H ₂ O	-	18,5
Total		25

Tabla 3. Condiciones de ciclado para la amplificación del gen citocromo c peroxidasa

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)	N $^{\circ}$ ciclos
Desnaturalización Inicial	95	3	1
Desnaturalización	95	0,5	30
Hibridación	45-55	0,5	30
Extensión	72	1,5	30
Extensión final	72	10	1

Como control negativo se realizó una reacción sin el agregado de ADN. Como control positivo se amplificó el gen que codifica para el ARNr de la subunidad 16S de los ribosomas (ADNr). Se utilizó en este caso los cebadores 27F y 1492R que amplifican una región de aproximadamente 1500 pb, también detallados en la Tabla 1. Como molde se utilizó un ADN genómico bacteriano disponible en el laboratorio.

En base a los resultados obtenidos se seleccionó la condición de amplificación más apropiada y con el fin de obtener un amplicón apto para realizar el posterior clonado, se realizó la amplificación utilizando la enzima Pfu polimerasa (Thermo Scientific). Esta enzima tiene actividad exonucleasa 3' a 5' (proofreading) que, a diferencia de la Taq polimerasa, da como resultado una mayor fidelidad en la amplificación. Esto es de gran interés ya que muchos errores de incorporación de nucleótidos pueden afectar la correcta expresión de la proteína. Sumado a esto la enzima Pfu genera extremos

romos que permitirá su posterior clonado en el vector pBlueScript SK (pBSK) en el sitio EcoRV.

Paralelamente se realizó la reacción de PCR en las mismas condiciones pero utilizando la cepa EPI300 18E5 como molde (PCR de colonia). Con el fin de lisar las células, se agregó una etapa previa adicional de 20 min a 95 °C. Esta etapa inicial de calentamiento provoca la liberación del plásmido de ADN de la célula, por lo que puede servir como molde para la reacción de amplificación. Luego de esta etapa se pausa el termociclador, se agrega la polimerasa y se sigue la reacción con las mismas etapas descritas en la Tabla 3.

3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Con el fin de determinar la presencia de amplicones del tamaño esperado se realizaron electroforesis en gel de agarosa 0,7% en TAE 1X (Tris-acético 0,04 M, EDTA 0,001 M, pH= 8,0). Para la visualización del ADN se utilizaron 2,5 µl de SYBR® Safe (Invitrogen) cada 50 ml de gel. Se sembró una alícuota de 5 µl de la reacción de PCR, se corrió la electroforesis a 9 V/cm y se expuso a luz ultravioleta para la visualización. El peso molecular aproximado de los fragmentos obtenidos fue determinado por comparación con el marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb ladder (Thermo Scientific).

3.5 Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR que fueron utilizados para la clonación (realizados con Pfu) fueron escindidos del gel y purificados con el kit comercial Zymoclean (Zymo Research). Debido a que los fragmentos a purificar no pueden ser irradiados con luz ultravioleta para evitar posibles alteraciones del ADN, se corrió un carril extra para poder visualizar dónde se localizaba nuestro producto de PCR y luego se recortó el gel siguiendo esta guía. Este kit de purificación utilizado provee una purificación rápida de ADN de alta calidad a partir de geles de agarosa. Contiene una solución que permite disolver la agarosa, y el ADN es recuperado mediante una columna de sílica. La elución del ADN se realizó con 50 µl de agua destilada estéril. El ADN recuperado fue cuantificado por medida de la absorbancia a 260 nm utilizando el espectrofotómetro nanodrop.

3.6 Clonado del gen *citC* en el vector pBSK

Previo al clonado del gen *citC* en el vector de expresión pET14b, se realizó un paso preliminar de clonado en el vector pBSK. El vector pBSK contiene una secuencia de sitio de clonado múltiple (MCS) y una secuencia de resistencia al antibiótico ampicilina (Figura 9). Posee la subunidad α del gen *lacZ* que permite la α complementación en una cepa adecuada, en este caso *E. coli* DH5 α . El sitio de clonado múltiple del plásmido se encuentra dentro de la subunidad α del gen *lacZ*, permitiendo verificar el correcto clonado de nuestro amplicón por la pérdida de la complementación. De esta manera, en presencia del sustrato X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido) en el medio de cultivo, las colonias con el inserto de interés serán blancas y aquellas sin inserto serán azules. Así, el vector pBSK permite detectar fácilmente la incorporación de un inserto.

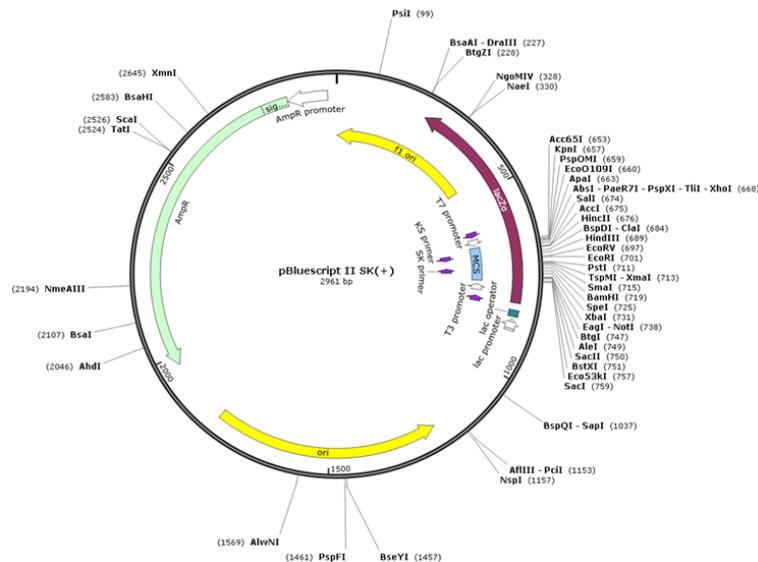


Figura 9. Mapa del vector de Clonado pBSK. En el sitio de de clonado múltiple del plásmido se encuentra una secuencia de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRV, la cual se utilizó para clonar nuestro gen de interés.

Además, facilita la posterior digestión de nuestro producto de PCR con las enzimas de restricción cuyas secuencias de reconocimiento fueron incluidas en los cebadores. Si bien se puede digerir directamente el producto de PCR con dichas enzimas, no es posible verificar la correcta digestión de ambas. En cambio, una vez clonado el

amplificón *citC* en el vector pBSK, la digestión con las enzimas de interés generará dos fragmentos de ADN fácilmente identificables en un gel de agarosa.

El vector pBSK se encontraba en una cepa de *E. coli* almacenada a -80 °C, por lo que para obtenerlo, inicialmente se realizó una mini preparación plasmídica. Se sembró un cultivo primario a partir de una colonia aislada de la cepa *E. coli* DH5α (pBSK) en 5 ml de LB suplementado con Amp 50 µg/ml durante 16 hs a 37 °C y 200 rpm, y luego se procedió de igual manera a lo descrito en el punto 3.2.

A continuación se digirió el vector pBSK con la enzima EcoRV (Thermo Scientific) incubándose a 37 °C durante 1 h con la finalidad de linealizar el plásmido, generando extremos romos que permitieran el clonado del producto de PCR. La reacción de digestión se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones y volúmenes de los reactivos para la digestión del pBSK con la enzima EcoRV

Reactivo	Concentración en stock	Volumen (µl)
EcoRV	10 U/µl	1
Buffer R	10x	2
H ₂ O	-	12
PBSK	10 ng/µl	5
Vf		20

La ligación se llevó a cabo mediante la acción de la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Scientific), incubándose 10 min a temperatura ambiente para generar el plásmido pBSK-CitC (Tabla 5). La T4 ADN ligasa cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' fosfato y el 3' hidroxilo terminal de ADN doble cadena. La enzima tiene la capacidad de reparar uniones de cadena simple de ADN, ARN o híbridos ADN/ARN.

Tabla 5. Concentraciones y volúmenes de los reactivos para la reacción de ligación del gen *citC* al vector pBSK

Reactivo	Concentración en stock	Volumen (µl)
<i>citC</i> amplificado	36 ng/µl	5
PBSK	10ng/µl	1
T4 ligasa	1 U/µl	1
Buffer T4	5X	2
H ₂ O	-	1
Vf		10

3.7 Transformación de células de *E. coli* DH5 α con el plásmido pBSK-CitC

Con la finalidad de introducir la construcción pBSK-CitC en una célula hospedera, se transformaron células *E. coli* DH5 α , previamente inducida su competencia como se describe a continuación.

3.7.1 Preparación de células competentes

Para la generación del estado de competencia se utilizó un método químico el cual altera la membrana externa celular aumentando su permeabilidad al ADN. A partir de una colonia aislada de *E. coli* DH5 α , se inocularon 5 ml de LB sin antibiótico y se incubó durante 16 hs a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente se realizó una dilución 1/100 en LB y se dejó crecer hasta una $DO_{600nm} = 0,2-0,3$. Las células se recuperaron por centrifugación a 4.500 rpm y 4 °C durante 5 min en tubos estériles previamente enfriados en hielo. Se re-suspendió el pellet bacteriano en 20 ml de $CaCl_2$ 0,1 M frío por cada 50 ml de cultivo original. Se dejó en hielo 20 min y se recuperaron las células nuevamente por centrifugación a 4.500 rpm y 4 °C durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendieron las células con 0,5 ml de $CaCl_2$ 0,1 M frío por cada 50 ml de cultivo original. Se debió tener especial cuidado pues las células en esta etapa ya están en estado de competencia y son muy susceptibles, por lo que se re-suspendió con pequeños golpeteos alternando con periodos de hielo. Las células competentes se guardaron a -80 °C en glicerol 25% (V/V) en alícuotas de 100 μ l.

3.7.2 Transformación de células competentes

Para introducir el ADN plasmídico en la cepa *E. coli* DH5 α , se utilizaron 100 μ l de las células competentes, se les agregó 1 μ l de mezcla de ligación (pBSK + *citC*) y se dejó en hielo 10 min. Se realizó un control negativo en el cual no se agregó ADN a las células, y un control positivo utilizando un plásmido cuantificado (1 ng del plásmido pUC).

Se utilizó el método de shock térmico, el cual favorece la formación de poros en la membrana que facilitarán el ingreso del ADN. Con esta finalidad, la mezcla se sometió a un golpe de calor a 42 °C durante 90s y rápidamente se colocó en hielo 2 min. Luego se agregó 1 ml de LB a cada tubo y se incubó 1 h a 37 °C con agitación para permitir a las células asimilar el ADN y expresar la resistencia al antibiótico. Se plaquearon

fracciones de 100 μl en placas de LB suplementadas con Amp 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y X-gal 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y se incubaron a 37 °C durante 16 hs.

Teniendo en cuenta las características del vector de clonado explicadas anteriormente se seleccionaron las colonias blancas resultantes de la transformación, las cuales se esperaba tuvieran el plásmido pBSK-CitC. Se verificó la presencia del inserto por PCR de colonia con los cebadores diseñados para el gen *citC* y las condiciones detalladas anteriormente.

3.8 Clonado del gen *citC* en un vector de expresión

Con la finalidad de introducir el gen *citC* en un vector de expresión, se purificó el plásmido pBSK-CitC mediante el método de lisis alcalina explicado anteriormente y se sometió a una doble digestión con las enzimas de restricción NdeI y XhoI, cuyos sitios de reconocimiento fueron adicionadas en los cebadores diseñados para amplificar el gen, tal como se detalló anteriormente. De igual manera se realizó la doble digestión del vector de expresión pET14b con las enzimas NdeI y XhoI (Thermo Fisher). Las reacciones de digestión se detallan en la Tabla 6 y fueron realizadas a 37 °C durante 1 h.

Tabla 6. Doble digestión de los plásmidos pET14b y pBSK-CitC con las enzimas de restricción NdeI y XhoI.

Reactivo	Concentración en stock	Volumen (μl)
pET14b o pBSK-CitC	50 ng/ μl	20
NdeI	10 U/ μl	1
XhoI	10 U/ μl	2
Buffer 0	10X	3
H ₂ O	-	4
Vf		30

El producto de ambas digestiones fue evaluado mediante electroforesis como se detalló anteriormente. Se sembró la totalidad de la reacción de digestión y para

purificar los fragmentos de interés se utilizó el kit comercial Zymoclean (Zymo Research) utilizando el mismo procedimiento que en 3.5.

El vector pET14b contiene un promotor T7 que puede ser reconocido por la T7 ARN polimerasa presente en cepas *E. coli* DE3, la cual es inducible por IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido). Contiene también un gen que confiere resistencia a ampicilina y una secuencia que codifica para una serie de histidinas que quedan fusionadas en el extremo N-terminal de la proteína. Esta secuencia de histidinas permite purificar la proteína recombinante utilizando una columna con una matriz que contiene Ni (II) inmovilizado (Figura 10).

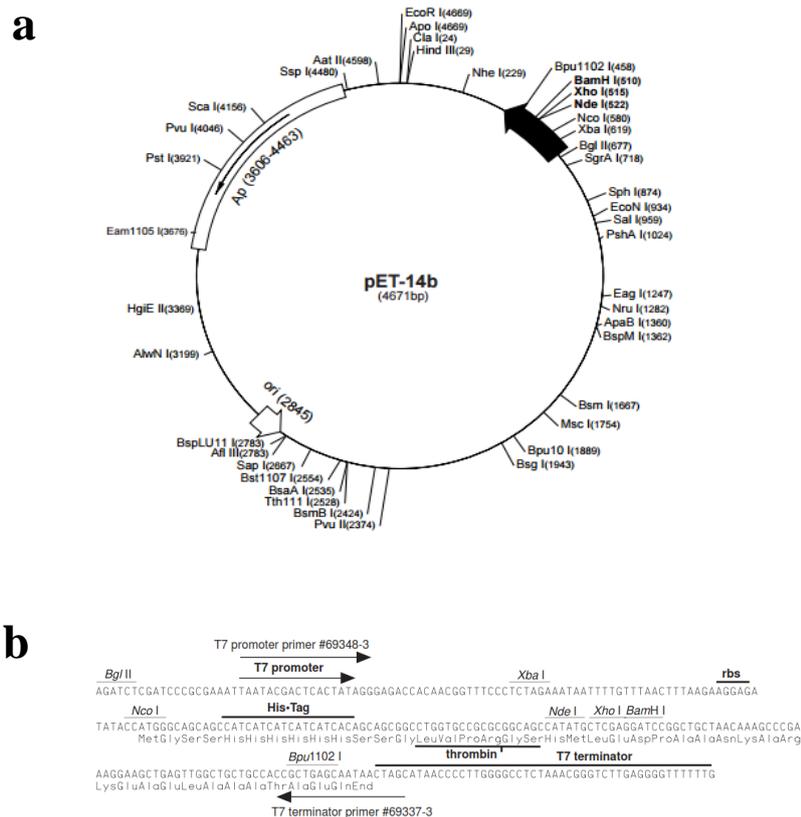


Figura 10. Mapa del vector de expresión pET14b. (a) Esquema del vector de expresión donde se puede ver en el sitio de clonado secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción NdeI y XhoI las cuales se utilizaron para realizar la clonación; (b) Esquema del sitio de clonado múltiple (MCS) ampliado.

El gen *citC* se ligó al vector pET14b mediante la acción de la enzima T4 DNA ligasa generando la construcción pET14b-CitC (Tabla 7).

Tabla 7. Ligación del gen *citC* al vector de expresión pET14b

Ligación	Concentración en stock	Volumen (μl)
<i>citC</i>	50 ng/ μl	5
pET14b	50 ng/ μl	1
T4 ligasa	1U/μl	1
Buffer T4	5X	2
H ₂ O	-	1
Vf		10

3.9 Transformación de células *E. coli* DH5α con pET14b-CitC

Con la intención de mantener nuestro plásmido recombinante pET14b-CitC en una célula hospedera, se transformaron células competentes de *E. coli* DH5α con la mezcla de ligación ya que se consideraron las células más adecuadas para este propósito. Se confirmó por PCR de colonia que las células resultantes de la transformación poseían el gen *citC*.

A partir de una colonia fresca de esta transformación se sembró un cultivo primario en LB suplementado con Amp 50 μg/ml y se incubó durante 16 hs a 37 °C y 200 rpm. Posteriormente, las células se guardaron en glicerol 25% (V/V) a -80 °C.

3.10 Transformación de células *E. coli* BL21 (DE3) pLysS con pET14b-CitC

Con la finalidad de introducir el plásmido pET14b-CitC en células capaces de expresarlo se transformaron células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS permite la expresión de proteínas con una alta eficiencia. Cualquier gen que esté bajo el control de un promotor T7 y que tenga un sitio de unión al ribosoma es susceptible de ser expresado en esta cepa. Esta cepa contiene el gen T7 del bacteriófago λ, que codifica la T7 ARN polimerasa, bajo el control de un promotor *lac* inducible por IPTG. Esta cepa también contiene el plásmido pLysS, que porta resistencia a Cm y que contiene el gen que codifica la lisozima del fago T7. La presencia de este plásmido permite reducir el nivel de expresión basal de los genes bajo el control del promotor de T7, pero no interfiere con el nivel de

expresión alcanzado después de la inducción por IPTG. Se siguieron iguales procedimientos a los explicados en 3.7.1 y 3.7.2 para la realización de células competentes y transformación de las mismas.

La transformación fue plaqueada en LB sólido con Amp 50 µg/ml y Cm 25 µg/ml y se incubaron 16 hs a 37 °C. Mediante PCR de colonia se confirmó la presencia del gen de interés (*citC*). Como control negativo se usó la cepa *E. coli* DH5α (pET14b) y como control positivo la cepa *E. coli* EPI300 (18E5). A su vez, para determinar si el inserto quedó en la orientación que se esperaba se realizó la amplificación con el cebador T7 en conjunto con el cebador reverso o con el directo de *citC*.

3.11 Secuenciación

Con la intención de corroborar la secuencia del inserto *citC* del plásmido recombinante pET14b-CitC y cerciorarse que no había ninguna mutación que pudiera afectar la expresión y actividad de la proteína, se secuenció el inserto. Se utilizó el servicio de secuenciación de MacroGen, Korea. Se secuenció en ambas direcciones utilizando los cebadores T7 directo (#69348-3) y reverso (#69337-3), con el fin de cubrir todo el gen. Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó el programa DNABaser para el ensamblado y el algoritmo BLAST del NCBI para comparar la secuencia del gen *citC* clonado en el vector de expresión con la secuencia que se encontraba en el fósido de partida.

3.12 Evaluación de la actividad MnOx en medio sólido.

Para determinar si la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (pET14b-CitC) era capaz de oxidar manganeso, se creció la misma en medio sólido LB suplementado con Amp 50 µg/ml y Cm 25 µg/ml con el agregado de 500 µM de MnCl₂ y en presencia de 0,5 mM del inductor IPTG, y se procedió a corroborar la actividad mediante el ensayo de Azul de Leucoberbelina (LBB). La LBB es un colorante orgánico sulfurado que se oxida en presencia de Mn (II) a Mn (VII), cambiando de incoloro a azul. Al agregar LBB al cultivo bacteriano, éste se torna azul en caso de existir óxidos de manganeso.

Se reveló con LBB 0,04% (m/V) en ácido acético 45 mM. Como control se utilizó la cepa BL21 (DE3) pLysS conteniendo el plásmido pET14b sin inserto.

3.13 Expresión heteróloga de la proteína CitC recombinante

3.13.1 Inducción de la expresión de CitC a pequeña escala

Para comprobar que la proteína se estaba expresando, inicialmente se realizó un ensayo a pequeña escala.

A partir de una colonia aislada de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (pET14b-CitC), se inocularon 5ml de LB suplementado con Amp 50 µg/ml y Cm 25 µg/ml y se incubó a 37 °C durante 16 hs a 200 rpm. Se utilizó como control negativo la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (pET14b) la cual se incubó en las mismas condiciones.

Se tomaron 100 µl del cultivo primario y se realizó un cultivo secundario inoculando 5 ml de LB suplementado con Amp 50 µg/ml y Cm 25 µg/ml con 100 µl del cultivo primario. Se dejó crecer a 37 °C con agitación a 200 rpm hasta llegar a una $DO_{600} = 0,5-0,7$. Posteriormente se ensayaron dos condiciones distintas de inducción tanto para la cepa conteniendo el plásmido pET14b-CitC como para el control: inducción con 0,5 mM de IPTG y 500 µM de $MnCl_2$; e inducción con 0,5 mM de IPTG. La inducción se realizó durante 2 hs a 30 °C.

Para determinar la sobre-expresión de la proteína recombinante se tomaron alícuotas de 1 ml del cultivo previo a la inducción (T0) y luego de las dos horas de inducción (T2). Los cultivos se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos y los pellets bacterianos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis. Las distintas muestras fueron sometidas a una electroforesis de proteínas en geles de poli-acrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

3.13.2 Electroforesis de proteínas por SDS- PAGE

Para evaluar los ensayos de expresión de proteínas se utilizó electroforesis en geles de poli-acrilamida en condiciones desnaturizantes. El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que desnaturiza las proteínas alterando su estructura secundaria y terciaria. Confiere además una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa, por lo que luego pueden ser separadas en un campo eléctrico según su peso molecular. Se utilizaron geles discontinuos, compuestos por un gel concentrador y un gel separador (anexo). Como agentes polimerizantes se utilizó

persulfato de amonio (APS) y N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED). Para la preparación de las muestras se re-suspendieron los pellets bacterianos con el buffer de carga (anexo) y se incubaron 5 min a 100 °C. Se sembraron 15 µl de muestra y se corrieron a 30 mA en buffer de corrida (anexo).

Finalmente, los geles fueron teñidos durante 2 hs con la solución de teñido (anexo) que contiene el colorante Azul de Coomassie, el cual forma complejos no covalentes con las proteínas. Su incorporación es proporcional a la cantidad de proteína, permitiendo detectar bandas de al menos 100 ng de proteína. Posteriormente se destiñeron los geles durante 2 hs con solución de desteñido (anexo). El tamaño de la proteína se estimó en comparación con un estándar de peso molecular que se detalla en cada caso, sembrándose 10 µl del mismo en cada gel.

3.13.3 Inducción de la expresión de CitC a mayor escala

Con el fin de inducir la proteína a mayor escala para poder posteriormente purificarla, se sembró un cultivo primario a partir de una placa fresca de la cepa BL21 (DE3) pLysS+pET14b-CitC en 5 ml de LB líquido suplementado con Amp 50 µg/ml y Cm 25 µg/ml, y se incubó durante 16 hs a 37 °C y agitación a 200 rpm. Posteriormente se inocularon matraces de 750 ml de medio líquido 2XTY (anexo) + Amp 50 µg/ml + Cm 25 µg/ml con 3,75 ml del cultivo primario. Se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta llegar a una $DO_{600} = 0,5- 0,7$ (aproximadamente a las 4 hs). Posteriormente se incubó el cultivo 15 minutos en hielo y se le agregaron 20 ml de etanol 95%. De esta manera detenemos el crecimiento bacteriano y favorecemos que la maquinaria celular se concentre en la producción de proteínas. A continuación se indujo la expresión de la proteína recombinante con 0,5 mM de IPTG. Se ensayaron distintas condiciones de temperatura para la inducción, así como en presencia o ausencia de hemina en el medio. Se agregaron condiciones con hemina basándose en que la proteína CitC tiene dos grupos hemo y con la hipótesis de que la hemina favoreciera el mejor plegamiento y mejor actividad de la proteína. Se indujeron cultivos de 250 ml en las seis condiciones que se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Diferentes condiciones de inducción ensayadas.

Condición	Descripción
1	BL21 pET14b-CitC + IPTG 0,5mM + Hem 0,1 mM a 12 °C
2	BL21 pET14b-CitC + IPTG 0,5mM + Hem 0,1 mM a 25 °C
3	BL21 pET14b-CitC + IPTG 0,5mM + Hem 0,1 mM a 30 °C
4	BL21 pET14b-CitC + IPTG 0,5mM a 12 °C
5	BL21 pET14b-CitC + IPTG 0,5mM a 25 °C
6	BL21 pET14b-CitC + IPTG 0,5mM a 30 °C

Se tomaron alícuotas de 1 ml los cultivos previo a la inducción (T0) y a las 2 hs (T2) y 4 hs de inducido (T4). Se centrifugaron las alícuotas a 4.000 rpm durante 5 minutos y los pellets bacterianos se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis. Luego de las cuatro horas de inducción, los cultivos se centrifugaron a 4.000 rpm durante 30 minutos, se secó el pellet y se guardó a -80 °C.

Para confirmar que se produjo la inducción de la proteína recombinante, las distintas muestras fueron sometidas a SDS-PAGE como se detalló anteriormente.

3.14 Localización celular de la proteína recombinante

3.14.1 Obtención de la fracción soluble e insoluble

Con el fin de determinar si la proteína recombinante se encontraban en la fracción soluble o en la fracción insoluble, se procedió a preparar los extractos celulares mediante disrupción mecánica de la membrana utilizando una prensa de French. Se re-suspendieron los pellets celulares en 15 ml de buffer de unión (anexo) con el agregado de 75 µl de una solución 200 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) en EtOH 95%. El PMSF es un inhibidor de proteasas que evita la degradación de proteínas una vez que la célula se rompe. Para romper las células se pasaron las muestras tres veces por la prensa de French utilizando una presión de 1500 Psi. Posteriormente, se agregaron 150 µl de Tritón X-100 por cada 15 ml de extracto total. El Tritón X-100 es un detergente suave que favorece la solubilización de proteínas. Se tomó una alícuota de 200 µl del extracto total y se guardó a -20 °C para posteriormente evaluar mediante

SDS-PAGE. Los extractos totales se centrifugaron a 12.000 rpm por 30 minutos, y el sobrenadante se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. El sobrenadante conteniendo la fracción proteica soluble se guardó a -20 °C hasta su posterior uso. También se guardaron los pellets conteniendo la fracción insoluble para evaluar por SDS-PAGE junto con el extracto total y la fracción soluble.

Se realizó un SDS-PAGE en iguales condiciones a las explicadas para el punto 3.13.2.

4 RESULTADOS

En la figura 11 se muestra un esquema con la aproximación metodológica utilizada en este trabajo.

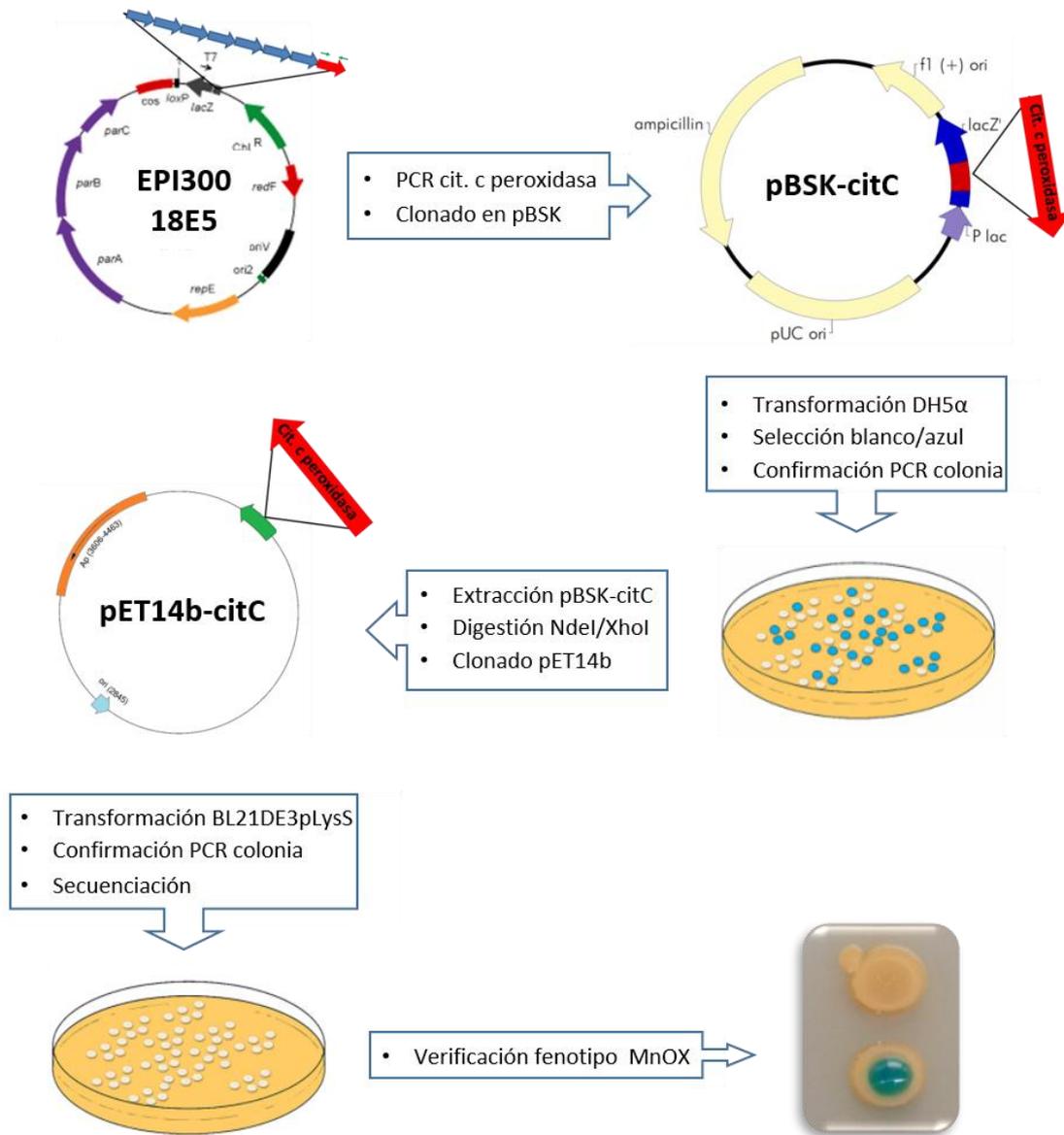


Figura 11. Esquema de la estrategia metodológica utilizada. A partir del fósforo 18E5 purificado se amplificó el gen *citC* mediante PCR y se ligó en el vector pBSK, obteniéndose el plásmido pBSK-CitC. Se transformaron células competentes DH5α con pBSK-CitC, se seleccionaron las colonias blancas y se confirmó la presencia del inserto por PCR. Se digirió el plásmido pBSK-CitC con las enzimas NdeI/XhoI y se clonó en el vector de expresión pET14b generando el plásmido pET14b-CitC. Se transformaron células competentes de BL21 (DE3) pLysS con pET14b-CitC y se confirmó mediante PCR. Se evaluó la actividad manganosa oxidada mediante el ensayo de LBB.

4.1 Extracción del fósforo 18E5

A partir de la cepa *E. coli* EPI300 + 18E5, se extrajo el fósforo 18E5 conteniendo el gen de la citocromo c peroxidasa mediante el método de lisis alcalina y mediante la utilización de un kit, de manera de comparar los resultados de las dos técnicas.

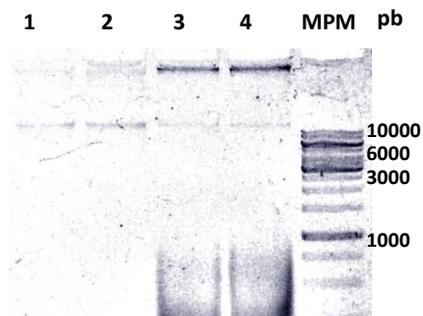


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa del fósforo 18E5. Carril 1 y 2: extracción con kit comercial; Carril 3 y 4: extracción según protocolo de lisis alcalina; MPM: Marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb.

Como se muestra en la figura 12, fue posible aislar el fósforo 18E5 mediante las distintas extracciones plasmídicas. Se evidencian dos bandas de alto peso molecular en los 4 carriles que posiblemente corresponden a las conformaciones relajada y súper-enrollada del fósforo. Ambas conformaciones se ubican por encima de la banda de 10 Kb del marcador de peso molecular, lo que concuerda con lo esperado para el fósforo 18E5 el cual tiene un tamaño de aproximadamente 35 Kb. En las extracciones plasmídicas realizadas por el método de lisis alcalina se observa una mancha difusa de bajo peso molecular que posiblemente corresponda con la presencia de ARN. Esto sugiere que, si bien se utilizó RNAsa en la extracción, la cantidad utilizada no fue suficiente para degradar el ARN por completo.

4.2 Amplificación del gen que codifica para la citocromo C peroxidasa

Utilizando el fósforo 18E5 como molde se amplificó el gen *citC* mediante PCR utilizando los cebadores específicos diseñados y un gradiente de temperaturas. Se obtuvo un amplicón de aproximadamente el tamaño esperado (1346 pb) en las diez condiciones de temperatura de hibridación ensayadas (datos no mostrados). En base a estos resultados utilizamos 55 °C como temperatura de hibridación porque al utilizar la

temperatura de hibridación más alta reducimos la posibilidad de amplificaciones inespecíficas.

La figura 13 muestra los productos de amplificación del gen citocromo c peroxidasa realizada con la enzima Pfu con el fin de asegurarnos mayor fidelidad en la amplificación. Se pueden observar en el carril 1 y 2 las amplificaciones del gen *citC* realizadas por PCR de colonia o utilizando como molde el ADN del fósforo 18E5, respectivamente. El control positivo presenta una banda del tamaño esperado (1465 pb) correspondiente al gen que codifica para el ARNr de la subunidad 16S utilizando los cebadores detallados en materiales y métodos.

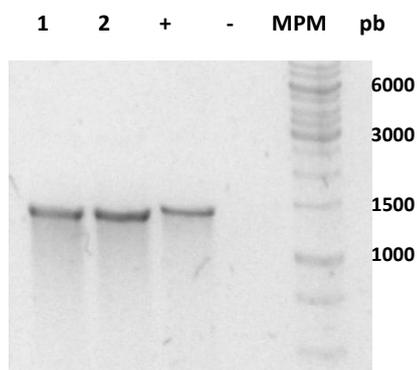


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación del gen citocromo c peroxidasa. Carril 1: Amplificación por PCR de colonia; Carril 2: Amplificación utilizando como ADN molde el fósforo 18E5; Carril 3: Control Positivo (16S ADNr), utilizando los cebadores 1492R y 27F ; Carril 4: Control Negativo, sin ADN; Carril 5: Marcador de peso molecular, GenRuler 1Kb.

4.3 Construcción del plásmido pBSK-CitC

La banda correspondiente al gen *citc* fue escindida del gel, purificada y clonada en el vector pBSK, el cual anteriormente fue digerido con EcoRV y purificado a partir del gel (datos no mostrados). Se generó de esta manera el plásmido pBSK-CitC, se transformaron células DH5 α y se seleccionaron las colonias blancas, posibles clones con el inserto de interés. Se detectaron dos colonias blancas en un total de 126 colonias, las cuales fueron sometidas a PCR de colonia para comprobar si presentaban el gen de interés. Como se muestra en la figura 14, solo en una de las dos colonias blancas (colonia 2) se logró amplificar el gen *citC*. La banda presentó el mismo tamaño que el control positivo (PCR de colonia de la cepa EPI300 18E5). Si bien en el carril 1 se observa una banda muy tenue del tamaño esperado, la misma banda se observa también en el control negativo. Dado que el control negativo no contiene ADN molde,

si bien esta amplificación podría deberse a una contaminación, lo más probable es que se deba a la difusión de los productos de los pocillos de al lado en el momento de sembrar el gel.

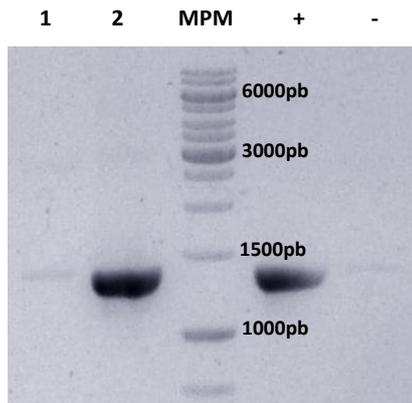


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la confirmación de la construcción pBSK-CitC mediante PCR de colonia. Carril 1: Colonia Blanca 1; Carril 2: Colonia Blanca 2; Carril 3: Marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb; Carril 4 Control Positivo: EPI300 18E5; Carril 5 Control Negativo: DH5α.

Adicionalmente se realizó la extracción del plásmido pBSK-CitC de ambas colonias y se corrió una electroforesis en gel de agarosa para visualizar el plásmido y compararlo con el pBSK sin inserto. Como se muestra en la figura 15, el plásmido obtenido a partir de la colonia 2 (carril 2), que había amplificado el gen *citC* en la PCR de colonia, tiene un mayor peso molecular que el control del plásmido pBSK. Esto sugiere que el plásmido obtenido de la colonia 1 contiene un inserto de ADN. Por otro lado, el plásmido obtenido de la colonia 1 (carril 1) presentó un perfil distinto al de la colonia 2 y al del control pBSK, que sugiere un peso molecular similar o aún menor al control.

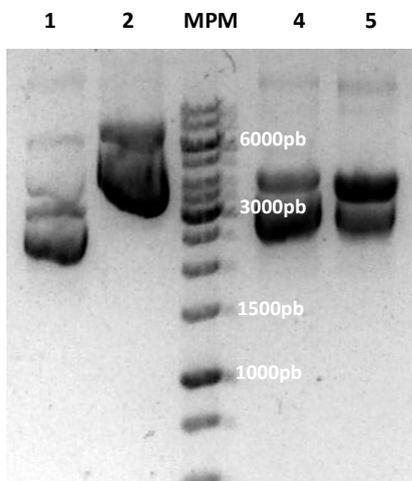


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de la preparación plasmídica de pBSK-CitC. Carril 1: Purificación plasmídica de la colonia blanca 1; Carril 2: Purificación plasmídica de la colonia blanca 2; Carril 3: Marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb; Carril 4 y 5: Control plásmido pBSK.

En base a estos los resultados mostrados en las figuras 14 y 15, se continuó trabajando con la colonia 2 y el plásmido pBSK-CitC obtenido a partir de ésta.

4.4 Construcción del plásmido pET14b-CitC

Dado que los cebadores para la amplificación del gen fueron diseñados con sitios de reconocimiento para las enzimas NdeI y XhoI, el plásmido pBSK-CitC fue digerido con ambas enzimas, obteniéndose dos bandas, una del tamaño del gen *citC* (1346pb) y una banda de aproximadamente 3 Kb correspondiente al vector pBSK (datos no mostrados).

Por otro lado, el vector de expresión pET14b fue digerido con las mismas enzimas que el gen. Como se muestra en la figura 16, se observa en el carril 1 una banda de aproximadamente 4600 pb correspondiente a la conformación lineal del vector pET14b, sugiriendo una correcta digestión. Como control se corrió el pET14b sin digerir donde se puede observar que éste corre con distintas conformaciones (carril 2).

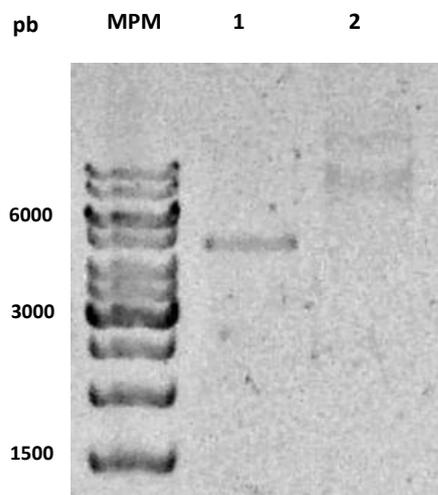


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de la doble digestión del vector pET14b con NdeI y XhoI. MPM: Marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb; Carril 1: Vector de expresión pET14b digerido; Carril 2: Vector de expresión pET14b.

Tanto el gen *citC* como el vector pET14b digeridos con las enzimas NdeI y XhoI fueron escindidos del gel, purificados y ligados para obtener la construcción pET14b-CitC. Se transformaron células DH5 α con el plásmido pET14b-CitC y se comprobó la presencia del gen *citC* mediante PCR de colonia (datos no mostrados). Se obtuvieron dos colonias positivas de 72 colonias analizadas. Esto podría deberse a que el paso de la doble

digestión no hubiese sido completamente exitoso y que algunos plásmidos se digirieran sólo con una de las dos enzimas (NdeI o XhoI), por lo cual en el paso de ligación el vector se podría haber auto ligado. Por lo tanto al transformar las células las mismas adquirieron resistencia a Amp dada por el pET14b auto ligado sin haberse éste ligado al gen *citC*.

Posteriormente se realizó la extracción del plásmido pET14b-CitC y se corrió una electroforesis en gel de agarosa para compararlo con el pET14b sin inserto. Como se muestra en la figura 17, la construcción pET14b-CitC (dos clones diferentes, carriles 1 y 2) presentan un mayor peso molecular que el plásmido pET14b (carril 3), sugiriendo que la ligación fue realizada con éxito.

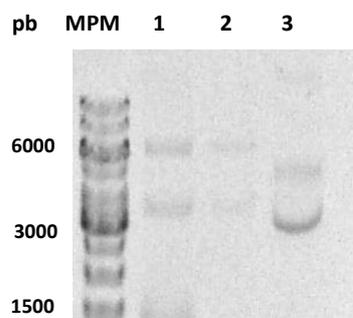


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa de la preparación plasmídica de pET14b-CitC. MPM: Marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb; Carril 1 y 2: pET14b-CitC; Carril 3: Control vector de expresión pET14b.

Se transformaron células *E. coli* BL21(DE3)pLysS con el plásmido pET14b-CitC, se seleccionaron 8 colonias y se realizó PCR de colonia para comprobar la presencia del gen *citC* en las mismas. Como se muestra en la figura 18, las 8 colonias dieron un amplicón del tamaño esperado confirmando la presencia del gen de interés. Como resultado todas las colonias amplificadas dieron positivo.

Se seleccionó una de las colonias para seguir trabajando. Se secuenció el gen *citC* utilizando el servicio Macrogen, Korea. Luego de ensamblar las secuencias obtenidas con el programa DNABaser se comparó la secuencia utilizando el algoritmo BLAST del NCBI, mostrando un 100% de identidad con la secuencia que se encontraba en el fósido 18E5.

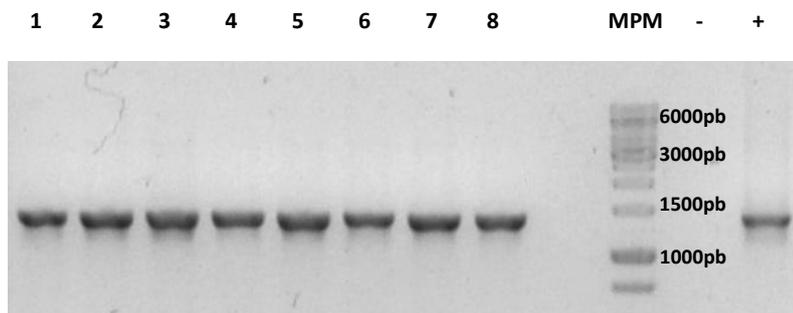


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones obtenidos mediante PCR de colonia. Carriles 1-8: colonias obtenidas en la transformación de *E. coli* BL21(DE3)pLysS con el plásmido pET14b-CitC; MPM: marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb; (-) control negativo DH5 α ; (+) control positivo *E. coli* EPI300+18E5.

4.5 Evaluación de la actividad MnOx en medio sólido.

Para determinar si la enzima citocromo c peroxidasa es la responsable del fenotipo de oxidación de manganeso previamente observado en el fósido 18E5, se evaluó la capacidad de la cepa recombinante *E. coli* BL21(DE3)pLys (pET14b-CitC) de oxidar manganeso. Se sembró la cepa en medio sólido LB con el agregado de 500 μ M de MnCl₂ y en presencia del inductor IPTG, y se incubó a 37 °C durante 16 hs. Las colonias no presentaron la coloración rojiza-amarronada característica de la formación de óxidos de manganeso (datos no mostrados). Posteriormente se sometieron las colonias al ensayo de Azul de Leucoberbelina (LBB). Este sustrato es muy sensible a la presencia de óxidos de manganeso y permite evidenciarlos en condiciones donde a simple vista no se detecta la coloración marrón. El resultado no fue positivo, no detectándose color azul al agregar LBB sobre las colonias (datos no mostrados). Para descartar la posibilidad de que el hecho de no evidenciar un fenotipo de oxidación de manganeso se deba a que la proteína recombinante no se expresa en nuestro sistema, evaluamos su presencia en células totales y en extractos celulares.

4.6 Expresión de la proteína

Para comprobar que la proteína se estaba sobre-expresando en nuestra construcción, se prosiguió a inducir la expresión de la proteína en medio líquido, evaluando distintas condiciones. Se realizó un ensayo de inducción a pequeña escala y otro a gran escala.

4.6.1 Ensayo a pequeña escala

En este ensayo se trabajó con pequeños volúmenes de cultivo (5 ml). Se evaluó mediante SDS-PAGE el perfil de proteínas totales en las distintas condiciones ensayadas. Como se muestra en la figura 19, en la cepa *E. coli* BL21(DE3)pLysS (pET14b-CitC) se observa una banda intensa de aproximadamente 50 kDa a las 2 horas de inducción con IPTG ya sea en presencia (carril 1) o en ausencia (carril 2) de MnCl₂. Como se observa en el carril 3, esta banda no está presente o está presente en muy baja cantidad previo a la inducción, siendo el perfil de proteínas totales muy similar al observado en el control [*E. coli* BL21(DE3)pLysS (pET14b)] previo a la inducción (carril 6). Se puede observar para el control que luego de la dos horas de inducción para ambas condiciones (carriles 4 y 5), no se observa la sobre-expresión de una proteína del tamaño esperado para CitC.

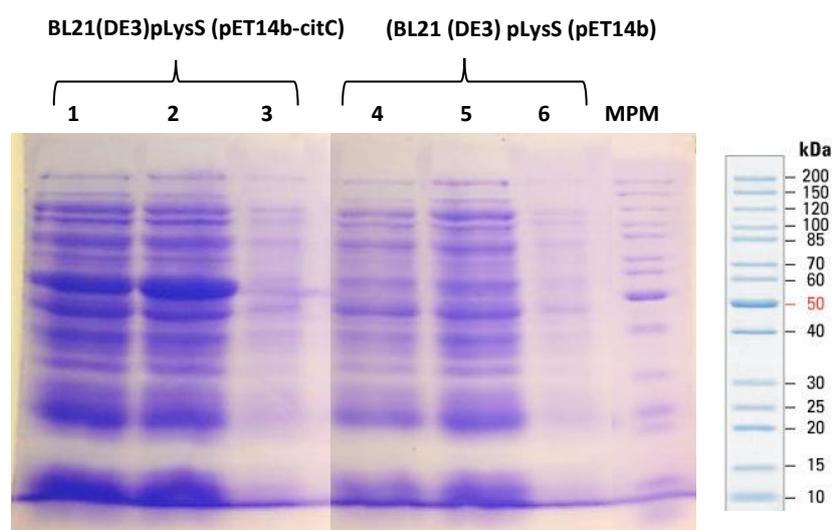


Figura 19. SDS PAGE de proteínas totales de la inducción de la expresión de la proteína CitC a pequeña escala. Carriles 1, 2 y 3: células conteniendo el vector pET14b-CitC a las dos horas de inducción con IPTG y MnCl₂ (carril 1), con IPTG (carril 2) o sin inducir (carril 3); Carriles 4, 5 y 6: controles de células conteniendo el vector control pET14b a las dos horas de inducción con IPTG y MnCl₂ (carril 4), con IPTG (carril 5) o sin inducir (carril 6); MPM: Marcador PageRuler™ Unstained Protein Ladder 26614 (TermoFisher).

Un análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la citocromo c peroxidasa, de 449 aminoácidos, predijo un peso molecular de aproximadamente 48,06 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 5,09. Mediante esta aproximación se detectó una banda sobre-expresada de aproximadamente el tamaño esperado para CitC en las células

conteniendo el vector pET14b-CitC (carriles 1 y 2), tanto para la condición con IPTG como para IPTG+ MnCl₂.

4.6.2 Ensayo a mayor escala

Posteriormente a estos resultados se realizó la inducción de la proteína a mayor escala en distintas condiciones de temperatura (12 °C, 25 °C y 30 °C) con hemina (Figura 20) y sin hemina (Figura 21). Como se muestra en ambas figuras, a las 2 hs y 4 hs de inducción (T2 y T4) hay una sobre expresión de una proteína de aproximadamente el tamaño esperado para CitC para las condiciones 25 °C y 30 °C al comparar con el perfil de proteínas totales previo a la inducción (T0). Para la condición de 12 °C tanto con hemina como sin hemina no se observa ninguna proteína sobre-expresada del tamaño esperado.

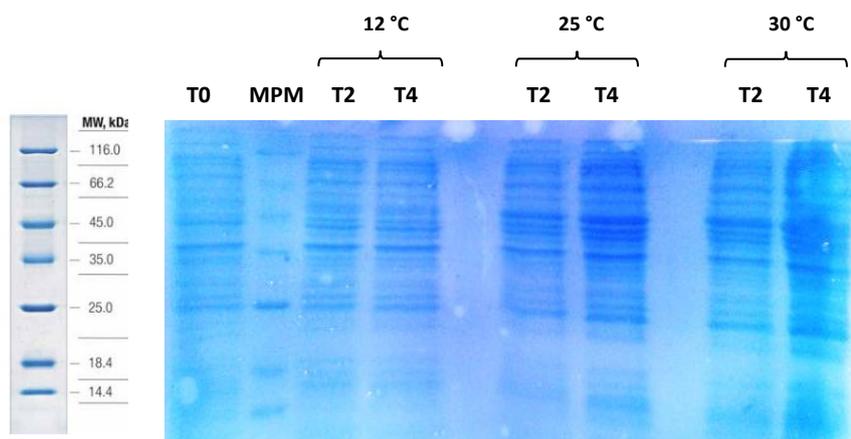


Figura 20. Inducción de la proteína en presencia de hemina. T0: cultivo previo a la inducción; T2: 2 hs de inducción y T4: 4 hs de inducción para las condiciones 12°C, 25°C y 30°C. MPM: Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 (Fermentas).

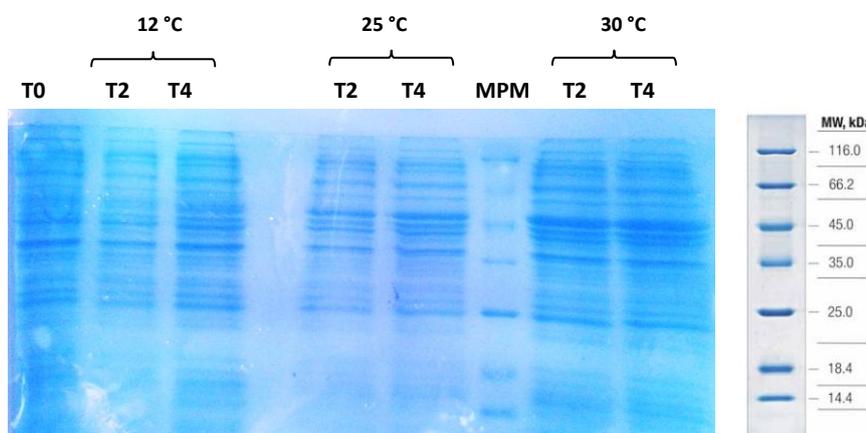


Figura 21. Inducción de la proteína en ausencia de hemina. T0: cultivo previo a la inducción; T2: 2 hs de inducción y T4: 4 hs de inducción para las condiciones 12°C, 25°C y 30°C. MPM: Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 (Fermentas).

Si bien las condiciones de inducción a 25 °C y 30 °C fueron donde se observó mayor sobre-expresión de la proteína CitC, se continuó trabajando únicamente con las células inducidas a 25 °C. Dado que la proteína CitC proviene de un ambiente frío, esperamos que una menor temperatura favorezca el correcto plegamiento de la proteína.

4.7 Obtención de extractos solubles e insolubles

Se obtuvieron los extractos celulares a partir de los pellets almacenados a -80 °C para evaluar dónde se ubicaba la proteína dentro de la célula. Los extractos celulares totales fueron centrifugados de manera de separar la fracción soluble (sobrenadante) de la fracción insoluble (pellet). En la figura 22, se muestran los resultados obtenidos para ambas condiciones de inducción a 25 °C (con hemina y sin hemina), donde se puede ver una gran banda del tamaño aproximado de la proteína (48,06 kDa) en los carriles 3 y 4. Éstos corresponden al primer pellet, indicando que la mayor parte de la proteína se encuentra en la fracción insoluble. Para los carriles 5 y 6 donde se corrió el sobrenadante, y por lo tanto se observan las proteínas que se encuentran en la fracción soluble, no se detecta ninguna banda sobre-representada del peso de la proteína de interés.

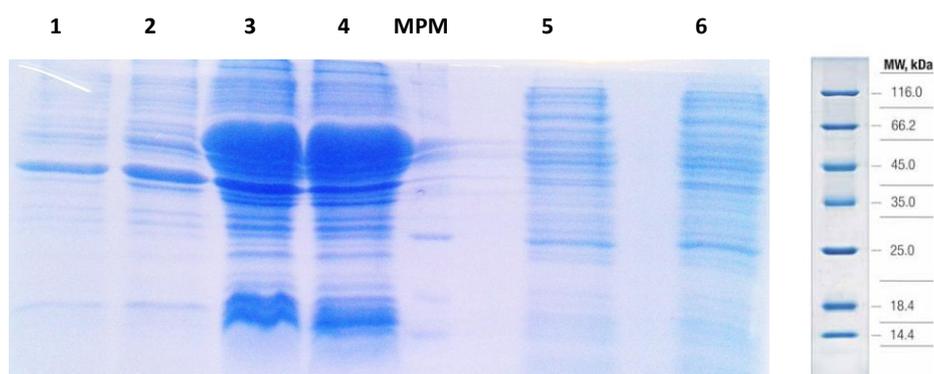


Figura 22. Extractos celulares solubles e insolubles. Carril 1 y 2: 2° pellet para las condiciones IPTG e IPTG + Hem, respectivamente; Carril 3 y 4: 1° pellet para las condiciones IPTG e IPTG + Hem, respectivamente; Carril 5 y 6: Fracción soluble para las condiciones IPTG e IPTG + Hem, respectivamente. MPM: Unstained Protein Molecular Weight Marker #SM0431 (Fermentas).

5 DISCUSIÓN

El punto de partida del presente trabajo fue el clon *E. coli* EPI300 + 18E5 de una metagenoteca funcional, en el cual se detectó la capacidad de oxidar manganeso. Se propuso estudiar la participación del gen citocromo c peroxidasa incluido en el fósido 18E5, en la actividad manganeso oxidasa observada en dicho clon.

Siguiendo con lo que nos planteamos en la estrategia metodológica, se logró clonar el gen de interés en el vector de expresión pET14b e introducirlo en una cepa diseñada para la expresión de proteínas recombinantes, *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

Al momento de la amplificación se procuró disminuir al máximo los posibles errores de incorporación de nucleótidos que pudieran afectar luego la correcta amplificación de la proteína. Por lo tanto se utilizó la enzima Pfu, la cual tiene actividad exonucleasa 3' a 5' que asegura mayor fidelidad en la amplificación. Al secuenciar y analizar la secuencia clonada en el vector pET14b, se determinó una identidad del 100% con la secuencia de la citocromo c peroxidasa presente en el fósido 18E5.

Se prosiguió a comprobar la actividad MnOx en medio sólido en las mismas condiciones que se habían ensayado para el clon de la metagenoteca (en presencia de 500 μ M de MnCl₂), y en este caso en presencia del inductor IPTG. El resultado no fue el esperado, no detectándose los precipitados rojizo-amarronado característicos de la presencia de óxidos de manganeso en la superficie celular. Tampoco se observó un cambio al color azul al aplicar el sustrato LBB a las colonias. La pregunta que nos hicimos entonces fue si la proteína realmente se estaba expresando.

Con los ensayos de inducción de la expresión de la proteína se pudo confirmar la sobre-expresión de una proteína de aproximadamente el tamaño esperado, siendo óptima a los 25 °C y 30 °C. Con esto se reafirmó que los procedimientos realizados hasta el momento tanto para el clonado como para la expresión de la proteína se habían realizado con éxito.

Basándonos en trabajos previos, se esperaba que la citocromo c peroxidasa fuera una proteína periplásmica. Mediante la utilización del servidor PrediSi se predijo un péptido señal de exportación hacia el periplasma, lo cual concuerda con proteínas homologas reportadas [85]. Se planteó la posibilidad de que si bien la proteína se estaba expresando, por algún motivo no lograba llegar al periplasma, donde esperábamos fuera funcional. Una explicación posible sería que al hacer una fusión N-terminal con His- Tag en pET-14b, la secuencia señal N- terminal propia de CitC ya no puede ser reconocida por la maquinaria de translocación.

Para determinar en qué fracción celular, soluble o insoluble, se encontraba la proteína recombinante se obtuvieron los extractos celulares de manera de separar las distintas fracciones. Estos ensayos revelaron que la mayor parte de la proteína se encontraba en la fracción insoluble.

E. coli es uno de los sistemas celulares hospederos más utilizados para la expresión heterologa de proteínas recombinantes. Presenta muchas ventajas como su rápida tasa de crecimiento y un gran número de herramientas disponibles para aplicaciones biotecnológicas [86]. La secuencia aminoacídica de la citocromo c peroxidasa presentó 77% de identidad con *Roseobacter sp* CCS2, una bacteria gram negativa con un contenido GC de 55%. Dado que *E. coli* también es gram negativa y con un contenido GC similar (50,8 % para BL21 (DE3)) en un principio se esperaba que esta cepa fuera un buen hospedero para expresar la citocromo c peroxidasa.

E.coli carece de la maquinaria necesaria para realizar algunas modificaciones post-traduccionales y una baja eficiencia para la formación de puentes disulfuros. Muchas veces la falta de estas modificaciones puede afectar al correcto plegamiento, expresión y función de la proteína ([87], [88]). La solubilidad de la citocromo c peroxidasa recombinante podría depender de alguna de estas modificaciones. Generalmente las proteínas que no son capaces de plegarse correctamente o que resultan tóxicas para la célula se acumulan en forma insoluble en cuerpos de inclusión, que son agregados proteicos intracelulares. Estos agregados están compuestos principalmente de proteína foránea, desnaturalizada y su solubilización suele ser muy compleja [89]. Es

muy probable que la citocromo c peroxidasa recombinante, que se encuentra mayoritariamente en la fracción insoluble, forme este tipo de agregados.

Debido a que se logró sobre-expresar gran cantidad de proteína pero la gran mayoría en forma insoluble se podrían ensayar métodos de optimización de la expresión de la proteína para intentar obtenerla en la fracción soluble. Esto involucraría variar la temperatura, la tasa de expresión, el metabolismo del hospedero o la co-expresión con chaperonas [88]. Otras variantes podrían ser transformar con el vector pET14b-CitC otras cepas bacterianas para expresar la proteína recombinante o también se podría utilizar otros vectores de expresión que poseen señales de exportación al periplasma. Ya ha sido reportado la utilización de *E. coli* como hospedero para expresar la citocromo c peroxidasa de forma soluble [90], [91]. Para el caso de *Rhodobacter* se ensayaron distintas cepas de expresión, distintos medios de cultivo y distintas condiciones de disponibilidad de oxígeno. Se determinó que las condiciones óptimas de expresión se daban en anaerobiosis y en un medio de cultivo mínimo. Las condiciones de anaerobiosis serían necesarias para la maduración del citocromo c, ya que el operón involucrado se expresa bajo condiciones de anaerobiosis. En el caso de *Geobacter* la aproximación que se utilizó fue expresar la proteína recombinante en condiciones de aereobiosis en una cepa que contenía un plásmido con dicho operón

También se podría trabajar directamente con la proteína agregada obtenida en los extractos insolubles. Los agregados pueden ser solubilizados con detergentes como urea, y la proteína puede ser plegada nuevamente mediante dilución, diálisis o métodos de re-plegamiento en columnas [88]. Cualquiera sea el método utilizado, sería interesante, ya que se tienen los extractos, poder purificar la proteína para confirmar su actividad *in vitro*.

6 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones

Se logró clonar la citocromo c peroxidasa en el vector de expresión pET14b y expresarla de forma heteróloga en *E. coli* BL21, no pudiéndose verificar la capacidad de la cepa transformada de oxidar manganeso en medio sólido LB suplementado con $MnCl_2$. Si bien se confirmó la sobre-expresión de una proteína del tamaño esperado, ésta se encontraba mayoritariamente en la fracción insoluble, por lo que se debería optimizar la metodología para obtenerla en la fracción soluble o solubilizarla para poder purificar la proteína y ensayar su actividad *in vitro*

6.2 Perspectivas

Dada la posibilidad de que la proteína citocromo c peroxidasa no sea la responsable de la actividad manganeso oxidasa, o que sea necesario otro factor presente en el fósido 18E5 para llevar a cabo esta función, como perspectivas a futuro nos planteamos dos aproximaciones.

Por un lado la realización de una mutagénesis generalizada *in vitro* del fósido 18E5, mediante la utilización de un transposón, y seguidamente transformar estos fósidos mutados a la cepa hospedera original *E. coli* EPI300 donde se identificó la capacidad de oxidar manganeso. Al sembrar las células transformadas con el 18E5 mutado en medio sólido LB suplementado con 500 μM de $MnCl_2$, esperamos ver pérdida de actividad manganeso oxidasa en alguno de los clones. En las colonias que no se presenten los característicos precipitados rojo-amarronados del clon original, posiblemente el transposón haya interrumpido un gen que participe en la oxidación de manganeso. Dichas colonias posteriormente serán secuenciadas para poder inferir exactamente que gen o genes de las 23 secuencias codificantes encontradas estarían relacionadas con la oxidación de manganeso.

Por otro lado pretendemos poner a punto la realización de zimogramas, técnica electroforética que permite la evaluación de la actividad enzimática en el gel. Ya se han reportado estudios donde se logra determinar la actividad enzimática MnOx en geles de poliacrilamida, tanto en condiciones nativas como en condiciones

desnaturalizantes. A grandes rasgos lo que se hace en estos casos es correr el gel en condiciones desnaturalizantes y luego re naturalizar las proteínas, o si es nativo correr en geles sin el agregado de b-mercaptoetanol, SDS, ni calentamiento de la muestra. Luego de la corrida electroforética el gel se incuba en un buffer con el pH adecuado para el funcionamiento de la proteína y con el suministro de $MnCl_2$. Se debería visualizar la oxidación Mn (II) en los geles después de varias horas de incubación, mediante la formación de bandas de color marrón donde se encuentre la proteína con actividad MnOx. Los geles también pueden ser revelados con LBB, donde la formación de bandas color azul permiten detectar las proteínas con actividad. Las bandas donde se detecta actividad luego pueden ser analizadas por MALDI-TOF / MS, con el fin de identificar la enzima.

7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] NEALSON and K. H., "The microbial manganese cycle," *Microb. Geochemistry*, pp. 191–221, 1983.
- [2] B. M. Tebo, B. G. Clement, and G. J. Dick, "Biotransformations of Manganese," *Manual of Environmental Microbiology*. pp. 1223–1238, 2007.
- [3] G. J. Brouwers, E. Vijgenboom, P. L., "Bacterial Mn²⁺ Oxidizing Systems and Multicopper Oxidases: An Overview of Mechanisms and Functions," *Geomicrobiol. J.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–24, Mar. 2000.
- [4] B. M. Tebo *et al.*, "BIOGENIC MANGANESE OXIDES: Properties and Mechanisms of Formation," *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.*, vol. 32, no. 1, pp. 287–328, May 2004.
- [5] J. J. Morgan and W. Stumm, "Colloid-chemical properties of manganese dioxide," *J. Colloid Sci.*, vol. 19, no. 4, pp. 347–359, 1964.
- [6] W. Sung and J. J. Morgan, "Oxidative removal of Mn(II) from solution catalysed by the γ -FeOOH (lepidocrocite) surface," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 45, no. 12, pp. 2377–2383, 1981.
- [7] J. W. Murray, J. G. Dillard, R. Giovanoli, H. Moers, and W. Stumm, "Oxidation of Mn(II): Initial mineralogy, oxidation state and ageing," *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 49, no. 2, pp. 463–470, 1985.
- [8] S. H. . Davies and J. J. Morgan, "Manganese(II) oxidation kinetics on metal oxide surfaces," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 129, no. 1, pp. 63–77, 1989.
- [9] D. W. Christianson, "Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes.," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 67, no. 2–3, pp. 217–52, 1997.
- [10] C. F. Yocum and V. L. Pecoraro, "Recent advances in the understanding of the biological chemistry of manganese," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 2, pp. 182–187, 1999.
- [11] *,‡ Nir Keren, § Matthew J. Kidd, § and James E. Penner-Hahn, and H. B. Pakrasi‡, "A Light-Dependent Mechanism for Massive Accumulation of Manganese in the Photosynthetic Bacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803‡," 2002.
- [12] K. H. Nealson, B. M. Tebo, and R. A. Rosson, "Occurrence and Mechanisms of Microbial Oxidation of Manganese," *Adv. Appl. Microbiol.*, vol. 33, pp. 279–318, 1988.
- [13] B. M. Tebo, "Manganese(II) oxidation in the suboxic zone of the Black Sea," *Deep Sea Res. Part A. Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 38, pp. S883–S905, 1991.
- [14] B. M. Tebo, H. A. Johnson, J. K. McCarthy, and A. S. Templeton, "Geomicrobiology of manganese(II) oxidation," *Trends Microbiol.*, vol. 13, no. 9, pp. 421–428, 2005.
- [15] J. E. Post, "Manganese oxide minerals: Crystal structures and economic and environmental significance," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 96, no. 7, pp. 3447–3454, 1999.
- [16] M. Villalobos, B. Lanson, A. Manceau, and B. Toner, "Structural model for the

- biogenic Mn oxide produced by *Pseudomonas putida* To cite this version :," 2007.
- [17] C. K. Remucal and M. Ginder-Vogel, "A critical review of the reactivity of manganese oxides with organic contaminants.," *Environ. Sci. Process. Impacts*, vol. 16, no. 6, pp. 1247–66, 2014.
- [18] T. Hennebel, B. De Gusseme, N. Boon, and W. Verstraete, "Biogenic metals in advanced water treatment," *Trends Biotechnol.*, vol. 27, no. 2, pp. 90–98, 2009.
- [19] G. J. Dick, J. W. Torpey, T. J. Beveridge, and B. M. Tebo, "Direct identification of a bacterial manganese(II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74, no. 5, pp. 1527–1534, 2008.
- [20] L. Xu, C. Xu, M. Zhao, Y. Qiu, and G. D. Sheng, "Oxidative removal of aqueous steroid estrogens by manganese oxides," *Water Res.*, vol. 42, no. 20, pp. 5038–5044, 2008.
- [21] H. Zhang, W.-R. Chen, and C.-H. Huang, "Kinetic Modeling of Oxidation of Antibacterial Agents by Manganese Oxide," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 15, pp. 5548–5554, Aug. 2008.
- [22] L. Xuezheng, G. Aiguo, and C. Haowen, "Isolation and phylogenetic analysis of cultivable manganese bacteria in sediments from the Arctic Ocean," *Acta Ecol. Sin.*, vol. 28, no. 12, pp. 6364–6370, 2008.
- [23] M. Huguet, M. Deborde, S. Papot, and H. Gallard, "Oxidative decarboxylation of diclofenac by manganese oxide bed filter," *Water Res.*, vol. 47, no. 14, pp. 5400–5408, 2013.
- [24] C. Schütt and J. C. G. Ottow, "Mesophilic and psychrophilic manganese-precipitating bacteria in manganese nodules of the Pacific Ocean," *Z. Allg. Mikrobiol.*, vol. 17, no. 8, pp. 611–616, Jan. 2007.
- [25] J. P. Cowen, G. J. Massoth, and R. A. Feely, "Scavenging rates of dissolved manganese in a hydrothermal vent plume," *Deep Sea Res. Part A. Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 37, no. 10, pp. 1619–1637, 1990.
- [26] B. M. Tebo, K. H. Nealson, S. Emerson, and L. Jacobs, "At the," vol. 29, no. 6, pp. 1247–1258, 1984.
- [27] B. Hungate *et al.*, "Characterization of manganese-oxidizing (MnII→MnIV) bacteria from Negev Desert rock varnish: implications in desert varnish formation," *Can. J. Microbiol.*, vol. 33, no. 10, pp. 939–943, Oct. 1987.
- [28] P. A. Tyler and K. C. Marshall, "Form and function in manganese-oxidizing bacteria," *Arch. f. Mikrobiol.*, vol. 56, no. 4, pp. 344–353, 1967.
- [29] P. A. Tyler and K. C. Marshall, "Microbial oxidation of manganese in hydro-electric pipelines," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 33, no. 1, pp. 171–183, Dec. 1967.
- [30] S. D. Chapnick, W. S. Moore, and K. H. Nealson, "Microbially mediated manganese oxidation in a freshwater lake," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 27, no. 6, pp. 1004–1014, 1982.
- [31] E. Gregory and J. T. Staley, "Widespread distribution of ability to oxidize manganese among freshwater bacteria.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 44, no. 2, pp. 509–11, Aug. 1982.

- [32] J. S. Maki, B. M. Tebo, F. E. Palmer, K. H. Nealson, and J. T. Staley, "The abundance and biological activity of manganese-oxidizing bacteria and Metallogenium-like morphotypes in Lake Washington, USA," *FEMS Microbiol. Ecol.*, vol. 3, no. 1, 1987.
- [33] K. H. Nealson, "The Manganese-Oxidizing Bacteria," pp. 222–231, 2006.
- [34] E. V. Yakushev, F. Pollehne, G. Jost, I. Kuznetsov, B. Schneider, and L. Umlauf, "Analysis of the water column oxic/anoxic interface in the Black and Baltic seas with a numerical model," *Mar. Chem.*, vol. 107, no. 3, pp. 388–410, 2007.
- [35] C. K. Hope and T. R. Bott, "Laboratory modelling of manganese biofiltration using biofilms of *Leptothrix discophora*," *Water Res.*, vol. 38, no. 7, pp. 1853–1861, 2004.
- [36] M. Okazaki *et al.*, "Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas putida* GB-1," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 63, no. 12, pp. 4793–4799, 1997.
- [37] L. F. Adams and W. C. Ghiorse, "Characterization of extracellular Mn²⁺-oxidizing activity and isolation of an Mn²⁺-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1," *J. Bacteriol.*, vol. 169, no. 3, pp. 1279–85, Mar. 1987.
- [38] C. A. Francis, E. M. Co, and B. M. Tebo, "Enzymatic manganese(II) oxidation by a marine alpha-proteobacterium," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 9, pp. 4024–9, Sep. 2001.
- [39] E. I. Larsen, L. I. Sly, and A. G. McEwan, "Manganese(II) adsorption and oxidation by whole cells and a membrane fraction of *Pedomicrobium* sp. ACM 3067," *Arch. Microbiol.*, vol. 171, no. 4, pp. 257–264, Mar. 1999.
- [40] X. Z. Lin, A. G. Gao, and H. W. Chen, "Isolation and phylogenetic analysis of cultivable manganese bacteria in sediments from the Arctic ocean," *Shengtai Xuebao/Acta Ecol. Sin.*, vol. 28, no. 12, pp. 6364–6370, 2008.
- [41] R. Caspi, B. M. Tebo, and M. G. Haygood, "c-type cytochromes and manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 10, pp. 3549–3555, 1998.
- [42] B. M. Tebo, W. C. Ghiorse, L. G. van Waasbergen, P. L. Siering, and R. Caspi, "Bacterially mediated mineral formation; insights into manganese(II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies," *Rev. Mineral. Geochemistry*, vol. 35, no. 1, 1997.
- [43] H. L. Ehrlich, "Microbes as Geologic Agents: Their Role in Mineral Formation," *Geomicrobiol. J.*, vol. 16, no. 2, pp. 135–153, May 1999.
- [44] H. L. Ehrlich, "How microbes influence mineral growth and dissolution," *Chem. Geol.*, vol. 132, no. 1, pp. 5–9, 1996.
- [45] W. C. Ghiorse, "Biology of Iron-and Manganese-Depositing Bacteria," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 38, no. 1, pp. 515–550, Oct. 1984.
- [46] F. S. Archibald and I. Fridovich, "Manganese, Superoxide Dismutase, and Oxygen Tolerance in Some Lactic Acid Bacteria," vol. 146, no. 3, pp. 928–936, 1981.
- [47] D. GHOSAL *et al.*, "How radiation kills cells: Survival of and under oxidative stress," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, no. 2, pp. 361–375, Apr. 2005.
- [48] W. G. Sunda and D. J. Kieber, "Oxidation of humic substances by manganese

- oxides yields low-molecular-weight organic substrates," *Nature*, vol. 367, no. 6458, pp. 62–64, 1994.
- [49] L. L. Richardson, C. Aguilar, and K. H. Nealson, "Manganese oxidation in pH and O₂ microenvironments produced by phytoplankton.," *Limnol. Oceanogr.*, vol. 33, no. 3, pp. 352–363, 1988.
- [50] M. F. Hullo, I. Moszer, A. Danchin, and I. Martin-Verstraete, "CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase.," *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 18, pp. 5426–30, Sep. 2001.
- [51] W. L. van Veen, E. G. Mulder, and M. H. Deinema, "The Sphaerotilus-Leptothrix group of bacteria.," *Microbiol. Rev.*, vol. 42, no. 2, pp. 329–56, Jun. 1978.
- [52] W. C. Ghiorse and P. Hirsch, "An ultrastructural study of iron and manganese deposition associated with extracellular polymers of pedomicrobium-like budding bacteria," *Arch. Microbiol.*, vol. 123, no. 3, pp. 213–226, Dec. 1979.
- [53] T. J. Beveridge, "Role of Cellular Design in Bacterial Metal Accumulation and Mineralization," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 43, no. 1, pp. 147–171, Oct. 1989.
- [54] H. L. Ehrlich, "Bacteriology of manganese nodules. II. Manganese oxidation by cell-free extract from a manganese nodule bacterium.," *Appl. Microbiol.*, vol. 16, no. 2, pp. 197–202, Feb. 1968.
- [55] W. K. Jung and R. Schweisfurth, "Manganese oxidation by an intracellular protein of a *Pseudomonas* species," *Z. Allg. Mikrobiol.*, vol. 19, no. 2, pp. 107–115, Jan. 2007.
- [56] C. E. Douka, "Kinetics of manganese oxidation by cell-free extracts of bacteria isolated from manganese concretions from soil.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 39, no. 1, pp. 74–80, Jan. 1980.
- [57] L. L. Barton, M. Mandl, and A. Loy, "Geomicrobiology: Molecular and environmental perspective," *Geomicrobiol. Mol. Environ. Perspect.*, no. li, pp. 1–437, 2010.
- [58] A. V. Soldatova, C. Butterfield, O. F. Oyerinde, B. M. Tebo, and T. G. Spiro, "Multicopper oxidase involvement in both Mn(II) and Mn(III) oxidation during bacterial formation of MnO₂," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 17, no. 8, pp. 1151–1158, 2012.
- [59] K. Geszvain *et al.*, "The molecular biogeochemistry of manganese(II) oxidation," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 40, no. August 2015, pp. 1244–1248, 2012.
- [60] D. J. Kosman, "Multicopper oxidases : a workshop on copper coordination chemistry , electron transfer , and metallophysiology," pp. 15–28, 2010.
- [61] T. Sakurai and K. Kataoka, "Structure and function of type I copper in multicopper oxidases," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 64, no. 19–20, pp. 2642–2656, Oct. 2007.
- [62] M. J. Daly *et al.*, "Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* Facilitates Gamma-Radiation Resistance," *Science (80-)*, vol. 306, no. 5698, 2004.
- [63] C. R. Anderson, H. A. Johnson, N. Caputo, R. E. Davis, J. W. Torpey, and B. M. Tebo, "Mn(II) oxidation is catalyzed by heme peroxidases in 'Aurantimonas manganoxydans' strain SI85-9A1 and *Erythrobacter* sp. strain SD-21," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 75, no. 12, pp. 4130–4138, 2009.
- [64] K. Nakama, M. Medina, A. Lien, J. Ruggieri, K. Collins, and H. A. Johnson,

- “Heterologous expression and characterization of the manganese-oxidizing protein from *Erythrobacter* sp. strain SD21,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 80, no. 21, pp. 6837–6842, 2014.
- [65] P. F. Andeer, D. R. Learman, M. McIlvin, J. A. Dunn, and C. M. Hansel, “Extracellular haem peroxidases mediate Mn(II) oxidation in a marine *Roseobacter* bacterium via superoxide production,” *Environ. Microbiol.*, vol. 17, no. 10, pp. 3925–3936, Oct. 2015.
- [66] K. Geszvain, L. Smesrud, and B. M. Tebo, “Identification of a third Mn(II) oxidase enzyme in *Pseudomonas putida* GB-1,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 13, pp. 3774–3782, 2016.
- [67] D. R. Lovley and R. T. Anderson, “Influence of dissimilatory metal reduction on fate of organic and metal contaminants in the subsurface,” no. lii.
- [68] D. R. Bond, D. E. Holmes, L. M. Tender, and D. R. Lovley, “Electrode-Reducing Microorganisms That Harvest Energy from Marine Sediments,” *Science (80-.)*, vol. 295, no. 5554, 2002.
- [69] P. Yong, J. P. G. Farr, I. R. Harris, and L. E. Macaskie, “Palladium recovery by immobilized cells of *Desulfovibrio desulfuricans* using hydrogen as the electron donor in a novel electrobioreactor,” no. Vii, pp. 205–212, 2002.
- [70] J. R. Lloyd and D. R. Lovley, “Microbial detoxification of metals and radionuclides,” no. li, pp. 248–253, 2001.
- [71] D. A. white and A. Asfar-Siddique, “Removal of Manganese and Iron from Drinking Water Using Hydrous Manganese Dioxide,” *Solvent Extr. Ion Exch.*, vol. 15, no. 6, pp. 1133–1145, Nov. 1997.
- [72] Y. M. Nelson*, L. W. Lion, M. L. Shuler, and W. C. Ghiorse, “Effect of Oxide Formation Mechanisms on Lead Adsorption by Biogenic Manganese (Hydr)oxides, Iron (Hydr)oxides, and Their Mixtures,” 2002.
- [73] *,† Mario Villalobos, ‡ and John Bargar, and G. Sposito§, “Mechanisms of Pb(II) Sorption on a Biogenic Manganese Oxide,” 2004.
- [74] Y. M. Nelson, L. W. Lion, M. L. Shuler, and W. C. Ghiorse, “Lead binding to metal oxide and organic phases of natural aquatic biofilms,” vol. 44, no. 7, pp. 1715–1729, 1999.
- [75] B. Toner, A. Manceau, S. M. Webb, and G. Sposito, “Zinc sorption to biogenic hexagonal-birnessite particles within a hydrated bacterial biofilm,” vol. 70, pp. 27–43, 2006.
- [76] *,† Yukinori Tani *et al.*, “Interaction of Inorganic Arsenic with Biogenic Manganese Oxide Produced by a Mn-Oxidizing Fungus, Strain KR21-2,” 2004.
- [77] B. K. Mandal and K. T. Suzuki, “Arsenic round the world : a review,” vol. 58, pp. 201–235, 2002.
- [78] I. Forrez *et al.*, “Biogenic metals for the oxidative and reductive removal of pharmaceuticals , biocides and iodinated contrast media in a polishing membrane bioreactor,” *Water Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 1763–1773, 2010.
- [79] I. Forrez, M. Carballa, H. Noppe, H. De Brabander, N. Boon, and W. Verstraete, “Influence of manganese and ammonium oxidation on the removal of 17 α -ethinylestradiol (EE2),” *Water Res.*, vol. 43, no. 1, pp. 77–86, 2009.
- [80] J. De Rudder, T. Van De Wiele, W. Dhooge, F. Comhaire, and W. Verstraete,

- “Advanced water treatment with manganese oxide for the removal of 17 α -ethynylestradiol (EE2),” vol. 38, pp. 184–192, 2004.
- [81] I. Ferrés, V. Amarelle, F. Noya, and E. Fabiano, “Construction and screening of a functional metagenomic library to identify novel enzymes produced by Antarctic bacteria,” *Advances in Polar Science*, vol. 26, no. 1, pp. 96–101, 2015.
- [82] I. Ferrés, V. Amarelle, F. Noya, and E. Fabiano, “Identification of Antarctic culturable bacteria able to produce diverse enzymes of potential biotechnological interest,” *Advances in Polar Science*, vol. 26, pp. 71–79, 2015.
- [83] I. Ferrés, “‘‘Uso de la metagenómica funcional como herramienta para la búsqueda de enzimas bacterianas de interés biotecnológico presentes en muestras colectadas en la Península Antártica’’. Tesina de Grado, Lic. Biología, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.’’ Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 2015.
- [84] W. E. Krumbein and H. J. Altmann, “A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and respiring microorganisms,” *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, vol. 25, no. 2–3, pp. 347–356, 1973.
- [85] I. Ferrés, “‘‘Uso de la metagenómica funcional como herramienta para la búsqueda de enzimas bacterianas de interés biotecnológico presentes en muestras colectadas en la Península Antártica’’. Tesina de Grado, Lic. Biología, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.’’ Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, 2015.
- [86] K. Terpe, “Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 72, no. 2, pp. 211–222, Sep. 2006.
- [87] J. Yin, G. Li, X. Ren, and G. Herrler, “Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes,” *J. Biotechnol.*, vol. 127, no. 3, pp. 335–347, 2007.
- [88] H. P. Sørensen and K. K. Mortensen, “Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*,” *J. Biotechnol.*, vol. 115, no. 2, pp. 113–128, 2005.
- [89] T. Mamiatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, and J. Engel, “Molecular cloning-A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545 S., 42 \$,” *Acta Biotechnol.*, vol. 5, no. 1, pp. 104–104, 1985.
- [90] L. De Smet, G. W. Pettigrew, and J. J. Van Beeumen, “Cloning , overproduction and characterization of cytochrome c peroxidase from the purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*,” vol. 6568, pp. 6559–6568, 2001.
- [91] J. Seidel *et al.*, “MacA is a Second Cytochrome c Peroxidase of *Geobacter sulfurreducens*,” *Biochemistry*, vol. 51, no. 13, pp. 2747–2756, Apr. 2012.

8 ANEXO

8.1 Medios de cultivo

Luria Bertani Caldo (LB)

Extracto de levadura 5 g/L
Tryptona 10 g/L
NaCl 10 g/L

LB-Agar

LB-Caldo
Agar 15 g/L

2XYT

Tryptona 16 g /L
Extracto de levadura 10g/L
NaCl 5g/L

8.2 Lisis alcalina

Solución I

Glucosa 50 mM
Tris.HCl (pH 8,0) 25 mM
EDTA (pH 8,0) 10 mM

Solución II

NaOH 0,2 N
SDS 1%

Solución III

Acetato de Potasio 3M
Acido acetico 11,5% (V/V)

8.3 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida SDS

Gel separador 12%

- buffer separador 2,5 ml
- Acrilamida 30% 4,04 ml
- H₂O 3,56 ml
- TEMED 5 µl
- AP 10% 50 µl

Gel compactador

- Buffer compactador 1,25 ml
- Acrilamida 30% 0,8ml
- H₂O 2,95 ml
- TEMED 5 µl
- AP 10% 30 µl

Buffer Tris-Glicina

Tris	302,75 g
Glicina	721 g
SDS	50 g
H2O	5 L

Antes de usar diluirlo 10X

Buffer de carga 2X

0,5 M Tris pH 6,8	12ml
Glicerol (20%)	10ml
SDS 20%	10ml
0,1% azul bromo fenol	5ml
H2O Csp	45ml

Antes de usar agregar β - mercapto etanol 10%

Acrilamida 30%

Acrilamida	58,4 g
Bisacrilamida	1,6 g
H2O	Csp 200 ml

Buffer separador

Tris base	72,6 g
SDS	1,6 g
H2O	300 ml
pH	8,8

Llevar a 400 ml de H2O

Buffer compactador

Tris base	24 g
SDS	1,6 g
H2O	300 ml
pH	6,8

Llevar a 400mL de H2O

Solución de tenido Rápido

0,1%(m/V) Azul Brillante de Coomassie R250 en:

Metanol	500 ml/L
Ácido acético glacial	100 ml/L
H2O	400 ml/L

Solución de desteñido Rápido

Metanol 500 ml/L
Ácido acético glacial 100 ml/L
H₂O 400 ml/L

Buffer de unión (pH 8,0) en 100 ml

H₂O 49,6 ml
Imidazol stock 5M 400 µl
Buffer His Tag 2X 50 ml

2X His Tag Buffer

100 mM NaH₂PO₄
600 mM NaCl

