

Caracterización de cepas nativas colombianas de clostridios solventogénicos por perfiles de plásmidos

Catalina Arévalo*

Adriana Arrieta**

Greicy Aguilera**

Fabio Aristizábal**¹

Dolly Montoya*¹

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar molecularmente trece cepas nativas de *Clostridium* solventogénicos aislados en suelos colombianos, con el propósito de establecer diferencias a través de sus perfiles plasmídicos. Se estandarizaron las condiciones para la extracción de plásmidos en estos microorganismos anaeróbicos y las condiciones para la digestión con enzimas de restricción. Todas las cepas nativas alojaron al menos un plásmido que migra entre 20 y 34 kpb y 7 de ellas poseen un plásmido más, que migra entre 11 y 14 kpb. Los perfiles plasmídicos obtenidos con las enzimas empleadas fueron muy homogéneos y no permitieron diferenciar las cepas, lo cual muestra que estos marcadores moleculares no tienen poder discriminatorio para el estudio de los Clostridios.

Palabras clave: Plásmidos – *Clostridios* solventogénicos – Perfiles plasmídicos – Restricción.

Summary

The objective of this work was the molecular characterisation of thirteen native *Clostridium* strains isolated from Colombian soils, with the purpose to establish differences between theirs plasmid profiles. A total plasmid extraction protocol was standardised for these anaerobic microorganisms during molecular characterisation and the conditions for endonucleases digestion also were standardised. A plasmid (molecular size between 20 and 34 kbp) was found in all of them. 7 possessed an extra plasmid ranging in

Recibido para evaluación: Enero de 2002
Aceptado para publicación: Octubre de 2002

* Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Edificio Manuel Ancizar. A.A. 14490.

1 E-mail: domonto@ibun.unal.edu.co

** Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490.

1 E-mail: fabioaris@ibun.unal.edu.co

size between 11 and 14 kbp. The plasmids profiles obtained with the endonucleases were very homogeneous and did not allow the differentiation between the strains.

Key words: Plasmids – solventogenic *Clostridium* – plasmid profiles – restriction.

Introducción

Los clostridios presentan un gran potencial biotecnológico para la producción de ácidos y solventes orgánicos al igual que enzimas. Las condiciones anaeróbicas de crecimiento, los largos tiempos de fermentación y bajos rendimientos de productos son desventajas que podrían ser superadas generando cepas con características deseadas por manipulación genética. Para este propósito los plásmidos de las cepas nativas representan una alternativa, para ser usados como vehículos de clonación (1). Por otro lado las técnicas de biología molecular se han constituido como herramientas válidas para la caracterización de micro-organismos con potencial biotecnológico, que permiten identificarlos y diferenciarlos, mediante la generación de series de datos particulares y acordes con los principios que rige cada una de técnicas. Sin embargo cada técnica debe ser evaluada para determinar qué poder discriminatorio puede tener frente a cada modelo, buscando obtener un número importante de datos con poder discriminante, los cuales una vez reunidos constituyen criterios de clasificación y caracterización (2, 3).

El grupo de investigación en caracterización molecular y valoración de la biodiversidad del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, ha desarrollado numerosos proyectos inicialmente enfocados a la optimización del proceso de obtención de productos de interés industrial, como los solventes, mediante el uso de cepas nativas de Clostridios. Así aunque inicialmente se realizaron trabajos desde el punto de vista de bioprocesos y desarrolló de diferentes esquemas de fermentación, que emplearon cepas de referencia internacional; posteriormente se aislaron Clostridios solventogénicos de muestras

de suelos colombiano. Trece de ellas produjeron mayor concentración de solventes totales que la cepa de referencia *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Estas cepas fueron evaluadas por su capacidad para degradar polímeros de celulosa, presentando algunas de ellas alta actividad degradadora de sustratos de origen natural (4). Las 13 cepas nativas han sido caracterizadas por 16s ARN y electroforesis de campo pulsado (5). Los resultados sugieren que las cepas nativas son un grupo muy homogéneo y estrechamente relacionado con *Clostridium butyricum*. En el presente trabajo se complementa la información existente a nivel molecular de estas cepas, mediante la estandarización de una metodología de extracción de material genético extracromosomal mediante un proceso modificado de lisis alcalina, que permitió extraer los plásmidos de las cepas nativas de *Clostridium sp.* Con esta técnica fue posible observar los plásmidos en trece cepas nativas y tres cepas patrón, que mostraron dos tipos de perfiles plasmídicos. La digestión con enzimas de restricción mostró perfiles altamente similares para once de las dieciséis cepas (6).

Parte experimental

Microorganismos: Se utilizaron las cepas nativas colombianas de *Clostridium*: *IBUN 125C*, *IBUN 158B*, *IBUN 137K*, *IBUN 22A*, *IBUN 13A*, *IBUN 64A*, *IBUN 62F*, *IBUN 140B*, *IBUN 62B*, *IBUN 18A*, *IBUN 18Q*, *IBUN 18S* e *IBUN 95B*, y las cepas patrón de *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 y *DSM 1732* y la cepa patrón de *Clostridium butyricum* *DSM 2478*, las cuales se conservan en el cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de

Colombia. Se utilizó la cepa *S. epidermidis* 850 M95 como control interno de la metodología empleada y los plásmidos de la cepa *E. coli* V 517 como marcadores de peso molecular.

Condiciones de crecimiento y conservación:

Las cepas de *Clostridium* fueron crecidas y conservadas en las mismas condiciones descritas previamente por Montoya y col. (5). Los preinóculos se prepararon inoculando 1 ml de la suspensión de células vegetativas en viales de 20 ml con 15 ml de RCM (Reinforced Clostridium Medium Merck®); los viales fueron incubados durante toda la noche a 37°C, para alcanzar una densidad óptica (D.O.) superior a 1. La D.O. de los cultivos fue determinada empleando un espectrofotómetro Spectronic 20 "Genesys TM" a 680 nm. 3 ml de este cultivo fueron inoculados en 40 mL de medio RCM e incubados a 37°C hasta D.O entre 0.3-0.4.

E. coli fue crecida a partir del cultivo conservado en placa en medio LB (Luria Bertani) durante 5 horas a 37°C con agitación constante (7). *S. epidermidis* fue cultivado en medio BHI (Infusión cerebro corazón) complementado con sacarosa al 15% y glicina al 2%, durante toda la noche a 37°C, con agitación constante.

Cinéticas de crecimiento: La cinética de crecimiento para cada una de las cepas, fue realizada tomando muestras de 1 mL del cultivo a intervalos de una hora, hasta D.O superior a 0.3, y cada media hora hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria. El procedimiento fue realizado por triplicado en días diferentes, manteniendo siempre las mismas condiciones. Con los datos de densidad óptica y tiempo de toma de muestra correspondientes se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada cepa (Datos no mostrados).

Recuento celular: Se seleccionaron tres cepas (*Clostridium IBUN 22A*, *Clostridium IBUN 140B* y *C. butyricum 2478*) representativas de las morfologías y cinéticas de crecimiento de todo

el grupo. Se escogieron tres tiempos basándose en las cinéticas de crecimiento para la toma de muestra, los que correspondían a densidades ópticas en el inicio, mitad y final de la fase exponencial de crecimiento. Para cada muestra de 2 mL se adicionaron 100 L de formaldehído al 40% V/V. Para tres diluciones diferentes de cada muestra se determinó el número de células en cámara de Neubauer.

Extracción del ADN plasmídico: Partiendo de dos métodos de extracción (8, 9) se pudo establecer el siguiente protocolo. Las cepas fueron cultivadas en un volumen de 40 mL, hasta una D.O. de 0.47. Los cultivos se enfriaron a 0°C durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 4500 r.p.m. a 4°C durante 15 min, se descartaron los sobrenadantes y se lavaron 3 veces con 1 mL de buffer TES (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, sacarosa 15%) preenfriado. Las células se resuspendieron en 1mL de buffer TES, se adicionó lisozima en una concentración final de 3 mg/mL y se incubaron a 37°C durante una hora. Se adicionaron 400 L de SDS-alcálico (dodecilsulfato de sodio 1%, NaOH 0.2N), después de mezclar bien, las muestras se colocaron a 0°C durante 15 min. Se adicionaron 300 L de solución de acetato (60 mL de acetato de potasio 5 M, 11.5 mL de ácido acético y agua c.s.p. 100 mL, pH 5.5), las muestras se incubaron a 0°C durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante por centrifugación a 11.000 rpm, a 4°C durante 15 min. Posteriormente se adicionó un volumen de fenol: cloroformo (1:1), se agitó hasta formar una emulsión. Nuevamente se centrifugó a 11000 r.p.m. a 4°C durante 5 min., recuperando la fase acuosa, se repitió este procedimiento dos veces más. Para eliminar los restos de proteínas y fenol, la fase acuosa fue transferida a otro tubo donde se trató tres veces con un volumen de cloroformo, seguido de centrifugación a 11000 rpm a 4°C durante 5 min. El sobrenadante de la

segunda centrifugación se incubó a 45°C durante 20 min., para eliminar los restos de cloroformo. Pasado este tiempo, se le adicionó el equivalente a dos volúmenes de etanol absoluto, y se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se recuperó el ADN por centrifugación a 11000 rpm, 4°C durante 15 min y se descartó el sobrenadante. El ADN recuperado se lavó tres veces con etanol al 70% manipulando suavemente y se dejó secar a 37°C durante 3 horas. Finalmente, se resuspendió en 15 L de H₂O destilada desionizada estéril.

Los plásmidos fueron observados en geles de agarosa de concentración 0.8 % de 25 x 18 cm y un espesor aproximado de 0.6 cm, corridos a 1.7 V/cm en 1800 mL de buffer TBE 0.5X (7), en una cámara de electrofóresis *Bio-Rad Subcell GT Basic*, durante 11 horas.

Digestión del ADN con enzimas de restricción: El ADN obtenido fue cuantificado por comparación con patrones de concentración conocida de fago lambda en geles de agarosa. Para evaluar los perfiles de restricción de los plásmidos, se utilizaron las enzimas *Hind III*, *Sau 3AI*, *Eco 52I*, y *Eco RV* con los respectivos buffer provistos por la casa comercial (Promega®). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL compuestos de 5 µL de ADN (aproximadamente 6 µg de ADN total), 10 unidades de enzima, 2 µL de buffer de la enzima, 0.2 µL de albúmina de suero bovino y agua destilada desionizada estéril c.s.p 20 µL. La mezcla de reacción fue incubada toda la noche a 37°C. Los fragmentos de restricción fueron observados en geles de agarosa de concentración 0.8 % de 12 x 8 cm, corridos en una cámara de electrofóresis *Bio-Rad Subcell wide mini*, durante 5 horas a un voltaje de 2.5 V/cm en buffer TBE 0.5X.

Simultáneamente se digirieron muestras de ADN cromosomal y ADN plasmídico recuperado por el protocolo descrito por Arévalo

(10) y Arias (11), buscando diferenciar las bandas correspondientes exclusivamente al ADN plasmídico.

Resultados y discusión

Varios factores dificultan la obtención eficiente de plásmidos. En primer lugar la alta actividad DNAsa descrita en el género *Clostridium*, cuya producción se incrementa a finales de la fase exponencial y durante toda la fase estacionaria (8, 9, 12, 13 y 14); en segundo lugar la baja concentración celular debido a su metabolismo anaeróbico y finalmente la producción de exopolisacárido hace más difícil el rompimiento celular como se ha descrito para otros microorganismos (15). Teniendo en cuenta que muy posiblemente en la mitad de la fase exponencial de crecimiento al encontrarse prácticamente todas las células en proceso continuo de división, tanto las nucleasas como los polisacáridos se producirían en baja escala y por tanto su interferencia fuera menor, fue necesario establecer para cada cepa la cinética de crecimiento y de ella determinar el tiempo en el cual se alcanzaba la mitad de la fase exponencial de crecimiento.

Para la elaboración de las cinéticas de crecimiento, inicialmente se ensayaron períodos de media hora para la toma de muestras, se observó lisis celular probablemente debido a la presencia de oxígeno y la alteración de las rutas metabólicas generadoras de energía, puesto que se puede inactivar la hidrogenasa. Estas observaciones llevaron a establecer tiempos de toma de muestras de una hora en la etapa inicial de crecimiento y de media hora cuando los valores de densidad óptica se acercaban a 0.3. En estas condiciones se determinaron las curvas de crecimiento para las 13 cepas en estudio, realizando curvas de número de células contra densidad óptica, para determinar la concentración

celular a los diferentes tiempos de muestreo, y mediante curvas de concentración celular versus tiempo, para determinar los parámetros que describen las cinéticas de crecimiento para cada aislamiento (Tabla 1). Los datos generados permitieron establecer que las cepas crecían a diferentes velocidades, pero en todos los casos se podía considerar que alcanzaban aproximadamente la mitad de la fase exponencial de crecimiento cuando los cultivos mostraban una densidad óptica de aproximadamente 0.47. Teniendo en cuenta este hecho se usó este valor para calcular los tiempos de cultivo en que se deberían realizar las extracciones de plásmidos, para cada una de las cepas (Tabla 1). Igualmente

las gráficas generadas mediante los recuentos celulares, permitieron determinar la concentración celular por interpolación en las gráficas de determinación de biomasa por Densidad Óptica. Se calcularon la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) de todas las cepas nativas (Tabla 1).

Recuentos celulares: Para la planeación de los experimentos se calculó teóricamente el número de células necesarias para detectar los plásmidos y el volumen de medio de cultivo que debería emplearse. Para ello, dada la similitud de esta especie con las cepas nativas obtenida por los análisis de 16s rARN descritas por Montoya y colaboradores (6), se tomó como

Tabla 1. Parámetros característicos de crecimiento para las diferentes cepas en ensayo.

CEPA	μ (min^{-1}) ¹	Td ²	Ttc (min) ³
C. Butyricum DSM 2478	1.65×10^{-2}	42 min.	180
C. Acetobutylicum DSM 1732	6.01×10^{-3}	1 h 55 min	204
C. Acetobutylicum ATCC 824	2.96×10^{-3}	3 h 54 min	215
IBUN 125C	6.16×10^{-3}	1 h 54 min	210
IBUN 185	5.95×10^{-3}	1 h 56 min	240
IBUN 13A	6.95×10^{-3}	1 h 40 min	210
IBUN 18A	6.72×10^{-3}	1 h 43 min	240
IBUN 62F	7.064×10^{-3}	1 h 31 min	240
IBUN 137K	6.43×10^{-3}	1 h 48 min	240
IBUN 64A	7.10×10^{-3}	1 h 38 min	335
IBUN 140B	7.63×10^{-3}	1 h 31 min	240
IBUN 158B	7.43×10^{-3}	1 h 33 min	240
IBUN 18Q	3.69×10^{-3}	3 h 8 min	210
IBUN 95B	5.25×10^{-3}	2 h 12 min	210
IBUN 22A	4.04×10^{-3}	2 h 52 min	180

1 Velocidad específica de crecimiento

2 Tiempo de duplicación

3 Tiempo de cultivo calculado

referencia el plásmido más pequeño presente en *Clostridium butyricum* (9). Con el tamaño molecular reportado para el plásmido (3.9 Mega Daltons-MDa) se calculó el número de células necesarias para obtener una cantidad suficiente de ADN plasmídico que pudiera ser claramente observado en geles de agarosa y posteriormente digerido (20 ng). Para ello fue necesario asumir que cada célula poseía una sola copia del mismo y que el rendimiento de la extracción sería del 100 %. Dicha determinación definió que se necesitaban al menos 3.2×10^9 células para poder aislar y detectar un plásmidos con las características supuestas. Las tres cepas nativas seleccionadas (Tabla 2) mostraron comportamientos análogos en los recuentos celulares, por ello se emplearon indistintamente para la cuantificación celular de todas las cepas nativas, esto se pudo corroborar al observar que dicha aproximación permitió establecer las curvas de crecimiento para todas ellas. La cantidad ideal de cultivo necesaria para realizar el proceso de extracción del DNA plasmídico debería ser de 30 mL. Sin embargo experimentalmente al emplear este volumen no fue posible visualizar

plásmidos en ninguna de las cepas estudiadas. Se ensayaron volúmenes de 40 y 150 mL de cultivo, obteniendo buenos resultados con el primero, mientras que para el segundo caso, que implicaba el uso de mayores volúmenes de reactivos, el DNA extraído mostraba altos niveles de contaminación, debido posiblemente a la ineficiente lisis celular, o a que el proceso de limpieza resultaba insuficiente bajo las condiciones de trabajo. El hecho de que se requiriera emplear 40 mL de cultivo y no 30 mL como se había calculado inicialmente, puede ser debido a que el proceso de extracción no tiene una eficiencia del 100%, siendo posible que parte del material plasmídico se pudiera estar degradando. Es importante recalcar que los resultados obtenidos permiten afirmar que los cálculos teóricos resultaron ser una buena estrategia para predecir los rangos de volumen y concentración de las células en los cultivos, necesarios para detectar los plásmidos.

Aunque son numerosos los protocolos que han sido usados para la extracción de ADN plasmídico en *Clostridios* del grupo de los solventogénicos, los que se tomaron como base

Tabla 2. Recuentos celulares.

Densidad óptica	Ln (número de células)		
	<i>C. Butyricum DSM 2478</i>	<i>IBUN 140B</i>	<i>IBUN 22^a</i>
0.19	18.24	17.34	17.68
0.24	18.21	17.62	17.76
0.38	18.81	17.80	18.01
0.47 (a)	18.90 (a)	18.34 (a)	18.16 (a)
0.75	19.22	18.63	18.62
0.89	19.25	18.75	18.86

(a) Se indican los puntos aproximadamente equivalentes a la mitad de la fase exponencial de crecimiento.

fueron los propuestos por Mahony y colaboradores (8) y Minton y Morris (9) quienes partieron de volúmenes pequeños de cultivo, realizaron tratamientos con lisozima y posterior purificación del ADN con fenol/cloroformo, cloroformo o por tratamiento térmico. Diferentes ensayos permitieron estandarizar una metodología con la cual se obtiene un ADN de muy buena calidad aunque no se logra eliminar eficientemente el ADN genómico, lo cual podría estar relacionado con su nivel de estabilidad química que tiene que ver con el estado de funcionalización (metilación y acetilación) que parecen ser frecuentes en estos microorganismos. Los ensayos realizados simplemente escalaron la utilización de lisozima, pero se emplea sólo un lavado con fenol/cloroformo, complementado con varios tratamientos con sólo cloroformo, evitando la degradación del ADN aislado.

Los 8 plásmidos de la cepa *E. coli* V517, cuyos tamaños en pb son conocidos, fueron utilizados como marcadores de peso molecular y aislados para este trabajo con el mismo protocolo empleado para aislar plásmidos de las cepas de *Clostridium* (8). Como control positivo de la metodología se utilizó *S. epidermidis* 850 M 95, cuyo número de plásmidos ya es conocido y reproducible dentro de trabajos anteriores del laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (16).

La presencia de los plásmidos en Clostridios ha sido estudiada, encontrándose en *Clostridium acetobutylicum* un megaplásmido (*pSOL1*) con características funcionales, cuyo tamaño es de 210 kpb. Este megaplásmido porta genes necesarios para la producción de butanol y etanol (14). Otro megaplásmido se encontró en *Clostridium butyricum* ATCC 43181 y ATCC 43755, los cuales contienen el gen que codifica para la toxina botulínica de tipo E, cuyo tamaño es de

mas 100 kpb (17). Sin embargo, los megaplásmidos no pueden ser resueltos con la metodología electroforética empleada, siendo probable que no hubieran logrado entrar en el gel y quedaran en los pozos; para poderlos visualizar se requieren realizar electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE). Todo parece indicar que los megaplásmidos en Clostridios portan genes funcionales, mientras que para los plásmidos pequeños aún no se conocen funciones específicas siendo considerados como crípticos, lo cual se corrobora en estudios previos (9), en los cuales se analizaron plásmidos en diferentes Clostridios y se encontraron plásmidos cuyo rango de tamaño oscila entre 1.5 y 76 kb, que sólo presentan resistencia a penicilina y otros antibióticos. En este rango de tamaño se hallan los plásmidos detectados en las cepas nativas de Clostridios.

Todas las cepas mostraron una banda de ADN plasmídico pesada que migra por encima del ADN cromosomal y algunas de ellas tenía un segundo tipo de banda más liviana (Figura 1A). Los valores aproximados en pares de bases (pb) fueron calculados de manera automática, haciendo uso del programa *Quantity One* (BioRad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, Ca 94547, The Discovery series TM.) mediante interpolación que este hace con referencia a los pesos moleculares de los plásmidos de *E. coli* V 517 y su frente de corrido.

Basándose en la presencia de los plásmidos y la similitud de sus tamaños, es posible clasificar las trece cepas nativas en dos grupos: Un primer grupo conformado por las cepas *IBUN* 13A, *IBUN* 95B, *IBUN* 18S, *IBUN* 22A, *IBUN* 140B e *IBUN* 62B, las cuales poseen tan solo un plásmido, cuyo tamaño promedio es de 32.5 kpb. El segundo grupo que posee un plásmido más, a su vez se subdivide en dos: las cepas *IBUN* 64A, *IBUN* 62F, *IBUN* 125C, y la *IBUN* 158B, que contiene dos plásmidos, uno de

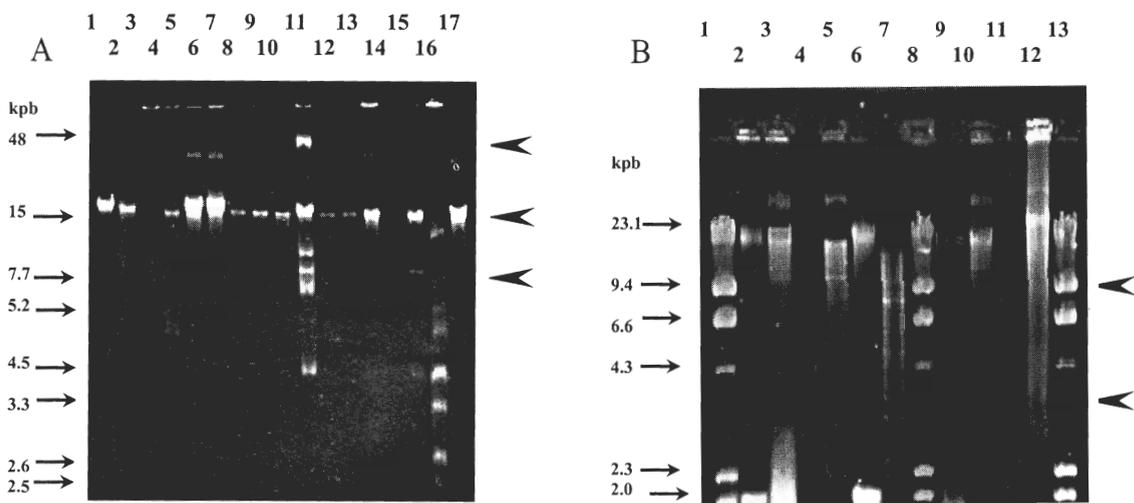


Figura 1. Algunos de los perfiles electroforéticos obtenidos en gels de agarosa al 0.8%. Para cada carril se emplearon (A) (B) ADN plasmídicos íntegros o (B) ADNs totales o plasmídicos sin digerir o digeridos con la enzima con Eco RV. Las bandas de los marcadores moleculares se muestran con flechas a la izquierda de cada foto, y a la derecha se resaltan algunos resultados. En los carriles aparecen las muestras de las cepas: (A) 1., 10. y 15. diferentes concentraciones del control *S. Epidemidis* 850 M95; 16. *E. coli* V517; 2. cepa patrón de *C. Acetobutylicum* ATCC 824 y las cepas nativas: 4. *IBUN* 18S; 5. *IBUN* 62B; 6. *IBUN* 22A; 7. *IBUN* 18S; 8. y 9. *IBUN* 13A; 13. *IBUN* 22A; 17. *IBUN* 95B respectivamente.

(B) 1., 8. y 13.- Marcador de peso Lambda con Hind III. La cepa *IBUN* 22A carriles: 2. y 4. ADN cromosomal sin digerir y digerido; 3. y 5. ADN plasmídico sin digerir y digerido. La cepa *IBUN* 137K carriles: 6. y 7. ADN plasmídico sin digerir y digerido. La cepa *IBUN* 62B en los carriles 9. y 10. ADN cromosomal sin digerir y digerido; 11. y 12. ADN plasmídico sin digerir y digerido.

tamaños entre 33.1 y 13.7 kpb y las cepas nativas *IBUN* 18A, *IBUN* 18Q e *IBUN* 137K cuyos plásmidos tienen tamaños estimado de 28.9 y 11.5 kpb.

Ensayos aislados permitieron establecer que varios de los plásmidos presentes en las cepas usadas durante la estandarización de los ensayos (*IBUN* 22A, *IBUN* 140B y *C. butyricum* 2478) no podían ser detectados una vez se habían realizado más de cinco pases consecutivos en el medio enriquecido para *Clostridium*, lo que puede indicar que muy posiblemente deben existir factores de presión externos necesarios para que el microorganismo conserve los plásmidos y no los elimine durante la proliferación.

Los perfiles de restricción de plásmidos totales se realizaron con varias enzimas; al digerir el ADN cromosomal y ADN plasmídico con la

enzima *Hind III*, se observó que los dos patrones de bandeado eran exactamente iguales (datos no mostrados), lo cual indica que las numerosas bandas generadas por el corte del ADN cromosomal, muy posiblemente porque las enzimas usadas resultan ser de corte frecuente, sobrelapan las generadas en la digestión del material plasmídico (19). Los ensayos realizados con la enzima *Sau3AI* mostraron que en ambas muestras la frecuencia de corte era alta generando bandas de tamaños inferiores a 400 pb, las cuales no fueron resueltas en los gels bajo las condiciones de corrida establecidas. La enzima *Eco52I* no digirió ni la muestra de ADN cromosomal ni la de ADN plasmídico, por lo tanto se descartó su uso para el análisis de restricción de las otras cepas.

La enzima Eco RV fue la escogida para evaluar los perfiles plasmídicos de todas las cepas debido a que con ella se generan al menos dos bandas perfectamente definidas en las muestras de ADN plasmídico (Figura 1B). Un único patrón de bandedo fue visualizado para la mayoría de las cepas, lo que podría indicar que las bandas están relacionadas con el plásmido de mayor tamaño presente en todas las cepas, o que el plásmido pequeño y el grande tienen segmentos de tamaños muy cercanos flanqueados por la secuencia de corte para Eco RV. Las bandas generadas poseen tamaños promedio de 8.9 y 3.4 kpb., pero en dos de las cepas nativas *IBUN 18A* e *IBUN 158B* sólo se detectó la banda de mayor tamaño.

Las condiciones para la extracción de plásmidos y para realizar los perfiles plasmídicos en estos microorganismos anaeróbicos fueron establecidas. Se determinó que muchas de las enzimas de restricción que muestran alta frecuencias de corte, no permiten diferenciar los dos tipos de ADN, al generar fragmentos pequeños que no se resuelven con las condiciones establecidas. Por otro lado la utilización de algunas enzimas de restricción de corte poco frecuente podría permitir generar datos con mayor poder de descriptivo, como pareció que podría suceder con Eco RV. Sin embargo, para las cepas estudiadas el número de bandas generadas fue pobre, no permitiendo establecer diferencias importantes. Podría ser útil el buscar otras enzimas que cortando muy pocas veces en el ADN genómico, generen un mayor número de bandas al cortar los ADNs plasmídicos.

Agradecimientos

Los autores queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a la Química-Farmacéutica Zulma Suárez por la lectura crítica del manuscrito y su activa participación en la preparación del

mismo. Este proyecto fue financiado en parte por el proyecto D100C390 de la DINAIN, y fue contemplado dentro del marco del proyecto 819072 de la DIB. Igualmente recibió respaldo de Volkswagen Foundation dentro del proyecto "Anaerobic, Solvent-Producing Bacteria from Colombian Sources: Molecular Biology, Taxonomy and Biotechnological Potential".

Bibliografía

1. N.P. Minton, "Clostridia", Plenum Press Eds. New York, 1989, p. 13.
2. G. Volker y C.M. Barrie, Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 3 (2001).
3. D.M. Olive y P. Bean, Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms, *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1661 (1999).
4. D. Montoya, S. Espitia, E. Silva, y W.H. Schwarz, Isolation of mesophilic solvent producing Clostridia from Colombian sources: Physiological characterization, solvent production and polisaccharide hydrolysis. *J. Biotechnol.*, **79**, 117 (2000).
5. D. Montoya, C. Arévalo, S. González, F. Aristizábal. and W.H. Schwarz, New solvent producing *Clostridium sp.* strains hydrolyzing a wide range of polysaccharides, are closely related to *Clostridium butyricum*. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.*, *Special Issue Clostridium*, **27**, 329 (2001).
6. G.N. Aguilera-Muñoz y A.M. Arrieta-Prieto, "Caracterización por Perfiles de Plásmidos y Megaplásmidos de Cepas Nativas de *Clostridium Solventogénicos*", Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (2001).
7. J. Sambroock, E.F. Fritsch, T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory

- Manual” Sambroock, Frisch and Maniatis Eds., 1989.
8. D.E. Mahony, G.A. Clark, M.E. Stringer, M.C. MacDonald, D.R. Duchesne y J.A. Mader, Rapid extraction of plasmids of *Clostridium perfringens*. *Appli. Environ. Microbiol.*, **51**, 521 (1986).
 9. N. Minton y G. Morris, Isolation and partial characterization of three cryptic plasmids from *Clostridium butyricum*, *J. Gen. Microbiol.*, **127**, 325 (1981).
 10. C Arévalo, “Contribución a la Caracterización Molecular de Cepas Nativas de *Clostridium spp* con Potencial Biotecnológico”, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (2001).
 11. G. Arias, “Caracterización de Cepas Nativas de *Clostridium spp* Solventogénicos por Polimorfismos de Longitud en Fragmentos de Restricción Amplificados (AFLPs)”, Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (2001).
 12. C.I. Kado y S.T. Liu, Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, **145**, 1365 (1981).
 13. A. Kim, A. Vertes y H. Blaschek, Isolation of a single -stranded plasmid from *Clostridium acetobutylicum* NCIB 6444, *Appli. Environ. Microbiol.*, **56**, 1725 (1990).
 14. E. Cornillot, R. Nair, E. Papoutsakis, P. Soucaille, The genes of butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 Reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain, *J. Bacteriol.*, **179**, 5442 (1997).
 15. M.G. Ammendiola, R. Di Rosa, R. Montanaro, C.R. Arciola y L. Baldassarri, Slime production and expression of the slime - associated antigen by Staphylococcal clinical isolates, *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3235 (1999).
 16. C. Arévalo, “Tipificación de *Staphylococcus epidermidis* Aislado de Infecciones Nosocomiales Utilizando Perfiles Plasmídicos”, Tesis de Grado, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá (1998).
 17. D. Hauser, M. Gibert, P. Boquet y M.R. Popoff, Plasmid localization of a type E botulinal neurotoxin gene homologue in toxigenic *Clostridium butyricum* strains, and absence of this gene in non-toxigenic *C. butyricum* strains, *FEMS Microbiol. Letters*, **99**, 251 (1992).
 18. M.E. Collins, J.D. Oultram y M. Young, Identification of restriction fragments from two cryptic *C. butyricum* plasmids that promote the establishment of a replication-defective plasmid in *B. subtilis*. *J. Gen Microbiol.*, **131**(8), 2097 (1985).