



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EL ANÁLISIS
METATRANSCRIPTÓMICO DE LA COMUNIDAD MICROBIANA BP8, CAPAZ DE
DEGRADAR UN BARNIZ DE POLIÉTER-POLIURETANO-ACRÍLICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

DIANA CAROLINA RUIZ REYES



MÉXICO, CDMX

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Herminia de Jesús Loza Tavera

VOCAL: Profesor: José Adelfo Escalante Lozada

SECRETARIO: Profesora: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

1er. SUPLENTE: Profesor: Genaro Jiménez Reyes

2° SUPLENTE: Profesor: Javier Axosco Marín

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 105. CONJUNTO E. DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA. FACULTAD DE QUÍMICA.
UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Martín Pedro Vargas Suárez

SUSTENTANTE:

Diana Carolina Ruiz Reyes

Agradecimientos técnicos

A los apoyos económicos brindados por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-UNAM (IN223317) y al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado-Facultad de Química-UNAM (5000-9117) otorgados a la Dra. Herminia Loza Tavera.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la formación académica, profesional y personal.

ABREVIATURAS

2-BE	2-butoxietanol
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool / Herramienta básica de búsqueda de alineamiento local
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DPGB	Dipropilenglicol butil-éter
DPGM	Dipropilenglicol monometil-éter
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
<i>g</i>	Gravedades
IP	Isopropanol
LB	Medio Luria Bertani
MM-PolyLack	Medio Mínimo con barniz PolyLack
NGS	Next Generation Sequencing/Tecnología de secuenciación de siguiente generación
NMP	N-metil 2-pirrolidona
PBS	Buffer fosfatos salino
PCR	Polymerase Chain Reaction/Reacción en cadena de la polimerasa
PE-PU	Poliéter-poliuretano
PE-PU-A	Poliéter-poliuretano-acrílico
PS-PU	Poliéster-poliuretano
PU	Poliuretano
RIN	RNA Integrity Number/Número de integridad de ácido ribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SN	Sobrenadante
TE	Tris-EDTA
% m/v	Porcentaje masa/volumen
% v/v	Porcentaje volumen/volumen

CONTENIDO

Agradecimientos técnicos	iii
Abreviaturas	iv
Índice de figuras y tablas	vii
1 RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	5
3.1 Aislamiento y selección de comunidades microbianas que crecen en barniz de poliéter-poliuretano-acrílico (PE-PU-A).....	5
3.2 Ataque de la comunidad microbiana BP8 a los grupos funcionales del barniz	5
3.3 Deconvolución del metagenoma de la comunidad microbiana BP8.....	6
3.4 Anotación funcional de los genomas deconvolucionados de la comunidad BP8.....	7
3.5 RNA-Seq	8
3.6 Planteamiento del Problema	9
4. OBJETIVOS	10
4.1 Objetivo general	10
4.2 Objetivos particulares.....	10
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS	12
6.1 Barniz de PE-PU-A utilizado como fuente de carbono.....	12
6.2 Aislamiento, selección y almacenamiento de la comunidad microbiana BP8.....	12
6.3 Preparación del preinóculo y siembra de los cultivos.....	12
6.4 Establecimiento de la condición control	13
6.4.1 Siembra de los cultivos para establecimiento de la condición control	13
6.4.2 Recuperación de proteínas de la fracción citosólica.....	13
6.4.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	13
6.4.4 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida	14
6.5 Extracción de RNA de la comunidad microbiana BP8.....	14
6.5.1 Recuperación de biomasa de comunidad microbiana BP8 para extracción de RNA.....	14
6.5.2 Extracción de RNA total con el kit NucleoSpin	15
6.5.3 Extracción de RNA total con Reactivo TRIzol	16
6.5.4 Extracción de RNA total con fenol ácido caliente	17

6.5.5 Extracción de RNA total de cultivos en fase estacionaria y segunda fase logarítmica	18
6.6 Tratamiento de RNA total con DNasa	20
6.6.1 Tratamiento con DNasa y limpieza de RNA total con protocolo del kit NucleoSpin	21
6.6.2 Tratamiento con enzima DNase I, RNase-free (1 U/μL)	21
6.7 Reacciones de PCR para determinar que las preparaciones de RNA no están contaminadas con DNA	22
6.7.1. Extracción de DNA genómico de la comunidad microbiana BP8	23
6.8 Análisis del RNA total libre de DNA por Bionalyzer	24
6.9 Reducción de RNA ribosomal de las muestras de RNA total con el kit MICROBExpress (Invitrogen)	24
6.9 Separación de RNA pequeño (17 - 200 nucleótidos) con el kit RNA Clean & Concentrator -5 (Zymo Research)	26
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
7.1 Determinación de la condición control	27
7.2 Determinación del protocolo más adecuado para la extracción de RNA total de la comunidad BP8	28
7.3 Tratamiento con DNasa	32
7.3.1 Determinación de la efectividad del tratamiento con DNasa	35
7.4 Enriquecimiento de RNA mensajero	39
7.4.1 Eliminación de RNA ribosomal 16S y 23S	39
7.4.2. Eliminación de RNA menor a 200 nucleótidos	39
7.5 Elección de tiempos de cultivo de la comunidad BP8 en MM-PolyLack de los cuales obtener RNA mensajero enriquecido	41
7.6 Construcción de bibliotecas de cDNA, secuenciación y análisis	50
8. CONCLUSIONES	52
9. PERSPECTIVAS	53
10. REFERENCIAS	54
APÉNDICE I	59
APÉNDICE II	66
APÉNDICE III	71

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Estructura general de los poliuretanos.

Figura 2. Crecimiento de la comunidad microbiana BP8 y consumo de carbono total en sobrenadantes del cultivo.

Figura 3. Perfiles proteicos de las fracciones citosólicas de cultivos de la comunidad microbiana BP8 en LB de 0 a 16 horas analizados en SDS-PAGE (12%).

Figura 4. RNA total extraído mediante los diferentes protocolos evaluados.

Figura 5. Integridad de RNA total tratado con DNasa.

Figura 6. DNA genómico de la comunidad BP8.

Figura 7. Amplicón del fragmento 968-1401 del gen rDNA 16S obtenido de la comunidad BP8.

Figura 8. Determinación de la sensibilidad de la PCR para amplificar el fragmento 968-1401 del gen rDNA 16S empleando como molde diferentes concentraciones de DNA de la comunidad BP8.

Figura 9. Verificación del efecto del tratamiento con DNasa por PCR.

Figura 10. Análisis de enriquecimiento de RNA mensajero.

Figura 11. RNA total de cultivos en MM-PL con protocolo para extracción de RNA total de cultivos en fase estacionaria y segunda fase logarítmica.

Figura 12. Integridad de RNA total extraído de cultivos correspondientes a fase estacionaria y segunda fase logarítmica en MM-PL con protocolo de fenol ácido caliente.

Figura 13. Ejemplo de electroferogramas resultado de análisis en Bioanalyzer 2100 de RNA total después de tratamiento con DNasa.

Figura 14. Integridad de muestras de RNA total de BP8 tratado con DNasa antes de enriquecimiento de RNA mensajero.

Figura 15. Estrategia experimental desarrollada para obtener RNA mensajero de la comunidad microbiana BP8.

Figura A1. Electroferograma correspondiente a la muestra 18.2 (18 h en MM-PolyLack).

Figura A2. Electroferograma correspondiente a la muestra 18.4 (18 h en MM-PolyLack).

Figura A3. Electroferograma correspondiente a la muestra 18.6 (18 h en MM-PolyLack).

Figura A4. Electroferograma correspondiente a la muestra 3.1 (3 días en MM-PolyLack).

Figura A5. Electroferograma correspondiente a la muestra 3.2 (3 días en MM-PolyLack).

Figura A6. Electroferograma correspondiente a la muestra 3.5 (3 días en MM-PolyLack).

Figura A7. Electroferograma correspondiente a la muestra C.4 (condición control: 5 días en MM-PolyLack + 12 h en LB).

Figura A8. Electroferograma correspondiente a la muestra C.5 (condición control: 5 días en MM-PolyLack + 12 h en LB).

Figura A9. Electroferograma correspondiente a la muestra C.6 (condición control: 5 días en MM-PolyLack + 12 h en LB).

Tabla 1. Microorganismos identificados en la comunidad BP8 y su abundancia.

Tabla 2. Comparación de calidad y rendimiento de RNA total extraído mediante los protocolos de kit NucleoSpin®, TRIzol® y fenol ácido caliente.

Tabla 3. Tratamientos con DNase I RNase-free (Thermo Scientific) probados para tratar muestras de RNA total extraído.

Tabla 4. Comparación de calidad y cantidad del RNA total después de los tratamientos con DNasa probados.

Tabla 5. Características de DNA genómico de BP8.

Tabla 6. Comparación de RNA total sin DNA antes y después de los tratamientos de enriquecimiento de RNA mensajero.

Tabla 7. Resultados de calidad y rendimiento de RNA total después de tratamiento con DNasa.

Tabla 8. Valores de RIN para cada muestra de RNA total sin DNA de la comunidad BP8 de la cual se enriqueció RNA mensajero.

Tabla 9. Tamaño y concentración de las bibliotecas de cDNA sintetizadas a partir de RNA mensajero enriquecido de la comunidad BP8.

1. RESUMEN

El poliuretano (PU) es un polímero sintético producto de la reacción de condensación de diisocianatos y poliols. Debido a la gran variedad de precursores con los que pueden sintetizarse, los PU son muy versátiles y, a diferencia de otros polímeros sintéticos, las estructuras resultantes son muy complejas. Esto dificulta su reciclaje, por lo tanto, la opción más recurrida de disponer de los residuos es desecharlos en vertederos, lo cual supone un gran problema ambiental. Recientemente, una estrategia que se ha estudiado para el tratamiento de este tipo de materiales es la biodegradación por medio de microorganismos que puedan emplear polímeros sintéticos como fuente de carbono.

En nuestro grupo de investigación se han estudiado varias comunidades microbianas enriquecidas para degradar barnices comerciales de PU. Estos estudios constituyen un modelo para entender como ocurre la degradación de plásticos de PU más recalcitrantes. La comunidad microbiana BP8 es capaz de crecer en un barniz de poliéter-PU-acrílico (PE-PU-A) (PolyLack®) y mediante diversos análisis físicos y químicos se ha demostrado la degradación del PU y otros compuestos xenobióticos presentes en el barniz a lo largo de 20 días de cultivo. En un trabajo realizado recientemente en nuestro laboratorio, se identificaron cinco microorganismos presentes en la comunidad, cuyos genomas fueron reconstruidos a partir de la deconvolución del metagenoma. La anotación funcional de estos genomas reveló abundancia de secuencias relacionadas con el metabolismo de xenobióticos y el PU. Un análisis metatranscriptómico mediante RNA-Seq permitirá no sólo identificar los genes que se expresan en la comunidad BP8 relacionados con estos procesos, sino también medir el nivel de expresión a diferentes etapas y condiciones de crecimiento.

El objetivo de este trabajo fue obtener preparaciones de RNA mensajero de la comunidad microbiana BP8 a diferentes tiempos de cultivo en MM-PolyLack y de un cultivo en medio mineral con el barniz PolyLack® (MM-PolyLack) transferido a LB como condición control, que permitieran realizar un análisis metatranscriptómico. Esto con el propósito de definir qué genes se expresan cuando la comunidad BP8 se cultiva en PE-PU-A y aditivos xenobióticos comparado con un sistema sin barniz. Se probaron distintos métodos de extracción de RNA y se eligió el método de fenol ácido caliente para obtener RNA total de buena calidad. Se optimizó un método para tratamiento con DNasa de las muestras de RNA total para eliminar el DNA contaminante, además de implementar una reacción de PCR para verificar la efectividad de este tratamiento. Se eligieron 18 h y 3 días como tiempos de cultivo en MM-PolyLack a los cuales se realizaría el análisis metatranscriptómico. Las preparaciones de RNA total tratado con DNasa se analizaron en Bioanalyzer para asegurarse de que la calidad de las muestras era adecuada para enriquecer RNA mensajero. Finalmente, se enriqueció el RNA mensajero, mediante la eliminación de RNA ribosomal 23S y 16S y RNA menor a 200 nucleótidos.

Las preparaciones de RNA mensajero enriquecido se enviaron a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología (IBT), donde se sintetizaron las bibliotecas de cDNA. La secuenciación de las bibliotecas se llevará a cabo por Phase Genomics Inc. en Seattle, WA.

2. INTRODUCCIÓN

El término poliuretano (PU) es usado para clasificar polímeros derivados de la condensación de poliisocianatos y polioles (Figura 1). Fueron sintetizados por primera vez en 1937 por el Dr. Otto Bayer, pero no fue sino hasta 1955 en que fueron producidos comercialmente y desde entonces se han utilizado ampliamente para elaborar productos para la industria médica, automotriz y de la construcción (Howard, 2011). Gracias a la gran variedad de poliisocianatos y polioles con los que pueden ser sintetizados, así como a los aditivos utilizados para dar características específicas al producto final, los PU pueden adoptar diversas formas, texturas y dureza, ya sea como espumas rígidas o flexibles, o como recubrimientos, adhesivos, selladores y elastómeros (denominados CASEs por sus siglas en inglés), para producir partes de automóviles, suelas para calzado, relleno de muebles, pinturas y barnices, entre otros productos (Simón *et al.*, 2018).

Debido a la gran versatilidad que tienen los PU, la demanda de estos materiales es muy alta. Es el sexto polímero más manufacturado del mundo, con una producción de aproximadamente 18 millones de toneladas al año (ADEME, 2014), de los cuales, en América Latina, México es el segundo productor de estos materiales, produciendo más de 300 mil toneladas al año (Plastics Technology México, 2017). Estas cifras implican que la generación de residuos de PU también es muy alta. Sin embargo, en América Latina no existe una legislación ambiental que impulse alternativas al desecho para este tipo de plásticos. Por el momento, sólo en la Unión Europea existen planes concretos y legislación que buscan reducir la cantidad de plástico en general que se desecha en vertederos para que se utilice para recuperación de energía o se recicle para aprovechar las propiedades de los materiales y así reducir la huella ambiental (PlasticsEurope, 2018).

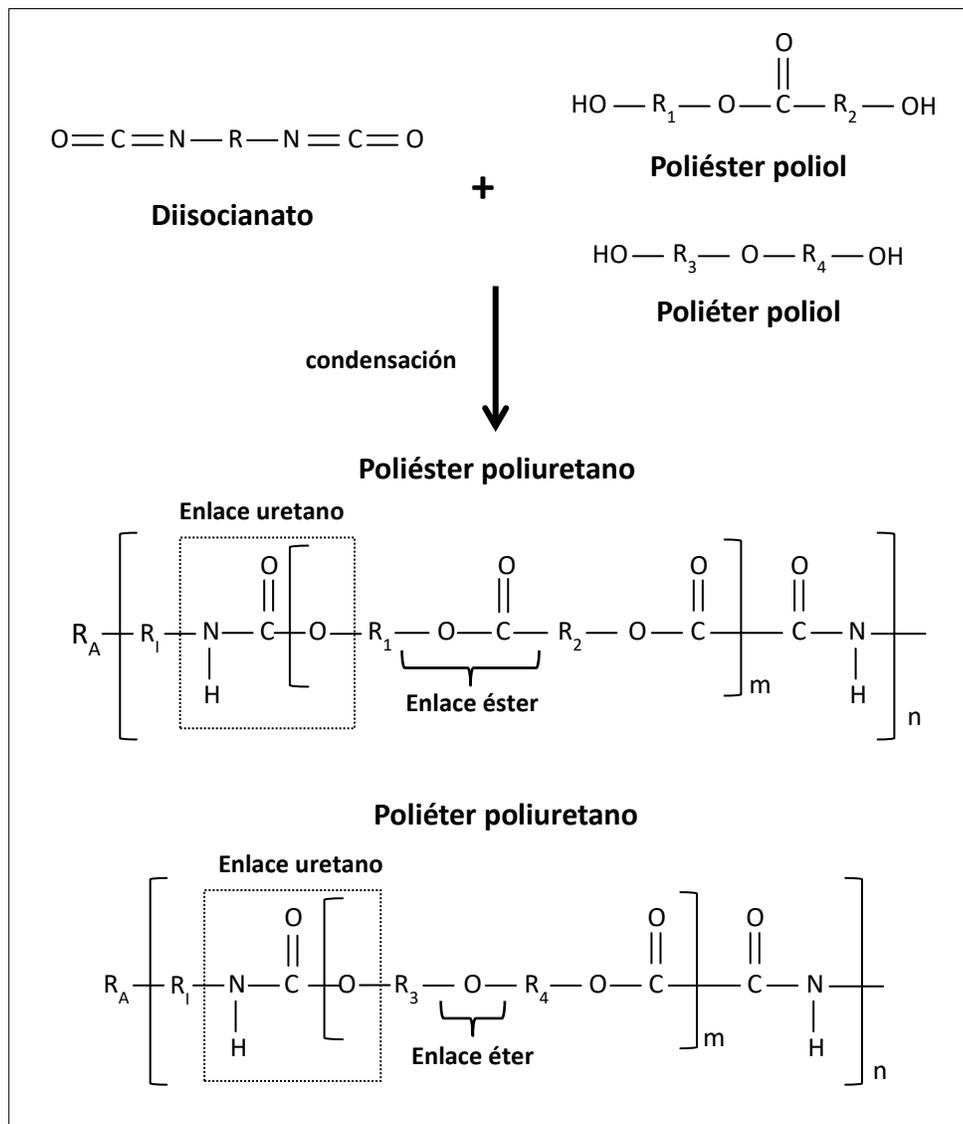


Figura 1. Estructura general de los poliuretanos. Los poliuretanos se sintetizan a partir de reacciones de condensación entre poliisocianatos y polioles, formando el característico grupo funcional uretano. Los poliéster polioles formarán poliéster poliuretano (PS-PU), mientras que los poliéter polioles formarán poliéter poliuretano (PE-PU). El grupo R_A puede ser una cadena de acrilatos para formar un PS-PU-A o PE-PU-A (modificado de Álvarez Barragán, 2013)

El reciclaje es la alternativa al desecho más estudiada de la última década y puede ser de varios tipos dependiendo del tipo de PU que se utilice:

- Reciclaje mecánico: este tipo de reciclaje utiliza PU en su forma polimérica para crear productos con características similares o diferentes al producto original. Consiste en trocear, pulverizar o granular el material para ser usado por sí solo o con una mezcla de aditivos o material virgen para la creación de nuevos productos (Simón *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2012; Zia *et al.*, 2007).
- Reciclaje químico: con este tipo de reciclaje se obtienen sustancias químicas básicas a partir de material de desecho. Los compuestos químicos obtenidos se pueden utilizar como materia prima para crear nuevos productos o como combustible (reciclaje termoquímico). En general, estos procesos se llevan a cabo haciendo reaccionar el material con catalizadores a altas presiones y temperaturas (Behrendt y Naber, 2009; Simón *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2012; Zia *et al.*, 2007).

A pesar de que es un tema ampliamente estudiado, los procesos de reciclaje de PU tienen ciertas desventajas, por ejemplo, el reciclaje mecánico sólo se aplica a PU proveniente de espumas o de recortes industriales, además de que no se recupera el valor original del material. Por otro lado, los procesos de reciclaje químico, no se han desarrollado lo suficiente para aplicarse a escala industrial, sobre todo por los altos costos que representa su implementación (Zia *et al.*, 2007). Debido a esto, se han buscado otras alternativas que permitan el tratamiento eficiente de este tipo de residuos, como la biodegradación. La biodegradación puede definirse como la fragmentación y pérdida de propiedades mecánicas y/o modificación química de un polímero por acción de microorganismos, lo cual resulta, en última instancia, en la formación de dióxido de carbono, agua y biomasa (Grima *et al.*, 2000).

En general, los plásticos no son biodegradables al ser física y químicamente robustos. Sin embargo, se ha demostrado en diversos estudios que el PU es susceptible al deterioro por parte de cepas aisladas de bacterias y hongos (Darby y Kaplan, 1968; Howard, 2011; Oprea y Doroftei, 2011) y también por comunidades microbianas (Cosgrove *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2008, Vargas-Suárez *et al.*, 2019). La degradación de PU ocurre primordialmente en el segmento polioliol, por lo tanto, la capacidad de degradación depende en gran medida de si este segmento es poliéster polioliol o poliéter polioliol. El poliéster poliuretano (PS-PU) es atacado por enzimas como proteasas, ureasas y esterases (Shah, 2008), mientras que el poliéter poliuretano (PE-PU) es más resistente a la hidrólisis enzimática, debido a que la ruptura del enlace éter es energéticamente muy costosa en relación con la cantidad de carbono asimilable que produce (White *et al.*, 1996). El ataque a los enlaces uretano es más complejo ya que es un grupo más recalcitrante, y las enzimas que posiblemente puedan romper este enlace son ureasas, esterases y proteasas (Mahajan y Gupta, 2015).

Tomando en cuenta lo anterior, la identificación y estudio de microorganismos capaces de degradar PU y el análisis transcriptómico de la expresión de sus genes es de interés con el propósito primero, de conocer los procesos bioquímicos y las vías metabólicas involucrados y posteriormente para desarrollar procesos biotecnológicos que permitan reducir el impacto ambiental que generan los desechos de materiales como los PU.

3. ANTECEDENTES

3.1 Aislamiento y selección de comunidades microbianas que crecen en barniz de poliéter-poliuretano-acrílico (PE-PU-A)

En nuestro grupo de investigación, a partir de espumas de PU en descomposición colectadas en el vertedero a cielo abierto Bordo Poniente, ubicado en Ciudad Nezahualcóyotl, Estado de México, México, se aislaron y seleccionaron ocho comunidades microbianas capaces de crecer en un medio mineral con un barniz comercial de PE-PU PolyLack[®] (MM-PolyLack) como única fuente de carbono (Savín Gámez, 2016). De acuerdo con la hoja de datos de seguridad, el barniz PolyLack contiene además del copolímero acrílico/uretano los aditivos N-metil-2-pirrolidona (NMP), 2-butoxietanol (2BE), dipropilenglicol butil éter (DPGB), dipropilenglicol monometil éter (DPGM), isopropanol (IP) y sílica (SayerLack, 2014).

3.2 Ataque de la comunidad microbiana BP8 a los grupos funcionales del barniz

Savín Gámez, en su tesis de maestría (2016), demostró que las ocho comunidades microbianas crecían en MM-PolyLack, mediante la cuantificación de peso seco de la biomasa generada por las comunidades incubadas por 120 horas. También demostró por espectroscopía infrarroja acoplada a transformada de Fourier (FTIR) que estas comunidades atacan a los grupos funcionales del copolímero acrílico/uretano del barniz. La comunidad microbiana denominada como BP8, en particular, se caracteriza por disminuir drásticamente las señales correspondientes a grupos amina y éter, mientras que desaparece las señales de los grupos metilo, metileno, carbonilo, aromático y enlaces uretano. Esta gran capacidad degradadora llevó a la elección de la comunidad microbiana BP8 como uno de los objetos de estudio para investigaciones posteriores más detalladas acerca de los mecanismos que despliegan para llevar a cabo esa degradación.

Así fue que en nuestro grupo de investigación, en el trabajo de tesis doctoral realizado por Gaytán Enríquez, se analizó el crecimiento y consumo de carbono de la comunidad microbiana BP8 en MM-PolyLack a lo largo de 25 días (Figura 2). Existen dos fases logarítmicas de crecimiento, relacionadas con el consumo de carbono del medio. La cantidad de carbono en el medio se reduce a medida que la comunidad crece durante la primera fase logarítmica, mientras que durante la fase estacionaria intermedia la cantidad de carbono en el medio se mantiene estable, para luego volver a mostrar un decremento durante la segunda fase logarítmica, de tal manera que a los 25 días se ha consumido aproximadamente 50% del carbono del medio. Esto sugiere que la comunidad microbiana BP8 consume las diferentes fuentes de carbono provenientes de los aditivos y del copolímero en estas fases. Un estudio completo de este consumo a lo largo del crecimiento de la comunidad BP8 se describe a detalle en el trabajo de Gaytán y cols. (2019).

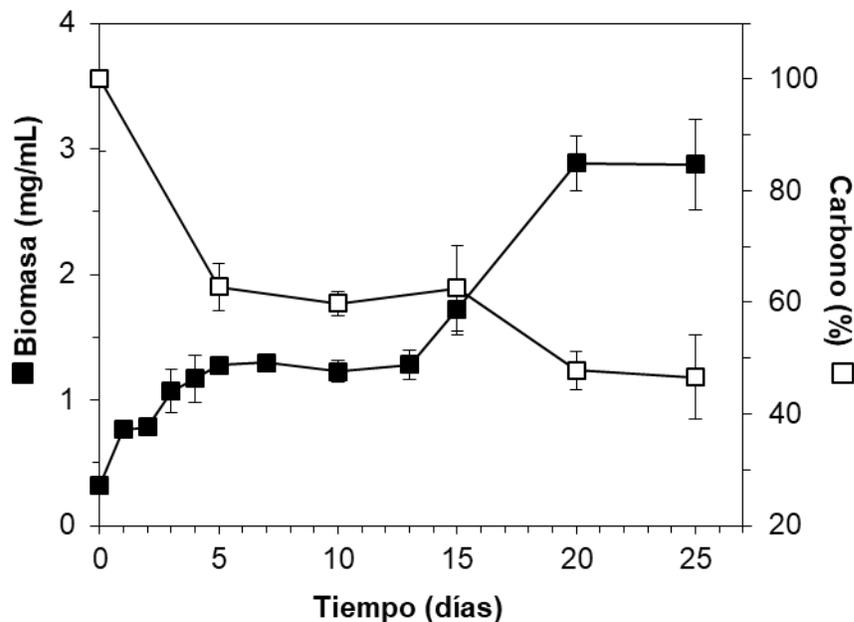


Figura 2. Crecimiento de la comunidad microbiana BP8 y consumo de carbono total en sobrenadantes del cultivo. El crecimiento de la comunidad BP8 en MM-PL presenta un comportamiento diáuxico (Tomado de Gaytán *et al.*, 2019).

3.3 Deconvolución del metagenoma de la comunidad microbiana BP8

A partir de la colecta de comunidades microbianas con capacidad de atacar al PU, en nuestro laboratorio se han hecho esfuerzos por identificar a los miembros de estas comunidades con estas nuevas capacidades. En el primer acercamiento, el trabajo de tesis de licenciatura de Fernández Cruz consistió en el aislamiento de algunos microorganismos de las comunidades y la caracterización morfológica de las colonias aisladas, posteriormente de algunas de estas colonias aisladas se amplificó la región V3 de rRNA 16S para secuenciar los amplicones obtenidos y con ello identificar mediante BLAST contra las bases de datos Genbank e EzTaxon la identidad de las bacterias aisladas (Fernández Cruz, 2015; Vargas-Suárez, 2019).

El siguiente acercamiento a la identificación de los miembros de las comunidades fue el trabajo de tesis de maestría de Savín Gámez, quien amplificó la región V3 de rRNA 16S para identificar estos miembros mediante DGGE (Savín Gámez, 2016).

El acercamiento más reciente ha sido mediante el método de secuenciación de metagenoma empleando la técnica Proximeta Hi-C Metagenome Deconvolution. Esta técnica permite reconstruir genomas individuales a partir de comunidades microbianas complejas, por medio de herramientas de secuenciación y bioinformática, realizando secuenciación de dos tipos de bibliotecas, una de tipo shotgun y otra de DNA entrecruzado (Hi-C). Para la creación de esta última, el DNA dentro de cada célula se entrecruza in vivo, se fragmenta y se ligan los extremos por proximidad, de tal manera que se crean uniones entre secuencias adyacentes. De esta manera, cada

par de secuencias unidas corresponde a DNA proveniente de la misma célula. Las uniones se purifican y se someten a secuenciación de tipo paired-end, para crear las bibliotecas de DNA entrecruzado. Estas lecturas se mapean contra las lecturas de tipo shotgun, para reunir las en clusters que tengan el mismo origen celular, y de esta manera se pueden identificar diferentes microorganismos en una muestra mixta como una comunidad microbiana (Apéndice III) (Burton et al., 2014).

El análisis de las lecturas crudas de la secuenciación shotgun con la herramienta MethaPhlAn (Segata et al., 2012) identificó secuencias correspondientes a 16 géneros bacterianos, siendo los más abundantes *Paracoccus* (83.9%) y *Ochrobactrum* (8.7%). Por otro lado, el análisis de Hi-C y shotgun complementados permitió deconvolucionar cinco genomas, identificando tres de ellos a nivel género, uno a nivel especie y otro a nivel familia (Tabla 1). La asignación taxonómica de estos cinco microorganismos se hizo con base en secuencias de tres marcadores filogenéticos universales de copia única: las proteínas ribosomales L3 y S5, y la subunidad A de DNA girasa (Gaytán et al., 2019).

Tabla 1. Microorganismos identificados en la comunidad BP8 y su abundancia

Microorganismo	Abundancia relativa en BP8* (%)
<i>Paracoccus</i> sp. BP8	57.7
<i>Ochrobactrum intermedium</i> BP8.5	22.5
<i>Parapedobacter</i> sp. BP8.3	12.5
<i>Chryseobacterium</i> sp. BP8.2	3.7
Microbacteriaceae bacterium BP8.4	3.6

*Considerando solo los genomas deconvolucionados mediante el análisis Hi-C.

3.4 Anotación funcional de los genomas deconvolucionados de la comunidad BP8

A partir de los cinco genomas que se obtuvieron mediante la deconvolución del metagenoma de la comunidad microbiana BP8 se realizó la anotación funcional para identificar el potencial fenotípico de la comunidad para biodegradar el copolímero acrílico-uretano y los aditivos presentes en el barniz. Para la biodegradación de NMP se encontraron genes que codifican proteínas muy similares (>40%) a enzimas responsables de la degradación de NMP en *Alycyclophilus denitrificans* BQ1 (Solís-González et al., 2017). Se encontraron genes que codifican enzimas para el metabolismo de IP, el cual lo convierte en acetil-CoA para incorporarlo al ciclo del citrato en *Paracoccus* sp. BP8 y *Ochrobactrum intermedium* BP8.5. Para los glicol éteres se encontraron enzimas homólogas a alcohol deshidrogenasas y aldehído deshidrogenasas que podrían oxidar estos compuestos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, así como enzimas que podrían romper el enlace éter para posteriormente formar intermediarios metabolizables. En cuanto al PU, se

encontraron genes que codifican enzimas homólogas a amidasas y esterases que rompen los enlaces uretano y éster, respectivamente; así como enzimas que rompen enlaces C-C de alcanos alifáticos, C-O-C de polipropileno y monooxigenasas que rompen anillos aromáticos, además de todas las enzimas responsables del metabolismo de benzoato (Gaytán *et al.*, 2019).

La identificación de estas secuencias en el metagenoma de la comunidad BP8 permite proponer un potencial biodegradativo de la comunidad para diversos compuestos xenobióticos. Una manera de comprobar este potencial biodegradativo es por medio de un análisis metatranscriptómico de la comunidad microbiana BP8 cultivada en PolyLack, el cual permitirá conocer los genes que expresan enzimas responsables de la degradación del barniz a diferentes tiempos de cultivo. Una metodología para realizar análisis transcriptómicos es RNA-Seq.

3.5 RNA-Seq

La metodología RNA-Seq aprovecha las tecnologías de secuenciación de siguiente generación (NGS) para analizar el transcriptoma de un organismo, permitiendo la medición de la expresión génica, así como el descubrimiento y anotación de transcritos completos (Cresko Lab, <https://rnaseq.uoregon.edu/>).

El flujo de trabajo general para un experimento de RNA-Seq es el siguiente:

1. Diseño experimental – Establecer los requerimientos del experimento a realizar para resolver el problema planteado, incluyendo si el acercamiento del experimento será cualitativo (anotación funcional) o cuantitativo.
2. Preparación del RNA – Aislar y purificar el RNA del organismo de interés. Enriquecer el mRNA. Se debe evaluar la calidad e integridad del RNA para asegurarse que la muestra es adecuada para la preparación de bibliotecas.
3. Preparación de bibliotecas – Convertir el RNA a DNA complementario de doble cadena (cDNA), añadir adaptadores compatibles con la plataforma de secuenciación que será utilizada y amplificarlo.
4. Secuenciación de bibliotecas – Secuenciar el cDNA generado mediante la plataforma de elección.
5. Análisis bioinformático – Procesar los datos obtenidos mediante el filtrado de las lecturas, ensamblaje de esas lecturas en un transcriptoma o alineándolas a un genoma de referencia, anotación de transcritos, cuantificación de las lecturas y comparación estadística de la abundancia de transcritos entre tratamientos o muestras.

Las ventajas de RNA-Seq por encima de otras estrategias de análisis de transcriptomas como los microarreglos, es que no depende de un genoma de referencia y se puede hacer un ensamble *de novo* de las lecturas, permitiendo también el refinamiento de la anotación funcional de transcritos nuevos en caso de tener el genoma de referencia. Otra ventaja es que los datos obtenidos permiten análisis cuantitativos confiables de los niveles de expresión de transcritos. Las desventajas de esta metodología radican más en el procesamiento y análisis de los datos, los cuales son cruciales para eliminar errores del llamado de base y lecturas de baja calidad que puedan arrojar información falsa (Zhao *et al.*, 2014; Margerat y

Bähler, 2010). Para este trabajo, la metodología de RNA-Seq es la ideal pues permite además el estudio de muestras complejas como son las comunidades microbianas y arrojará información acerca de la dinámica entre los microorganismos que forman parte de la comunidad BP8.

3.6 Planteamiento del problema

Con base en la curva de crecimiento de la comunidad en MM-PolyLack (Figura 2), era de interés obtener RNA de al menos tres tiempos, relacionados con la primera fase logarítmica, la fase estacionaria y la segunda fase logarítmica de crecimiento, para determinar si los genes identificados y sugeridos por la anotación funcional del metagenoma de BP8 se expresaban en estas condiciones y si además de éstos había otros genes expresados que pudieran estar relacionados con la degradación de los compuestos del barniz. Para ello, fue necesario determinar una condición control, donde no se expresarán los genes que podrían estar relacionados con el crecimiento en MM-PolyLack. Los retos a enfrentar en este trabajo fueron definir la condición control y obtener RNA adecuado para realizar un análisis metatranscriptómico. A su vez, el aislamiento de RNA implica enfrentarse a otros retos, como la eliminación efectiva de otros componentes celulares como proteínas, polisacáridos y DNA de tal manera que se conserve su integridad. La confiabilidad de los resultados generados dependerá directamente de la calidad del RNA purificado.

4. OBJETIVOS

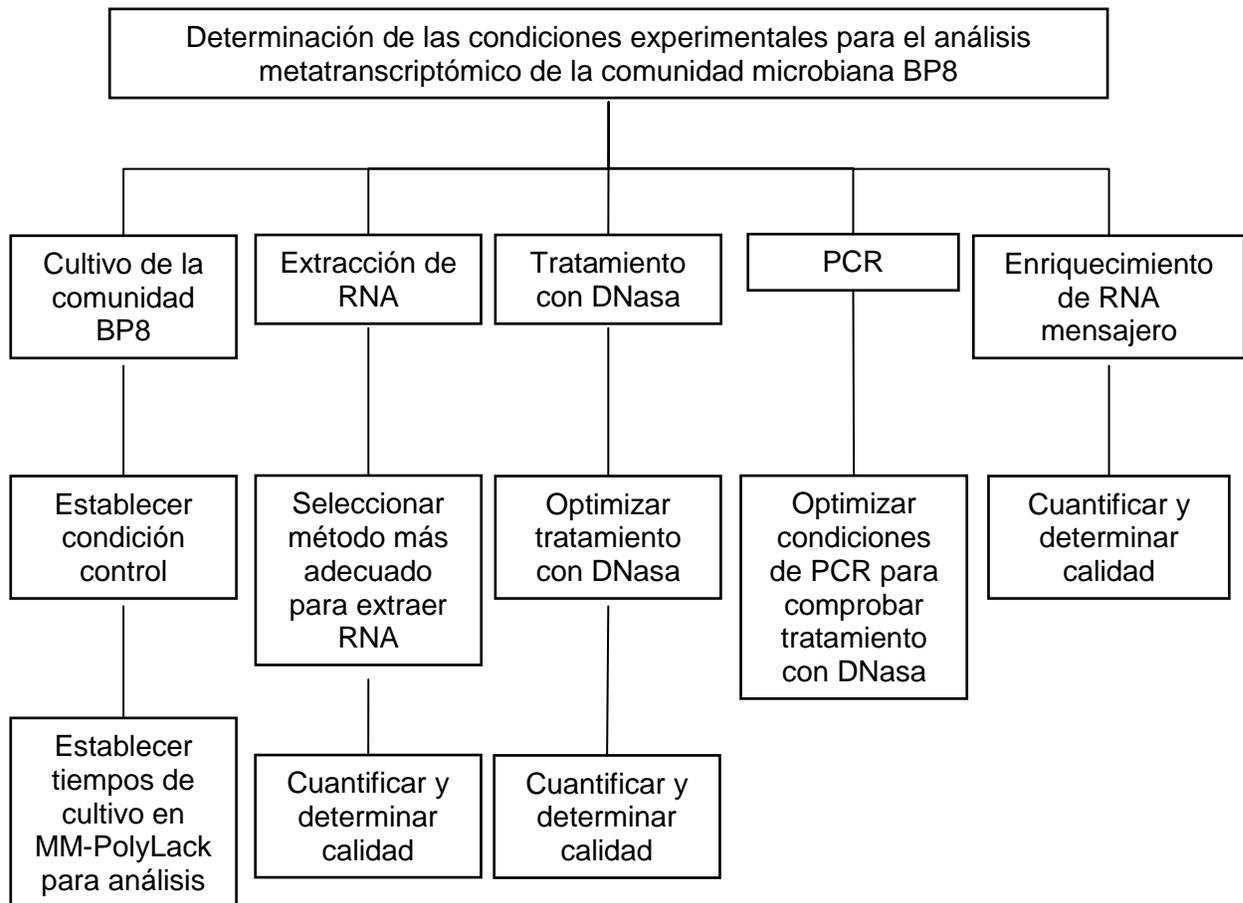
4.1 Objetivo general

Implementar las condiciones experimentales necesarias para purificar RNA mensajero de la comunidad microbiana BP8 a diferentes tiempos de cultivo en MM-PolyLack, definir la condición de cultivo control adecuada y obtener los RNA mensajeros para su posterior análisis metatranscriptómico.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar una condición de cultivo control que permita detectar la expresión diferencial de genes de la comunidad microbiana BP8 cultivado en MM-PolyLack.
- Definir un método adecuado para extracción de RNA total de la comunidad microbiana BP8.
- Seleccionar tiempos de cultivo relevantes de la comunidad microbiana BP8 en MM-PolyLack para extracción de RNA total.
- Obtener RNA total de alta calidad libre de DNA.
- Verificar la calidad del RNA libre de DNA
- Enriquecer el RNA mensajero a partir del RNA total extraído.
- Realizar las preparaciones necesarias para entregar tres réplicas por condición de estudio, de RNA mensajero de alta calidad para la construcción de bibliotecas de cDNA, a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la UNAM.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Barniz de PE-PU-A utilizado como fuente de carbono

El PU utilizado en este trabajo fue el barniz comercial de PE-PU-A PolyLack® Aqua Brillante UB-0800 (Sayer Lack), el cual está compuesto por el copolímero acrílico/uretano ($\leq 30\%$ m/v), N-metil-2-pirrolidona ($\leq 6\%$ v/v), 2-butoxietanol ($\leq 5\%$ v/v), dipropilenglicol butil éter ($\leq 2\%$ v/v), dipropilenglicol monometil éter ($\leq 1\%$ v/v), isopropanol ($\leq 3\%$ v/v) y sílica ($\leq 3\%$ m/v).

6.2 Aislamiento, selección y almacenamiento de la comunidad microbiana BP8

La comunidad microbiana BP8 se obtuvo a partir de un trozo de espuma de PU con signos de deterioro recolectado del vertedero a cielo abierto Bordo Poniente, ubicado en Cd. Nezahualcóyotl, Estado de México, México. Un trozo de espuma de aproximadamente 1 cm^3 se inoculó en un medio mínimo mineral (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995) conteniendo como única fuente de carbono al barniz comercial PolyLack® (concentración de sólidos 0.3%) (MM-PolyLack). Se incubó a 30°C y 220 rpm por 7 días. Después de ese tiempo, 2 mL del cultivo se inocularon en 25 mL de MM-PolyLack fresco y se incubó bajo las mismas condiciones por 1 semana. Se re-inoculó en medio fresco e incubó durante el mismo tiempo y condiciones dos veces más, para sumar en total 28 días de cultivo en MM-PolyLack. Muestras de la comunidad fueron preservadas en MM-PolyLack/30% glicerol a -70°C . Estas condiciones se describen a detalle en el trabajo de Vargas-Suárez y cols. (2019).

A partir de la comunidad microbiana conservada se prepararon alícuotas en glicerol con el propósito de utilizarlas como inóculo para este trabajo:

1. Tomar 500 μL de la comunidad microbiana conservada en glicerol e inocular en 25 mL de MM-PolyLack (ver Apéndice I). Incubar a 37°C y 220 rpm por 48 h.
2. Tomar 5 mL del cultivo anterior e inocular un matraz de 100 mL con 20 mL de MM-PolyLack fresco. Incubar a 37°C y 220 rpm por 16 h.
3. Tomar alícuotas de 350 μL de cultivo y añadir 150 μL de glicerol. Almacenar a -70°C .

6.3 Preparación del preinóculo y siembra de los cultivos

Con el propósito de que los microorganismos de la comunidad microbiana BP8 estuvieran representados similarmente que en la condición inicial de cultivo cada vez que se cultivaran para los experimentos realizados en este trabajo, se definió el siguiente protocolo para generar los preinóculos:

1. Inocular 500 μL de la comunidad microbiana conservada en glicerol en 50 mL de MM-PolyLack fresco e incubar a 37°C y 220 rpm por 48 h.
2. Centrifugar el cultivo a aproximadamente $1800 \times g$ durante 5 min en un tubo estéril de 15 mL, previamente pesado.
3. Descartar el SN y pesar el tubo con la pastilla celular.
4. Resuspender la pastilla en un volumen de MM-PolyLack tal que se tenga una concentración de 3 mg de peso fresco por mL de medio de cultivo. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces de 125 mL con 25 mL de MM-PolyLack.

6.4 Establecimiento de la condición control

6.4.1 Siembra de los cultivos para establecimiento de la condición control

1. Establecer un cultivo de BP8 en 25 mL de MM-PolyLack a partir de preinóculos como ya se describió anteriormente, e incubar a 37°C y 220 rpm por 5 días.
2. Centrifugar el cultivo a 1800 x *g* durante 5 min en tubos estériles de 15 mL, previamente pesados y descartar el SN.
3. Lavar la pastilla obtenida con 10 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7, al menos tres veces o hasta que el SN salga claro.
4. Descartar el SN y cuantificar el peso de la pastilla celular. Para la extracción de proteínas del cultivo inicial (t_0), tomar aproximadamente 150 mg de biomasa.
5. Resuspender 1.2 g de biomasa en 400 mL de medio Luria-Bertani (LB) para tener una concentración de 3 mg de peso fresco por mL. Distribuir el medio inoculado en 16 matraces de 125 mL, de tal manera que cada matraz contenga 25 mL de medio. Incubar a 37°C, a 220 rpm.
6. Tomar un matraz cada dos horas, vaciar el cultivo en tubos estériles de 15 mL previamente pesados y centrifugar el cultivo a 1800 x *g* por 5 min. Posteriormente, descartar el SN.
7. Lavar la pastilla obtenida con 10 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7, al menos dos veces o hasta que el SN salga claro.
8. Descartar el SN y pesar el tubo con la pastilla celular. Posteriormente, resuspender la pastilla en 1 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 y transferir a un tubo de microcentrifuga estéril de 2 mL.

6.4.2 Recuperación de proteínas de la fracción citosólica

1. Colocar en un baño de hielo el tubo de microcentrifuga con la suspensión celular. Lisar las células con el sonicador Vibra Cell VC 505 (Sonics & Materials Inc.) por 6 ciclos de 15 segundos de disrupción por 15 segundos de descanso a amplitud de 21%.
2. Centrifugar el lisado celular a 20800 x *g* por 14 min a 4°C y recuperar el SN en tubos de microcentrifuga estériles de 1.5 mL.

6.4.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas se basa en la unión del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 a la proteína, el cual forma un complejo colorido que absorbe a 595 nm. Para cuantificar las proteínas de la fracción citosólica, se siguió el protocolo incluido en el reactivo Protein Assay (Bio-Rad), basado en el método de Bradford (1976).

1. Tomar un volumen de fracción citosólica de entre 5 y 20 μ L para cada muestra y depositar en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Llevar a un volumen de 800 μ L con buffer de fosfatos (pH 7, 50 mM).
2. Preparar un blanco con 800 μ L de buffer de fosfatos.

3. Añadir a cada tubo 200 μL de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad).
4. Incubar los tubos a temperatura ambiente, en oscuridad, por 5 min. Pasado este tiempo, agitar los tubos por inversión.
5. Medir la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro DU 650 (Beckman). Calcular la concentración de proteína en cada muestra comparando con una curva de calibración preparada con BSA de 2 a 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

6.4.4 Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida

Se analizó el perfil proteico de las fracciones citosólicas extraídas a diferentes tiempos de cultivo de la comunidad microbiana BP8 en medio LB, después de ser cultivada en MM-PolyLack por 5 días, con el propósito de definir el tiempo en el que se presentan cambios en la expresión de genes al cambiar a un medio de cultivo enriquecido. Estos cambios se manifestarían como aparición o desaparición de bandas en un gel SDS-PAGE.

1. Preparar el gel SDS-PAGE al 12% (ver Apéndice I)
2. Cargar 4 μL del marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (BIO-RAD) en el primer pozo
3. Cargar aproximadamente 15 μg de proteína con 5 μL del buffer de carga de cada tiempo a analizar en el gel y correrlo en cámara de electroforesis con buffer de corrida 1X por aproximadamente 2 h a 100 V.
4. Al final de la corrida fijar las proteínas en el gel con solución de Coomassie (ver Apéndice I) por aproximadamente 12 h.
5. Desteñir el gel con solución desteñidora (ver Apéndice I) por aproximadamente 2 h.
6. Digitalizar el gel mediante un sistema de imagen (ChemiDoc XRS+ de BIO-RAD) para analizar los perfiles proteicos y elegir el tiempo de cultivo en LB en el que se observen mayores cambios en dichos perfiles.

6.5 Extracción de RNA de la comunidad microbiana BP8

Para extraer RNA total de la comunidad microbiana BP8 se probaron 3 diferentes métodos: extracción en columna con el kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel), extracción con reactivo TRIzol® (Invitrogen) y extracción con fenol ácido caliente.

6.5.1 Recuperación de biomasa de comunidad microbiana BP8 para extracción de RNA

1. Realizar inóculos de BP8 a una concentración de 3 mg de peso fresco por mL en MM-PolyLack a partir de preinóculos como ya se describió anteriormente, e incubar a 37°C y 220 rpm por los tiempos establecidos para extracción de RNA.
2. Centrifugar el cultivo a aproximadamente 1800 x g durante 5 min en tubos estériles de 15 mL y descartar el SN.
3. Lavar la pastilla obtenida con 10 mL de buffer de fosfatos (pH 7, 50 mM), al menos tres veces o hasta que el SN salga claro. Descartar el SN.

4. Resuspender la pastilla en 1 mL de buffer de fosfatos y transferir a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, previamente pesado.
5. Recuperar la pastilla mediante breve centrifugación, descartar el SN y pesar el tubo con la pastilla celular.
6. Si la biomasa obtenida excede los 100 mg, dividir la biomasa en partes aproximadamente iguales en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL mediante resuspensión en buffer de fosfatos. En este punto se puede proceder con la extracción de RNA con la biomasa fresca o bien, guardar la pastilla celular sin buffer a -70°C hasta su uso.

6.5.2 Extracción de RNA total con el kit NucleoSpin

La extracción de RNA total con el kit NucleoSpin consiste en una extracción en fase sólida utilizando un buffer que lisa las células, inactiva ribonucleasas y crea las condiciones apropiadas para la adhesión del RNA a una columna de sílica. Este kit incluye un tratamiento con DNasa y buffers de lavado que eliminan sales y otros componentes celulares para obtener RNA de alta pureza.

Para la extracción de RNA con el kit NucleoSpin se siguió el protocolo sugerido por el fabricante al cual se le realizaron algunas modificaciones.

1. Resuspender la pastilla celular en 300 μ L de Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8), conteniendo 1 mg/mL de lisozima.
2. Vortexear e incubar a 37°C por 20 min.
3. Transferir solución a un mortero y congelar células con N₂ líquido, macerar con movimientos circulares.
4. Añadir 600 μ L de Buffer RA1 con 6 μ L de β -mercaptoetanol y transferir la suspensión a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Vortexear por 1 min.
5. Centrifugar a 11000 x g por 5 min a 4°C.
6. Depositar el lisado en el filtro de anillo violeta acoplado a un tubo de 2 mL, Centrifugar a 11000 x g por 5 min a 4°C. Si se forma un pellet en el filtrado, tomar el SN y transferir a un tubo de 1.5 mL.
7. Añadir 600 μ L de etanol al 70% al filtrado y vortexear.
8. Pipetear el lisado un par de veces y depositarlo por completo en una columna NucleoSpin (anillo azul). Centrifugar a 11000 x g por 30 s. Pasar la columna a un tubo colector nuevo.
9. Añadir 350 μ L de Membrane Desalting Buffer y centrifugar a 11000 x g por 1 min.
10. Preparar tratamiento con DNasa añadiendo 90 μ L de buffer de reacción a 10 μ L de rDNasa reconstituida.
11. Añadir 95 μ L de rDNasa diluida al centro de la membrana. Incubar a temperatura ambiente por 30 min.
12. Añadir 200 μ L de Buffer RAW2 a la columna. Centrifugar a 11000 x g por 30 s. Cambiar la columna a un tubo colector nuevo.

13. Añadir 600 μL de Buffer RA3 a la columna. Centrifugar a 11000 x *g* por 30 s. Desechar el efluente y regresar la columna al tubo colector.
14. Añadir 250 μL de Buffer RA3 a la columna. Centrifugar a 11000 x *g* por 2 min. Desechar el efluente y colocar la columna en un tubo colector de 1.5 mL nuevo.
15. Añadir 55 μL de agua libre de nucleasas y centrifugar a 11000 x *g* por 1 min.
16. Sin cambiar el tubo o desechar el efluente, repetir el paso 15 con la misma cantidad de agua de tal manera que la cantidad total de efluente obtenido será de 110 μL .
17. Cuantificar el RNA total con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) utilizando 2 μL de muestra y evaluar la integridad del RNA en un gel de agarosa desnaturalizante al 1%.

6.5.3 Extracción de RNA total con Reactivo TRIzol

La extracción de RNA total con el Reactivo TRIzol (Invitrogen) consiste en una extracción orgánica. De acuerdo con el fabricante, el reactivo TRIzol es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidinio y otros compuestos de propietario, que permiten el aislamiento de RNA íntegro en un solo paso, inhibiendo la actividad RNasa, lisando las células y disolviendo componentes celulares. El reactivo y el protocolo están basados en el método de aislamiento de RNA desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987).

El reactivo TRIzol no incluye tratamiento con DNasa, pero se emplea el kit NucleoSpin para este propósito (ver Tratamiento con DNasa y limpieza de RNA total —protocolo del kit NucleoSpin—).

Para la extracción de RNA con el reactivo TRIzol se siguió el protocolo sugerido por el fabricante al cual se le realizaron algunas modificaciones.

El protocolo indica que por cada 50-100 mg de tejido (biomasa) se utiliza 1 mL de TRIzol.

1. Resuspender la pastilla de biomasa en 200 μL de TRIzol.
2. Transferir solución a un mortero y congelar células con N_2 líquido, macerar con movimientos circulares. Añadir más N_2 si fuera necesario para evitar que se descongele.
3. Añadir 800 μL de TRIzol y macerar con movimientos circulares hasta que empiece a descongelarse formando una pasta.
4. Transferir solución a un tubo de microcentrífuga de 2 mL.
5. Centrifugar a 12000 x *g* por 10 min a 4°C.
6. Tomar el SN y transferir a un tubo de 2 mL. Poner el tubo en hielo e incubar 5 min para permitir la disociación de complejos de nucleoproteínas.
7. Añadir 200 μL de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol utilizado, agitar vigorosamente en vórtex por 15 s y posteriormente incubar en hielo 3 min.
8. Centrifugar a 12000 x *g* por 15 min a 4°C.

9. Tomar la fase acuosa cuidadosamente, evitando tomar la interfase o la fase orgánica y transferir a tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
10. Añadir 500 μ L de isopropanol 100% por cada 1 mL de TRIzol utilizado y mezclar por inversión. Incubar a -20°C por 30 min para precipitar.
11. Centrifugar a $12000 \times g$ por 10 min a 4°C .
12. Desechar SN y lavar cuidadosamente el pellet con 1 mL de etanol al 70%, al menos dos veces.
13. Después del lavado, retirar el SN con pipeta y secar la pastilla de RNA a temperatura ambiente, por aproximadamente 5 min.
14. Disolver la pastilla de RNA en 100 μ L de agua libre de nucleasas.
15. Realizar un tratamiento con DNasa y limpieza con el kit NucleoSpin o bien, cuantificar el RNA total con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) utilizando 2 μ L de muestra y evaluar la integridad del RNA en un gel de agarosa desnaturalizante al 1%.

6.5.4 Extracción de RNA total con fenol ácido caliente

La extracción de RNA total con fenol ácido caliente se realizó con un protocolo basado en el reportado por Georgellis y cols. (1992).

1. Colocar los tubos de microcentrífuga con biomasa en hielo. En caso de partir de muestras congeladas, dejar en hielo por 5 min, sin permitir la descongelación total de biomasa.
2. Calentar la solución de fenol (saturado con 0.1 M buffer de citratos, pH 4.3, Sigma Aldrich) a 70°C .
3. En hielo, añadir 200 μ L de Solución I (ver Apéndice I) por cada 100 mg de biomasa y resuspender completamente la pastilla celular mediante pipeteo.
4. Añadir 200 μ L de Solución II (ver Apéndice I) y mezclar suavemente, sin pipeteo.
5. Calentar los tubos de microcentrífuga en un termoblock a 70°C por 1.5 min aproximadamente. Agregar 400 μ L de solución de fenol saturado precalentado a 70°C y vortexear los tubos por 15 s.
6. Incubar los tubos a 70°C por aproximadamente 3 min.
7. Centrifugar los tubos a $20800 \times g$ por 3 min a 4°C .
8. Pasar los tubos a hielo y transferir la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL.
9. En hielo, agregar 1 volumen de solución de fenol a 70°C y vortexear los tubos por 5 s.
10. Centrifugar los tubos a $20800 \times g$ por 3 min a 4°C .
11. Repetir los pasos 8, 9 y 10 hasta que desaparezca la interfase blanca, gruesa y viscosa, que corresponde a proteínas desnaturalizadas. En este punto se pueden juntar las fases acuosas provenientes de la misma muestra de biomasa dividida.

12. Transferir la última fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 mL, agregar 1 volumen de solución de fenol a 4°C y vortexear los tubos por 5 s.
13. Centrifugar los tubos a 20800 x g por 3 min a 4°C.
14. Pasar los tubos a hielo y transferir la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL. Puede ser que se observe una interfase delgada y blanca, en ese caso repetir la extracción con fenol a 4°C hasta que desaparezca.
15. Transferir la última fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 mL y añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, saturado con 10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA, Sigma Aldrich) a 4°C. Vortexear los tubos por 5 s.
16. Centrifugar los tubos a 20800 x g por 3 min a 4°C.
17. Pasar los tubos a hielo y transferir la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL. Si se llega a observar interfase, repetir la extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.
18. Añadir un volumen de cloroformo a 4°C, vortexear los tubos por 5 s y centrifugar a 20800 x g por 3 min a 4°C. Transferir las fases acuosas a tubos nuevos.
19. Añadir 2.5-3 volúmenes de etanol absoluto a 4°C. Vortexear vigorosamente y dejar precipitar el RNA a -20°C toda una noche o a -70°C durante una hora.
20. Centrifugar los tubos a 20800 x g por 15 min a 4°C.
21. Retirar el SN con una pipeta, con cuidado de no aspirar la pastilla de RNA.
22. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, al menos dos veces.
23. Después del lavado, retirar el SN y secar la pastilla de RNA a temperatura ambiente, por aproximadamente 5 min.
24. Disolver la pastilla de RNA en 100 µL de agua libre de nucleasas.
25. Cuantificar el RNA total con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) utilizando 2 µL de muestra, y realizar un gel de agarosa desnaturalizante al 1% para evaluar la integridad.

6.5.5 Extracción de RNA total de cultivos en fase estacionaria y segunda fase logarítmica

La extracción de RNA total de cultivos de 5 a 18 días se realizó con un protocolo basado en el reportado por Wasniewski (2012) para extracción de RNA de fase estacionaria de *E. coli*, con algunas modificaciones.

1. Establecer cultivos de BP8 en 25 mL de MM-PolyLack a partir de preinóculos como ya se describió anteriormente e incubar a 37°C y 220 rpm por los tiempos establecidos para extracción de RNA de cultivos de fase estacionaria y segunda fase logarítmica: 5, 7, 10, 12, 15, y 18 días.
2. Tomar un matraz con el cultivo y añadir 0.1 volúmenes (2.5 mL) de Stop Solution (ver Apéndice I).
3. Centrifugar el cultivo a aproximadamente 1800 x g durante 5 min en tubos estériles de 15 mL y descartar el SN.

4. Lavar la pastilla obtenida con 10 mL de buffer fosfatos salino (PBS) (ver Apéndice I) a 4°C al menos tres veces o hasta que el SN salga claro. Descartar el SN.
5. Resuspender la pastilla en 1 mL de PBS y transferir a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, previamente pesado.
6. Recuperar la pastilla mediante breve centrifugación, descartar el SN y cuantificar el peso de la pastilla celular.
7. Si la biomasa obtenida excede los 100 mg, dividir la biomasa en partes aproximadamente iguales en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL mediante resuspensión en buffer de fosfatos. En este punto se puede proceder con la extracción de RNA con la biomasa fresca o bien, guardar la pastilla celular sin buffer a -70°C hasta su uso.
8. Colocar los tubos de microcentrífuga con biomasa en hielo. En caso de partir de muestras congeladas, dejar en hielo por 5 min, sin permitir la descongelación total de biomasa.
9. Calentar Solución I, Solución II (véase Apéndice) y la solución de fenol (saturado con 0.1 M buffer de citratos, pH 4.3, Sigma Aldrich) a 70°C.
10. Transferir pellet celular a un mortero y congelar células con N₂ líquido, macerar con movimientos circulares.
11. Depositar células molidas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, añadir 200 µL de Solución I a 70°C por cada 100 mg de biomasa y resuspender completamente la pastilla celular mediante pipeteo.
12. Añadir 200 µL de Solución II (véase Anexo) a 70°C y mezclar suavemente, sin pipeteo.
13. Calentar los tubos de microcentrífuga en un termoblock a 70°C por 3 min aproximadamente. Agregar 400 µL de solución de fenol saturado precalentado a 70°C y vortexear los tubos por 15 s.
14. Incubar los tubos a 70°C por aproximadamente 5 min.
15. Incubar en hielo 10 min, invirtiendo los tubos para mezclar cada 30 s.
16. Centrifugar los tubos a 20800 x g por 3 min a 4°C.
17. Pasar los tubos a hielo y transferir la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL.
18. Pasar los tubos a hielo y transferir la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL.
19. En hielo, agregar 1 volumen de solución de fenol a 70°C y vortexear los tubos por 5 s.
20. Centrifugar los tubos a 20800 x g por 3 min a 4°C.
21. Repetir los pasos 8, 9 y 10 hasta que desaparezca la interfase blanca, gruesa y viscosa, que corresponde a proteínas desnaturalizadas. En este punto se pueden juntar las fases acuosas provenientes de la misma muestra de biomasa dividida.

22. Transferir la última fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 mL, agregar 1 volumen de solución de fenol a 4°C y vortexear los tubos por 5 s.
23. Centrifugar los tubos a 20800 x g por 3 min a 4°C.
24. Pasar los tubos a hielo y transferir la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL. Puede ser que se observe una interfase delgada y blanca, en ese caso repetir la extracción con fenol a 4°C hasta que desaparezca.
25. Transferir la última fase acuosa a un tubo nuevo de 1.5 mL y añadir un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, saturado con 10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA, Sigma Aldrich) a 4°C. Vortexear los tubos por 5 s.
26. Centrifugar los tubos a 20800 x g por 3 min a 4°C.
27. Pasar los tubos a hielo y transferir la fase acuosa a tubos nuevos de 1.5 mL. Si se llega a observar interfase, repetir la extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico.
28. Añadir un volumen de cloroformo a 4°C, vortexear los tubos por 5 s y centrifugar a 20800 x g por 3 min a 4°C. Transferir las fases acuosas a tubos nuevos.
29. Añadir 2.5-3 volúmenes de etanol absoluto a 4°C. Vortexear vigorosamente y dejar precipitar el RNA a -20°C toda una noche o a -70°C durante una hora.
30. Centrifugar los tubos a 20800 x g por 15 min a 4°C.
31. Retirar el SN con una pipeta, con cuidado de no aspirar la pastilla de RNA.
32. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, al menos dos veces.
33. Después del lavado, retirar el SN y secar la pastilla de RNA a temperatura ambiente, por aproximadamente 5 min.
34. Disolver la pastilla de RNA en 100 µL de agua libre de nucleasas.
35. Cuantificar el RNA total con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) utilizando 2 µL de muestra, y realizar un gel de agarosa desnaturalizante al 1% para evaluar la integridad.

6.6 Tratamiento de RNA total con DNasa

En un experimento de RNA-Seq, si el RNA a partir del cual se crean y secuencian bibliotecas de cDNA está contaminado con DNA, se obtendrán resultados falsos. Por esto es importante que el RNA sea sometido a un tratamiento con DNasa para eliminar el DNA que pueda haber en la muestra.

De los tres métodos de extracción de RNA total que se probaron, sólo el kit NucleoSpin contiene un tratamiento con DNasa y posterior eliminación de la enzima, Sin embargo, el tratamiento con DNase del kit puede emplearse para eliminar DNA de preparaciones de RNA obtenidas con otro método.

Para el tratamiento con DNasa, se probaron dos métodos: el protocolo complementario del kit NucleoSpin y la enzima DNase I, RNase-free (1 U/µL) (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante con modificaciones.

6.6.1 Tratamiento con DNasa y limpieza de RNA total con protocolo del kit NucleoSpin

El protocolo complementario para el tratamiento con DNasa y limpieza del RNA total después de la extracción de RNA fue seguido de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit NucleoSpin.

1. Preparar mezcla de buffer de unión: por cada 100 μL de solución de RNA en agua, mezclar 300 μL de Buffer RA1 y 300 μL de etanol absoluto.
2. Añadir los 600 μL de mezcla de Buffer RA1 y etanol a los 100 μL de muestra de RNA y mezclar con vórtex.
3. Mezclar la solución de RNA un par de veces para homogeneizar y cargarla totalmente en la columna NucleoSpin de anillo azul.
4. Centrifugar a 11000 x *g* por 30 s.
5. Pasar la columna a un tubo colector de 2 mL.
6. Preparar tratamiento con DNasa añadiendo 90 μL de buffer de reacción a 10 μL de rDNasa reconstituida.
7. Añadir 95 μL de rDNasa al centro de la membrana. Incubar a temperatura ambiente por 30 min.
8. Añadir 200 μL de Buffer RAW2 a la columna. Centrifugar a 11000 x *g* por 30 s. Cambiar la columna a un tubo colector nuevo.
9. Añadir 600 μL de Buffer RA3 a la columna. Centrifugar a 11000 x *g* por 30 s. Desechar el efluente y regresar la columna al tubo colector.
10. Añadir 250 μL de Buffer RA3 a la columna. Centrifugar a 11000 x *g* por 2 min. Colocar la columna en un tubo colector de 1.5 mL.
11. Añadir 55 μL de agua libre de nucleasas y centrifugar a 11000 x *g* por 1 min.
12. Repetir el paso 15 con la misma cantidad de agua, en diferente tubo.
13. Cuantificar el RNA total con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) utilizando 2 μL de muestra, y evaluar la integridad del RNA obtenido en un gel de agarosa desnaturalizante al 1%.

6.6.2 Tratamiento con enzima DNase I, RNase-free (1 U/ μL)

El protocolo para tratamiento con DNasa empleando directamente la enzima DNase I, RNase-free (Thermo Scientific) se llevó a cabo siguiendo indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones.

Para tratar 10 μg de RNA total, calcular las cantidades a añadir de cada componente, considerando que el volumen final de la reacción debe ser 45 μL (ajustar el volumen final si el RNA está en solución más diluida), que el buffer de reacción para la enzima DNase I debe estar a concentración final de 1X y que la preparación debe tener 4.5 U de DNase.

1. En un tubo de microcentrífuga de 200 μ L, añadir en orden: agua libre de nucleasas (si es necesaria), buffer de reacción, RNA y DNasa.
2. Mezclar suavemente dando ligeros golpecitos al tubo. Dividir la reacción en tres alícuotas de igual volumen.
3. Incubar a 37°C por 30 minutos.
4. Transcurrido el tiempo de incubación, juntar las alícuotas de la reacción y llevar la mezcla a un volumen final de 400 μ L con agua libre de nucleasas. Añadir 400 μ L (1 volumen) de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1, saturada con 10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA, Sigma Aldrich). Vortexear la mezcla por 5 s.
5. Centrifugar a 20800 x *g* por 5 min a 4°C.
6. Tomar la fase acuosa y transferir a un tubo nuevo de 1.5 mL. Añadir 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y vortexear por 5 s.
7. Centrifugar a 20800 x *g* por 5 min a 4°C.
8. Añadir 2.5-3 volúmenes de etanol absoluto a 4°C. Vortexear vigorosamente y dejar precipitar el RNA a -20°C toda una noche, o a -70°C durante una hora.
9. Centrifugar los tubos a 20800 x *g* por 15 min a 4°C.
10. Retirar el sobrenadante con una pipeta, con cuidado de no aspirar la pastilla de RNA.
11. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, al menos dos veces.
12. Después del lavado, retirar el sobrenadante y secar la pastilla de RNA a temperatura ambiente, por aproximadamente 5 minutos.
13. Disolver la pastilla de RNA en 18 μ L de agua libre de nucleasas.
14. Cuantificar el RNA total con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) utilizando 2 μ L de muestra, realizar un gel de agarosa desnaturalizante al 1% para evaluar la integridad, y una PCR para comprobar que el RNA está libre de DNA.

6.7 Reacciones de PCR para determinar que las preparaciones de RNA no están contaminadas con DNA.

Para determinar que las preparaciones de RNA no contienen DNA contaminante que genere resultados falsos en el RNA-seq, se analizan por PCR amplificando un fragmento del gen 16S. Para ello se emplean los primers universales 968f y 1401r y la Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific) con los cuales se amplifica una región de aproximadamente 430 pares de bases (968 a 1401) (Luo et al. 2007). Las secuencias de los primers son: 968f: 5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3' y 1401r: 5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3'. Las reacciones se corren en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). La mezcla de reacción empleada fue: Buffer 1X, MgCl₂ 5 mM, dNTP's 1 mM, primer 968f 0.5 mM, primer 1401r 0.5 μ M, DMSO 3%, Taq polimerase 0.02 U/ml. Para el control positivo de la reacción se utilizaron 50 ng DNA como molde, para el control negativo no se utiliza molde y para analizar el RNA se utilizan 200 ng. Las condiciones de la reacción de amplificación fueron: un ciclo a 95°C por 3 min; 30

ciclos de 95°C por 45 s, 54°C por 30 s, 72°C por 40 s y un ciclo de 72°C por 10 min. Los amplicones resultantes se analizan en un gel de TAE al 1.5%.

Con el propósito de tener un control positivo para la PCR necesaria para comprobar la efectividad del tratamiento de las muestras de RNA total con DNasa, se extrajo DNA genómico de la comunidad microbiana BP8. Para ello se empleó el protocolo descrito en Current Protocols of Molecular Biology Vol. 1 (1995) Unidad 2.4, con modificaciones realizadas en nuestro laboratorio (Savín Gámez, 2016).

1. Centrifugar un cultivo de 25 mL de 5 días en MM-PolyLack a aproximadamente 1800 x g durante 5 min en tubos estériles de 15 mL. Descartar el SN.
2. Lavar la pastilla obtenida con 10 mL de buffer de fosfatos (pH 7, 50 mM), al menos tres veces o hasta que el SN salga claro. Descartar el SN.
3. Lavar la pastilla celular con buffer Tris-EDTA (TE, 50 mM/20 mM) y resuspender en 450 µL del mismo buffer.
4. Agregar 50 µL de lisozima (10 mg/mL) y 8 µL de RNasa (25 mg/mL, Sigma Aldrich R-4642). Mezclar e incubar la mezcla a 37°C por 60 min.
5. Agregar 50 µL de SDS (10%), vortexear e incubar a 37°C por 35 min.
6. Añadir 6 µL de proteinasa K (20 mg/mL, Thermo Scientific, #EO0491), vortexear e incubar a 37°C por 30 min.
7. Añadir 100 µL de NaCl 5 M, vortexear e incubar a 65°C por 10 min.
8. Añadir 100 µL de CTAB 2% en NaCl 0.7 M, vortexear e incubar a 65°C por 15 min.
9. Añadir 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y vortexear. Centrifugar la mezcla a 20800 x g por 5 min a 4°. Repetir los pasos 8 y 9 para remover los polisacáridos de la muestra.
10. Tomar la fase superior y transferir a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL. Añadir 1 volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1, Sigma-Aldrich, 77617) y vortexear para mezclar bien. Centrifugar la mezcla a 20800 x g por 5 min a 4°C.
11. Tomar la fase superior y transferir a un tubo estéril de 1.5 mL. Agregar 1 volumen de cloroformo:isoamílico (24:1) y vortexear para mezclar bien. Centrifugar la mezcla a 20800 x g por 5 min a 4°C.
12. Tomar la fase superior y se transferir a un tubo estéril de 1.5 mL. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol y mezclar por inversión. Incubar 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar la mezcla a 20800 x g por 5 min a 4°C.
13. Retirar el SN, lavar la pastilla de DNA 3 veces con etanol al 70% y dejar secar a temperatura ambiente.
14. Resuspender la pastilla de DNA en 30 µL de agua estéril libre de nucleasas y separar en alícuotas de 5 µL.
15. Utilizar 2 µL para cuantificar el DNA genómico extraído con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) utilizando 2 µL de muestra, realizar un gel de TAE al

1% para evaluar la integridad, y una PCR para amplificar la región del gen rRNA 16S.

6.8 Análisis del RNA total libre de DNA por Bionalyzer

Para asegurarse de que el RNA total libre de DNA tuviera una calidad adecuada para purificar RNA mensajero a partir de éste, se cuantificó y se separó una alícuota de cada muestra para ser analizada por el Bioanalyzer 2100 (Agilent) en la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva y Bioinformática (UUSMB) del Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM. Este equipo, basado en una combinación de microfluídica, electroforesis microcapilar y detección por fluorescencia, evalúa la integridad de muestras de RNA usando un algoritmo, el cual, entre otros parámetros, mide la relación entre las áreas de los picos correspondientes al RNA ribosomal 16S y 23S. Esta relación arroja un número llamado RNA Integrity Number (RIN) (Schroeder *et al.*, 2006). Si el valor de RIN en una muestra es mayor o igual a 7, se consideraba adecuada y se procedía al enriquecimiento de RNA mensajero.

6.9 Reducción de RNA ribosomal de las muestras de RNA total con el kit MICROBExpress (Invitrogen)

Para obtener lecturas más representativas de la secuenciación y lograr hacer un análisis metatranscriptómico completo, el RNA mensajero se enriquece mediante eliminación del RNA ribosomal, el RNA de transferencia y el RNA no codificante de tamaño menor a 200 nucleótidos.

Para eliminar el RNA ribosomal, el kit comercial MICROBExpress® (Invitrogen) se basa en el método de captura por hibridación selectiva oligonucleótidos de captura para RNAs ribosomales, unidos a perlas magnéticas que al ser atraídas por un imán, separan los RNA ribosomales 16S y 23S de la muestra de RNA total, conservando el RNA mensajero, el RNA de transferencia, el RNA ribosomal 5S y otros tipos de RNA pequeños.

Para someter las muestras de RNA a tratamiento con el kit MICROBExpress se deben tomar algunas consideraciones:

- La muestra de RNA total debe estar libre de DNA contaminante.
- El RNA debe estar íntegro.
- La cantidad máxima que se puede tratar con una reacción son 10 µg de RNA total, en un volumen máximo de 15 µL.
- La muestra de RNA debe estar en solución de EDTA ≥ 1 mM.

Para la eliminación de RNA ribosomal con el kit MICROBExpress se siguió el protocolo del fabricante, con algunas modificaciones en los tiempos de incubación.

1. Depositar 200 µL de Binding Buffer en un tubo de 1.5 mL.
2. Añadir la muestra de RNA total. Mezclar suavemente con ligeros golpecitos al tubo.
3. Añadir 4 µL de Capture Oligo Mix a la mezcla de RNA y buffer. Mezclar suavemente con ligeros golpecitos al tubo.

4. Incubar la mezcla a 70°C por 15 min para desnaturalizar la estructura secundaria del RNA.
5. Incubar la mezcla a 37°C por 1 hora para que las regiones homólogas de RNA ribosomal 16S y 23S se hibriden.
6. Vortexear el tubo que contiene la suspensión de Oligo MagBeads para homogeneizarlas. Tomar 50 µL por cada muestra de RNA a tratar y depositarlos en un tubo de 1.5 mL.
7. Capturar las Oligo MagBeads poniendo el tubo en un soporte magnético, por aproximadamente 5 min o hasta que todas las perlas estén acomodadas en el tubo cerca del imán.
8. Retirar el SN aspirando con una pipeta y descartarlo.
9. Añadir un volumen equivalente al original (antes de la captura magnética) de agua libre de nucleasas a las perlas. Mezclar suavemente con ligeros golpecitos al tubo.
10. Recapturar las perlas con el soporte magnético, aspirar el agua y descartarla.
11. Añadir un volumen equivalente al original (antes de la captura magnética) de Binding Buffer a las perlas. Mezclar suavemente con ligeros golpecitos al tubo.
12. Recapturar las perlas con el soporte magnético, aspirar el Binding Buffer y descartar.
13. Añadir un volumen equivalente al original (antes de la captura magnética) Binding Buffer fresco a las perlas. Mezclar suavemente con ligeros golpecitos al tubo.
14. Incubar el tubo a 37°C hasta que se equilibre la temperatura de la solución.
15. Tomar 100 µL de Wash Solution por cada muestra de RNA y depositar en un tubo de 300 µL. Precalentar a 37°C.
16. Mezclar las Oligo MagBeads suavemente con ligeros golpecitos al tubo y añadir 50 µL de la suspensión a la mezcla de RNA y Capture Oligo Mix.
17. Incubar a 37°C por 1 hora.
18. Capturar las Oligo MagBeads con el soporte magnético por al menos 5 min.
19. Aspirar el SN (RNA sin RNA ribosomal) y transferirlo a un tubo colector en hielo.
20. Añadir 100 µL de Wash Solution precalentada a las Oligo MagBeads capturadas. Mezclar suavemente con ligeros golpecitos al tubo.
21. Recapturar las Oligo MagBeads y retirar el SN. Transferirlo a la solución de RNA recuperada.
22. Añadir a la solución de RNA recuperada lo siguiente en el orden que se indica: 1/10 volumen de acetato de sodio 3M, 1/50 volumen de glucógeno (5 mg/mL) y 3 volúmenes de etanol 100% frío. Mezclar por inversión.
23. Precipitar a -70°C por al menos una hora.
24. Centrifugar 30 min a $\geq 10,000 \times g$ a 4°C.

25. Retirar el SN con una pipeta, con cuidado de no aspirar la pastilla de RNA.
26. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70%, al menos dos veces.
27. Después del lavado, retirar el SN y secar la pastilla de RNA a temperatura ambiente, por aproximadamente 5 min.
28. Disolver la pastilla de RNA en 20 μ L de agua libre de nucleasas. Continuar lo más pronto posible con la separación de RNA pequeño (17-200 nucleótidos)

6.10 Separación de RNA pequeño (17 - 200 nucleótidos) con el kit RNA Clean & Concentrator -5 (Zymo Research)

Para la separación de RNA pequeño, este kit emplea un sistema de buffer de unión a una columna de sílica que permite la recuperación selectiva de RNA total de tamaño mayor a 200 nt y/o RNA de 17 a 200 nt de longitud.

Para usar el kit RNA Clean & Concentrator -5 se siguió el protocolo del fabricante, con algunas modificaciones.

1. Ajustar el volumen de la muestra de RNA a mínimo 50 μ L.
2. Preparar RNA Binding Buffer ajustado: mezclar volúmenes equivalentes de buffer y etanol (95-100%), preparando conforme se vaya necesitando.
3. Añadir 2 volúmenes de buffer ajustado a la muestra y mezclar.
4. Transferir la mezcla a la columna de sílica en un tubo colector de 1.5 mL y centrifugar por 30 seg. Los RNA pequeños se encontrarán en el efluente, mientras que el RNA de interés quedará retenido en la columna.
5. Cambiar la columna de tubo. Añadir 400 μ L de RNA Prep Buffer a la columna y centrifugar por 30 seg a 16,000 x g. Desechar el efluente
6. Añadir 700 μ L de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar por 30 seg a 16,000 x g. Desechar el efluente.
7. Añadir 400 μ L de RNA Wash Buffer a la columna y centrifugar por 30 seg a 16,000 x g. Desechar el efluente.
8. Añadir 6 μ L de agua libre de RNAsas directamente en la columna y centrifugar por 20 segundos. Repetir la elución con otros 6 μ L.
9. Cuantificar el RNA con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) utilizando 2 μ L de muestra.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue obtener preparaciones de RNA mensajero de la comunidad microbiana BP8 a diferentes tiempos de cultivo en MM-PolyLack y de una condición control que permitieran realizar un análisis metatranscriptómico con el propósito de definir qué genes se expresan cuando la comunidad BP8 se cultiva en PE-PU-A y aditivos xenobióticos.

7.1 Determinación de la condición control

Lo primero que se realizó fue determinar qué condición de cultivo podría considerarse un control adecuado, que permitiera inferir la expresión diferencial de genes de la comunidad microbiana BP8 cuando se cultiva en un medio con un barniz de PE-PU-A como única fuente de carbono. Debido a que la comunidad BP8 siempre se ha cultivado en MM-PolyLack, no se tenía información de cómo se comportaría al cultivarse en un medio rico, como el medio LB, lo cual podría incluso modificar su composición poblacional. Por esto, se propuso cultivar a la comunidad microbiana BP8 en MM-PolyLack y posteriormente transferirla a medio LB por diferentes horas, monitoreando cambios en los perfiles proteicos, lo que sería un reflejo de cambios en el metabolismo de la comunidad y por lo tanto de cambios en la expresión genética debido a represión de genes que codifican proteínas que participan en la degradación de los componentes del barniz ya que no es necesario que se expresen en medio rico.

Para llevar a cabo este análisis, se cultivó a la comunidad BP8 en MM-PolyLack por 5 días, tiempo en el que la comunidad alcanza la fase estacionaria, se cosecharon las células y se pasaron a medio LB distribuyéndose en distintos matraces. Cada 2 h durante 16 h se tomó un matraz del que se cosecharon las células para extraer las proteínas de la fracción citosólica. Estas proteínas se analizaron en un SDS-PAGE, para observar la desaparición de bandas en el gel, lo que estaría relacionado con el abatimiento de la expresión de los genes involucrados en la degradación del barniz PolyLack y aparición de nuevas bandas que corresponderían a genes necesarios para crecer en medio rico. Se observó que a las 4 h de cultivo en medio LB desaparecen bandas presentes a 2 h de cultivo; asimismo desaparecen proteínas a las 12 h de cultivo que estaban presentes a las 10 (Figura 3). Se eligió tomar cultivos de 12 h en LB como cultivo control dado que a este tiempo observamos que hay un cambio más claro en la expresión genética.

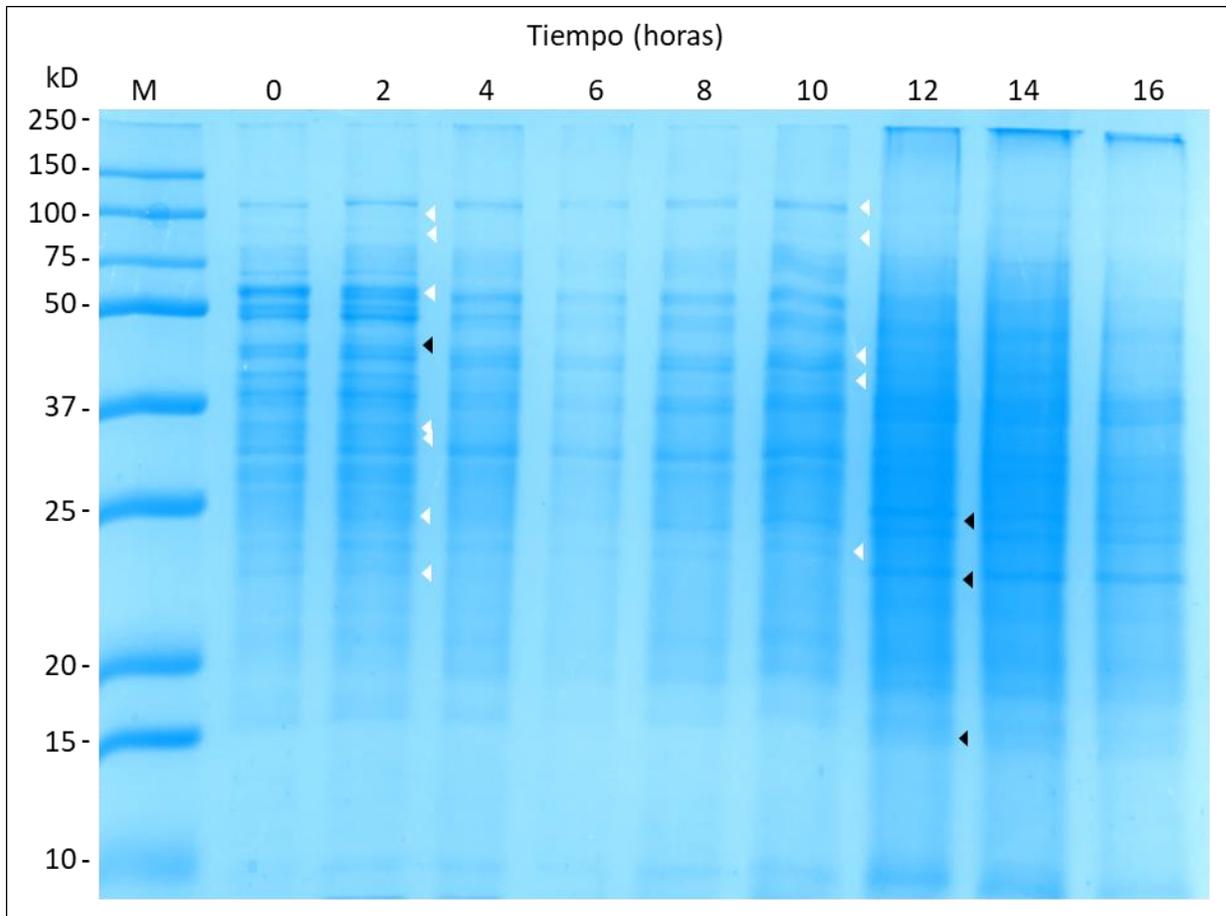


Figura 3. Perfiles proteicos de las fracciones citosólicas de cultivos de la comunidad microbiana BP8 en LB de 0 a 16 horas analizados en SDS-PAGE (12%). Las flechas blancas indican bandas que desaparecen con respecto al carril siguiente, las flechas negras indican bandas que aparecen con respecto al carril anterior. M: Precision Plus Protein Standards (BIO-RAD). En cada carril se cargaron 15 mg de proteína.

7.2 Determinación del protocolo más adecuado para la extracción de RNA total de la comunidad BP8

En un experimento de RNA-Seq, la calidad e integridad de los transcritos de RNA mensajero son cruciales para obtener información confiable acerca de la expresión genética. El método de extracción utilizado para obtener RNA total afecta la calidad de éste y en consecuencia, los resultados de perfiles genéticos (Jahn *et al.*, 2008). Por esta razón, es indispensable obtener RNA total de la más alta calidad posible, de tal manera que después de los diferentes procesos para obtener RNA mensajero, su calidad no se afecte. Se probaron de manera consecutiva métodos de extracción de RNA de comunidades microbianas creciendo en MM-PolyLack, utilizando cultivos de 18 h, hasta encontrar un protocolo que aislara RNA en una cantidad y calidad adecuadas.

El primer método que se probó fue el kit comercial NucleoSpin[®] (Macherey Nagel), el cual se basa en extracciones en fase sólida. La principal ventaja de utilizar kits de fase sólida es que la extracción de ácidos nucleicos es más rápida y eficiente en comparación con los métodos convencionales (Tan *et al.*, 2009). Inicialmente se extrajo RNA siguiendo el protocolo del fabricante, sin ninguna modificación, pero se obtuvieron rendimientos y calidades más bajas de las que garantizaba el fabricante. Debido a esto, se realizaron distintas modificaciones al protocolo para lograr optimizar la extracción de RNA total con este kit, las cuales consistieron en: aumentar la cantidad de células tratadas, lisar las células con lisozima y una combinación de ambas. Aún con las modificaciones, el rendimiento de RNA no mejoró substancialmente (Tabla 2). La principal desventaja de utilizar kits comerciales de columnas de sílica es que no se logran eluir por completo los ácidos nucleicos, de tal manera que 5-10% de los ácidos nucleicos extraídos se mantienen retenidos (Esser *et al.*, 2005), por lo que se buscó otra alternativa de extracción del RNA.

El segundo método que se probó para extraer RNA fue con el reactivo TRIzol[®] (Invitrogen), el cual está basado en un protocolo de extracción de fenol y tiocianato de guanidina desarrollado por Chomczynski y Sacchi (1987). La ventaja de este protocolo es la extracción en un solo paso, por lo cual es un método muy rápido. Se extrajo RNA con este reactivo siguiendo el protocolo del fabricante, al cual se le hicieron algunas modificaciones para maximizar la extracción de RNA, las cuales consistieron en lisis celular macerando la biomasa congelada con N₂ e incubación a -20°C por 30 min antes de la precipitación. El rendimiento del RNA total extraído mejoró con respecto a los resultados obtenidos del kit NucleoSpin. Sin embargo, la calidad no era adecuada (Tabla 2), por lo que se buscó otro método de extracción que pudiese mejorar los resultados obtenidos.

El tercer método de extracción que se probó fue una extracción de fenol-cloroformo. En este método la solución de fenol utilizada está a pH bajo (4.2) y las primeras extracciones se realizan con la solución caliente (70°C). Se utilizó un método basado en el reportado por Georgellis y cols. (1992), con el cual se obtuvieron mejores rendimientos de RNA con calidad adecuada para los pasos subsiguientes (Tabla 2). El pH de la solución de fenol juega un papel importante en la extracción, pues determina la separación del RNA del DNA en las fases acuosa y orgánica, respectivamente. A un pH neutro o ligeramente alcalino, los enlaces fosfodiéster en los ácidos nucleicos están cargados negativamente, por lo que tanto DNA como RNA se encontrarán en la fase acuosa. Por el otro lado, si el fenol está a un pH ácido, la mayoría de las proteínas y DNA menor a 10 kb se separarán a la fase orgánica, mientras que los fragmentos de DNA más largos y algunas proteínas se encontrarán en la interfase (Zumbo, <http://physiology.med.cornell.edu>; Jankovich, 2016).

Uno de los criterios más importantes para elegir un método adecuado de extracción de RNA es la integridad del RNA total extraído, la cual se puede evaluar visualmente mediante electroforesis en gel de agarosa. En esta evaluación el resultado esperado es observar dos bandas intensas, características en una muestra de RNA total: la correspondiente a RNA ribosomal 23S de aproximadamente 2.9 kb y la del RNA ribosomal 16S de aproximadamente 1.5 kb. En caso de observarse un barrido en lugar de las bandas intensas, la muestra de RNA se considera degradada.

Todas las muestras de RNA obtenidas con los diferentes métodos de extracción se corrieron en geles de agarosa desnaturalizante (realizados con buffer MOPS con formaldehído al 37%) teñidos con una solución de EtBr 120 µg/mL. Algunos resultados representativos se presentan en la Figura 4. Para los tres métodos de extracción evaluados, se observaron las dos bandas características de RNA ribosomal bien definidas, por lo cual se puede concluir que los tres métodos extraen RNA total íntegro. En algunas muestras de RNA puede verse un desplazamiento de las bandas, el cual puede ser debido al procesamiento del RNA para su extracción o bien, por efecto del gel desnaturalizante (con formaldehído).

Dado que con el método del fenol ácido caliente se obtenía RNA íntegro, con el mejor rendimiento y mejor calidad dada por las relaciones de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , se eligió este método para extraer RNA total de la comunidad microbiana BP8 a los distintos tiempos de cultivo.

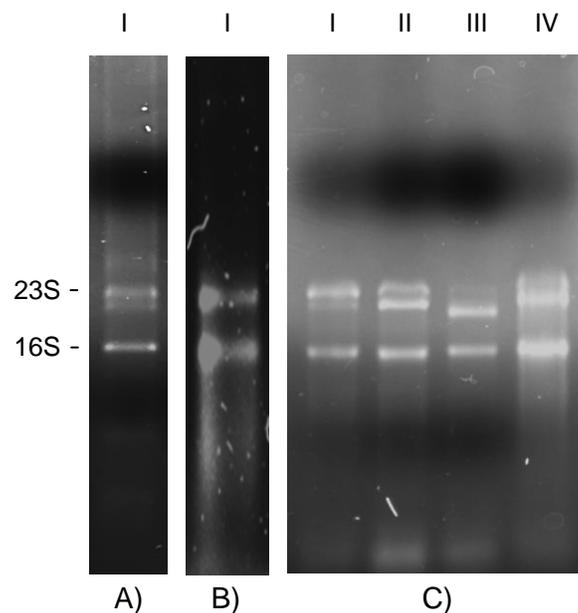


Figura 4. RNA total extraído mediante los diferentes protocolos evaluados. A) kit NucleoSpin®, B) TRIzol® y C) fenol ácido caliente. RNA de cultivos de: I) 18 horas, II) 3 días, III) 12 días, IV) control (5 días en MM-PolyLack más 12 h en LB). Gel desnaturalizante de agarosa al 1%. En cada carril se cargó 1 µg de RNA.

Tabla 2. Comparación de calidad y rendimiento de RNA total extraído mediante los protocolos de kit NucleoSpin®, TRIzol® y fenol ácido caliente.

Método	Condición	Biomasa tratada (mg)	Concentración (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	RNA total obtenido (μg)	μg RNA total/mg biomasa
NucleoSpin®	18 h	60	63.6	1.39	0.75	3.8	0.063
	18 h (+ lisozima)	150	62.9	1.82	1.11	6.8	0.046
	18 h (+ lisozima)	1000	22.1	1.74	0.64	2.3	0.002
TRIzol®	18 h	130	465	1.75	0.70	22	0.17
	18 h	100	517.4	1.83	0.61	24	0.24
Fenol ácido caliente	18 h	120	666.2	1.84	2.4	58.8	0.45
	3 días	145	282	1.79	2.3	19.6	0.13
	12 días	150	156.7	1.68	2.28	9.8	0.06
	Control	200	1323.6	1.95	2.27	127.4	0.58

7.3 Tratamiento con DNasa

En la preparación de bibliotecas para RNA-Seq, el cDNA debe reflejar lo más cercanamente posible la población de RNA a partir del cual fue sintetizado (Marguerat y Bähler, 2010). Es por esto que es importante que el RNA esté libre de DNA contaminante que pueda generar datos falsos de expresión génica y con ello afectar al análisis transcriptómico.

La manera más sencilla y efectiva de eliminar el DNA contaminante de muestras de RNA es mediante la digestión en solución con DNasa I libre de RNasa. Hay dos alternativas para llevar a cabo este tratamiento: ya sea como un paso por separado después del aislamiento de RNA o en el mismo tubo de reacción durante la síntesis de cDNA a partir de RNA mensajero (Huang *et al.*, 1996). Dado que uno de los objetivos de este trabajo es obtener muestras de RNA mensajero listo para la síntesis de cDNA, se optó por realizar el tratamiento con DNasa posterior al aislamiento de RNA total y previamente al enriquecimiento de RNA mensajero. Para establecer el protocolo más adecuado para realizar este tratamiento, se emplearon muestras de RNA total de cultivos de 18 h en MM-PolyLack.

Habiendo decidido esto y considerando que se tenía disponible en el laboratorio el kit NucleoSpin en el cual después de la extracción y adsorción del RNA en la columna de sílica, se da el tratamiento con DNasa I, que se incuba y se elimina antes de eluir el ácido nucleico, se probó este sistema para eliminar el DNA de las preparaciones. La ventaja de este método es que se minimiza la manipulación del RNA extraído, con lo cual se reduce la posibilidad de contaminación o desnaturalización. Las desventajas de este método, como ya se mencionó anteriormente, es la retención del ácido nucleico en la columna —lo cual se traduce en un bajo rendimiento de RNA— y que el kit no garantiza la eliminación total del DNA contaminante.

También se probó la eliminación de DNA con un tratamiento con DNasa en solución, empleando la enzima comercial DNase I RNase-free (1 U/ μ L) (Thermo Scientific). La desventaja de este método es la pérdida física de RNA y que demanda mayor tiempo que el método en columna (Huang *et al.*, 1996). Se realizaron varias pruebas consecutivas para optimizar la reacción, modificando las cantidades de RNA a tratar, las unidades de DNasa empleadas y el tiempo de incubación (Tabla 3). Después de la digestión de DNA con la enzima, ésta debe desactivarse y/o retirarse de la solución de RNA, dado que cualquier residuo de DNasa I podría degradar el cDNA sintetizado. Este procedimiento puede realizarse mediante inactivación por calor o eliminación de la enzima mediante una extracción con fenol, seguida de precipitación con etanol del RNA libre de DNA. La inactivación por calor implica la adición de EDTA para quelar iones metálicos que puedan existir en la preparación, pero el EDTA es un inhibidor de la PCR, la cual debe hacerse posteriormente verificar que el tratamiento con DNasa ha sido efectivo. Por lo tanto, se eligió eliminar la enzima con una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, seguida de una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico para limpiar residuos de fenol, y reprecipitar el RNA libre de DNA para analizarlo mediante PCR, de tal manera que se pueda proseguir al enriquecimiento de RNA mensajero.

Tabla 3. Tratamientos con DNase I RNase-free (Thermo Scientific) probados para tratar muestras de RNA total extraído.

Componente	Tratamiento				
	1	2	3	4	5
RNA (μg)	30	20	20	10	3.3
Buffer DNase I (10 X) (μL)	30	20	20	10	1.5
DNase I (U)	1	4	8	6	1.5
Volumen total (μL)	300	200	200	100	15
Tiempo incubación (h)	1	1.5	2	12	0.5

Para probar el tratamiento con DNasa en columna se empleó una muestra de RNA extraída con TRIzol. De esta manera, se podría controlar la cantidad de RNA a tratar y comparar con la cantidad eluida después del tratamiento. Además del tratamiento con DNasa, el kit también puede usarse para limpieza de la muestra, por lo cual también se podría comparar la calidad del RNA antes y después del tratamiento. La calidad de la muestra mejoró, aumentando el valor de las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , aunque esta última no se encontraba dentro del rango aceptable (mayor a la relación A_{260}/A_{280}). Por otro lado, se perdió gran cantidad del RNA inicial (89%) (Tabla 4). En cambio, para el RNA total tratado con DNasa en solución, las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} de las muestras después de cada tratamiento son similares o incluso mejoran con respecto a las relaciones de la muestra de RNA total original, lo cual indica que la limpieza de la enzima mediante extracciones orgánicas no afecta negativamente a la calidad del RNA. Por otro lado, hay una reducción importante de la cantidad de RNA de entrada de más del 60%, lo cual indica que a pesar de que en teoría la extracción con fenol es selectiva para RNA, en la práctica se extrae una cantidad importante de DNA, esto aunado a la pérdida física de RNA tratado debido a la manipulación necesaria para realizar la extracción orgánica para la eliminación de la enzima (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de calidad y cantidad del RNA total después de los tratamientos con DNasa probados.

	Tratamiento	Cantidad de RNA total de entrada (µg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Cantidad de RNA total de salida (µg)	Pérdida (%)
Antes	DNasa NucleoSpin	22	1.75	0.70		
Después			2.07	1.07	2.3	89
Antes	1	30	1.93	2.18		
Después			1.99	1.86	16.5	45
Antes	2	20	2.08	2.29		
Después			2.01	1.99	6.6	67
Antes	3	20	2.08	2.29		
Después			2.01	2.10	9.6	52
Antes	4	10	2.07	2.31		
Después			2.08	2.16	2.9	71
Antes	5	10	2.08	2.06		
Después			2.07	2.12	4.39	56.1

Después de la eliminación del DNA, limpieza, precipitación y cuantificación del RNA resultante, se realizó un análisis de integridad en gel de agarosa desnaturante para asegurar que las muestras de RNA conservasen la integridad y por lo tanto se pudieran seguir procesando. De los tratamientos probados, solo el tratamiento 4 (Tabla 6) resultó ser muy agresivo debido al tiempo de incubación y degradó algunas de las muestras, por lo que se descartó este tratamiento (Figura 5). Estas muestras fueron analizadas por PCR para determinar si la eliminación del DNA fue efectiva.

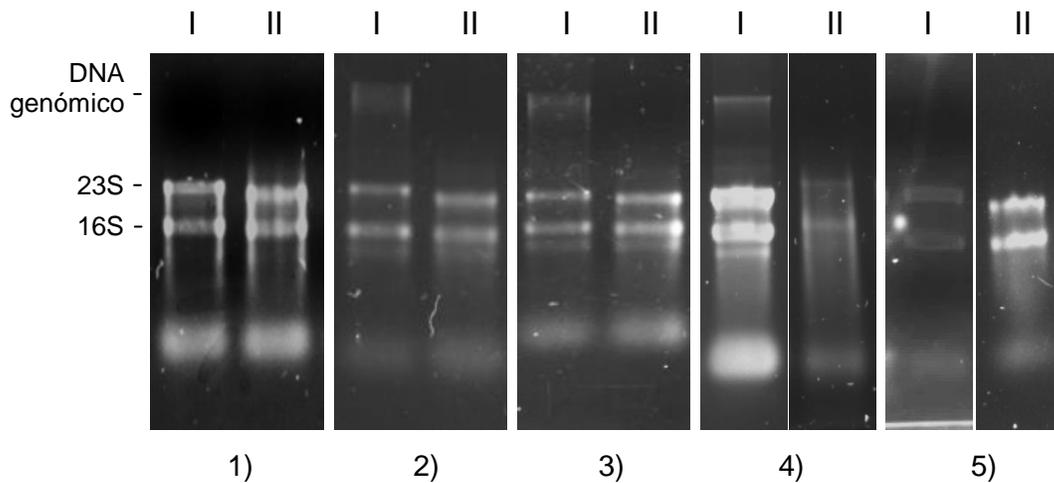


Figura 5. Integridad de RNA total tratado con DNasa. 1) Tratamiento 1, 2) Tratamiento 2, 3) Tratamiento 3, 4) Tratamiento 4, 5) Tratamiento 5. Para detalles de los tratamientos ver Tabla 6. I) RNA total antes del tratamiento, II) RNA total después del tratamiento. DNasa: DNase I, RNase-free (Thermo Scientific). Gel desnaturalizante de agarosa al 1%. En cada carril se cargó 1 μ g de RNA.

7.3.1 Determinación de la efectividad del tratamiento con DNasa

Para determinar la efectividad del tratamiento con DNasa en las muestras de RNA total, se realizan reacciones de PCR. Se empleó como control positivo para la PCR, DNA genómico de la comunidad BP8 con relaciones de A_{260}/A_{280} mayores a 1.8 y buena integridad (Tabla 5, Figura 6). El DNA se empleó como molde para optimizar las condiciones de la PCR. Una banda de 430 pb del rDNA 16S se obtiene de la amplificación con los primers 968f y 1401r. (Figura 7).

Tabla 5. Características de DNA genómico de BP8.

# Muestra	Biomasa tratada (mg)	Concentración (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	DNA obtenido (μ g en 30 μ L)
1	95	433.4	1.94	2.10	13
2	123	676.2	1.84	1.79	20

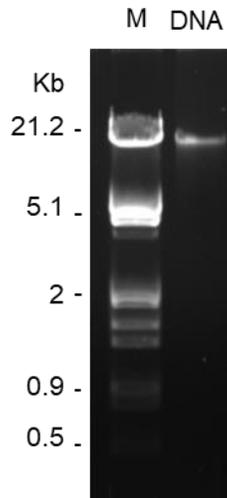


Figura 6. DNA genómico de la comunidad BP8. Se cargaron 200 ng de DNA. M: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker (Thermo Scientific). Gel de agarosa al 1%.

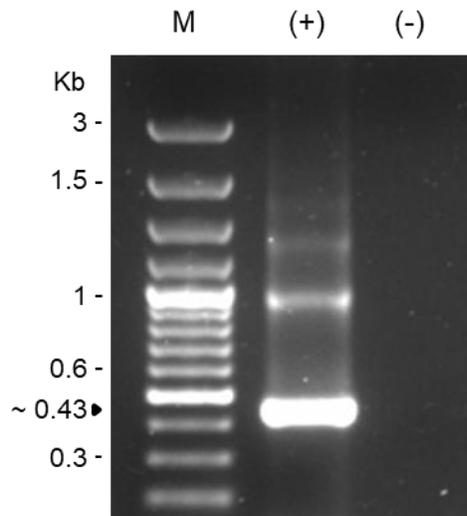


Figura 7. Amplicón del fragmento 968-1401 del gen rDNA 16S obtenido de la comunidad BP8. (+) reacción con 100 ng DNA genómico de BP8, (-) reacción sin DNA molde, M: GeneRuler 100 bp Plus (Thermo Scientific). Gel de agarosa al 1%. En cada carril se cargaron 5 μ L de reacción. La flecha indica el tamaño de la banda que se genera empleando los primers 968f y 1401r para un fragmento de rDNA 16S.

Para verificar la sensibilidad de la reacción de PCR se llevaron a cabo pruebas con diluciones seriadas de DNA de BP8 como molde (Figura 8). Se encontró que aún empleando 0.25 ng de DNA como molde, se logran amplificaciones del fragmento de interés, observándose que la banda resultante en el gel de agarosa es intensa. Dilworth y McCarrey (1992) reportan que una muestra de 500 ng de RNA implantada con 5 ng de DNA genómico puede producir una amplificación positiva en una PCR tal que la banda resultante puede ser visualizada mediante una tinción con EtBr. En la prueba realizada para este trabajo, la cantidad de DNA que produjo la amplificación del fragmento de interés (0.25 ng) es veinte veces menor que la reportada en la referencia, por lo cual podemos concluir que la reacción es lo suficientemente sensible para detectar cantidades muy pequeñas de DNA contaminante. Por lo tanto, la PCR es una prueba confiable para determinar si el tratamiento con DNasa fue efectivo.

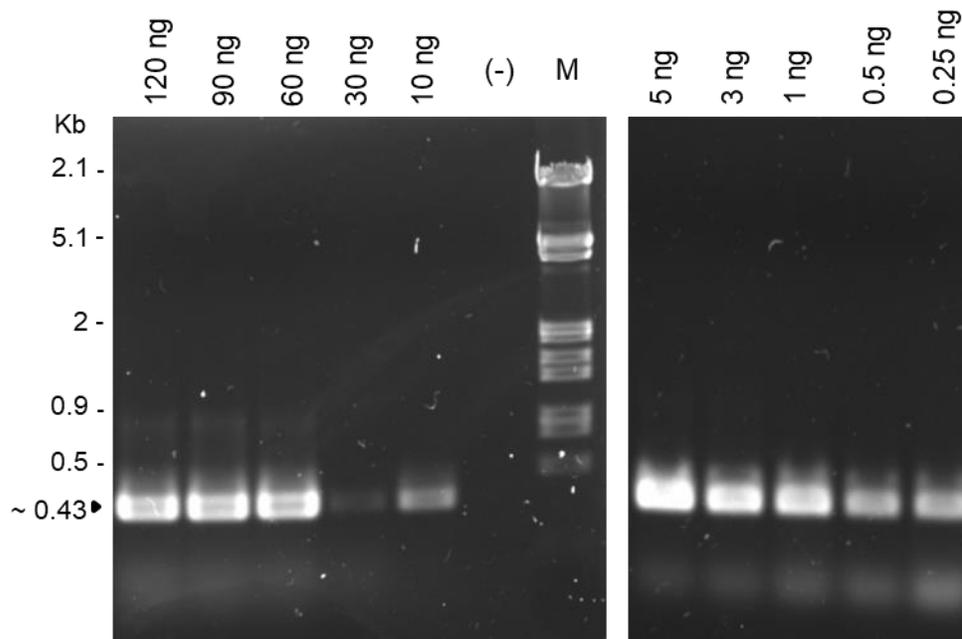


Figura 8. Determinación de la sensibilidad de la PCR para amplificar el fragmento 968-1401 del gen rDNA 16S empleando como molde diferentes concentraciones de DNA de la comunidad BP8. (-) sin DNA como molde; M: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker (Thermo Scientific). Gel de agarosa al 1.5%. En cada carril se cargaron 5 μ L de reacción de PCR.

Para cada muestra de RNA que resultó íntegro después del tratamiento con DNase I (Tabla 3), se realizaron PCRs para verificar su efectividad (Figura 9). Los tratamientos 1, 2 y 3 demostraron no ser efectivos para eliminar el DNA contaminante de las muestras de RNA, pues se aprecia la amplificación del fragmento de interés, mientras que con el tratamiento 5, no se presentó amplificación del fragmento lo que indica que el DNA fue eliminado exitosamente de las muestras de RNA. Con esta prueba se demuestra que el tratamiento 5 (10 µg de RNA tratados con 4.5 U de DNase I, en un volumen total de 45 µL dividido en tres alícuotas, incubado a 37°C por 30 min), es el más adecuado para eliminar el DNA de las muestras de RNA total (Figura 9).

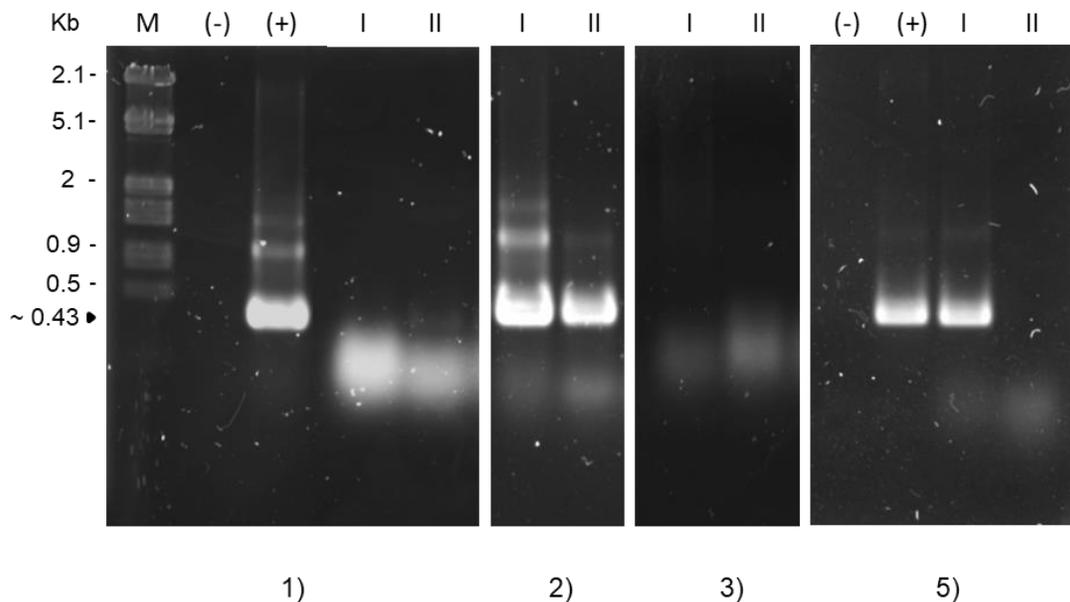


Figura 9. Verificación del efecto del tratamiento con DNasa por PCR. 1) Tratamiento 1, 2) Tratamiento 2, 3) Tratamiento 3, 5) Tratamiento 5. (-) sin DNA, (+) 50 ng DNA genómico de BP8 usado como molde, I) 200 ng de RNA total sin tratamiento con DNasa usado como molde, II) 200 ng de RNA total después de tratamiento con DNasa usado como molde, M: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker (Thermo Scientific). Gel de agarosa al 1.5%. En cada carril se cargaron 5 µL de reacción.

7.4 Enriquecimiento de RNA mensajero

Para el enriquecimiento de RNA mensajero a partir de RNA total se emplearon dos kits comerciales: MICROBExpress (Ambion) y RNA Clean & Concentrator (Zymoresearch). El primer kit elimina exclusivamente RNA ribosomal 16S y 23S, mientras que el segundo kit elimina RNA de tamaño menor a 200 nucleótidos del resto del RNA. Ambos kits pueden usarse en un orden indistinto, pero debido a la posibilidad de que se retuviera RNA en la columna de sílica usada en el kit RNA Clean & Concentrator se optó por primero eliminar el RNA ribosomal con el kit MICROBExpress.

7.4.1 Eliminación de RNA ribosomal 16S y 23S

Lo primero que se realizó fue una reacción con el RNA control incluido en el kit, para verificar el correcto funcionamiento de los componentes y familiarizarse con el procedimiento. Se siguió el protocolo descrito por el fabricante con las modificaciones de tiempos de incubación propuestas en el laboratorio.

El RNA control fue cuantificado y analizado en gel de agarosa desnaturalizante antes y después del tratamiento, con el objetivo de comparar la reducción de RNA ribosomal (Tabla 6, Figura 10). La cantidad de RNA disminuyó un 61.6% y en el gel de agarosa pueden aún observarse bandas correspondientes al RNA ribosomal, pero de menor intensidad comparadas con la muestra de RNA de entrada. Dado que el RNA ribosomal es la especie más abundante en una muestra de RNA total, constituyendo alrededor del 90% (He *et al.*, 2010), la pérdida de ácido nucleico puede atribuirse a su eliminación, por lo que se consideró que el kit funcionaba de manera adecuada.

Puesto que los oligonucleótidos de captura del kit MICROBExpress están diseñados para el RNA ribosomal de *E. coli*, no se podía asegurar que funcionara de la misma manera con el RNA de la comunidad BP8. Debido a esto, se realizó una segunda prueba, esta vez con RNA total libre de DNA de una muestra de la comunidad BP8. De igual manera que como el RNA control, se cuantificó y analizó la muestra en gel de agarosa desnaturalizante antes y después del tratamiento (Tabla 6, Figura 10). En este caso hubo una pérdida del 76.8% del RNA de entrada y en el gel de agarosa aún puede verse una banda intensa correspondiente al RNA ribosomal 16S, mientras que la banda del RNA ribosomal 23S prácticamente desaparece.

He y cols. (2010) reportan una reducción del 82% de RNA ribosomal al utilizar este kit en RNA obtenido de una comunidad bacteriana constituida artificialmente; mientras que Passalacqua y cols. (2009) reportan una reducción de RNA total inicial del $\geq 75\%$ de una cepa de *Bacillus anthracis*

7.4.2. Eliminación de RNA menor a 200 nucleótidos

Para enriquecer de manera más completa el RNA mensajero, era deseable eliminar los RNA de tamaño menor a 200 nucleótidos, entre los que se encuentran los RNAs de transferencia (65-110 nucleótidos) y RNA ribosomal 5S (120 nucleótidos). Para esto se utilizó el kit RNA Clean & Concentrator, basado en un sistema de una columna de sílica y buffers que permiten la recuperación selectiva de RNA mayor o menor a 200 nucleótidos de longitud.

Se realizó una prueba para comprobar la efectividad de este kit, utilizando el RNA de BP8 después de la prueba con el kit MICROBExpress. El RNA resultante se cuantificó y analizó en gel de agarosa desnaturalizante con el objetivo de evaluar la desaparición de los RNA pequeños, como el RNA de transferencia o el RNA ribosomal 5S (Tabla 6, Figura 10). Hubo una reducción del 92.6% del RNA total sin DNA inicial, mientras que en el gel de agarosa desnaturalizante se observa reducción considerable de la señal intensa en la parte inferior. El barrido a lo largo del carril corresponde a RNA mensajero.

Tabla 6. Comparación de RNA total sin DNA antes y después de los tratamientos de enriquecimiento de RNA mensajero.

RNA	Tratamiento	Concentración (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	Cantidad de RNA	Pérdida (%)
Control del kit MICROBExpress	sin tratamiento	518.1	2.11	2.17	10 μg	-
	MICROBExpress	76.9	2.01	2.10	3.84 μg en 25 μL	61.6
BP8	sin tratamiento	286	2.08	2.13	8.5 μg en 15 μL	-
	MICROBExpress	36.5	1.88	1.74	1.97 μg en 54 μL	76.8
	RNA C&C	78.9	2.24	2.15	631 ng en 8 μL	92.6

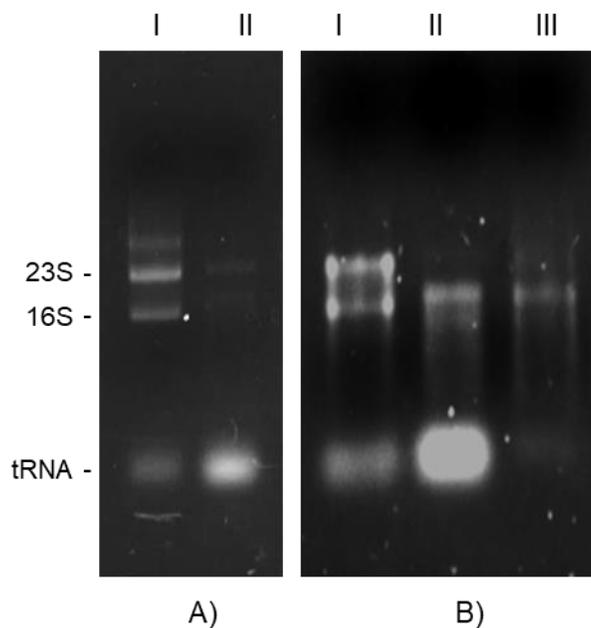


Figura 10. Análisis de enriquecimiento de RNA mensajero. A) RNA control incluido en el kit MICROBExpress, B) RNA total de BP8 sin DNA. I) RNA total antes del tratamiento, II) RNA después de tratamiento con kit MICROBExpress, III) RNA después de tratamiento con RNA Clean & Concentrator. Gel desnaturizante de agarosa al 1%. En cada carril se cargaron 600 ng de RNA.

7.5 Elección de tiempos de cultivo de la comunidad BP8 en MM-PolyLack de los cuales obtener RNA mensajero enriquecido

Una vez determinadas las condiciones control de cultivo y establecidos los protocolos y tratamientos que se llevarían a cabo para obtener RNA mensajero de alta calidad, se eligieron distintos tiempos de cultivo de la comunidad BP8 en MM-PolyLack a los cuales sería interesante estudiar la expresión de los genes. Con base en la curva de crecimiento de la comunidad BP8 en el barniz PolyLack reportados por Gaytán y cols. (2019) (Figura 2), inicialmente se propusieron como tiempos de cultivo 18 h, 3 días y 12 días para estudiar la expresión de genes en diferentes etapas de crecimiento de la comunidad.

Para tener una idea de la cantidad mínima de RNA total que se necesitaría obtener de cada réplica, tal que resultara en al menos 200 ng de RNA mensajero enriquecido para construir las bibliotecas de cDNA, se consideró que el RNA mensajero constituye 1-5% del RNA total y que ocurre una pérdida aproximada de 75% del RNA total después del tratamiento con DNasa. Por lo que se calculó que sería adecuado obtener al menos 80 µg de RNA total, que empleando el método de fenol ácido caliente y a las 18 h de cultivo, pueden ser obtenidos de 100 mg de biomasa. Sin embargo, no necesariamente sería la misma cantidad de biomasa para los diferentes tiempos de cultivo.

Una vez determinada la cantidad mínima de RNA total a obtener, se procedió con las extracciones, cuyos productos se cuantificaban, se determinaban las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} en NanoDrop 2000 (ThermoScientific) y se realizaban geles de agarosa desnaturante para analizar su integridad. Para las condiciones control, 18 horas y 3 días, la calidad, cantidad e integridad del RNA total extraído era adecuada, sin embargo, para la condición de 12 días en MM-PolyLack el rendimiento de RNA total era muy pobre, aun usando hasta el doble de la cantidad de biomasa requerida para las extracciones correspondientes a 18 h y 3 días (hasta 300 mg) (resultados no mostrados). Se observó que el cultivo de BP8 a ese tiempo formaba agregados de células y polímero, lo cual formaba grumos que dificultaban la resuspensión de la biomasa en las soluciones de lisis y muy probablemente se traducía en un bajo rendimiento de RNA. Por esta razón se propuso una modificación al protocolo de extracción de RNA con fenol ácido caliente, que consistió en lisis mecánica mediante la maceración en mortero, de células congeladas con N_2 antes de la lisis química y así poder asegurar una mejor extracción del RNA. No obstante, el rendimiento de RNA obtenido no mejoró a pesar de la gran cantidad de biomasa tratada (hasta 400 mg) (resultados no mostrados). Por lo tanto, se decidió buscar otro protocolo para extraer RNA de la fase estacionaria del cultivo de la comunidad BP8.

Se encontró un protocolo desarrollado por Wasniewski (2012), el cual está basado en la extracción de RNA con fenol ácido caliente, pero tiene modificaciones para extraer RNA de cultivos de *E. coli* en fase estacionaria, por lo que decidimos adaptar dichas modificaciones. Este protocolo se probó con biomasa obtenida de 12 días, pero tampoco se obtuvo RNA. Entonces se decidió probar si este protocolo a diferentes tiempos de cultivo para determinar si era efectivo para esta comunidad microbiana. Para ello, se extrajo RNA de cultivos de 5, 7, 10, 12, 15 y 18 días, correspondientes no sólo a fase estacionaria sino también a la segunda fase logarítmica. El RNA extraído se cuantificó, se determinaron las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} en NanoDrop 2000 (ThermoScientific) y se realizaron geles de agarosa desnaturante para analizar su integridad (Figura 11). Se observó que con este protocolo se extrajo DNA en vez de RNA, incluso de cultivos de 3 días, del cual se realizó una extracción como control. Por lo tanto, se descartó el uso de este método y se decidió continuar con la búsqueda del tercer tiempo de cultivo en MM-PolyLack con el protocolo de fenol ácido caliente ya establecido.

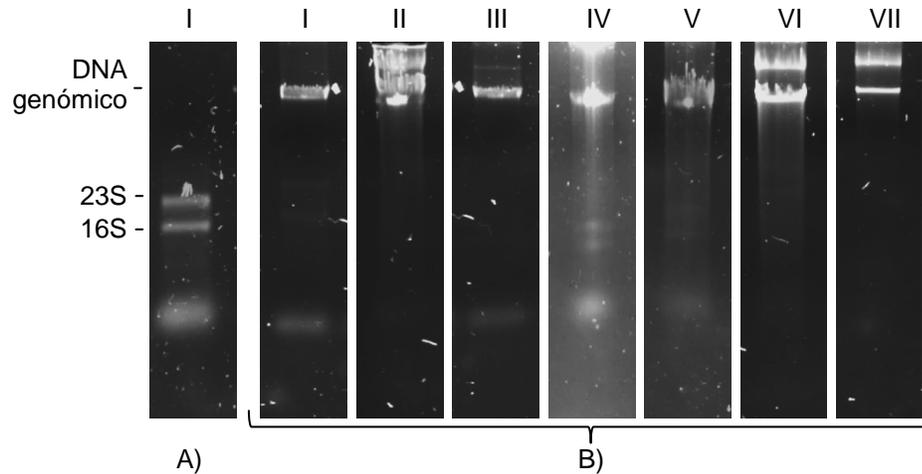


Figura 11. RNA total de cultivos en MM-PL con protocolo para extracción de RNA total de cultivos en fase estacionaria y segunda fase logarítmica. A) RNA extraído con protocolo de fenol ácido caliente, B) RNA extraído con protocolo de Wasniewski. RNA de cultivos de: I) 3 días, II) 5 días, III) 7 días, IV) 10 días, V) 12 días, VI) 15 días, VII) 18 días. Gel desnaturizante de agarosa al 1%. En cada carril se cargaron 800 ng de RNA.

Para definir un tiempo de cultivo de más de 3 días en el que se pudiera hacer el análisis de la expresión génica de la comunidad BP8, se hicieron extracciones de prueba de 5 y 7 días de cultivo, correspondientes a la fase estacionaria y a 15 días de cultivo, correspondiente a la segunda fase logarítmica. El RNA obtenido fue cuantificado, se determinaron las relaciones de calidad y fue analizado en un gel de agarosa desnaturizante (Figura 12). Se observó que la condición de 5 días era aquella extracción que menos DNA arrastraba y resultaba en mayor rendimiento de RNA, por lo que se eligió extraer RNA de esta condición, la cual corresponde al inicio de la fase estacionaria. Sin embargo, más de la mitad del ácido nucleico extraído correspondía a DNA.

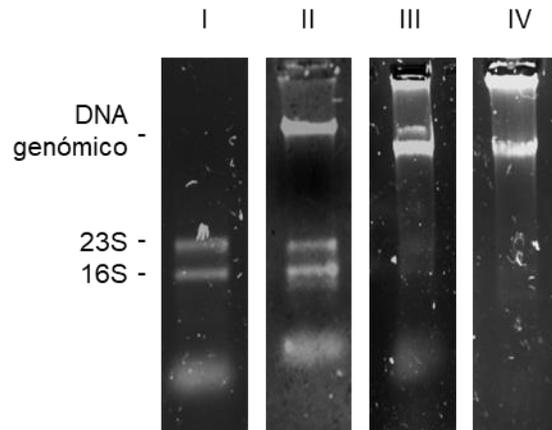


Figura 12. Integridad de RNA total extraído de cultivos correspondientes a fase estacionaria y segunda fase logarítmica en MM-PL con protocolo de fenol ácido caliente. RNA de cultivos de: I) 3 días, II) 5 días, III) 7 días, IV) 15 días. Gel desnaturalizante de agarosa al 1%. En cada carril se cargó 1 µg de RNA.

Neidhardt y Magasanik (1960) compararon la cantidad de RNA extraído de cultivos de fase estacionaria y de fase logarítmica de una cepa de *Aerobacter aerogenes* y encontraron que la cantidad de RNA disminuye de 3 a 4 veces en un cultivo de fase estacionaria, mientras que las cantidades de DNA y proteína no se ven afectadas de manera tan drástica. En este estudio también se reporta que en un cultivo de crecimiento diáuxico, la cantidad de DNA y proteína en la fase estacionaria sigue incrementándose a una velocidad un poco menor que en la fase logarítmica inicial, mientras que la cantidad de RNA muestra un incremento muy pobre. La síntesis de RNA se reestablece hasta que empieza a utilizar la segunda fuente de carbono, es decir ya que entra a la segunda fase logarítmica. En la comunidad BP8, se observó un crecimiento diáuxico y aunque no se cuantificaron las concentraciones de proteína en las diferentes fases de crecimiento para determinar su comportamiento, la cantidad de RNA extraída en la fase estacionaria (5, 7, 10 y 12 días) y segunda fase logarítmica (15 y 18 días) fueron muy bajas, lo cual concuerda parcialmente con lo observado por Neidhardt y Magasanik (1960).

Ya que se obtuvo el RNA total de la condición de 5 días de cultivo en MM-PolyLack, se procedió a hacer el tratamiento con DNasa, observándose que después del tratamiento la cuantificación de ácidos nucleicos era muy baja, pues se perdía más del 80%, lo que resultaba en una cantidad insuficiente para el enriquecimiento de RNA mensajero (Tabla 7). Se realizaron aproximadamente veinte extracciones de RNA de esta condición, en las cuales los resultados después de este tratamiento eran similares. Dadas las complicaciones para obtener RNA total libre de DNA de esta condición, decidió descartarse y realizar el análisis solo en las condiciones control, a 18 h y 3 días.

Tabla 7. Resultados de calidad y rendimiento de RNA total después de tratamiento con DNasa.

Condición	Rendimiento antes de tratamiento (μg RNA total/mg biomasa)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	Pérdida de RNA inicial (%)
18 h	1.36	2.08	2.17	47
3 días	0.23	2.08	2.22	44
5 días	0.13	1.87	2.07	87
Control (5 días en MM-PolyLack más 12 h en LB)	1.14	2.08	2.07	58

n=6

Una vez que se comprobó que las muestras de RNA a analizar, después del tratamiento con DNasa conservaban la integridad y estaban libres de DNA, se cuantificaron y se separó una alícuota de cada muestra para ser analizada por el Bioanalyzer 2100 (Agilent) en la UUSMB. Si el valor de RIN en una muestra es mayor o igual a 7, se consideró adecuada y se procedía al enriquecimiento de RNA mensajero, en caso de tener un valor de RIN debajo de 7, se volvieron a obtener muestras de RNA libre de DNA que tuvieran una calidad adecuada para el enriquecimiento del RNA mensajero. Un ejemplo de los resultados obtenidos de algunas de las muestras de RNA total enviadas para análisis por Bioanalyzer se muestra en la Figura 13. Después de separar las alícuotas para ser enviadas al Bioanalyzer, las muestras se almacenaban a -70°C hasta tener los resultados de RIN y proseguir con el enriquecimiento del RNA mensajero. Los resultados del RIN de las muestras que resultaron adecuadas para proseguir con el enriquecimiento de RNA mensajero se muestran en la Tabla 8. Ejemplos de la integridad de algunas muestras de RNA antes y después del tratamiento con DNasa se muestran en la Figura 14. Los electroferogramas y simulación en gel de agarosa de cada muestra se incluyen en el Apéndice II.

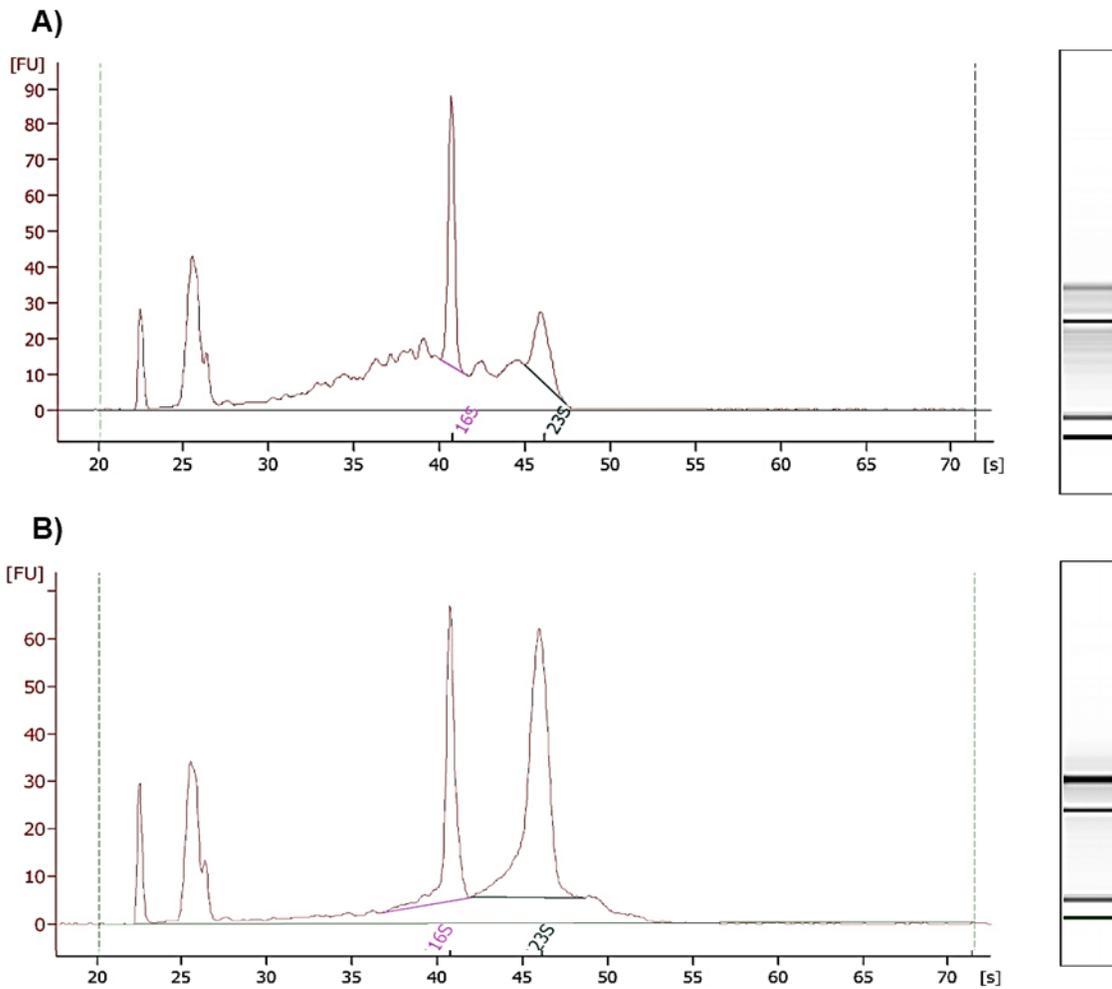


Figura 13. Ejemplo de electroferogramas resultado de análisis en Bioanalyzer 2100 de RNA total después de tratamiento con DNasa. Se muestran resultados de repeticiones de la misma muestra: A) El valor de RIN es de 6, a la derecha se muestra una simulación de gel de agarosa, el RNA está degradado. B) El valor de RIN es de 9.5, a la derecha se muestra una simulación de gel de agarosa, el RNA está íntegro. Para cada análisis se utilizaron 3 μ L de muestra.

Tabla 8. Valores de RIN para cada muestra de RNA total sin DNA de la comunidad BP8 de la cual se enriqueció RNA mensajero.

Condición	Réplica	RIN
18 h	18.2	9.5
	18.4	7.5
	18.6	7.6
3 días	3.1	7.5
	3.2	7
	3.5	9.1
Control (5 días en MM-PolyLack más 12 h en LB)	C.4	7.1
	C.5	8.6
	C.6	9.5

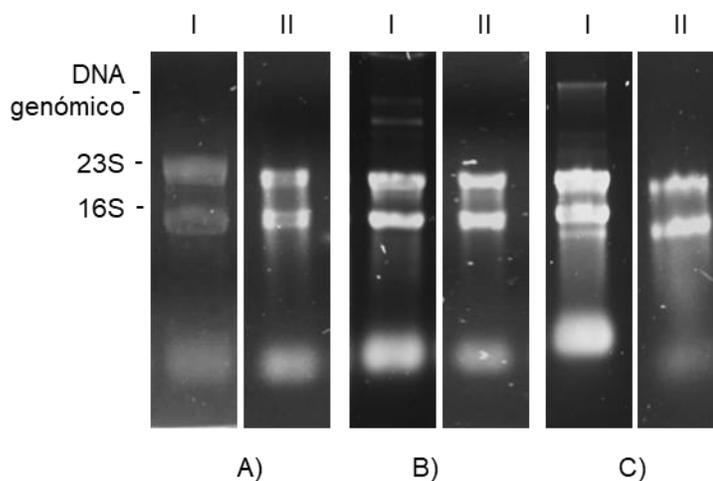


Figura 14. Integridad de muestras de RNA total de BP8 tratado con DNasa antes de enriquecimiento de RNA mensajero. RNA de las muestras que resultaron adecuadas para enriquecimiento de RNA mensajero. A) 18 h, B) 3 días, C) Control (5 días en MM-PolyLack más 12 h en LB. I) RNA total antes del tratamiento, II) RNA total después del tratamiento. Gel desnaturizante de agarosa al 1%. En cada carril se cargaron 400 ng de RNA.

Una vez que se tuvieron las preparaciones de RNA mensajero libres de DNA y de buena calidad de las dos condiciones de cultivo en MM-PolyLack y de la condición control, se enviaron las muestras a la UUSMB para la construcción de bibliotecas de cDNA.

Este trabajo se enfocó al desarrollo de la metodología y en la obtención de RNA mensajero de la comunidad BP8. El diagrama de flujo que se siguió para la obtención de las muestras de RNA mensajero de la comunidad microbiana BP8 como parte del experimento de RNA-Seq se muestra en la Figura 15. A pesar de que los pasos de construcción y secuenciación de bibliotecas de cDNA y el análisis no se realizaron como parte de este proyecto, se describen a continuación para mostrar la continuidad del experimento completo de RNA-Seq.

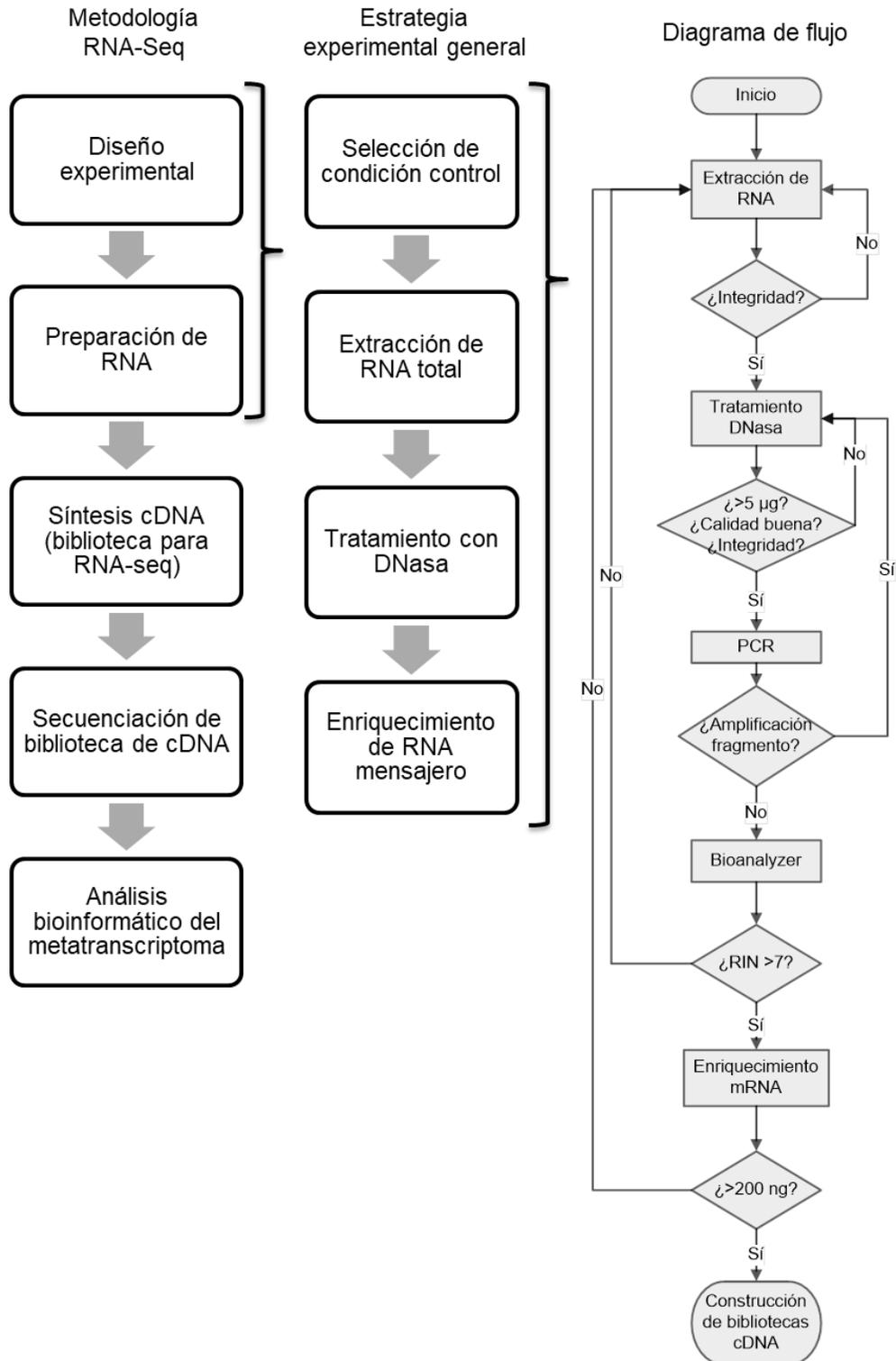


Figura 15. Estrategia experimental desarrollada para obtener RNA mensajero de la comunidad microbiana BP8. Esta metodología se desarrolló como parte de un experimento de RNA-Seq.

7.6 Construcción de bibliotecas de cDNA, secuenciación y análisis

La metodología RNA-Seq utiliza los protocolos desarrollados para NGS, para esto se sintetiza cDNA de doble cadena, al cual posteriormente se le añaden adaptadores específicos según la plataforma de secuenciación que se vaya a utilizar (Margerat y Bähler, 2010). Los datos de secuenciación de cDNA deben reflejar lo mejor posible la población de RNA mensajero original.

La construcción de las bibliotecas de cDNA de la comunidad BP8, corrió a cargo de la UUSMB del IBT. Para ello se utiliza el protocolo TruSeq® Stranded mRNA Illumina, el cual consiste en fragmentar el RNA mensajero y sintetizar la primera cadena de cDNA usando transcriptasa reversa y primers al azar. Posteriormente se sintetiza la segunda cadena de cDNA usando RNase H y DNA polimerasa I. Se adenilan los extremos 3' de los fragmentos romos para evitar que se ligen entre sí durante la reacción de adición de los adaptadores. Finalmente, los productos se enriquecen mediante PCR y se purifican, resultando en las bibliotecas finales de cDNA en un volumen de 10 μ L. La concentración y tamaño de las bibliotecas resultantes se describe en la Tabla 9.

Tabla 9. Tamaño y concentración de las bibliotecas de cDNA sintetizadas a partir de RNA mensajero enriquecido de la comunidad BP8.

Condición	Réplica	Tamaño promedio de biblioteca (bp)	Concentración Qubit (nM)	Concentración qPCR (eficiencia del 94.5%)
18 h	18.2	350	2.73	348.70 pM
	18.4	350	18.48	4.63 nM
	18.6	350	14.42	2.32 nM
3 días	3.1	350	20.00	29.14 nM
	3.2	350	26.45	7.93 nM
	3.5	350	70.56	21.88 nM
Control (5 días en MM-PolyLack más 12 h en LB)	C.4	350	28.61	5.36 nM
	C.5	350	33.46	8.48 nM
	C.6	350	29.00	37 nM

La secuenciación de las bibliotecas de cDNA generará los datos a analizar. Un factor importante a considerar es la profundidad de la secuenciación, la cual se traduce como el número de lecturas secuenciadas. A mayor profundidad, mayor cantidad de transcritos serán detectados y su cuantificación será más precisa, aunque también depende de los objetivos experimentales (Conesa *et al.*, 2016). La secuenciación de las bibliotecas de cDNA de la comunidad BP8 correrá a cargo de Phase Genomics Inc., ubicada en Seattle WA, EE.UU. Para este estudio, se utilizará la plataforma HiSeq4000 de Illumina, con corridas tipo paired-end de un tamaño de lecturas de 150bp y profundidad de secuenciación de 10-15 millones de lecturas por cada muestra.

El análisis e interpretación de los datos generados de la secuenciación responde al planteamiento del problema para el cual fue diseñado el experimento de RNA-Seq. Al ser una metodología que genera una gran cantidad de datos, éstos pueden ser interpretados de distintas maneras según las preguntas a resolver. En el presente trabajo, es de interés detectar transcritos que codifiquen proteínas responsables de la degradación del copolímero poliéter-poliuretano-acrílico y los aditivos del barniz, compararlos con los genes identificados previamente en la anotación funcional del metagenoma y cuantificar expresión diferencial de dichos genes para cada condición de cultivo de la comunidad BP8 en MM-PolyLack.

Como flujo de trabajo general, las lecturas que se obtendrán de la secuenciación deberán someterse a un control de calidad para eliminar aquellas de baja calidad, para posteriormente ensamblarse en el metagenoma de BP8, previamente obtenido en el trabajo de Gaytán y cols. (2019). A partir de este alineamiento se realizará la anotación funcional de estos transcritos, se cuantificará el número de lecturas por transcrito para conocer la abundancia y se comparará estadísticamente la abundancia de cada transcrito entre réplicas y condiciones de cultivo.

8. CONCLUSIONES

Se determinó como condición control el cultivo de la comunidad microbiana BP8 por 12 horas en medio LB después de 5 días en MM-PolyLack. Se extrajo RNA de esta condición.

Se extrajo RNA total de la comunidad BP8 con el método del fenol ácido caliente, el cual produjo un RNA íntegro y de alta calidad.

Se optimizó un tratamiento con DNasa de tal manera que se obtuvo RNA total libre de DNA.

Se eligieron las condiciones de 18 h y 3 días de cultivo en MM-PolyLack para extraer RNA de la comunidad BP8.

Se obtuvieron 3 réplicas de RNA mensajero para cada condición a partir de RNA total de alta calidad para la construcción de bibliotecas de cDNA en la UUSMB-IBT-UNAM.

9. PERSPECTIVAS

Analizar el metatranscriptoma de la comunidad BP8 para medir expresión diferencial de genes y comparar entre cada condición estudiada y el control.

Realizar la anotación funcional de los transcritos encontrados en la comunidad BP8 y comparar con la anotación funcional del metagenoma realizada en un trabajo previo.

Relacionar los transcritos identificados con el genoma de los microorganismos de la comunidad microbiana BP8 que los expresan en cada condición para definir qué miembros son los más degradadores y proponer interacciones entre ellos durante la biodegradación del PU y los xenobióticos.

Obtener RNA mensajero de la comunidad microbiana BP8 de condiciones mayores a 3 días de cultivo en MM-PolyLack, preferentemente relacionadas con la fase estacionaria y la segunda fase logarítmica de crecimiento, con el objetivo de estudiar la expresión de genes en esa etapa relacionadas con el consumo del PU y xenobióticos del barniz PolyLack.

Los resultados que se obtengan del análisis metatranscriptómico permitirán la manipulación de las capacidades degradadoras de la comunidad BP8 para mejorar procesos tecnológicos para tratamiento de distintos tipos de PU y xenobióticos.

10. REFERENCIAS

- Agence de l'Environnement et de la Mîtrise de l'Energie (ADEME). 2014. Panorama du marché du polyurethane et état de l'art de ses techniques de recyclage. Tomado de:
https://www.ademe.fr/sites/default/files/assets/documents/a13473_1202c0079_etude_polyurethane.pdf (Último acceso el 18 de septiembre de 2019).
- Behrendt G, Naber B W. 2009. The Chemical Recycling of Polyurethanes (Review). *JUCTM*. 44:3-23
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bhagwat A, Ying Z, Smith A. 2014. Evaluation of ribosomal RNA removal protocols for Salmonella RNA-Seq projects. *Adv. Microbiol.* 4:25-32.
- Burton J, Liachko I, Dunham M J, Shendure J. 2014. Species-Level Deconvolution of Metagenome Assemblies with Hi-C–Based Contact Probability Maps. *G3*. 4:1339-1346.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szczesniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhan X, Mortazavi A. 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 17:1-19.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, Handley PS. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5817-5824.
- Cresko Lab, Universidad de Oregon. RNA-seqlopedia Tomado de:
<https://rnaseq.uoregon.edu/> (último acceso el 14 de mayo de 2019).
- Darby RT, Kaplan AM. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Appl. Microbiol.* 16:900-905.
- Dilworth DD, McCarrey JR. 1992. Single-step elimination of contaminating DNA prior to reverse transcriptase PCR. *Genome Res.* 1:279-282.
- Esser K, Marx W, Lisowsky T. 2005. Nucleic acid-free matrix: Regeneration of DNA binding columns. *BioTechniques.* 39:270-271.

- Fernández Cruz V. 2015. Caracterización de consorcios bacterianos capaces de crecer en medio adicionado con barnices de poliuretano (PU) como única fuente de carbono. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Gaytán I, Sánchez-Reyes A, Burelo M, Vargas-Suárez M, Liachko I, Press M, Sullivan S, Cruz-Gómez J, Loza-Tavera H. 2019. Degradation of recalcitrant polyurethane and xenobiotic additives by a selected landfill microbial community and its biodegradative potential revealed by proximity ligation-based metagenomic analysis. Preprint in BioRxiv. [dx.doi.org/10.1101/760637](https://doi.org/10.1101/760637).
- Georgellis D, Arvidson S, von Gabain A. 1992. Decay of *ompA* mRNA and processing of 9S RNA are immediately affected by shifts in growth rate, but in opposite manners. *J. Bacteriol.* 174:5382-5390.
- Grima S, Bellon-Maurel V, Feuilloley P, Silvestre F. 2000. Aerobic biodegradation of polymers in solid-state conditions: A review of environmental and physicochemical parameter settings in laboratory simulations. *J. Polym. Environ.* 8:183-195.
- He S, Wurtzel O, Singh K, Froula J, Yilmaz S, Tringe S, Wang Z, Chen F, Lindquist E, Sorek R, Hugenholtz P. 2010. Validation of two ribosomal RNA removal methods for microbial metatranscriptomics. *Nat. Methods.* 7:807-812.
- Howard G. 2011. Microbial degradation of polyurethane. En: A. Fainleib and O. Grigoryeva, ed. *Recent Developments in Polymer Recycling*, 1ra ed. Kerala, India: Transworld Research Network, pp.215-238.
- Huang Z, Fasco M, Kaminsky L. 1996. Optimization of DNase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *BioTechniques.* 20:1012-1020.
- Jahn C, Charkowski, AO, Willis DK. 2008. Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *J. Microbiol. Methods.* 75:318-324.
- Jankovich J. 2016. Acid Phenol Chloroform Extraction of DNA, RNA and protein: 3 in 1. Tomado de: <https://bitesizebio.com/31609/acid-phenol-chloroform-extraction/> (Último acceso el 8 de junio de 2019)
- Larson RJ, Bookland EA, Williams RT, Yocom KM, Saucy DA, Freeman MB, Swift G 1997. Biodegradation of acrylic acid polymers and oligomers by mixed microbial communities in activated sludge. *J. Environ. Polym. Degr.* 5: 41-48
- Luo P, Hu C, Zhang L, Ren C, Sheng Q. 2007. Effects of DNA extraction and universal primers on 16S rRNA gene-based DGGE analysis of a bacterial community from fish farming water. *Chin. J. Oceanol. Limn.* 25:310-316.

- Mahajan N, Gupta P. 2015. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. RSC Adv. 5:41839-41854.
- Marguerat S, Bähler J. 2010. RNA-seq: From technology to biology. Cell. Mol. Life Sci. 67:569-579.
- Maurya SD, Kurmvanshi SK, Mohanty S, Nayak SK. 2018. A Review on acrylate-terminated urethane oligomers and polymers: synthesis and applications. Polym. Plast. Technol. Eng. 57:625-656.
- Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51:134-140.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. FEMS Microbiol. Lett. 129:39-42.
- Neidhart FC, Magasanik B. 1960. Studies on the role of ribonucleic acid in the growth of bacteria. Biochim. Biophys. Acta. 42:99-116.
- Obruca S, Marova I, Vojtova L. 2011. Biodegradation of polyether-polyol-based polyurethane elastomeric films: influence of partial replacement of polyether polyol by biopolymers of renewable origin. Environ. Technol. 32:1043-1052.
- Oprea S, Doroftei F. 2011. Biodegradation of polyurethane acrylate with acrylated epoxidized soybean oil blend elastomers by *Chaetomium globosum*. Int. Biodeter. Biodegr. 65:533-538.
- Passalacqua KD, Varadarajan A, Ondov BD, Okou DT, Zwick ME, Bergman NH. 2009. Structure and complexity of a bacterial transcriptome. J. Bacteriol. 191:3203-3211.
- PlasticsEurope. 2018. PlasticsEurope Annual Review 2017-2018. Tomado de: <https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>
- Plastics Technology México. 2017. La demanda de poliuretanos crecerá 4.5% al 2020 en México Tomado de: <https://www.pt-mexico.com/news/la-demanda-de-poliuretanos-crecer-45-al-2020-en-m%C3%A9xico> (último acceso el 27 de febrero de 2018).
- Savín-Gámez A. 2016. Identificación de miembros bacterianos de consorcios capaces de crecer en un barniz de poliéter poliuretano. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.

- SayerLack. PolyLack AquaBrillante UB-0800. Hoja de datos de seguridad de materiales. 2014.
- Schrader C, Shielke A, Ellerbroek L, Johne R. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113:1014-1026.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7:1-14.
- Segata N, Waldron L, Ballarini A, Narasimhan V, Jousson O, Huttenhower, C. 2012. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature Methods.* 9:811-4.
- Shah A, Hasan F, Akhter JI, Hameed A., Ahmed S. 2008. Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil. *Ann. Microbiol.* 58: 381-386.
- Simón D, Borreguero AM, de Lucas A, Rodríguez JF. 2018. Recycling of polyurethanes from laboratory to industry, a journey towards the sustainability. *J. Waste Manag.* 76:147-171.
- Solís-González CJ, Domínguez-Malfavón L, Vargas-Suárez M, Gaytán I, Cevallos MA, Lozano L, Cruz-Gómez MJ, Loza-Tavera H. 2018. Novel Metabolic Pathway for N-Methylpyrrolidone Degradation in *Alicyclophilus* sp. Strain BQ1. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:e02136-17.
- Tan S, Yiap B. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009:1-10.
- Vargas-Suárez M, Fernández-Cruz V, Loza-Tavera H. 2019. Biodegradation of polyacrylic and polyester polyurethane coatings by enriched microbial communities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103:3225-3236.
- Wasniewski J. 2012. RNA extraction protocol development for the assay of temporal gene expression in batch-cultured *Escherichia coli* K-12. Tesis de maestría en Ciencias. McMaster University.
- White GF, Russell NJ, Tidswell EC. 1996. Bacterial scission of ether bonds. *Microbiol. Rev.* 60:216-232.
- Yang W, Dong Q, Liu S, Xie H, Liu L, Li J. 2012. Recycling and disposal methods for polyurethane foam wastes. *Procedia Environ. Sci.* 16:167-175
- Zhao S, Fung-Leung WP, Bittner A, Ngo K, Liu X. 2014. Comparison of RNA-Seq and Microarray in Transcriptome Profiling of Activated T Cells. *PLoS ONE.* 9:e78644

Zia KM, Bhatti HN, Bhatti IA. 2007. Methods for polyurethane and polyurethane composites, recycling and recovery: A review. *React. Funct. Polym.* 67:675-692

Zumbo P. Phenol-chloroform extraction. Tomado de:
<http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/PHENOL-CHLOROFORM.pdf> (último acceso el 14 de mayo de 2019)

APÉNDICE I

Preparación de medios de cultivo

Medio Mínimo-PolyLack® (MM-PolyLack)

- Medio Mínimo Mineral (Nakajima-Kambe, 1995)

Solución A (10X), para 1 L

KH_2PO_4 20 g

K_2HPO_4 70 g

Solución B (100X), para 1 L

NH_4NO_3 100 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g

Solución C (1000X), para 1 L

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g

$\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 g

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g

1. Preparar soluciones A, B, y C.
2. Esterilizar las soluciones A y B en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.
3. Esterilizar la solución C por filtración usando membranas de poro de 0.22 μm (Milipore).

- Solución de Poly Lack® 10X

La concentración de sólidos del barniz PolyLack® Aqua Brillante UB-0800 es de 30%, por lo que se debe diluir de tal manera que la concentración final de sólidos en el medio de cultivo MM-PL sea de 0.3%.

1. Realizar una dilución 1:10 de barniz PolyLack® en agua desionizada. Esta solución tiene una concentración al 3% de sólidos.
2. Esterilizar la solución en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.

- MM-PolyLack, para 100 mL

Solución A 10 mL

Solución B 1 mL

Solución C 0.1 mL

Agua desionizada 78.9 mL

Solución de PolyLack 10X 10 mL

1. Medir y agregar las soluciones en el siguiente orden: Solución A, Solución B, Solución C, agua desionizada estéril, y finalmente solución de PolyLack®.
2. Aforar al volumen deseado con agua desionizada estéril.

Medio Luria Bertani (LB), para 1 L

Peptona	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	10g

1. Pesar polvos y disolver en 600 mL de agua desionizada con agitación y un poco de calor.
2. Ajustar a pH 7.0.
3. Aforar a 1 L con agua desionizada y esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.

Soluciones de lavado de cultivos

Buffer de fosfatos 1 M pH 7, para 1 L

KH ₂ PO ₄	136.09 g
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	140.7 g

1. Pesar KH₂PO₄ y disolver en aproximadamente 300 mL de agua desionizada.
2. Pesar K₂HPO₄*3H₂O y disolver en aproximadamente 300 mL de agua desionizada.
3. Mezclar ambas soluciones, ajustar a pH 7 con KPOH y aforar a 1 L.
4. Para preparar 1 L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7, tomar 20 mL de buffer de fosfatos 1 M.
5. Ajustar el pH si es necesario y aforar a 1 L.
6. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.

Buffer de fosfatos salino (PBS) 1X pH 7.4, para 1 L

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g
KCl	0.2 g

1. Pesar polvos y disolver en 800 mL de agua desionizada.
2. Ajustar el pH si es necesario y aforar a 1 L.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.

Soluciones de trabajo para extracción de RNA total con fenol ácido caliente

Agua DEPC, para 1 L

Agua desionizada	1 L
DEPC	1 mL

1. Medir el agua y añadir el DEPC.
2. Dejar en agitación al menos 12 horas.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.

Acetato de sodio (CH₃COONa) 3M, pH 4.5, para 100 mL

CH ₃ COONa	2.46 g
-----------------------	--------

1. Pesar la sal y disolver en aproximadamente 25 mL de agua DEPC.
2. Ajustar pH a 4.5 con ácido acético.
3. Aforar a 100 mL con agua DEPC y esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.
4. Almacenar a temperatura ambiente.

Solución I para extracción de RNA con fenol ácido caliente, para 100 mL

Sacarosa	10.269 g
----------	----------

CH ₃ COONa 3M pH 4.5	333 µL
---------------------------------	--------

1. Pesar los polvos y mezclar en aproximadamente 50 mL de agua DEPC hasta disolver.
2. Aforar a 100 mL con agua DEPC y esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.
3. Almacenar a 4°C.

Solución II para extracción de RNA con fenol ácido caliente, para 100 mL

SDS	2 g
-----	-----

CH ₃ COONa 3M, pH 4.5	333 µL
----------------------------------	--------

1. Pesar los polvos y mezclar en aproximadamente 50 mL de agua DEPC hasta disolver.
2. Aforar a 100 mL con agua DEPC y esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.
3. Almacenar a temperatura ambiente.

Soluciones de trabajo para extracción de RNA total de cultivos de fase estacionaria y segunda fase logarítmica

Stop Solution (EtOH; fenol 5%), para 50 mL

Fenol-Tris pH 8	2.5 mL
-----------------	--------

Etanol absoluto	47.5 mL
-----------------	---------

1. Medir ambos reactivos y mezclar. Almacenar a -20°C en un contenedor que no permita el paso de la luz.

Preparación de geles

SDS-PAGE

Gel SDS-PAGE 12%

- Gel separador 12% (1 gel)

Agua destilada	1.683 mL
Buffer separador	1.250 mL
Acrilamida al 30%	2 mL
SDS 10%	50 μ L
Persulfato de amonio al 20%	15 μ L
TEMED	3 μ L

1. Armar el equipo para la preparación de los geles, limpiar cuidadosamente los cristales de 1 mm de espesor con etanol y algodón.
2. En un tubo falcon de 15 mL, mezclar el agua, buffer separador, acrilamida y SDS.
3. Agregar persulfato de amonio y TEMED, mezclar y verter rápidamente entre los vidrios.
4. Dejar polimerizar (aproximadamente por 15 min) mientras se prepara el gel apilador.

- Gel apilador (1 gel)

Agua destilada	1.5 mL
Buffer apilador	630 μ L
Acrilamida al 30%	330 μ L
SDS 10%	33 μ L
Persulfato de amonio al 20%	10 μ L
TEMED	2 μ L

1. Preparar de la misma forma que el gel separador
2. Colocar encima del gel separador y colocar inmediatamente el peine para formar los carriles, cuidando que no se formen burbujas de aire.
3. Dejar polimerizar (aproximadamente 15 min) antes de retirar el peine.

Acrilamida 30% (gel SDS-PAGE), para 100 mL

Acrilamida	30 g
Bis-acrilamida	0.8 g

1. Pesar los compuestos y disolver en aproximadamente 80 mL de agua desionizada en una parrilla con agitación y un poco de calor.
2. Una vez disuelto, filtrar la mezcla con un filtro Whatman No. 1.
3. Aforar a 100 mL con agua desionizada y almacenar a temperatura ambiente.

Buffer separador para gel SDS-PAGE, para 100 mL

Tris-base	18.17 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris, disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 8.8 con HCl 12 N.
2. Agregar el SDS y aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer apilador para gel SDS-PAGE, para 100 mL

Tris-base	6.06 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris disolverlo en 80 mL de agua destilada y ajustar el pH a 6.8 con HCl 12N
2. Agregar el SDS y aforar con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer de corrida 10X para gel SDS-PAGE, para 1L

Tris-base	30 g
Glicina	14 g
SDS	10 g

1. Disolver en 600 mL de agua destilada la glicina y agitar
2. Agregar el Tris y esperar a que casi por completo esté solubilizado
3. Verificar el pH, debe estar entre 8.3 y 8.8
4. Agregar el SDS, disolverlo y ajustar el volumen a 1 L en una probeta. Almacenar a TA.
5. Para preparar 1 L de Buffer de corrida 1X para correr el gel, tomar 100 mL de Buffer de corrida 10X y aforarlos a 1 L con agua desionizada.

Colorante de Coomasie (Coomasie 0.05% en 50% metanol: 10% ácido acético glacial), para 100 mL

Coomasie brillante blue R250	0.05 g
Metanol grado técnico	50 mL
Agua	40 mL
Ácido acético glacial	10 mL

1. Pesar y medir los reactivos, disolverlos en un vaso de precipitado de vidrio (no usar plástico) con agitación a temperatura ambiente.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

Mezcla desteñidora (Metanol; ácido acético 7.5%), para 250 mL

Metanol grado técnico	50 mL
Ácido acético glacial	18.75 mL

1. Medir los reactivos y ajustar a 250 mL con agua desionizada
2. Almacenar a TA.

ELECTROFORESIS DE DNA

Gel de agarosa para electroforesis de DNA (1%)

Agarosa	35 mg
Buffer TAE 1X	35 mL

1. Limpiar cuidadosamente el soporte para el gel, los peines, y la cámara de electroforesis para asegurar que estén libres de grasa y polvo.
2. Pesar la agarosa y transferir a un matraz estéril de 125 mL.
3. Añadir el buffer y calentar hasta la completa disolución de la agarosa. Dejar enfriar sin permitir que solidifique.
4. Verter el gel en el soporte y colocar el peine. Dejar solidificar por aproximadamente 15 min antes de retirar el peine.

Buffer TAE 50X para gel de electroforesis de DNA, para 1 L

Tris base	242 g
0.5 M EDTA, pH 8.0	100 mL
Ácido acético glacial	57.1 mL

1. Mezclar en agua desionizada y aforar a 1 L.
2. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lb por 15 min.
3. Almacenar a temperatura ambiente.
4. Para preparar 1 L de Buffer TAE 1X para preparar geles y buffer de corrida para electroforesis de DNA, tomar 20 mL de Buffer TAE 50X y aforarlos a 1 L con agua desionizada.

ELECTROFORESIS DE RNA

Gel de agarosa desnaturalizante para electroforesis de RNA (1%)

Agarosa	35 mg
Buffer MOPS 1X	35 mL

1. Limpiar cuidadosamente el soporte para el gel, los peines, y la cámara de electroforesis para asegurar que estén libres de grasa y polvo.
2. Pesar la agarosa y transferir a un matraz estéril de 125 mL.
3. Añadir el buffer y calentar hasta la completa disolución de la agarosa. Dejar enfriar sin permitir que solidifique.
4. Verter el gel en el soporte y colocar el peine. Dejar solidificar por aproximadamente 15 min antes de retirar el peine.

Buffer MOPS 1X para gel de electroforesis de RNA, para 500 mL

MOPS	2.5 g
Acetato de sodio	0.25 g
EDTA	0.186 g

1. Disolver MOPS, acetato de sodio y EDTA en aproximadamente 200 mL de agua DEPC, con agitación y un poco de calor.
2. Aforar a 500 mL con agua DEPC.
3. Para preparar 500 mL de buffer de corrida para electroforesis de RNA, tomar 491 mL de Buffer MOPS 1X y añadir 9 mL de formalina (formaldehído al 37%)

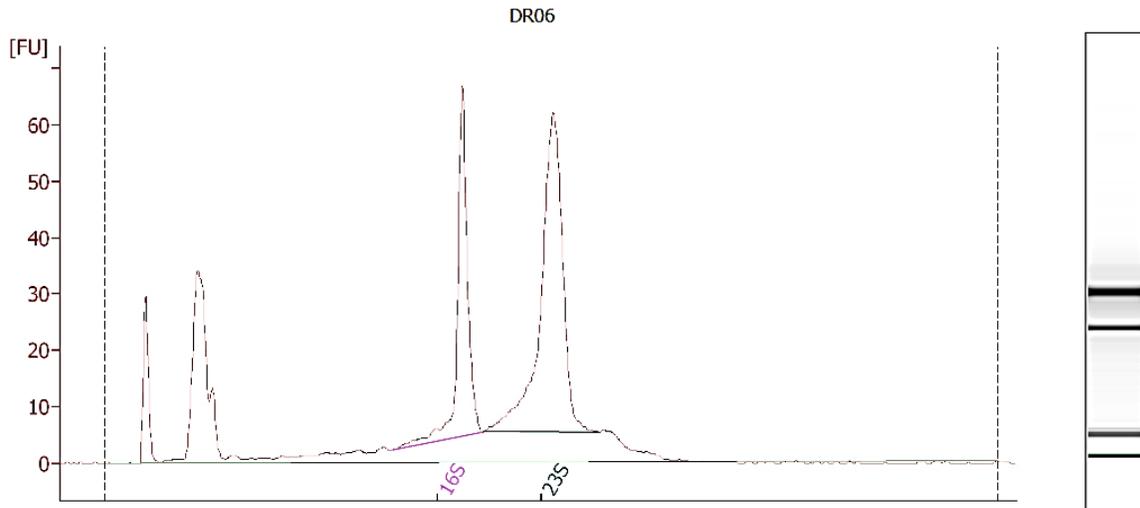
Solución de EtBr 120 pg/mL para tinción de geles de agarosa, para 100 mL

Solución de EtBr 4 mg/mL	3 μ L
Buffer TAE 1X	100 mL

1. Mezclar la solución de EtBr en un recipiente con Buffer TAE 1X.
2. Colocar el gel de agarosa a teñir, asegurándose de que esté sumergido completamente.
3. Dejar tiñendo el gel en la oscuridad aproximadamente 15 min, digitalizar la imagen inmediatamente

APÉNDICE II

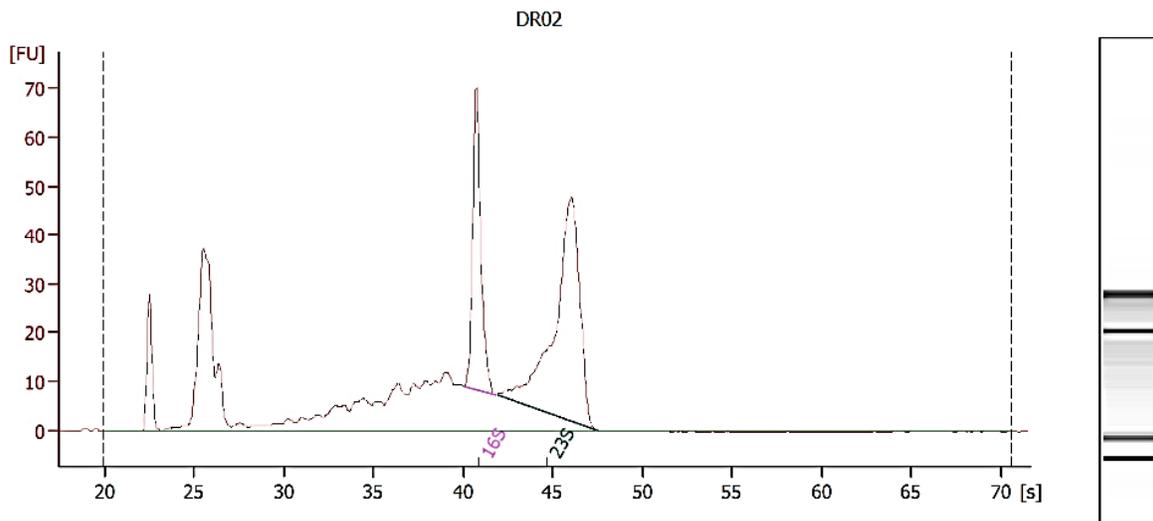
Electroferogramas obtenidos del Bioanalyzer de muestras de RNA total de la comunidad BP8 después de tratamiento con DNasa apropiadas para enriquecimiento de RNA mensajero



Overall Results for sample 2 : **DR06**

RNA Area:	609.5	rRNA Ratio [23s / 16s]:	1.8
RNA Concentration:	197 ng/ μ l	RNA Integrity Number (RIN):	9.5 (B.02.08)

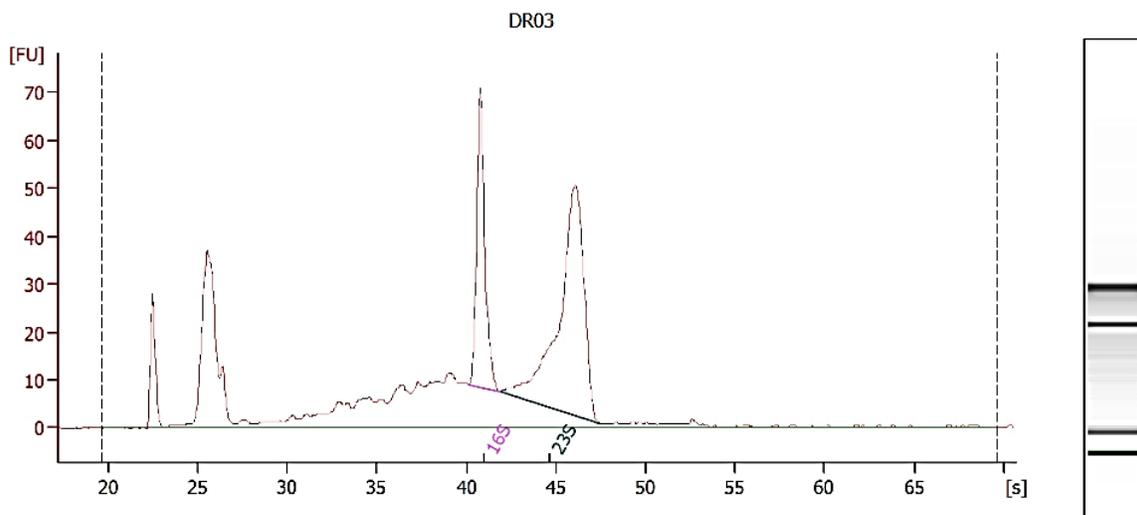
Figura A1. Electroferograma correspondiente a la muestra 18.2 (18 h en MM-PolyLack).



Overall Results for sample 2 : **DR02**

RNA Area:	666.8	rRNA Ratio [23s / 16s]:	2.0
RNA Concentration:	209 ng/ μ l	RNA Integrity Number (RIN):	7.5 (B.02.10)

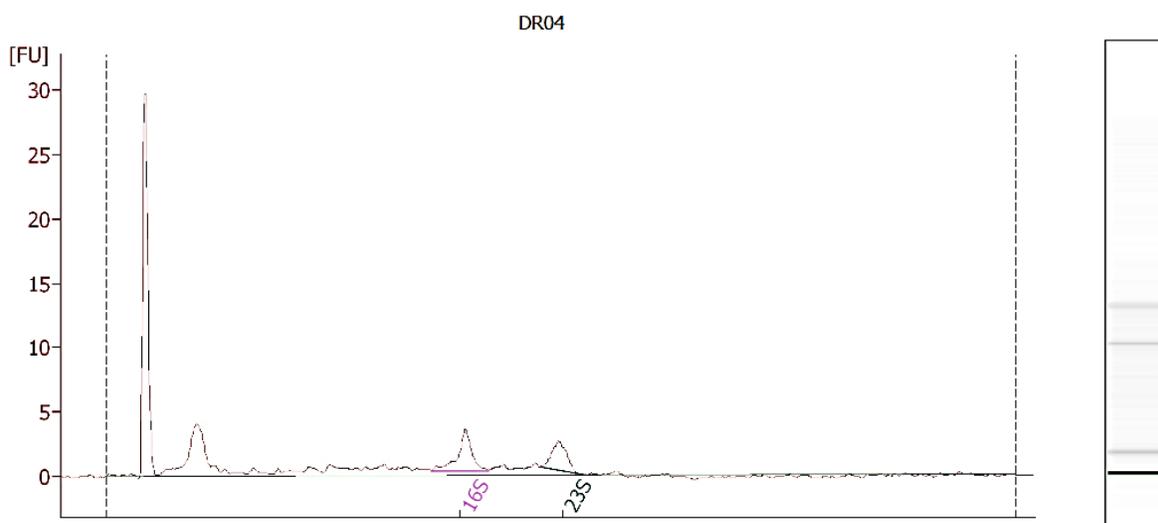
Figura A2. Electroferograma correspondiente a la muestra 18.4 (18 h en MM-PolyLack).



Overall Results for sample 3 : DR03

RNA Area:	675.0	rRNA Ratio [23s / 16s]:	2.1
RNA Concentration:	212 ng/μl	RNA Integrity Number (RIN):	7.6 (B.02.10)

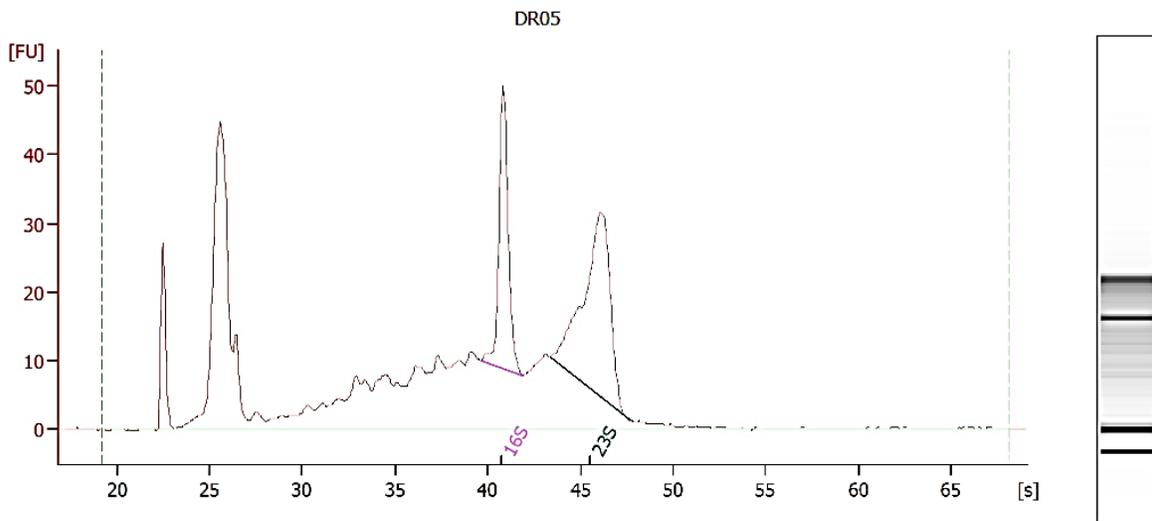
Figura A3. Electroferograma correspondiente a la muestra 18.6 (18 h en MM-PolyLack).



Overall Results for sample 1 : DR04

RNA Area:	60.0	rRNA Ratio [23s / 16s]:	0.7
RNA Concentration:	19 ng/μl	RNA Integrity Number (RIN):	7.5 (B.02.08)

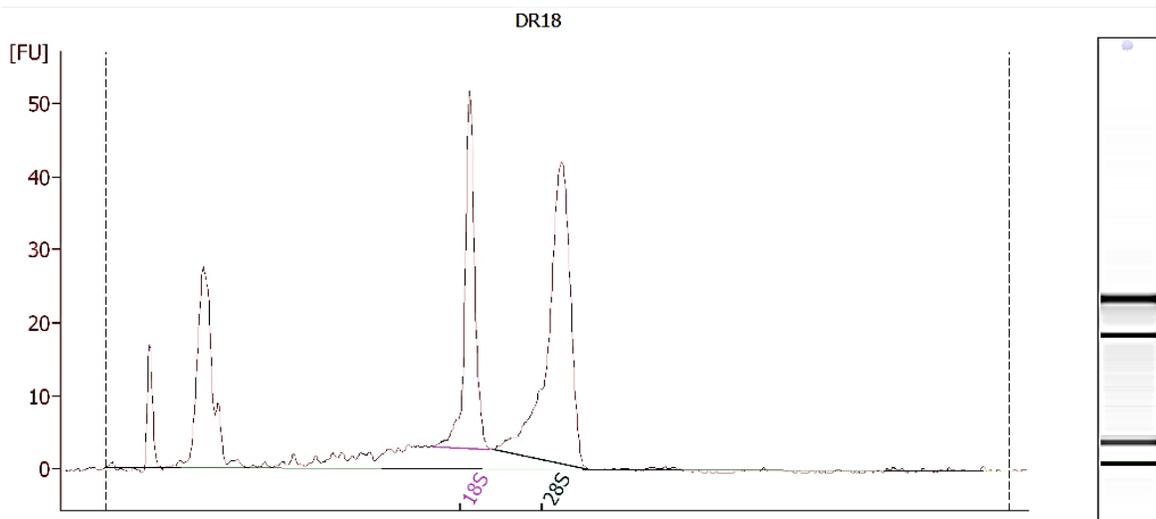
Figura A4. Electroferograma correspondiente a la muestra 3.1 (3 días en MM-PolyLack).



Overall Results for sample 5 : DR05

RNA Area:	684.1	rRNA Ratio [23s / 16s]:	1.7
RNA Concentration:	215 ng/ μ l	RNA Integrity Number (RIN):	7 (B.02.10)

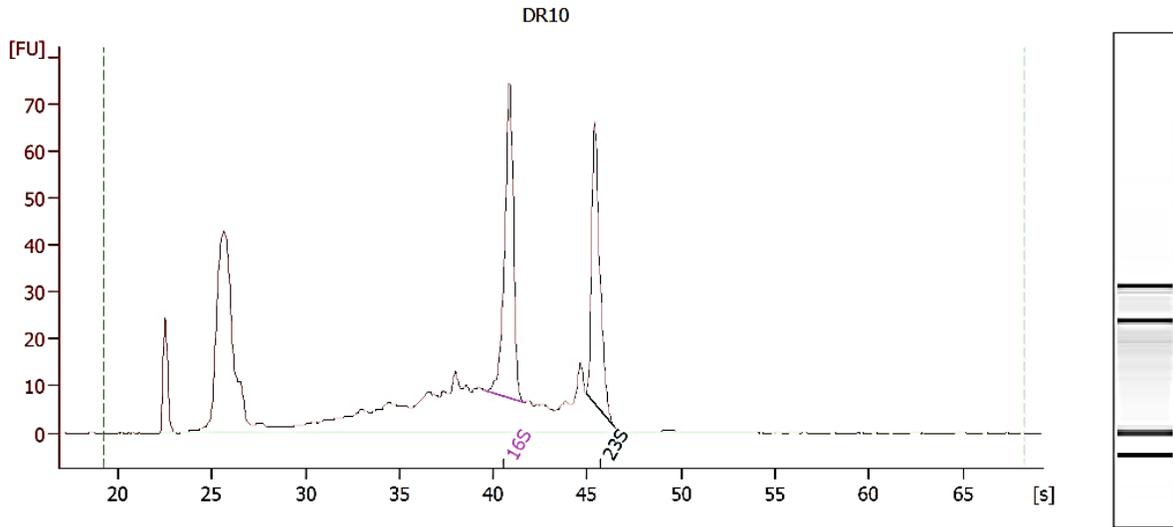
Figura A5. Electroferograma correspondiente a la muestra 3.2 (3 días en MM-PolyLack).



Overall Results for sample 11 : DR18

RNA Area:	413.1	RNA Integrity Number (RIN):	9.1 (B.02.08)
RNA Concentration:	262 ng/ μ l	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.7	Result Flagging Label:	RIN: 9.10

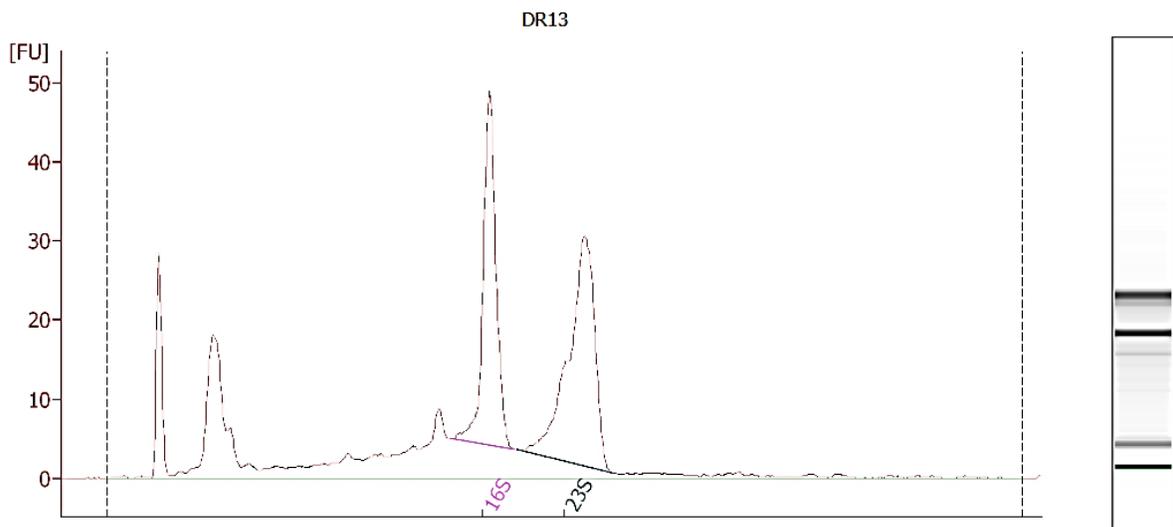
Figura A6. Electroferograma correspondiente a la muestra 3.5 (3 días en MM-PolyLack).



Overall Results for sample 10 : DR10

RNA Area:	615.9	rRNA Ratio [23s / 16s]:	0.8
RNA Concentration:	193 ng/μl	RNA Integrity Number (RIN):	7.1 (B.02.10)

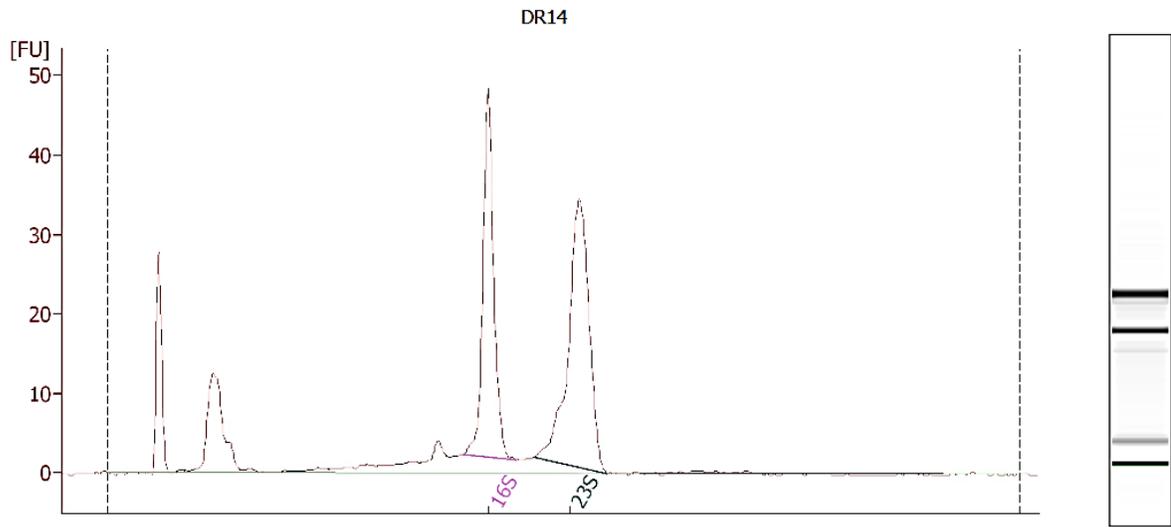
Figura A7. Electroferograma correspondiente a la muestra C.4 (condición control: 5 días en MM-PolyLack + 12 h en LB).



Overall Results for sample 7 : DR13

RNA Area:	441.0	rRNA Ratio [23s / 16s]:	1.2
RNA Concentration:	142 ng/μl	RNA Integrity Number (RIN):	8.6 (B.02.08)

Figura A8. Electroferograma correspondiente a la muestra C.5 (condición control: 5 días en MM-PolyLack + 12 h en LB).



Overall Results for sample 8 : DR14

RNA Area:	286.8	rRNA Ratio [23s / 16s]:	1.3
RNA Concentration:	93 ng/μl	RNA Integrity Number (RIN):	9.5 (B.02.08)

Figura A9. Electroferograma correspondiente a la muestra C.6 (condición control: 5 días en MM-PolyLack + 12 h en LB).

APÉNDICE III

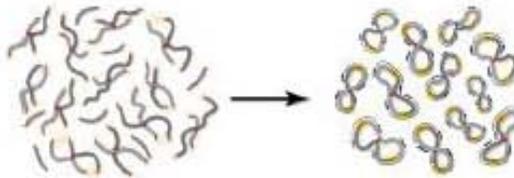


4000 Mason Rd
Suite 225
Seattle, WA 98195-2141

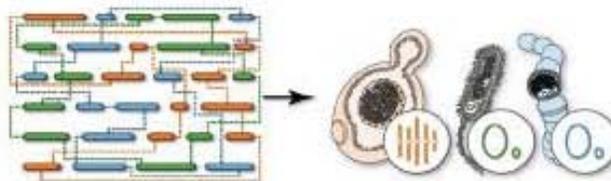
ProxiMeta™ Metagenome Deconvolution



In vivo crosslinking traps intra-cellular DNA contacts, including inter-chromosomal and plasmid-genome interactions. Because crosslinking is performed *in vivo*, inter-cellular interactions are negligible.



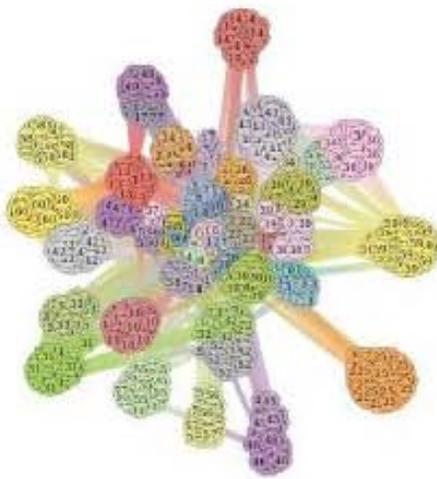
Crosslinked loci are fragmented and proximity ligated, creating chimeric junctions between sequences originating from the same cell. Paired-end sequencing of these junctions yields proximity signal that is used to group sequences by cellular origin.



Intracellular proximity signal is used to deconvolute metagenomes by grouping sequences into species- and strain-specific clusters. Multi-chromosome genomes can also be assembled, and plasmids can be assigned to host organisms.

Metagenome Deconvolution

The power of ProxiMeta™ HI-C lies in its unique ability to accurately determine the cellular origin of multiple DNA sequences from virtually any metagenomic sample. This property enables it to deconvolute complete and near-complete genomes from mixed populations – including novel & unculturable organisms.

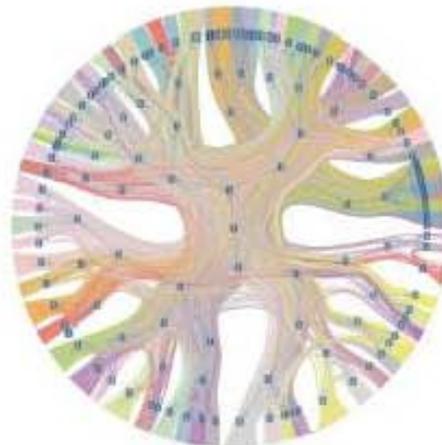


From Contigs to Genomes

By combining HI-C proximity data and metagenomic sequencing, ProxiMeta deconvolutes mixed samples at a species and strain level by determining which DNA sequences were physically present within the same cell in vivo, and then placing contigs into groups based on this signal.

Strains, Species, Genera

ProxiMeta iteratively clusters contigs into a hierarchy, with groupings becoming progressively more specific at deeper levels. This clustering hierarchy reflects the taxonomy of members of the community and results in the most accurate reflection of sample population.



Metagenome Deconvolution

Sample Report

After deconvolution, ProxiMeta™ estimates the completeness of each genome assembly, the level of contamination/mis-clustering, and abundance of each organism in the sample. It also compares each assembled genome to a global database in order to find each genome's identity or, in the case of novel genomes, its closest relative.

