



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE BANCOS METAGENÓMICOS DE MUESTRAS
AMBIENTALES ENFOCADO A LA BÚSQUEDA DE GENES
Y ACTIVIDADES DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA

PRESENTA

NOMBRE DEL SUSTENTANTE:

KARINA PEÑA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:	Profesor: Aurora Irma Ortegón Ávila
VOCAL:	Profesor: José Adelfo Escalante Lozada
SECRETARIO:	Profesor: Martha Giles Gómez
1° SUPLENTE:	Profesor: José de Jesús García Trejo
2° SUPLENTE:	Profesor: Beatriz Ruiz Villarán

APOYO ACADÉMICO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 4 de investigación de los Drs. Francisco Bolívar Zapata y Guillermo Gosset Lagarda, perteneciente al Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM, Campus: Cuernavaca, Morelos.

Agradezco al Instituto de Biotecnología; ya que este proyecto contó con el apoyo económico de PAPIIT DGAPA-UNAM: IN-207914.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

SUSTENTANTE (S):

Karina Peña Martínez

El pulque a través del tiempo ha sido fuente de inspiración de dichos y coplas populares entre la población; tales como la siguiente:

“El licor, el intoxicante ritual, la bebida-medicina, el líquido sacrificial, el vino blanco, leche de Mayahuel, la legendaria nutrición de los mexicanos, el teometl, vino sagrado para los guerreros vencidos que se iban a inmolar, bebida de los valientes y los sabios”.

Lehmann en Artes de México, No.51

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES	8
2.1 La aproximación metagenómica como una estrategia para la obtención de genes y actividades de interés biotecnológico.....	8
2.1.1 Análisis de la diversidad bacteriana por técnicas no dependientes del cultivo microbiano.....	8
2.1.2 Métodos empleados para la extracción del ADN metagenómico.	11
2.1.3 Clonación molecular del ADN metagenómico como una estrategia para el análisis y extracción de la diversidad metabólica de una muestra ambiental: implicaciones biotecnológicas.	12
2.1.4 Aislamiento de genes clonados en un banco del ADN metagenómico que codifiquen para proteínas con aplicaciones biotecnológicas	14
2.1.5 Análisis de la secuencia de los genes clonados en un banco del ADN metagenómico.....	17
2.2 Análisis de la diversidad microbiana y metabólica del pulque. Estudio de su metagenoma enfocado a la búsqueda de genes y actividades de interés biotecnológico.	17
2.2.1 El pulque, una bebida con características de importancia para el interés biotecnológico.	17
2.3 Justificación.	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVOS	24
Objetivo general.....	24
Objetivos particulares.....	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1 Cepas bacterianas y plásmido	25
5.2 Colecta de muestras de pulque.	27
5.3 Extracción del ADN metagenómico del pulque	27
5.4 Construcción del banco metagenómico	27
5.5 Análisis y caracterización del banco metagenómico	30
5.6 Búsqueda de genes involucrados en el transporte de glucosa por medio de la complementación funcional de <i>E.coli</i> PB11 con el pool metagenómico: <i>pJET1.2/MP31</i>	
5.6.1 Transformación de la cepa <i>E.coli</i> PB11 (PTS ⁻ , Glc ⁻)	31
5.6.2 Selección de clonas positivas	32
5.6.3 Tipificación de clonas	33
5.7 Secuenciación de clonas únicas	34
5.8 Análisis de secuencias.....	36
5.9 Determinación del efecto fisiológico del inserto metagenómico sobre el crecimiento de la cepa <i>E.coli</i> PB11.....	36
5.9.1 Medios de cultivo.....	37

5.9.2 Pre-inóculos e Inóculos para cultivos	37
5.9.3 Condiciones de cultivo	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1 Extracción del ADN metagenómico del pulque	40
6.2 Construcción del banco metagenómico	41
6.2.1 Digestión enzimática parcial del ADN metagenómico y ligación en el vector pJET1.2 / blunt.	41
6.2.2 Análisis y Caracterización de banco metagenómico	43
6.3 Búsqueda de genes involucrados en el transporte de glucosa por medio de la complementación funcional de <i>Escherichia coli</i> PB11 con el <i>pool</i> metagenómico: pJET1.2/MP.	46
6.3.1 Transformación de la cepa <i>Escherichia coli</i> PB11 (PTS ⁻ , Glc ⁻)	46
6.3.2 Selección de clonas positivas capaces de completar el crecimiento en glucosa de la cepa de <i>E. coli</i> PB11.	47
6.3.3 Tipificación de clonas positivas	48
6.4 Secuenciación de clonas metagenómicas únicas	49
6.5 Análisis de secuencias	49
6.6 Determinación del efecto fisiológico del inserto metagenómico sobre el crecimiento de la cepa <i>E.coli</i> PB11	54
7. CONCLUSIONES	56
8. PERSPECTIVAS	57
BIBLIOGRAFÍA	58
APÉNDICE I	64
APÉNDICE II	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de maguey empleados para la producción de pulque	3
Figura 2. Árbol filogenético de Bacterias mostrando los phyla establecidos (en cursiva los nombres en Latín) y los phyla candidatos descritos previamente en noviembre del 2003 en la base de datos ARB (http://arb-home.de) con 16,964 secuencias mayores a 1,000 pb.....	10
Figura 3. Aproximación metagenómica para el estudio de la diversidad genómica y metabólica presente en una muestra ambiental.	14
Figura 4. Descubrimiento de nuevos antibióticos a partir del análisis de bancos metagenómicos (Handelsman, 2004).	16
Figura 5. Mapa del vector de clonación pJET1.2 / blunt.....	26
Figura 6. Estrategia Primer Walking de secuenciación para insertos inespecíficos.	35
Figura 7. Sistema de Mini-fermentadores o Fleakers	39
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de metagenoma del pulque extraído por el método de fenol-cloroformo.....	41
Figura 9. Electroforesis de la digestión parcial del ADN metagenómico del pulque con la enzima SmaI.....	42
Figura 10. Digestiones de 12 clonas seleccionadas al azar para determinar el tamaño promedio de los insertos metagenómicos clonados.	45
Figura 11. Crecimiento en agar MacConkey-Ap100 suplementado con 1% de glucosa. Se observa el crecimiento de E. coli PB11 transformada con el pool metagenómico (pJET1.2/MP), presentando un fenotipo Glc+.	47
Figura 12. Análisis de restricción del pJET1.2/MP de 8 clonas que recuperaron su capacidad de crecer en glucosa.	48
Figura 13. Mapa de las secuencias de las 3 clonas metagenómicas analizadas.	53
Figura 14. Crecimiento de E. coli PB11 (PTS-, Glc-) y clonas metagenómicas.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones del análisis de bancos metagenómicos.	13
Tabla 2. Microorganismos detectados en el pulque utilizando técnicas dependientes y no dependientes de cultivo.	21
Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmido utilizados en este trabajo.	26
Tabla 4. Condiciones de digestión parcial de ADN metagenómico del pulque.....	28
Tabla 5. Mezcla de la reacción de ligación del ADN metagenómico del pulque y el vector de clonación pJET1.2/blunt.	29
Tabla 6. Mezcla de reacción de digestión del pJET1.2/MP clona 1-12.	31
Tabla 7. Mezcla de reacción de digestión de E.coli PB11 transformada con el pool metagenómico: pJET1.2/MP; clonas Glu1, Glu2 y Glu3.....	33
Tabla 8. Tamaño de bancos metagenómicos empleando plásmido como vector.	44

RESUMEN

La metagenómica es una disciplina que permite acceder al potencial genómico de muestras ambientales sin la necesidad de cultivar microorganismos presentes en ellas. Los resultados del análisis de metagenomas de diversos ambientes permiten identificar la presencia de una gran cantidad de nuevos linajes bacterianos y de genes que codifican para nuevas actividades enzimáticas de interés biotecnológico. La complementación de cepas bacterianas con inactivaciones en genes específicos del metabolismo central del carbono (MCC), y la vía de síntesis de metabolitos aromáticos empleando bancos metagenómicos de suelos o ambientes naturalmente enriquecidos (p.e. el pulque); abre la posibilidad de identificar genes que pudieran incrementar las capacidades metabólicas de cepas productoras de metabolitos de interés biotecnológico a partir de genes potencialmente nuevos presentes en las muestras de metagenomas analizados. El pulque representa un ambiente naturalmente enriquecido a partir del cual podrían ser aislados nuevos microorganismos y genes con aplicaciones biotecnológicas potenciales; debido a la naturaleza química del aguamiel (integrada por sacarosa, fructosa, glucosa y fructo-oligosacáridos) y el hecho que durante el proceso de elaboración del pulque se presenten tres tipos de fermentación: ácida, alcohólica y viscosa: producción de exopolisacáridos (EPS). En este trabajo se describe la creación de un banco metagenómico bacteriano de una muestra de pulque colectada del poblado de Huitzilac, Morelos; y su uso para transformar una cepa de *Escherichia coli* (PTS⁻ gen “Inactivo” para el sistema de fosfotransferasa de azúcares, Glc⁻ gen “Inactivo” para la absorción de glucosa como fuente de carbono) y restaurar su capacidad de crecimiento en glucosa bajo condiciones anaerobias.

La selección de tres clonas (designadas como clonas Glu) que permitieron restaurar la capacidad de crecer en glucosa de esta cepa, su secuenciación y análisis de las respectivas clonas metagenómicas seleccionadas al azar de este banco empleando el método de *primer walking*, permitió identificar a estos insertos metagenómicos como: Clona Glu1, una secuencia correspondiente a una proteína putativa (retrotransposón sin clasificar) de *Oryza sativa*. La clona Glu2 fue identificada como una timidilato cinasa de *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4 y finalmente la clona Glu3 fue identificada como FOF1 ATP sintasa subunidad A de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5.

1. INTRODUCCIÓN

Octli es el nombre náhuatl del pulque, cuyo cambio se cree fue debido a la nominación con la que los antiguos le asignaban a esta bebida, cuando ya se encontraba en descomposición, *octli poliunqui*, "vino descompuesto"; por lo que los españoles "alteraron el vocablo fundando así la denotación pulque" (Corcuera de Mancera, 1997). El pulque es una bebida fermentada tradicional alcohólica (de 4 a 7 ° G. L.), que se obtiene a partir de la fermentación del aguamiel (savia azucarada) extraído de varias especies de magueyes productores de pulque (Escalante *et al.*, 2008). El maguey es una planta oriunda de México que pertenece al orden de las Amarilidáceas y al género de los Agaves. Existen diversas clases de magueyes pulqueros, tales como: *Agave salmiana* otto ex Salm, *A. mapisaga* Trel, *A. atrovirens* Kart ex Salm, *A. ferox* Koch, *A. hookeri* Jacobi, *A. americana* L. Siendo las especies *A. salmiana* y *A. atrovirens* las más importantes de estas especies, **FIGURA. 1** (García-Garibay, 1993).



a)



b)

Figura 1. Tipos de maguey empleados para la producción de pulque

a) *Agave salmiana* otto ex Salm ("maguey pulquero", "maguey palmilla") b) *Agave atrovirens* Karw ex Salm-Dyck ("maguey manso", "maguey de montaña"). Pertenecientes a la familia de las agaváceas. Son plantas suculentas de origen mexicano, a partir de cuya savia se produce la bebida alcohólica llamada pulque.

Dependiendo del gusto, el pulque se puede consumir suave, fuerte o maduro o bien “curado”; es decir, con la adición de frutas, hortalizas, algunos cereales o productos de origen animal. Esta bebida es actualmente producida y consumida principalmente en la región central de México; en los estados de: Michoacán, Estado de México, Querétaro, Morelos, la zona rural del D.F., Hidalgo y Tlaxcala, siendo la zona limítrofe entre estos dos últimos estados, en donde es más intenso el cultivo del maguey.

Para la elaboración del pulque, se emplea aguamiel fresco; colectado diariamente por la mañana o por la tarde de magueyes que hayan sido “tratados” previamente; cuando el maguey ha alcanzado la edad estimada (entre 8 y 12 años de plantado), se procede a efectuar el “capado”, antes de que surja del cogoyo o yema central; la flor o “quiote”.

La cantidad y calidad de aguamiel depende de que el capado se realice en el tiempo adecuado. El “tlachiquero” es el encargado de realizar la operación, la cual consiste en cortar con un cuchillo las púas laterales de las pencas hasta llegar al corazón, para posteriormente cortarlo y extraerle un trozo del extremo inferior, a lo que le llaman comúnmente “huevo”. Posteriormente, el maguey se deja reposar aproximadamente 6 meses, después de esto se inicia el “raspado” y con ello la extracción del aguamiel.

Tradicionalmente el aguamiel es extraído con el “acocote”, este instrumento no ha cambiado desde la época prehispánica, la especie de calabozo o bule impide el contacto del aguamiel con los labios del tlachiquero que lo succiona. Un maguey puede producir durante 6 meses, extrayendo 2 veces al día la cantidad diaria de 3 a 4 litros, después de esto la planta muere. El aguamiel se vierte en las “castañas” o bolsas hechas de cuero para su transportación, pero dependiendo del volumen que se haya colectado se emplean recipientes de plástico; para ser transferido al “tinacal” (tradicionalmente recipientes de madera y piel; pero en la actualidad se emplean comúnmente recipientes de plástico) y es aquí en donde la fermentación se lleva a cabo. El proceso inicia con la adición de la “semilla”, “nana”, “madre” o “pie de cuba” lo cual disminuye el tiempo que tomará la fermentación espontánea (de más de 2

semanas a 36 horas). El inóculo se prepara mediante la fermentación natural de aguamiel de alta calidad, en tinajas de 25 litros protegidas con manta de cielo; la producción del mismo toma de 25 a 30 días.

Los términos “tender las puntas o “despuntar” se emplean para describir la inoculación y “correr las puntas”, para denominar la acción de continuar la fermentación vaciando parcialmente las tinajas y llenándolas nuevamente con aguamiel fresco (García Garibay, 1993). Tradicionalmente la fermentación concluye al observar el desarrollo de la viscosidad, que es el resultado de la producción de exopolisacáridos (EPS) y la producción de alcohol (etanol); siendo estos los principales parámetros acostumbrados a determinar el grado de la fermentación (pulque fresco o maduro). Dependiendo de que el aguamiel sea colectado al amanecer o por la tarde; es el tiempo en que varía la fermentación, este puede ser desde unas horas hasta toda la noche. Finalmente el pulque se deposita en barriles de madera y es distribuido para su venta y consumo, esto se realiza sin añadir conservadores. Es de gran importancia mencionar que el proceso completo de elaboración del pulque (desde la recolección del aguamiel, su transporte y la fermentación), se realizan bajo condiciones no asépticas; por lo tanto los microorganismos que están involucrados en el proceso de la fermentación son todos aquellos, que se incorporan al aguamiel durante su recolección, transporte, fermentación y manipulación (Godoy, 1987; Lappe y Ulloa, 1993).

Los primeros estudios sobre la microbiología del pulque datan de principios del siglo XX y hasta 1977 (Godoy, 1987; Lappe y Ulloa, 1993). Con base en estos estudios se aislaron de muestras de aguamiel y pulque diferentes microorganismos, incluyendo a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y a la bacteria *Zymomonas mobilis*; ambas productoras de etanol. *Leuconostoc mesenteroides* bacteria ácido-láctica (LAB), responsable de la producción de dextranas a partir de sacarosa y diversas especies de bacterias lácticas homo- y hetero-fermentativas. Estos microorganismos, han sido considerados como esenciales en el proceso de fermentación del pulque (Escalante *et al.*, 2008).

Recientemente, en el grupo de investigación del Dr. Francisco Bolívar, en el Instituto de Biotecnología, UNAM, se han realizado diferentes estudios para la caracterización de la diversidad microbiana del aguamiel y el pulque, empleando los métodos tradicionales dependientes de cultivo y los métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano (Escalante *et al.*, 2008).

El pulque se puede considerar como un ambiente particularmente interesante, ya que representa un recurso en vías de exploración y con un gran potencial en el contexto biotecnológico. Gracias a la naturaleza química del sustrato (aguamiel) conformada por: sacarosa, fructosa, glucosa y fructo-oligosacáridos; además de la presencia de microorganismos aún no reportados previamente (Escalante *et al.*, 2004; 2008), ya que durante el proceso de elaboración del pulque, se pueden distinguir tres tipos de fermentación: la fermentación alcohólica, la fermentación ácida y la fermentación viscosa; haciendo de esta bebida fermentada tradicional alcohólica un excelente ambiente naturalmente enriquecido a partir del cual se podrían aislar nuevos microorganismos, identificar nuevos genes con aplicaciones biotecnológicas; como los que codifican sistemas de transporte y asimilación de azúcares (sacarosa, glucosa, xilosa); enzimas hidrolíticas extracelulares con capacidad de degradar polímeros, en la síntesis de EPS, genes involucrados en la síntesis de los productos de la fermentación (etanol, ácido láctico y ácido acético) y detección de actividades enzimáticas asociadas a la síntesis de metabolitos aromáticos primarios y secundarios, entre otras aplicaciones, haciendo uso de la aproximación metagenómica. En los últimos 20 años se han desarrollado y perfeccionado herramientas moleculares que han permitido desarrollar la ingeniería genética molecular o tecnología del ADN recombinante (Bolívar, 2004); empleando estas herramientas se ha logrado el aislamiento, modificación y caracterización del ADN de cualquier organismo. Aplicando las técnicas del ADN recombinante al estudio de la diversidad bacteriana, se ha superado la limitación de no poder cultivar a la mayoría de los integrantes de un nicho ecológico particular. En la actualidad, la necesidad de cultivar a los microorganismos de una muestra ambiental, ha sido reemplazada por la capacidad de aislar y caracterizar el ADN presente en la

muestra. Al conjunto de los genomas de microorganismos presentes en una muestra, de un nicho ecológico determinado, se le llama **metagenoma** (Handelsman *et al.*, 2002). El análisis del metagenoma bacteriano por técnicas moleculares ha permitido obtener información sobre: diversidad, organización genómica y fisiológica de grupos bacterianos no cultivables; además de que gracias a esto se han podido obtener en el laboratorio diversos productos de importancia biotecnológica (Escalante *et al.*, 2004).

2. ANTECEDENTES

2.1 La aproximación metagenómica como una estrategia para la obtención de genes y actividades de interés biotecnológico.

2.1.1 Análisis de la diversidad bacteriana por técnicas no dependientes del cultivo microbiano.

El humano a través del tiempo y hasta nuestros días ha tenido la necesidad de emplear a los microorganismos, para obtener productos y materiales útiles en la vida diaria, esta práctica ha sido de importancia para la humanidad.

El aislar a los microorganismos de un ambiente particular es el paso inicial en la búsqueda de productos de origen microbiano, por ejemplo: identificación de nuevos tipos de transporte bacterianos de azúcares, nuevos tipos de enzimas biosintéticas, metabolitos primarios, metabolitos secundarios, etcétera; ya que son de gran utilidad por sus aplicaciones en la industria farmacéutica, agrícola, alimentaria; entre otras.

Usualmente los estudios para caracterizar a la diversidad microbiana de diferentes ambientes se han basado en suponer que estas técnicas permiten recuperar a la mayoría de los integrantes de la muestra; sin embargo, actualmente contamos con evidencia suficiente, que nos señala que estos métodos de aislamiento tradicional de microorganismos, únicamente nos permiten obtener entre 0.1 a 10% de los microorganismos del ambiente en estudio y que son cultivables (Rondon *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 1999; Tiedje y Stein., 1999; Handelsman *et al.*, 2002; Torsvik y Øvreas, 2002; Torsvik *et al.*, 2002). Este fenómeno puede ser explicado como el resultado del desconocimiento de los requerimientos nutricionales y las condiciones fisicoquímicas para que se desarrollen un gran número de grupos de microorganismos en su hábitat natural. También, porque hay poca información sobre las relaciones simbióticas y parasitarias que sostienen los integrantes de un nicho en particular (McDougald *et al.*, 1998; Tiedje y Stein, 1999; Zengler *et al.*, 2002; Keller y Zengler, 2004). Esta limitante ha sido muy negativa para la búsqueda de nuevos compuestos.

Un claro ejemplo de lo anterior; es la búsqueda de nuevos antibióticos a partir de cultivos de microorganismos, que han sido aislados del ambiente, ya que actualmente hasta el 99.9% de los antibióticos aislados son ya conocidos (Keller y Zengler, 2004); por esta razón, el estudio de la diversidad microbiana empleando métodos no cultivables, para la búsqueda de nuevos compuestos con importancia biotecnológica se ha convertido en un recurso con gran potencial y que aún no ha sido explotado.

Esta tecnología, ha sido aplicada tanto para entender un gran número de procesos biológicos, como para el estudio de la diversidad microbiana (Torsvik *et al.*, 2002). Dentro del estudio de la diversidad microbiana, la aplicación de técnicas del ADN recombinante y de la biología molecular, han permitido superar la limitación producida por la incapacidad de poder cultivar a la mayor parte de los microorganismos de un ambiente particular. Por lo tanto, la necesidad que existía de cultivar a los microorganismos, actualmente ha sido reemplazada por la capacidad de aislar, modificar y caracterizar el ADN presente en la muestra analizada. Al conjunto de los genomas de microorganismos en una muestra de un nicho ecológico determinado, se le denomina **metagenoma** (Handelsman *et al.*, 2002). El analizar el metagenoma bacteriano de un ambiente particular; aplicando las técnicas moleculares, ha arrojado información sobre la diversidad, la organización filogenética de microorganismos no cultivables y de manera muy importante han permitido obtener en el laboratorio nuevos productos con aplicaciones biotecnológicas.

Entre las técnicas moleculares más destacadas para el análisis del metagenoma bacteriano de un ambiente determinado; es el análisis de las secuencias de los genes que codifican los ARN ribosomales 16S (ADNr 16S), a partir de su amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esto ha generado evidencia que indica la existencia de un gran número de grupos bacterianos no descritos previamente pero que están relacionados filogenéticamente con grupos bacterianos cultivables y así como la presencia de grupos sin relación filogenética con organismos cultivables, los cuales presentan una diversidad muy amplia, **FIGURA.2** (Borneman *et al.*, 1996; Keller y Zengler, 2004).

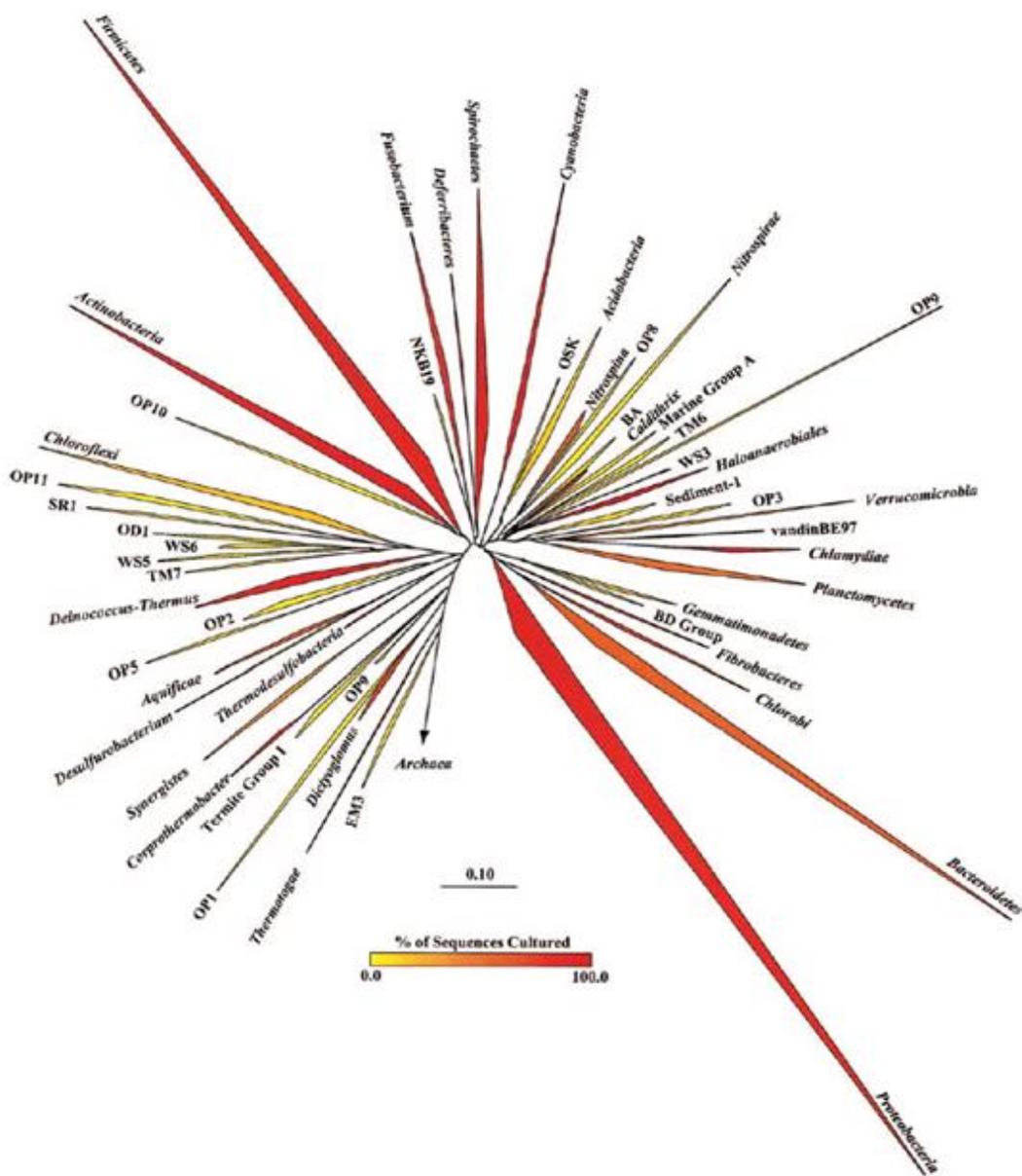


Figura 2. Árbol filogenético de Bacterias mostrando los phyla establecidos (en cursiva los nombres en Latín) y los phyla candidatos descritos previamente en noviembre del 2003 en la base de datos ARB (<http://arb-home.de>) con 16,964 secuencias mayores a 1,000 pb

La intensidad del rojo corresponde a la proporción de las secuencias en cada phylum obtenidas de representantes cultivados. Los phyla candidatos no poseen miembros cultivados (Handelsman, 2004).

2.1.2 Métodos empleados para la extracción del ADN metagenómico.

Actualmente se han desarrollado métodos de extracción del metagenoma bacteriano de diversos ambientes, cada vez más eficientes. Estos deben garantizar la obtención de ADN de buena calidad; es decir, ADN no degradado, preferentemente de gran tamaño, libre de contaminantes del medio ambiente que puedan interferir con la actividad de las enzimas de restricción o ADN polimerasas y sobre todo que asegure la lisis de todos los microorganismos presentes en la muestra que se desee analizar. Con base en los puntos anteriores, estos métodos se dividen en dos grupos:

1.- Método de lisis directa. Los microorganismos son lisados directamente, en una suspensión amortiguada de la muestra a analizar (Zhou *et al.*, 1996; Rondon *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2003). Estos métodos directos han permitido la extracción rápida de ADN de buena calidad; por ejemplo: *arcilla*, con una eficiencia de lisis bacteriana entre 26 a 92% y rendimientos de 2.5 a 26.9 mg ADN g⁻¹ suelo (Zhou *et al.*, 1996). Aunque, en el metagenoma que se ha obtenido empleando este método, se ha detectado ADN no bacteriano, como el mitocondrial y de cloroplastos; que está contaminado con sustancias asociadas al ambiente de la muestra que interfieren en la manipulación enzimática del ADN extraído; por ejemplo: ácidos húmicos (Zhou *et al.*, 1996; Frostegard *et al.*, 1999). Por otro lado, empleando estos métodos se ha obtenido ADN genómico de alto peso molecular y libre de sustancias húmicas contaminantes, debido a la aplicación en los procesos de lisis de varios ciclos de enfriamiento en combinación con una extracción con fenol caliente, seguido de la purificación del material genético extraído, por medio de una electroforesis preparativa en gel de agarosa (Rondon *et al.*, 2000, Handelsman *et al.*, 2002).

2.- Lisis a partir de células separadas. Los microorganismos primero son separados del sustrato para posteriormente ser lisados (Courtois *et al.*, 2001; Courtois *et al.*, 2003). Este método basado en el aislamiento preliminar de células por homogenización-centrifugación secuencial de la muestra analizada y su posterior lisis, ha permitido obtener ADN con integridad y puridades mayores, pero con eficiencia de lisis y

rendimientos menores (7.3 a 23% y hasta 4 mg ADN g⁻¹ suelo) (Holben *et al.*, 1998; Krsek y Wellington, 1999).

Es importante mencionar que aunque estas metodologías de extracción del metagenoma han sido diseñadas para el análisis de muestras de suelo; su aplicación con las debidas modificaciones a otros ambientes, han dado resultados exitosos; por lo que en la actualidad es posible obtener el metagenoma microbiano de aguas oceánicas (Venter *et al.*, 2004), alimentos fermentados semisólidos o masas (Escalante *et al.*, 2001), bebidas fermentadas con alto grado de viscosidad (pulque), es la muestra que compete a este estudio (Escalante *et al.*, 2004) y a partir del tracto intestinal de larvas de lepidópteros (Brennan *et al.*, 2004).

2.1.3 Clonación molecular del ADN metagenómico como una estrategia para el análisis y extracción de la diversidad metabólica de una muestra ambiental: implicaciones biotecnológicas.

Para el estudio de la diversidad bacteriana de muestras ambientales, también se han empleado sistemas de clonación, los cuales han permitido ligar fragmentos de ADN metagenómico para su propagación dentro de un huésped bacteriano y su posterior análisis.

Generalmente en las bacterias, toda la información genética esencial se encuentra contenida en una única molécula de ADN circular de doble cadena, llamada cromosoma; además, contienen moléculas de ADN de doble cadena, circular cerrada, extracromosomal y con replicación autónoma, denominadas plásmidos. Un plásmido constituye un replicón independiente del cromosoma bacteriano, se mantiene en la célula en un número estable y característico de copias y este número permanece constante de generación en generación. Estas moléculas tienen un tamaño de entre 3 y 10 Kb; por lo que son significativamente menores que un cromosoma. También, de acuerdo a su tamaño, pueden codificar hasta 10 proteínas diferentes; sin embargo, generalmente no contienen genes esenciales para la supervivencia de la bacteria, pero pueden portar genes que le confieran una ventaja selectiva en algunos nichos

ecológicos. Estas moléculas han sido empleadas desde los 70's, como receptores de fragmentos de ADN provenientes del mismo organismo o de otro (Bolívar, 2004).

Además, se han desarrollado vectores de clonación especializados, por ejemplo; cósmidos y cromosomas bacterianos artificiales, capaces de ligar fragmentos de ADN de hasta 39 Kb y 100 Kb respectivamente; que permiten clonar fragmentos de ADN metagenómico que contenga varias docenas de genes y, que teóricamente, puedan codificar rutas biosintéticas completas (Rondon *et al.*, 1999; Handelsman *et al.*, 2002; Berry *et al.*, 2003; Lorenz *et al.*, 2002; Voget *et al.*, 2003). Una vez que se ha obtenido el metagenoma bacteriano, se prosigue a construir el banco metagenómico y su posterior análisis basado en los siguientes enfoques: a) Análisis de la búsqueda de la función de los genes clonados en el banco; y b) Análisis de las secuencia nucleotídica de los genes representados en el banco.

El análisis del metagenoma bacteriano empleando estas aproximaciones a diversos problemas microbiológicos han permitido sus aplicaciones en diversos campos de la biotecnología (Handelsman *et al.*, 2002; Schloss *et al.*, 2003; Keller y Zengler, 2004):

Tabla 1. Aplicaciones del análisis de bancos metagenómicos.

La caracterización filogenética de la diversidad bacteriana,
La caracterización de la organización de nuevos genomas,
La elucidación de nuevas vías biosintéticas, para la síntesis de metabolitos primarios y secundarios,
La identificación de nuevos genes y actividades microbianas con capacidad de degradar agentes contaminantes,
El descubrimiento de nuevas enzimas y biopolímeros,
La elucidación de la estructura trófica de comunidades microbianas; entre otros.

2.1.4 Aislamiento de genes clonados en un banco del ADN metagenómico que codifiquen para proteínas con aplicaciones biotecnológicas

Este método se basa en los siguientes criterios (**FIGURA. 3**):

- Identificar aquellas clonas que contengan ADN metagenómico que expresen una característica de interés (p.e. una actividad enzimática o producción de sustancias antimicrobianas);
- Secuenciación del inserto de ADN en las clonas positivas; y
- Análisis del producto o actividad (Rondon *et al.*, 1999; 2000; Handelsman *et al.*, 2000; Voget *et al.*, 2003).

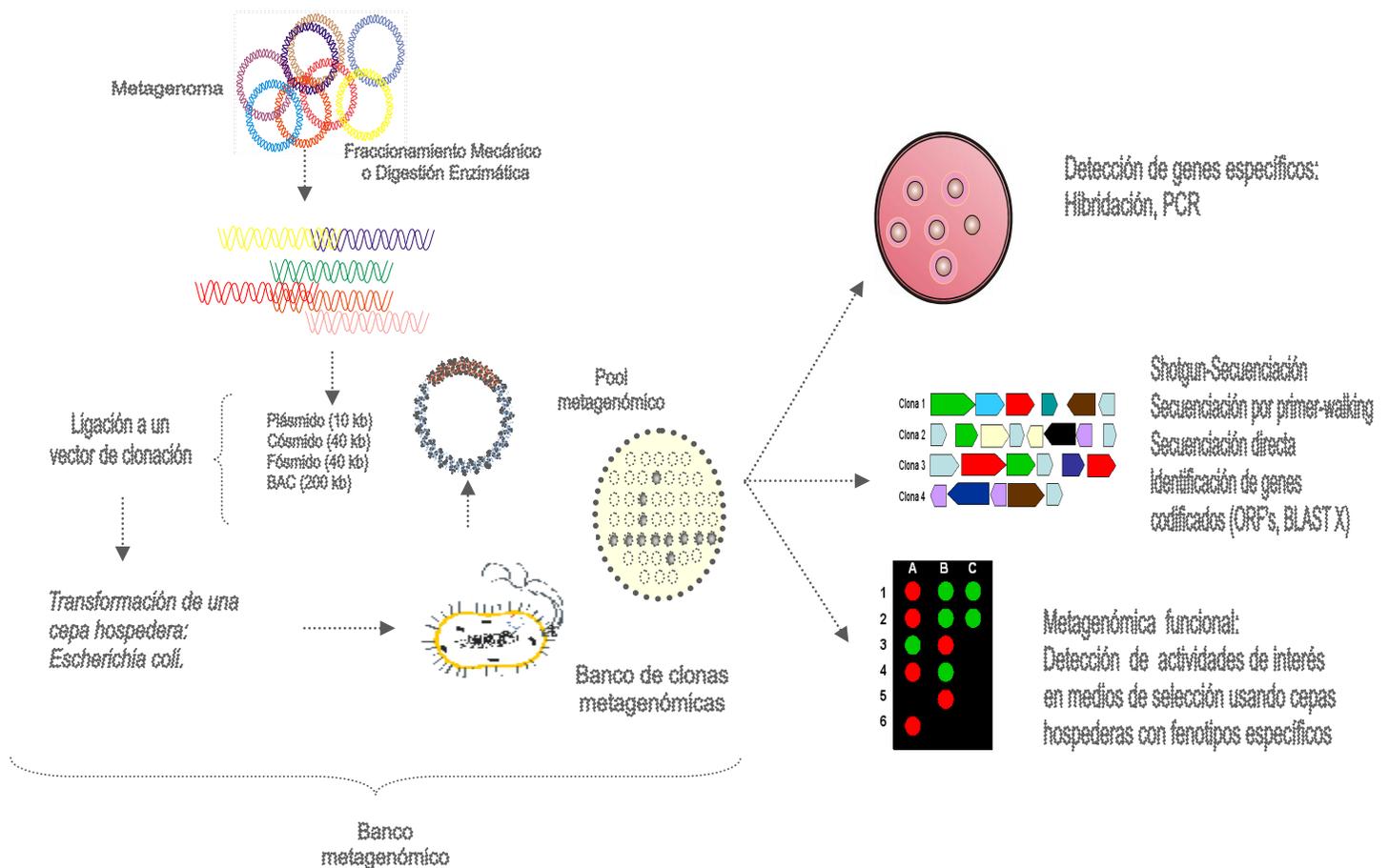
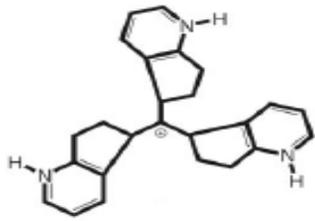


Figura 3. Aproximación metagenómica para el estudio de la diversidad genómica y metabólica presente en una muestra ambiental.

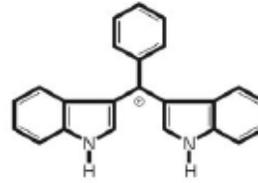
Pero existe una limitación en este método, ya que se requiere la expresión de los genes presentes en el metagenoma por la maquinaria enzimática transcripcional de la célula huésped (generalmente se emplea a *Escherichia coli*); además, en los casos en los que el producto de interés resulta de una vía metabólica, se requiere que todos los genes que la integran se encuentren en el fragmento de ADN metagenómico clonado. Se han desarrollado también bancos de cepas de *Escherichia coli* con características específicas (por ejemplo: mutaciones puntuales, mutantes auxótrofas, etc), y se han utilizado otros microorganismos diferentes a *E. coli* como hospederos. Con ello se ha logrado ampliar el rango del análisis de expresión del ADN metagenómico (Rondon *et al.*, 1999; Gillespie *et al.*, 2002; Handelsman *et al.*, 2002).

El análisis funcional de los bancos de ADN metagenómico ha permitido obtener en laboratorio, diversos productos y actividades de interés biotecnológico, de los cuales se pueden mencionar los siguientes (**FIGURA. 4**):

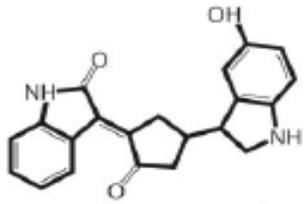
- Antibióticos nuevos, (p.e. turbomicina A, turbomicina B, violaceína, etcétera);
- Lipasas y esterasas capaces de sintetizar precursores de importancia farmacéutica y agroquímica;
- Quitinasas;
- Proteínas de membrana;
- Genes que codifican la síntesis de compuestos (p.e. poli-hidroxi-butilato, el cual se trata de un polímero biodegradable);
- Genes que codifican la vía biosintética de vitaminas, etcétera (Rondon *et al.*, 2000; Gillespie *et al.*, 2002; Courtois *et al.*, 2003; Schloss y Handelsman, 2003).



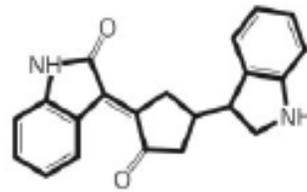
Turbomicina A



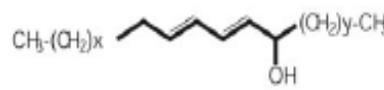
Turbomicina B



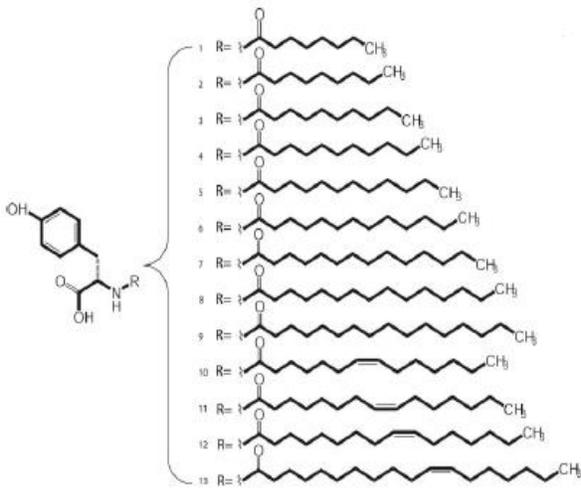
Violaceina



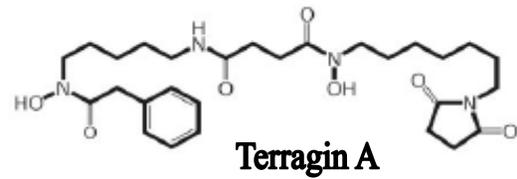
Deoxiviolaceina



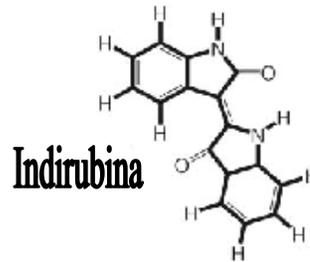
Isómeros de alcoholes grasos diénicos



Antibióticos aminoácidos N-acil de cadena larga



Terragin A



Indirubina

Figura 4. Descubrimiento de nuevos antibióticos a partir del análisis de bancos metagenómicos (Handelsman, 2004).

2.1.5 Análisis de la secuencia de los genes clonados en un banco del ADN metagenómico.

Esta metodología tiene como objetivo determinar toda la secuencia nucleotídica de los segmentos específicos del ADN metagenómico, ya que de esta manera se pueden establecer relaciones filogenéticas y funcionales entre las proteínas codificadas por los genes presentes en el metagenoma y las secuencias de aminoácidos localizadas en bases de datos (Venter *et al.*, 2004). Como el GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov); este archivo de secuencias es el más importante y extenso que existe en la actualidad. Es poseedor de secuencias de ADN de diversos organismos en una cantidad equivalente a veinte mil millones de pares de bases; esta cantidad de información equivale aproximadamente a 20 millones de genes o 4000 genomas bacterianos completos de tamaño similar al de *Escherichia coli*. Utilizando herramientas computacionales específicas ha sido posible analizar si el ADN clonado tiene similitud significativa con alguna secuencia depositada en la base de datos. Si el análisis determina que existe dicha similitud y previamente se conoce la función de la secuencia depositada en el banco; entonces se asume que la secuencia clonada tendría una actividad biológica idéntica o similar. Este resultado proporciona un criterio que permite la definición de enfoques experimentales que establecerían las propiedades bioquímicas de la proteína codificada en el metagenoma analizado.

2.2 Análisis de la diversidad microbiana y metabólica del pulque. Estudio de su metagenoma enfocado a la búsqueda de genes y actividades de interés biotecnológico.

2.2.1 El pulque, una bebida con características de importancia para el interés biotecnológico.

Se entiende por pulque a la bebida fermentada tradicional alcohólica no destilada, que se obtiene de la fermentación del aguamiel (savia), sustrato extraído de varias especies

de magueyes pulqueros (*A. mapisaga*, *A. ferox*, *A. hookori*, *A. americana*, siendo *A. salmiana* y *A. atrovirens*, las más importantes de estas especies).

Actualmente esta bebida es producida y consumida principalmente en la región central de México. Para la elaboración del pulque, se emplea aguamiel fresco; colectado diariamente por la mañana o por la tarde de magueyes que hayan sido “tratados”.

El aguamiel se vierte en las bolsas hechas de cuero para su transportación, pero dependiendo del volumen que se haya colectado se pueden emplear recipientes de plástico; posteriormente es transferido al “tinacal” es el recipiente en donde se desarrolla propiamente la fermentación.

El proceso inicia con la adición de la semilla, está es preparada de diferentes maneras, dependiendo del productor. Ya establecida la semilla, se inoculan las tinas y la fermentación termina considerando tradicionalmente el desarrollo de la viscosidad y la producción de alcohol; siendo estos los principales parámetros acostumbrados a determinar el grado de la fermentación; es decir, pulque fresco o maduro. Dependiendo de que el aguamiel sea colectado al amanecer o por la tarde; es el tiempo en que la fermentación varía, este puede ser desde unas horas hasta toda la noche.

Finalmente el pulque es depositado en barriles de madera y distribuido para su venta y consumo sin añadir conservadores.

El proceso completo de elaboración del pulque se realiza bajo condiciones no asépticas; por lo tanto los microorganismos que están involucrados en el proceso de la fermentación son todos aquellos, que se incorporan al aguamiel durante su recolección, transporte, fermentación y manipulación.

Los primeros estudios sobre la microbiología del pulque datan de principios del siglo XX; pero no es hasta 1924 que gana relevancia científica a nivel internacional, cuando el investigador alemán Paul Lindner, reporta el aislamiento de la bacteria productora de etanol a la cual nombró como *Termobacterium mobile*, actualmente denominada como *Zymomonas mobilis*, esta bacteria es la más ampliamente empleada para producir cantidades elevadas de etanol, por lo que es considerada como un microorganismos de gran interés industrial.

En la American Type Culture Collection (www.attc.org), se encuentran depositadas 11 cepas que fueron aisladas de muestras de pulque. En trabajos de microbiología desarrollados por los Drs. Alfredo Sánchez-Marroquín y Miguel Ulloa, se describen diversas especies de bacterias y levaduras en esta bebida; siendo *Zymomonas mobilis* y la bacteria ácido-láctica *Leuconostoc mesenteroides* las que se reportan con mayor frecuencia en los trabajos, junto a las bacterias ácido-lácticas identificadas como miembros del género *Lactobacillus* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Considerando a la bacteria *Zymomonas mobilis* y a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, como los microorganismos encargados de producir etanol durante la fermentación; mientras tanto a la bacteria ácido-láctica *Leuconostoc mesenteroides* como responsable del desarrollo de la viscosidad que es característica del pulque; como consecuencia de la producción de exopolisacáridos (EPS). Debido a estas características, los microorganismos anteriores han sido considerados como fundamentales en la fermentación del pulque.

La importancia económica y social del pulque en nuestra historia es fundamental, siendo lamentable que haya sido relativamente poco estudiado; ya que a partir de la década de los 80's, los estudios microbiológicos de esta bebida tradicional, sufren un vacío considerable, en comparación con otras bebidas alcohólicas.

Desde el punto de vista biotecnológico, el pulque es un ambiente en el que se desarrollan tres tipos de fermentación: la fermentación alcohólica que permite la producción de etanol; la fermentación ácida, la cual produce ácido láctico y ácido acético y la fermentación "viscosa", que produce polisacáridos. Estas características, aunadas a la presencia de microorganismos no reportados previamente y finalmente la presencia de compuestos de tipo prebiótico (sustancias que favorecen el crecimiento de microorganismos benéficos en el intestino), tales como la inulina presente en el aguamiel y durante las primeras etapas de la fermentación, han sido motivo suficiente, para que varios grupos de investigación se enfocaran de nueva cuenta en el estudio de la microbiología del pulque. Dentro de los resultados de estas investigaciones se han aislado especies de bacterias y levaduras que producen enzimas de interés industrial:

- La enzima **dextransacarasa**, producida por *Leuconostoc mesenteroides*, es responsable de la producción de dextrana (biopolímero) a partir de sacarosa, la cual tiene importantes aplicaciones en diversos campos de la industria. De una muestra de pulque fue aislada la cepa *Leuconostoc mesenteroides* PQ-IBT, en la que se identificó una dextransacarasa con características cinéticas similares a las que presenta la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL-B512F, empleada industrialmente para la producción de dextrana (Chellapandian *et al.*, 1998).
- La enzima **inulinasa**, producida por una especie de la levadura *Kluyveromyces sp.*, es utilizada para degradar inulina (Cruz-Guerrero *et al.*, 2006).

Escalante *et al.*, 2004; 2008, describieron la diversidad bacteriana del pulque, utilizando el análisis de secuencias de ADNr 16S amplificadas a partir de los correspondientes metagenomas; este estudio reveló la presencia de nuevas especies no detectadas previamente en el pulque (**Tabla 2**):

Tabla 2. Microorganismos detectados en el pulque utilizando técnicas dependientes y no dependientes de cultivo.

Grupo Microbiano	Microorganismo detectado/aislado	Se reporta previamente
α -Proteobacteria- Rhodospirillales	<i>Acetobacterium malorum</i> <i>A. orientales</i> <i>A. pomorium</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>	Np Np
α -Proteobacteria- Sphingomonadales	<i>Zymomonas mobilis</i> <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>pomaceae</i>	
β -Proteobacteria	<i>Hafnia alvei</i>	Np
γ -Proteobacteria- Enterobacteriales	<i>Citrobacter</i> spp. <i>Enterobacter</i> spp. <i>E. agglomerans</i> <i>Erwinia rhapontici</i> <i>Kluyvera ascorbata</i> <i>K. cochleae</i> <i>Providencia</i> spp. <i>Serratia grimensii</i>	
γ -Proteobacteria- Pseudomonadales	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	
γ -Proteobacteria- Xhantomonadales	<i>Sterotrophomonas</i> spp.	
Flavobacterias	<i>Chryseobacterium</i> spp.	
Bacillus-Lactobacillus- Streptococcus	<i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Lactobacillus</i> spp. AC07 <i>Lactobacillus</i> spp. ASF360 <i>Lactobacillus</i> spp. Y10 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	

2.3 Justificación.

Actualmente el pulque es considerado como un ambiente particularmente interesante y naturalmente enriquecido; ya que en el desarrollo del proceso fermentativo que determina sus características sensoriales finales intervienen tres tipos de fermentación de interés biotecnológico: fermentación alcohólica que produce etanol; fermentación ácida que produce ácido láctico y ácido acético y la fermentación “viscosa”, que produce polisacáridos (EPS). Durante estos procesos, los diferentes microorganismos involucrados en la fermentación del pulque, utilizan como fuente de carbono una gran cantidad de azúcares presentes en el aguamiel (sustrato); debido a su naturaleza química integrada por: sacarosa, fructosa, glucosa y fructo-oligosacáridos. La capacidad de emplear a estos azúcares por medio de la utilización de sistemas transportadores específicos, hace posible considerar a este ambiente como una fuente muy importante de genes que codifiquen a estos sistemas.

El uso de la aproximación metagenómica nos permitirá detectar, aislar y caracterizar a estos genes, los cuales cuentan con el potencial de ser incorporados a diferentes líneas de nuestro grupo de investigación del Departamento de Ingeniería celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología (IBT), UNAM en el contexto de ingeniería de vías metabólicas enfocadas a la obtención de diferentes cepas bacterianas para la producción de metabolitos aromáticos y productos de fermentación a partir de diversos sustratos de origen agroindustrial utilizados como fuente de carbono.

3. HIPÓTESIS

El análisis del banco metagenómico de una muestra de pulque permitirá la detección y aislamiento de genes involucrados en el transporte de glucosa por complementación de una cepa de *Escherichia coli* con una capacidad limitada de consumo de glucosa.

4. OBJETIVOS

Objetivo general.

1. Construcción de un banco metagenómico a partir de pulque y su análisis enfocado a la búsqueda de genes bacterianos de interés biotecnológico.

Objetivos particulares.

1. Construcción y caracterización de un banco metagenómico de una muestra de pulque.

2. Búsqueda de genes involucrados en el transporte de glucosa por complementación funcional de una cepa de *Escherichia coli* (Glc⁻).

3. Secuenciación de insertos metagenómicos de clonas que complementaron a una cepa de *Escherichia coli* (Glc⁻).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas y plásmido

En la **Tabla 3**, se muestran las características relevantes de las cepas y del plásmido, que se emplearon para realizar este trabajo.

- I. ***Escherichia coli* TOP10**: Cepa altamente eficiente para clonar ADN plásmidico relajado. Tiene resistencia a estreptomicina.
- II. ***Escherichia coli* PB11**: Cepa mutante que se generó a partir de una cepa *Escherichia coli* de tipo silvestre (JM101); tiene una delección en los genes que codifican para el sistema PTS de transporte de glucosa (Δ -*ptsH-ptsI-crr*); por lo que tiene una capacidad muy limitada para crecer utilizando glucosa como fuente de carbono. Además, esta cepa tiene resistencia a Kanamicina.
- III. **Vector de clonación *pJET1.2/blunt* (2, 974 bp)**: Utilizamos este vector por las ventajas que ofrece el proveedor, algunas de las cuales son:

La clonación es un proceso rápido y eficiente. La ligación es de solo 5 minutos y el rendimiento mayor al 99% de clonas positivas. Es adecuado para la clonación de fragmentos finales de ADN rasurados o adhesivos; también es eficiente en la clonación de productos PCR generados con *Pfu* ADN polimerasa, *Taq* ADN polimerasa o ADN polimerasas termoestables, entre otros. Es económico (**FIGURA. 5**).

Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmido utilizados en este trabajo.

Cepa / Plásmido	Características	Referencia
<i>E. coli</i> TOP10	F-mrcA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Invitrogen
<i>E. coli</i> PB11	JM101 PTS ⁻ , Glc ⁻	Flores <i>et al.</i> , 1996
pJET1.2 / blunt	rep (pMB1) <i>bla</i> (Ap ^R) <i>eco471R</i> P _{lacUV5} T7 promoter	Fermentas

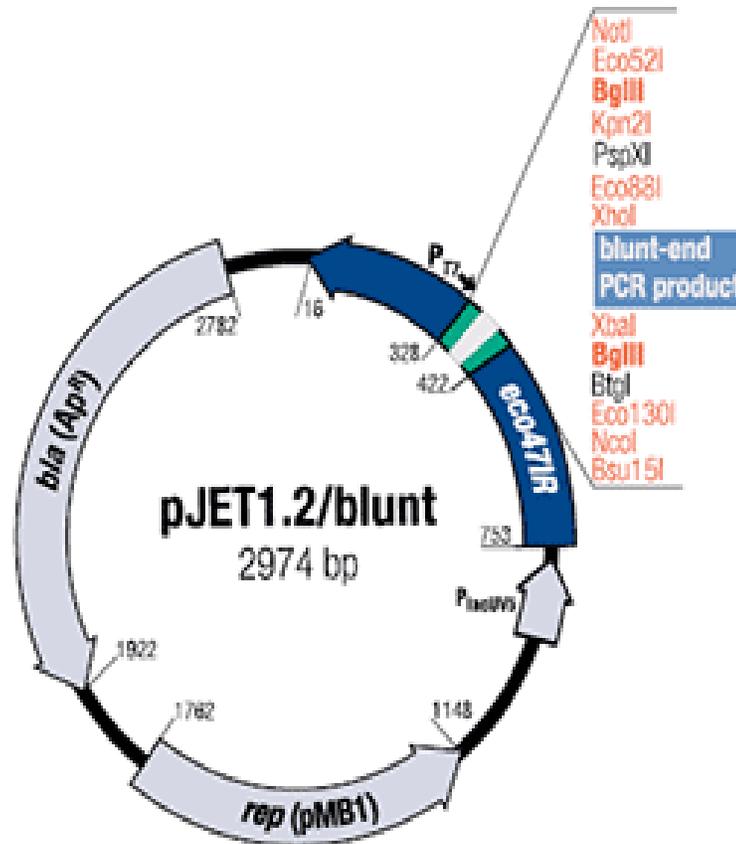


Figura 5. Mapa del vector de clonación pJET1.2 / blunt (Extremos Romos)

5.2 Colecta de muestras de pulque.

Las muestras de aguamiel y pulque para este estudio fueron obtenidas del municipio de Huitzilac; ubicado en el Estado de Morelos, México (se localiza en el ángulo nor-occidental del Estado, 19° 00'00" y 19°07'20" de latitud norte y entre 99°10'20" y 99°20'00" de longitud oeste). Tiene una altitud de 2550 m en una región montañosa con un clima frío. Las muestras colectadas se transportaron al laboratorio en recipientes estériles de plástico.

5.3 Extracción del ADN metagenómico del pulque

Para la extracción del ADN, se mezcló el aguamiel y el pulque en una proporción de 1:1, y se utilizó 1 litro de la mezcla aguamiel - pulque maduro. La muestra se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C en una centrífuga refrigerada de mesa (Eppendorf) para sedimentar las células y fue sometida a un proceso de extracción de ADN directo por el método de fenol-cloroformo (Rondon *et al.*, 2000). Para verificar la calidad e integridad del ADN metagenómico extraído se analizaron 4 µl de cada uno de los tubos en los que se recuperó el ADN por electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 1%.

5.4 Construcción del banco metagenómico

Como primer paso se realizaron digestiones parciales al ADN metagenómico, utilizando a la enzima de restricción *Sma*I (New England BioLabs) la cual genera fragmentos flanqueados por extremos rasurados, compatibles con el vector para realizar una clonación rápida. La mezcla de reacción utilizada se muestra en la **Tabla 4**.

Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 45 min y 90 min. Al término de la incubación la reacción se inactivó 20 minutos a 65°C.

Las reacciones se purificaron agregando un volumen de la mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico en una proporción (24:1), se recuperó la fase acuosa, para posteriormente precipitarlas con acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y 2.5 volumen de etanol frío (etanol absoluto en hielo seco). Finalmente la reacción se lavó con etanol al 70%, se secó por evaporación (Savat) y se resuspendió en 50 µl de agua MQ estéril. Las digestiones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1%. A partir del gel se determinó el tamaño promedio de los fragmentos de digestión y su concentración por densitometría, utilizando un fotodocumentador EagleEye™ II, Stratagene y espectrofotométricamente; obteniéndose una concentración final del ADN de 47.8 ng/µl y 39.5 ng/µl, para la digestión realizada durante 45 y 90 minutos, respectivamente.

Tabla 4. Condiciones de digestión parcial de ADN metagenómico del pulque.

Reactivos	Volumen
ADN metagenómico de PQ ₈	80 µl
Buffer 4 BioLabs (10X)	10 µl
Enzima <i>Sma</i> I (BioLabs)	10 µl
Volumen final	100 µl

Para construir el banco metagenómico se probaron dos condiciones, esto con el fin de averiguar cuál de las dos resultaba la ideal para capturar la mayor cantidad ADN y por lo tanto generar mayor número de colonias. Como resultado del análisis de las digestiones por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se determinó que la digestión de 45 minutos produjo fragmentos en un rango de entre 0.9 Kb y 2 Kb. Para la digestión de 90 minutos el rango de los fragmentos generados fue de 4 Kb y 8 Kb. Se eligió este último rango; debido a que de esta manera aumentamos las probabilidades de clonar genes completos e inclusive operones.

La reacción de ligación del ADN metagenómico y el pJET1.2 se realizó como lo indica la **Tabla 5** (recomendadas por el proveedor), utilizando una proporción inserto-vector de 3:1, con una incubación a 22°C durante 30 minutos.

Tabla 5. Mezcla de la reacción de ligación del ADN metagenómico del pulque y el vector de clonación pJET1.2/blunt.

Mezcla de ligación	Digestión de 45 min.	Digestión de 90 min.
ADN digerido (inserto)	10.6 µl (47.8 ng/µl)	13 µl (39.5 ng/µl)
Buffer de reacción (5X)	4 µl	4 µl
pJET1.2 (vector)	1 µl (50 ng/µl)	1 µl (50 ng/µl)
Ligasa T4 (5 U/µl)	1 µl	1 µl
Agua libre de nucleasas	3.4 µl	1 µl
Volumen final	20 µl	20 µl

Las ligaciones se purificaron por columna utilizando Pure Link™ PCR Purification Kit de Invitrogen; se concentraron por evaporación (Savat) y se resuspendieron en 20 µl de agua MQ estéril. Una alícuota de 2.5 µl de la reacción de ligación se utilizó para transformar un tubo de células electrocompetentes de la cepa *E. coli* TOP10 por electroporación empleando un electroporador BioRad Gene Pulser a 2500 V; estas células se recuperaron agregándoles 250 µl de medio SOC sin glucosa a cada tubo e incubando a 37°C durante 1 hora a 300 rpm. Al término de la incubación se sembraron 25 µl de células transformadas en placas de agar LB-Ap¹⁰⁰ (Ampicilina a 100 µg/mL) y se incubaron a 37°C por 12 horas.

Las colonias resultantes se picaron en placas de LB-Ap¹⁰⁰ y se evaluaron para determinar la presencia de insertos por digestión de los plásmidos extraídos por lisis alcalina (ver sección 5.5); (c) **Obtención de ADN plasmídico**, ir al apéndice).

Finalmente, los 17.5 µl de la reacción de ligación restantes, se utilizaron para realizar 7 transformaciones más con la respectiva recuperación de células, bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

El total de células recuperadas de estas 7 transformaciones y el volumen restante de la primera transformación (párrafo anterior), se utilizaron para inocular un matraz Erlenmeyer con 250 mL de medio líquido LB-Ap¹⁰⁰ incubándose a 37°C por 12 horas. De este matraz se prepararon mezclas de 1 mL del cultivo con 1 mL de glicerol al 50% (glicerol) en viales de 2 mL de capacidad con tapa rosca (criotubos), se congelaron en hielo seco y se mantuvieron a -70°C con la finalidad de mantener una reserva del banco metagenómico: **pJET1.2/MP** (plásmido/Metagenoma del pulque).

El resto del cultivo se utilizó para realizar una extracción masiva de plásmido con el inserto metagenómico, utilizando una Maxiprep de plásmidos por lisis alcalina (ver apéndice en la sección d).

5.5 Análisis y caracterización del banco metagenómico

De las colonias plaqueadas en LB-Ap¹⁰⁰ se seleccionaron 12 al azar para hacer la extracción del plásmido y verificar la presencia y el tamaño de los insertos; por digestión con la enzima *Bgl*II (Stratagene), bajo las condiciones que se muestran en la **Tabla 6**. Estas reacciones se incubaron durante 2 horas a 37°C, sin inactivar por calor y posteriormente se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño promedio del inserto de cada una de las clonas recuperadas se calculó sumando los insertos de cada una de las colonias.

Tabla 6. Mezcla de reacción de digestión del pJET1.2/MP clona 1-12.

Reactivos	Volumen
Buffer 3 BioLabs (10X)	2 µl para tenerlo a 1X
Agua estéril	11 µl
pJET1.2/MQ clona 1-12	5 µl
Enzima <i>Bgl</i> I Stratagene	2 µl
Volumen final	20 µl

5.6 Búsqueda de genes involucrados en el transporte de glucosa por medio de la complementación funcional de *E.coli* PB11 con el pool metagenómico: pJET1.2/MP

5.6.1 Transformación de la cepa *E.coli* PB11 (PTS⁻, Glc⁻)

Se purificó una alícuota de 100 µl de la Maxiprep de plásmidos pJET1.2/MP, utilizando Pure Link™ PCR Purification Kit de Invitrogen. Al calcular la concentración de ADN del pool metagenómico por densitometría en gel de agarosa al 1%, se obtuvo una concentración final de ADN de 33.22 ng/µl. Se transformaron 100 ng del banco metagenómico en células electrocompetentes de *E.coli* PB11 por electroporación como se describió anteriormente. Se plaquearon 60 µl de células transformadas en cajas de agar MacConkey-Ap¹⁰⁰ suplementado con 1% de glucosa (**ver apéndice**) y se estrió por agotamiento 60 µl de *E.coli* PB11 sin transformar (*control negativo*) en placa de agar MacConkey suplementado con glucosa al 1% y se incubaron a 37°C durante toda 12 horas (**condiciones aerobias**).

5.6.2 Selección de clonas positivas

Una vez que se realizó el ensayo en condiciones aerobias y no se observaron resultados satisfactorios para nuestros fines (a partir de la creación de nuestro banco metagenómico del pulque, emplearlo para complementar inactivaciones de genes del sistema de transporte de carbohidratos PTS:glucosa en la cepa *E. coli* PB11 PTS⁻, Glc⁻ y de esta manera incrementar su baja capacidad para crecer utilizando glucosa como fuente de carbono (cuestión que se discutirá más adelante), por lo tanto; decidimos establecer en el ensayo en condiciones de anaerobiosis. Para esta sección del trabajo se realizó el mismo procedimiento antes mencionado, solo que la caja control y las cajas con las células transformadas se colocaron en la jarra de anaerobiosis, empleando los sobres BD BBL™ Gas Pak™ Plus, Anaerobic System, Envelopes with Palladium Catalyst; para generar la atmósfera de anaerobiosis. El fundamento de este sistema se basa en:

1. La generación de H₂ y CO₂ por medio de una reacción química cuyos sustratos se encuentran separados en un sobre al cual se le agrega agua, para desencadenar dicha reacción.
2. La combinación del H₂ y el O₂ del aire para formar agua generan la anaerobiosis, esta reacción se cataliza empleando granallas de Zinc recubiertas de Paladio, las cuales se encuentran depositadas en la canastilla dentro de la jarra. Una tira de papel impregnada con Azul de metileno (azul en presencia de O₂, incoloro en ausencia) introducida en la jarra es el indicador de anaerobiosis.

La jarra de anaerobiosis se incubó a 37°C durante 48 horas. Para asegurarnos de la efectividad del ensayo y eliminar los posibles falsos positivos, se transfirieron todas las colonias aisladas (rojas con halo turbio) por picadura, bajo las mismas condiciones de anaerobiosis establecidas para el ensayo.

5.6.3 Tipificación de clonas

- i. **Extracción de plásmidos:** De las colonias aisladas (rojas con halo turbio) en el paso anterior; se seleccionaron 10 al azar, las que tuvieran mayor tamaño y se sembraron por estría (por duplicado), en placas de agar MacConkey-Ap¹⁰⁰ suplementado con 1% de glucosa, las incubamos a 37°C por 48 horas en jarra de anaerobiosis; para posteriormente realizar una extracción de plásmidos por miniprep alcalina.

- ii. **Digestión de clonas únicas:** A partir de la extracción de plásmido de las 10 colonias recuperadas; verificamos la presencia y tamaño de los insertos con digestiones, utilizando a la enzima *Bgl*II de Fermentas, como se muestra en la **Tabla 7**. Estas reacciones se incubaron 2 horas a 37°C, y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño del inserto se calculó sumando el tamaño de las bandas observadas. El análisis de los perfiles de restricción permitió identificar posibles clonas duplicadas.

Tabla 7. Mezcla de reacción de digestión de *E.coli* PB11 transformada con el pool metagenómico: pJET1.2/MP; clonas Glu1, Glu2 y Glu3.

Reactivos	Volumen
Buffer 0 Fermentas (10X)	2 µl para tenerlo a 1X
Agua estéril	17 µl
<i>E.coli</i> PB11(pJET1.2/MP-clonas Glu 1-3)	0.5 µl
Enzima <i>Bgl</i> II Fermentas	0.5 µl
Volumen final	20 µl

5.7 Secuenciación de clonas únicas

De las 10 colonias seleccionadas inicialmente y después del análisis de restricción se seleccionaron las clonas Glu1, Glu2 y Glu3, las cuales se secuenciaron por medio de la estrategia de ADN **Primer Walking**. Este es un método de secuenciación, muy común y efectivo para secuenciar fragmentos de ADN clonado entre 4-10 Kb. Tales fragmentos son muy largos para ser resueltos en una sola reacción de secuencia (dideoxiterminación).

Este método (**FIGURA. 6**) se basa en secuenciar fragmentos de una secuencia de gran tamaño de ADN a partir de un primer (P_1) en una posición de referencia conocida; por ejemplo, los extremos del vector. Una vez que se obtiene la secuencia a partir de (P_1), se diseña un segundo primer (P_2) tomando como referencia la última sección de esta secuencia. Al realizar esto a partir de cada uno de los extremos de la secuencia desde el vector (primer's Fw y Rv) sucesivamente hasta completar la secuencia del inserto.

El método de secuenciación utilizado (dideoxiterminación), resuelve de 700 a 900 bases. Es importante señalar que ambos extremos de la secuencia presentan una región de ambigüedad, por lo que para el diseño del P_2 Fw y P_2 Rv se debe de considerar este problema técnico. También, es relevante mencionar que para el diseño de los primer's P_2 se debe de considerar una región de al menos -100 bases en la que se une el nuevo primer al templado, las bases que se pierden durante el arranque de la reacción y unas 20 bases con ambigüedad, de tal forma que de no considerar esta región, se tendría la posibilidad de perder una región de referencia para ensamblar la nueva secuencia resultante.

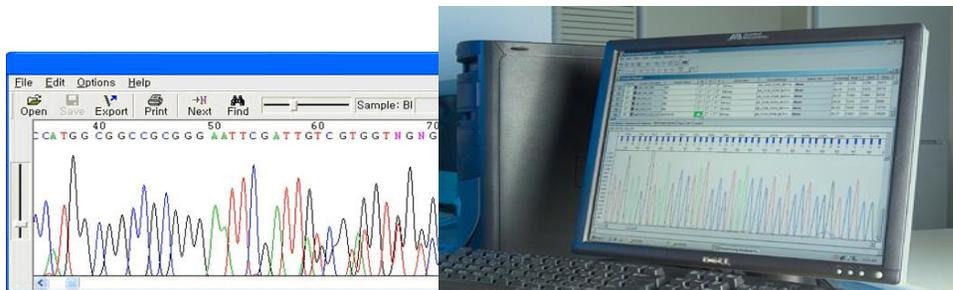
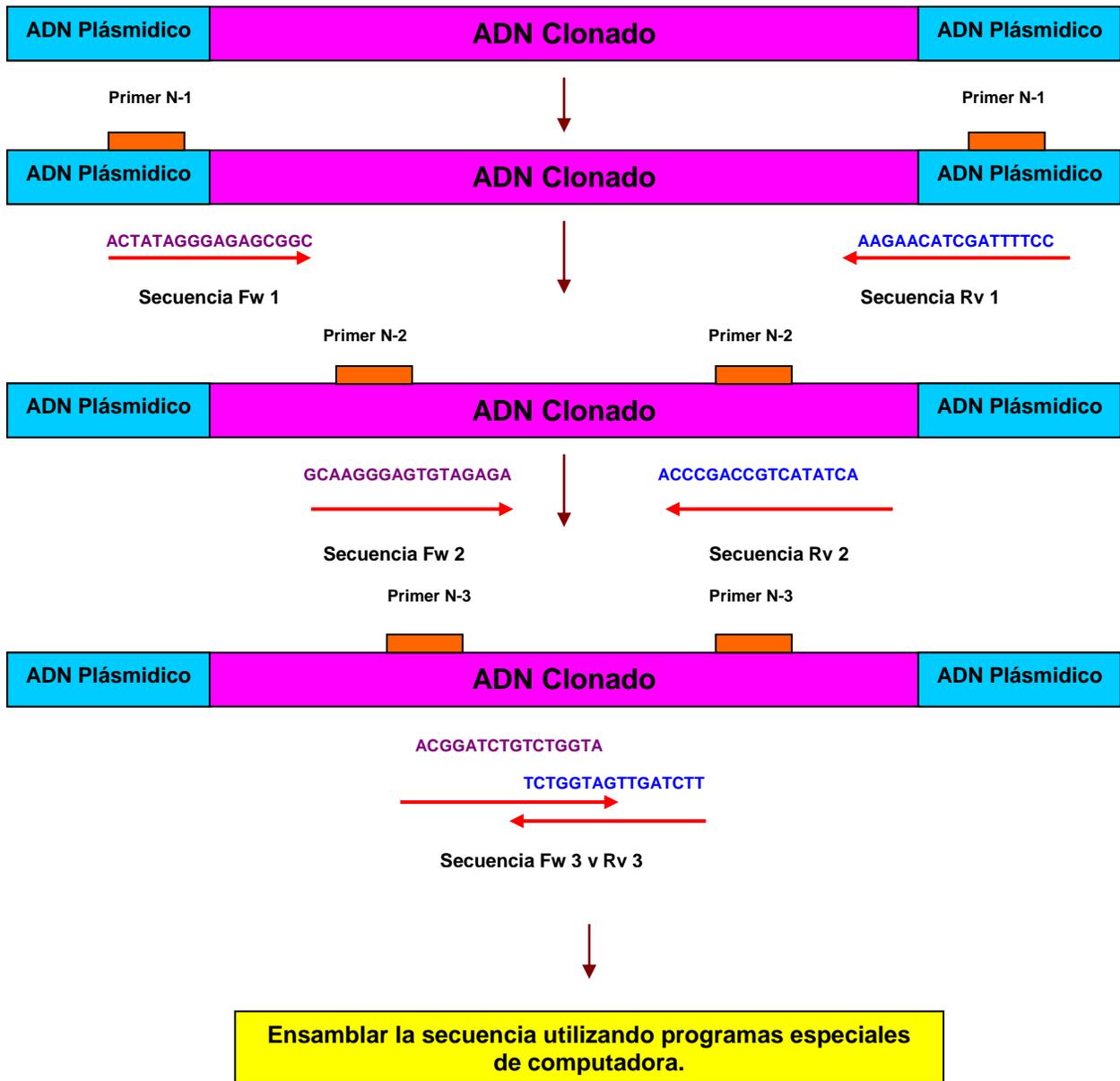


Figura 6. Estrategia Primer Walking de secuenciación para insertos inespecíficos.

5.8 Análisis de secuencias

Para identificar a los posibles genes codificados en los insertos metagenómicos secuenciados, se realizaron varios análisis utilizando las herramientas bioinformáticas incluidas en el programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>; versión actual 7. 0.9):

- I. Verificación de la calidad de la secuencia;
- II. Obtención de secuencias reversas complementarias (para casos requeridos);
- III. Alineamiento de secuencias parciales para identificar regiones complementarias y ensamblado de secuencias.

Una vez ensamblada la secuencia se realizó un análisis en el programa BLAST (Nucleotide Blast, Blastx, Blastn) comparando la secuencia obtenida en la base de datos no redundante del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para conocer la identidad de las secuencias obtenidas en las clonas del banco metagenómico del pulque.

5.9 Determinación del efecto fisiológico del inserto metagenómico sobre el crecimiento de la cepa *E.coli* PB11.

El banco metagenómico del pulque que construimos en este proyecto lo utilizamos para transformar a la cepa *Escherichia coli* PB11 (PTS⁻ Glc⁻), con el fin de incrementar su baja capacidad para crecer empleando glucosa como fuente de carbono; debido a la deleción que tiene en los genes que codifican para el sistema de transporte de carbohidratos PTS; como resultado de la complementación de posibles genes involucrados en el transporte de glucosa presentes en el banco.

Se seleccionaron 4 clonas positivas y se evaluó su capacidad de crecer en glucosa 10 g/L en medio mineral mínimo M9; en sistemas de fermentación bajo condiciones anaerobias (sistema de Mini-fermentadores o Fleakers); comparado con la cepa *E. coli* PB11.

5.9.1 Medios de cultivo

Para los cultivos realizados en mini-fermentadores se utilizó el medio mineral mínimo M9 (Maniatis *et al.*, 1982), suplementado con 1% de glucosa como única fuente de carbono, adicionado con Km⁴⁰ (40 µg/mL) o Ap¹⁰⁰ (100 µg/mL) para la cepa *E.coli* PB11 o las clonas *E.coli* PB11 Glu1-3 y Sac6. La composición del medio se presenta en el **apéndice II**.

5.9.2 Pre-inóculos e Inóculos para cultivos

A partir de células congeladas en glicerol (50%) de *E.coli* PB11 y clonas *E.coli* PB11 Glu1-3 y Sac6; se realizó un pre-inóculo en 20 mL de medio líquido LB-Km⁴⁰ (40 µg/mL) y LB-Ap¹⁰⁰ (100 µg/mL) respectivamente; incubándose a 37°C por 12 horas a 300 rpm. La composición del medio puede consultarse en el **apéndice II**.

Posteriormente, de cada uno de los pre-inóculos tomamos 5 mL y se adicionaron a los matraces que contenían el medio de cultivo para obtener el inóculo. El crecimiento de los inóculos se realizó en matraces Erlenmyer de 250 ml, conteniendo cada uno 45 mL de medio mineral mínimo M9-Km⁴⁰ y M9-Km⁴⁰-Ap¹⁰⁰; completando así un volumen de 50 mL por cada matraz, adicionalmente agregamos 0.5 mL de casaminoácidos al 20% a cada uno de los matraces. Estos matraces fueron incubados inmediatamente a 37°C durante 24 horas a 300 rpm. Durante este periodo de tiempo, se tomó una muestra de 1 mL cada hora las últimas 4 horas, para determinar el crecimiento celular (D.O. 600 nm); hasta obtener una de aproximadamente 1.5.

Finalmente, todos los cultivos fueron inoculados con la cantidad suficiente de inóculo para obtener una D.O. $_{600\text{ nm}}$ inicial de 0.1, las células fueron transferidas a cada cultivo resuspendiéndolas en el medio respectivo (la variación de la concentración inicial celular en todos los cultivos se debe al error experimental). Para calcular la concentración celular requerida en este trabajo, medimos la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman (DU-70).

5.9.3 Condiciones de cultivo

Los cultivos anaerobios los realizamos en sistemas de mini-fermentadores (Fleakers), con un volumen de trabajo de 200 mL. La temperatura de cultivo se mantuvo a 37°C y sin control de pH, con una agitación de 100 rpm. Cada fermentación se realizó por duplicado. Una vez inoculados los fermentadores se tomó una muestra de 1 mL para medir el crecimiento por análisis de D. O. $_{600\text{ nm}}$ en un espectrofotómetro Beckman (DU-70) cada hora las primeras 8 horas, posteriormente cada 4 horas, hasta cubrir 25 horas de análisis.

El sistema de mini-fermentadores o Fleakers consta de (**FIGURA. 7**):

- 1) 6 Fleakers o Mini-fermentadores con un volumen nominal de 250 mL y un volumen de trabajo de 200 mL, cuyo sistema de agitación interno consiste en un agitador magnético en forma de cruz de 1 pulgada.
- 2) Un control de temperatura, el cual está integrado por un baño de agua, un sensor de temperatura y un termo-circulador de agua.
- 3) Un control de pH, el cual está integrado por 1 electrodo, 1 controlador y 1 válvula (solenoide) para la adición de la base por fermentador. El sistema completo consta de hasta 6 mini-fermentadores operando simultáneamente.
- 4) Un sistema de agitación o parrilla magnética en la base (con un rango de 100-850 rpm).



Figura 7. Sistema de Mini-fermentadores o Fleakers

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción del ADN metagenómico del pulque

Para la extracción del ADN metagenómico del pulque se utilizó el método de lisis directa. Sobre este método pudimos determinar que presenta cierta desventaja (en comparación contra el método de extracción por kit); ya que se necesita extraer el ADN partiendo de una gran cantidad de muestra, para obtener una concentración y volumen aceptable; debido a que por cada paso se va disminuyendo considerablemente la concentración. También, existen reportes en los que los mayores rendimientos de ADN, los presentan los métodos de extracción directa; pero en la actualidad se han optimizado con el empleo de kits comerciales; lamentablemente en este trabajo no podemos comparar resultados de ambos métodos, debido a que no utilizamos la extracción por kit.

El ADN metagenómico del pulque extraído por el método de fenol-cloroformo a partir de 1 L de la mezcla aguamiel-pulque (1:1). Se extrajo en gran volumen, con la finalidad de obtener un stock para su posterior empleo. Se trabajaron 4 extracciones de 250 µl cada una y en la etapa final de cada extracción se deshidrató el pellet resultante, el cual se re-suspendió en 3 mL de agua. Sin embargo, se observó una fracción viscosa que fue difícil de disolver (tubos identificados como 5-8), mientras que la fracción no viscosa se re-suspendió más fácilmente (tubos identificados como 1-4). El análisis de 4 µl de cada uno de los ocho tubos por electroforesis en gel de agarosa (Sigma) al 1%; permitió observar que la fracción viscosa de los tubos (5, 6, 7 y 8) está conformada por DNA cromosomal de buena calidad, tomando como criterio la baja o nula degradación de las muestras en comparación con la integridad del ADN observado en las muestras 1-4, **(FIGURA. 8)**.

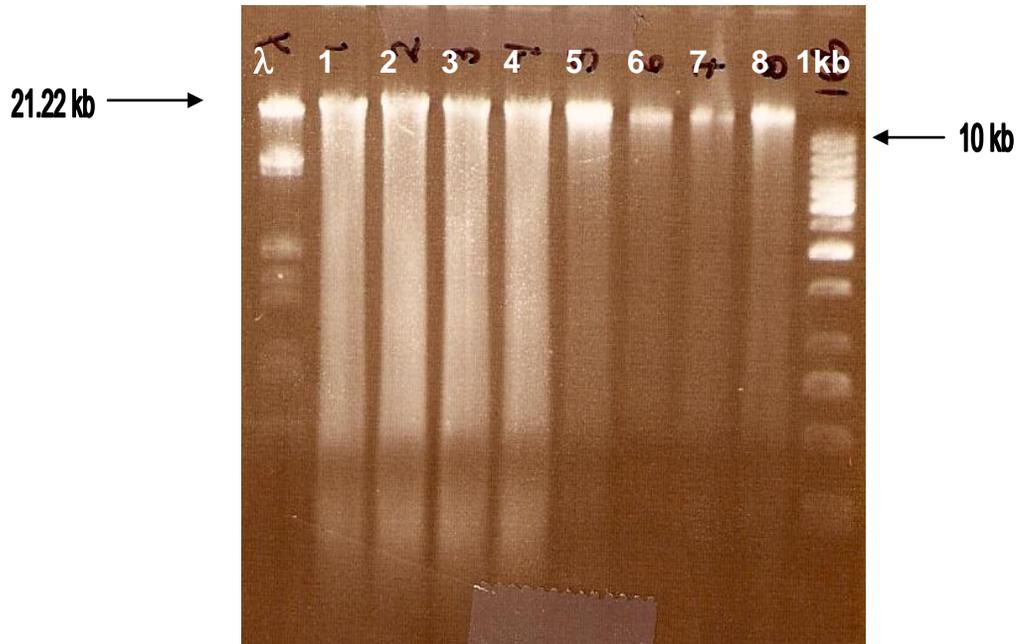


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de metagenoma del pulque extraído por el método de fenol-cloroformo.

6.2 Construcción del banco metagenómico

6.2.1 Digestión enzimática parcial del ADN metagenómico y ligación en el vector pJET1.2 / blunt.

La finalidad de realizar una digestión parcial al ADN metagenómico, fue para lograr un rango de fragmentos entre 5 kb y 10 kb; ya que al elegir este tamaño incrementaríamos la probabilidad de clonar genes completos e incluso pequeños operones. Para lograrlo,

elegimos a la enzima *Sma*I, debido a que produce extremos rasurados (blunt) y porque al incubar las reacciones a 37°C su actividad es del 50% de la que tendría a temperatura ambiente durante 45 y 90 minutos.

El análisis de las digestiones parciales con esta enzima por electroforesis en geles de agarosa al 1% (**FIGURA. 9**), permitió observar que la digestión de 90 minutos generó fragmentos en el rango esperado. La digestión de 45 minutos generó fragmentos de tamaño pequeño, por lo que se seleccionó la primera condición para preparar el ADN a utilizar en la clonación al vector pJET1.2 / blunt.

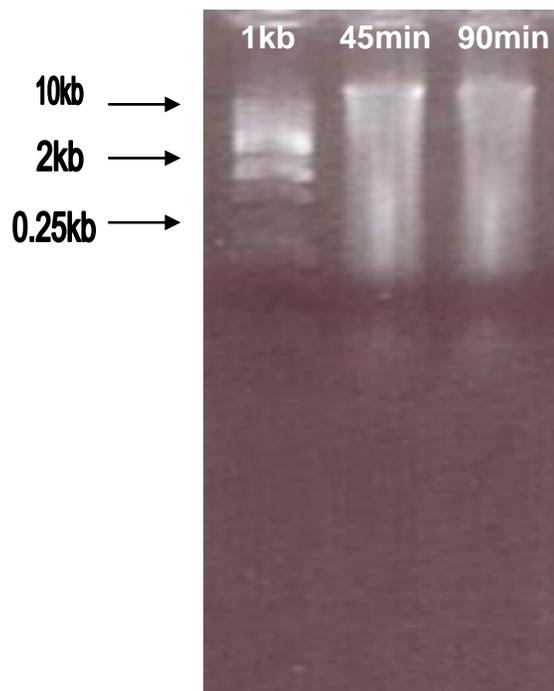


Figura 9. Electroforesis de la digestión parcial del ADN metagenómico del pulque con la enzima *Sma*I.

Para la construcción de nuestro banco metagenómico, se ligaron 505.05 ng con un tamaño entre 5-10 kb de ADN inserto digerido en el vector pJET1.2 / blunt. La transformación de toda la ligación (2.5 µl) en *E. coli* TOP10 permitió obtener 23,424 Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

6.2.2 Análisis y Caracterización de banco metagenómico

De acuerdo al número de colonias obtenidas como resultado de la transformación de una reacción de ligación, se realizaron los siguientes cálculos para calcular el tamaño del banco metagenómico:

- 1.- Por 2.5 µl de reacción de ligación que transformamos; obtuvimos 2,928 UFC.
- 2.- El volumen final de la reacción de ligación fue de 20 µl y preparamos 8 reacciones de ligación de 2.5 µl cada una.
- 3.- Por 20 µl de reacción de ligación obtuvimos 23,424 UFC totales, considerando un tamaño mínimo promedio de inserto de 5 kb, se tiene entonces un total estimado de 23,424 UFC (totales), lo que equivale a 117,120 kb o expresado en términos de un genoma promedio (*E. coli*, 4500 kb), se tiene 23,424 genomas equivalentes de *E.coli* o expresado en Gb = 0.11 totales.

En la **Tabla 8**, se muestra una comparación del tamaño del banco metagenómico del pulque obtenido en este trabajo con otros bancos metagenómicos obtenidos a partir de diferentes muestras y construidos en plásmidos.

Tabla 8. Tamaño de bancos metagenómicos empleando plásmido como vector.

Ambiente	Número de clonas (UFC)	Tamaño promedio inserto (kb)	ADN total en el banco (Gb)
Prado, campo de remolacha azucarera, valle de río.	Aprox. 1,500,000	5-8	7.8
Loess alcalino (Suelo)	100,000	8-12	1.0
Prado, campo de remolacha azucarera, tierras de cultivo	583,000; 360,000; 324,000	4.4; 3.8; 3.5	4.05
Silt loam (Suelo)	200,000; 58,000; 250,000; 650,000	4.1, 2.7; 3.5, 3.5	4.2
Superficie cubierta de musgo (Suelo)	30,000	3.5	0.11
Campo agrícola	80,000	5.2	0.42
Suelo forestal (cerca del IBT)	87,552	5	0.43
Pulque (Huitzilac, Mor.)	23,424	5	0.11

(Daniel; 2005)

Como resultado de la primera transformación hecha con 2.5 μ l, se obtuvieron varias colonias de las cuales se seleccionaron 12 al azar para verificar la presencia del inserto por digestión con la enzima *Bgl*II. El análisis por electroforesis en gel de agarosa de estas digestiones se muestra en la **FIGURA. 10**. Se pueden observar que el tamaño de los insertos es bajo con relación a lo que se esperaba (tamaño promedio de 5 kb), sin embargo es posible que durante la reacción de ligación se hayan ligado preferencialmente fragmentos pequeños, por lo que la probabilidad de haber capturado genes o incluso pequeños operones disminuye, debido a que el tamaño de los insertos es pequeño.



Figura 10. Digestiones de 12 clonas seleccionadas al azar para determinar el tamaño promedio de los insertos metagenómicos clonados.

6.3 Búsqueda de genes involucrados en el transporte de glucosa por medio de la complementación funcional de *Escherichia coli* PB11 con el *pool* metagenómico: pJET1.2/MP.

6.3.1 Transformación de la cepa *Escherichia coli* PB11 (PTS⁻, Glc⁻)

La glucosa, junto con el indicador de pH rojo neutro, sirven para comprobar la fermentación de dicho azúcar, con lo anterior nosotros esperamos observar colonias glucosa-positivas (rojas con halo turbio); debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares. La transformación de esta cepa con el *pool* metagenómico del pulque, su selección en placas de agar base MacConkey suplementadas con glucosa y su selección bajo condiciones aerobias permitió detectar:

Solo el crecimiento de colonias blancas e incoloras, lo que indicó que bajo estas condiciones no utilizaron a la glucosa como fuente de carbono; pero si crecieron gracias a los hidrolizados que contiene el medio de cultivo (peptona de caseína y peptona de carne). Las peptonas, además de representar su fuente de nitrógeno, también pueden ser utilizadas como fuente de carbono. En el control negativo de este experimento, *E. coli* PB11 sin transformar: solo crecieron colonias blancas.

Considerando que *Escherichia coli* es una bacteria anaerobia facultativa y que el ensayo para degradar a la glucosa en condiciones aerobias no permitió seleccionar posibles sistemas de transporte codificados en los insertos metagenómicos, se decidió realizar el ensayo bajo condiciones de anaerobiosis, utilizando la misma metodología pero incubando en una jarra de anaerobiosis.

6.3.2 Selección de clonas positivas capaces de completar el crecimiento en glucosa de la cepa de *E. coli* PB11.

Las colonias que crecieron bajo las condiciones de anaerobiosis, fueron rojas con halo turbio; **FIGURA. 11**, lo que indica la capacidad de esta cepa de fermentar la glucosa como resultado del restablecimiento de la capacidad de transportar glucosa.

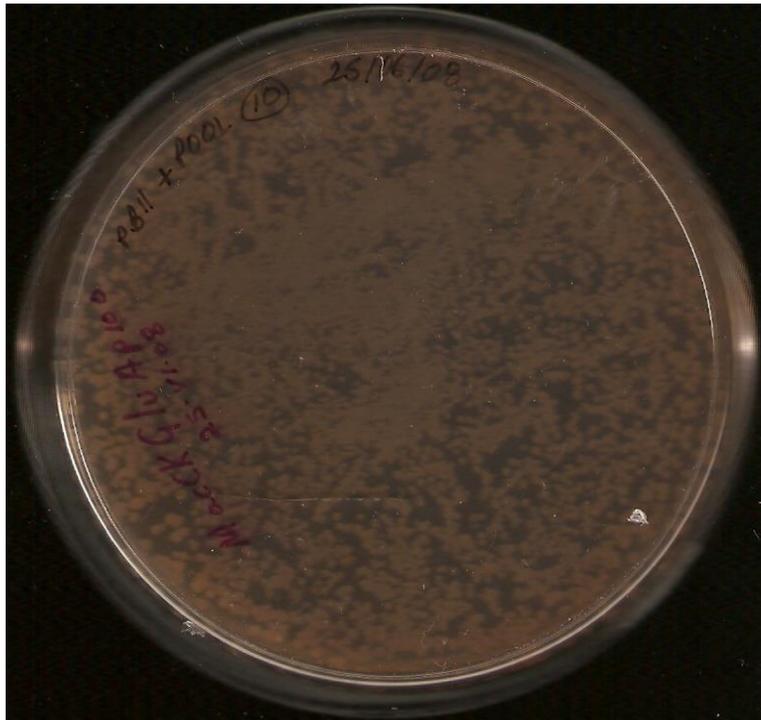


Figura 11. Crecimiento en agar MacConkey-Ap100 suplementado con 1% de glucosa. Se observa el crecimiento de *E. coli* PB11 transformada con el pool metagenómico (pJET1.2/MP), presentando un fenotipo Glc+.

De las colonias resultantes se picaron 250 colonias rojas con halo turbio a placas de agar MacConkey-Ap¹⁰⁰ suplementado con 1% de glucosa y se incubaron bajo condiciones de anaerobiosis. Se observó que todas las colonias conservaron el fenotipo rojo.

6.3.3 Tipificación de clonas positivas

Se seleccionaron al azar 20 colonias a las cuales se les realizó una extracción de plásmidos por lisis alcalina: clonas Glu1, Glu2, Glu3, Sac2, Sac5, Sac6, Sac7 y Sac10 (metagenoma del pulque clonas 1-8). El análisis de restricción con la enzima *Bgl*II y su análisis por electroforesis en gel de agarosa (**FIGURA. 12**), permitió identificar la presencia de patrones únicos de restricción.

Este resultado sugiere que como resultado de la complementación de la cepa de *E. coli* PB11 con el banco metagenómico del pulque se seleccionaron diferentes genes que restauraron la capacidad de transportar glucosa. Con base en estos resultados se decidió secuenciar los insertos de las clonas Glu1, Glu2 y Glu3.

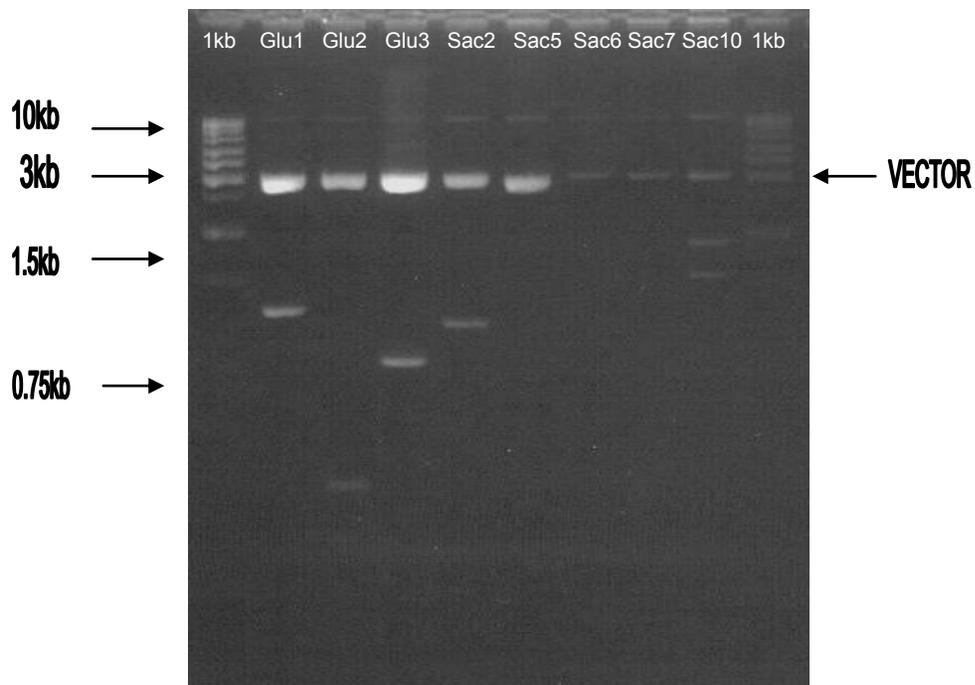


Figura 12. Análisis de restricción del pJET1.2/MP de 8 clonas que recuperaron su capacidad de crecer en glucosa.

6.4 Secuenciación de clonas metagenómicas únicas.

Como ya mencionamos anteriormente, de acuerdo al tamaño promedio estimado de los insertos metagenómicos seleccionados; la estrategia más adecuada para su secuenciación fue el método ADN primer walking.

El paso inicial, fue secuenciar los extremos 5' y 3' de cada inserto metagenómico clonado, empleando las secuencias de los primers que incluye el kit de clonación pJET1.2/blunt; estos primer's corresponden a 23 bases forward y 24 bases reverse del sitio de clonación. Una vez que obtuvimos las secuencias, diseñamos los siguientes primers basándonos en la primera secuencia obtenida; de tal forma que de este modo se "caminó" sobre el inserto metagenómico. Este procedimiento se repitió varias veces más; analizando simultáneamente los resultados en el programa BioEdit para determinar si las secuencias obtenidas se complementan y de esta manera completar la secuencia total. Esta estrategia de secuenciación es muy parecida a lo que hacemos cuando armamos un rompecabezas, ya que la secuencia previa te da la pista, para obtener el siguiente fragmento.

Mediante esta estrategia se secuenciaron completamente las clonas Glu1, Glu2 y Glu3.

6.5 Análisis de secuencias

La secuenciación completa de los insertos de las clonas Glu1, Glu2 y Glu3, fueron analizadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) para posteriormente hacer un **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)**, secuencia de la proteína con la que nuestras secuencias problema mantenían la mayor identidad.

Decidimos emplear **BLAST** para realizar nuestro análisis, debido a que es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas; es capaz de comparar una secuencia problema (*query*) contra una gran cantidad de secuencias que se localizan en una base de datos.

El algoritmo del programa encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema. Un punto importante, es que BLAST emplea un algoritmo heurístico por lo que no puede garantizar que ha encontrado la solución correcta.

Sin embargo, este programa es capaz de calcular la significación de sus resultados, por lo que nos provee de un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen. Usualmente esta herramienta es utilizada para encontrar probables genes homólogos, inferir parálogos y ortólogos.

Generalmente, cuando una nueva secuencia es obtenida, como es nuestro caso; se usa el BLAST para compararla con otras secuencias que han sido previamente caracterizadas, para así poder inferir su función. El BLAST es la herramienta más utilizada para la anotación y predicción funcional de genes o secuencias proteicas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/producttable.shtml#blastx>).

Programas de la familia BLAST, empleados en el análisis de las secuencias obtenidas en este proyecto:

Blastn: Es de los más comúnmente usados. Compara una secuencia de nucleótidos contra una base de datos que contenga también secuencias nucleotídicas.

Mega BLAST: Usa un algoritmo ambicioso para la búsqueda por alineamiento de secuencias de nucleótidos. Este programa está optimizado para alinear secuencias que divergen ligeramente como resultado de posibles errores de secuencia u otros similares. Al usar un ancho de palabra mayor llega a ser hasta 10 veces más rápido y puede trabajar con secuencias de ADN mucho más largas que el programa blastn con el algoritmo tradicional.

BlastX: Este programa usa como entrada una secuencia de nucleótidos. Traduce la secuencia en sus seis posibles marcos de lectura (tres marcos de lecturas por hebra) y compara estas secuencias traducidas contra una base de datos de proteínas.

Esta opción se utiliza para encontrar productos potenciales de la traducción de una secuencia de nucleótidos desconocida. También, se usa cuando se tiene sospecha de que la secuencia de entrada codifica para una proteína pero no se sabe exactamente cuál es su producto.

Al usar el BLAST debemos tener en cuenta las siguientes consideraciones:

Este programa NO garantiza que las secuencias que alinea sean homólogas y mucho menos que tengan la misma función (en el caso que sean proteínas), simplemente provee posibles candidatos.

La puntuación del BLAST depende del largo de la secuencia, una secuencia muy corta tendrá una puntuación menor que una grande simplemente por la cantidad de caracteres que tiene. Así que siempre se debe interpretar la puntuación con respecto al largo de la secuencia.

El e-valor (da la probabilidad de que la similitud entre la secuencia problema y la encontrada en la base de datos se deba al azar) depende del tamaño de la base de datos. Para bases de datos muy pequeñas, e-valores altos son más significativos que para bases de datos muy grandes. Para la base de datos no redundante (NR) de NCBI por lo general e-valores de 0.01 o menos son considerados como significativos, pero esto puede depender de la secuencia que se esté analizando.

Se debe tener cuidado con los errores de anotación; es común que alguna secuencia que se anotó mal (ya sea porque se hizo automática o por error humano) sea utilizada como referencia para anotar otras secuencias similares, por lo que los errores de anotación se pueden propagar rápidamente. Siempre debemos especificar que la función de nuestra secuencia es posible o probable si fue asignada usando identidad con otras secuencias. Asimismo debemos tener en cuenta que la gran mayoría de las funciones asignadas en la actualidad son putativas y que pueden no ser una buena referencia para una asignación funcional.

De acuerdo a los criterios antes mencionados de este programa, se encontró la posible proteína con la que nuestras secuencias problema mantienen la mayor similitud. Finalmente reportamos solo las identidades mayores al 70%:

1) Para la clona Glu1 con 1,264 pb; empleando en primer lugar el **Blastn** y **MegaBLAST**: Se identificó una secuencia ITS1 (Internal Transcribed Spacer, regiones espaciadoras transcritas dentro de la unidad de repetición en tándem del ADN ribosomal) de *Acetobacter pasteurianus* cepa L5 con 76% y 77% de identidad respectivamente con número de acceso [\[AMO48876.1\]](#).

Posteriormente utilizando **BlastX**: Se identificó una proteína putativa (retrotransposón sin clasificar) de *Oryza sativa* con un 82% de similitud, número de acceso [gb|ABF94836.1](#).

2) Para el caso de la clona Glu2 con 529 pb, utilizamos **Blastn, MegaBLAST y BlastX**: Para los tres casos esta clona fue identificada como una timidilato cinasa de *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4 con 98% de identidad y número de acceso [ref|YP_162825.1](#).

3) Por último para la clona Glu3 con 971 pb; el análisis solo se realizó en **Blastn y BlastX**: Para ambos casos la clona fue identificada como FOF1 ATP sintasa subunidad A de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5 con 82% de similitud y número de acceso [ref|YP_001601436.1](#).

Por lo tanto, es importante mencionar que el tamaño de los insertos completos de las clonas secuenciadas y analizadas en este trabajo, es mucho menor al estimado (por debajo de la mitad); por lo que al emplear la base de datos del NCBI y aplicar las variaciones que nos ofrece la herramienta bioinformática BLAST; se observa que solo se logró hacer la captura de un solo gen por cada clona analizada (**FIGURA. 13**). Debido a esto; la elección del vector de clonación juega un papel determinante en la construcción del banco metagenómico; de igual manera que la estrategia empleada para la extracción y purificación del ADN metagenómico; ya que de esto dependen la integridad y la concentración del material genético con el que se inicie el estudio.

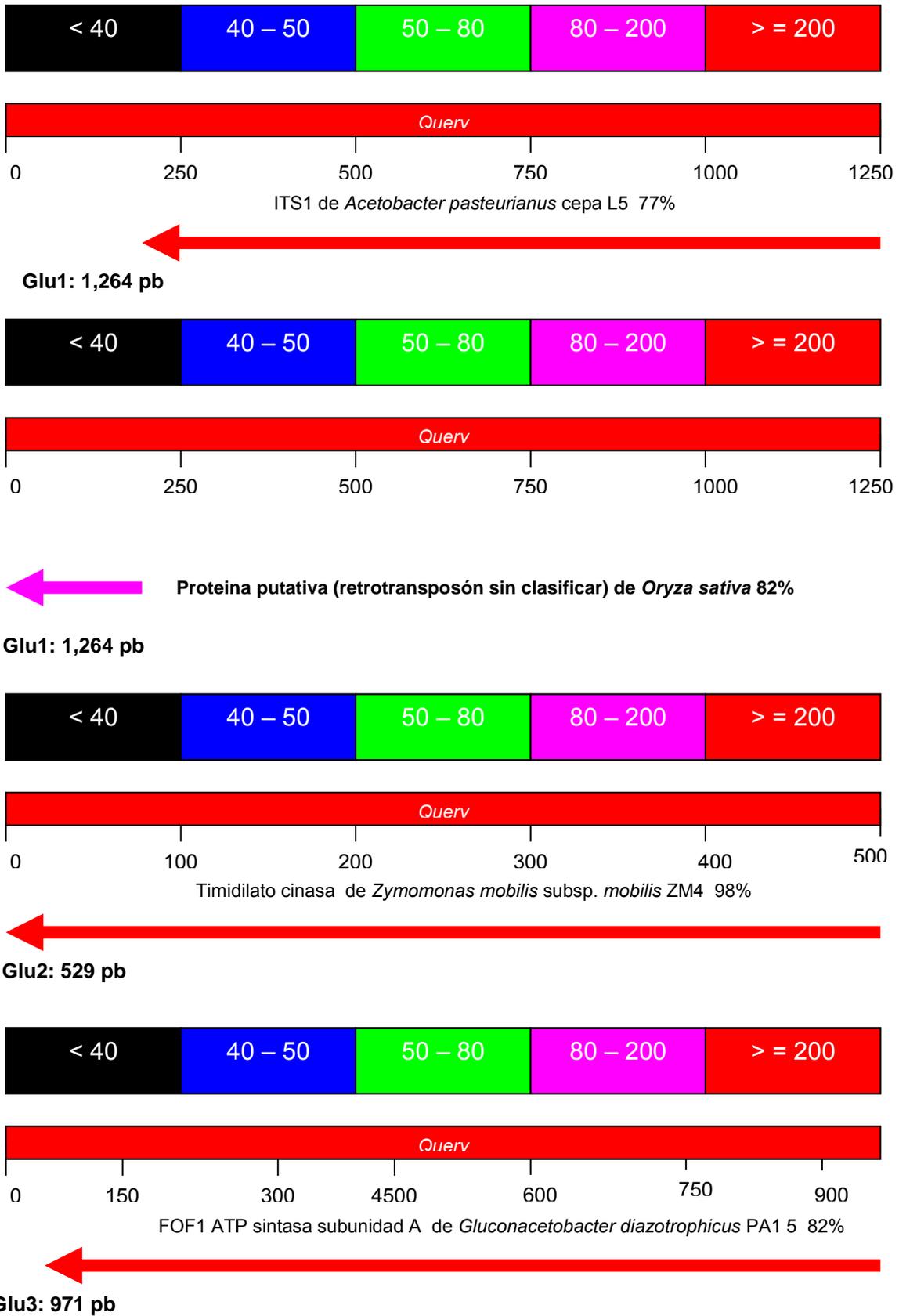


Figura 13. Mapa de las secuencias de las 3 clonas metagenómicas analizadas.

6.6 Determinación del efecto fisiológico del inserto metagenómico sobre el crecimiento de la cepa *E.coli* PB11.

La **FIGURA. 14**, muestra las cinéticas de crecimiento de la cepa PB11 y 4 clonas metagenómicas. La clona Sac6 que posee únicamente el vector no crece bajo estas condiciones, sugiriendo que la cepa PB11 no tolera la carga metabólica generada por el plásmido pJET1.2/blunt, bajo las condiciones de cultivo empleadas en el ensayo (evaluamos su capacidad de crecer en glucosa 10 g/L en medio mineral mínimo M9; en sistemas de fermentación bajo condiciones anaerobias o sistema de Mini-fermentadores; inoculando los Fleakers con 200 mL de medio; temperatura de 37°C; pH de 7 y velocidad de agitación de 100 rpm).

La presencia del inserto metagenómico en las clonas Glu1, Glu2 y Glu3 revierte este efecto y permite el crecimiento de estas clonas al mismo nivel que la cepa PB11 sin plásmido. Este resultado indica que los genes presentes en los insertos metagenómicos son capaces de restablecer el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* PB11.

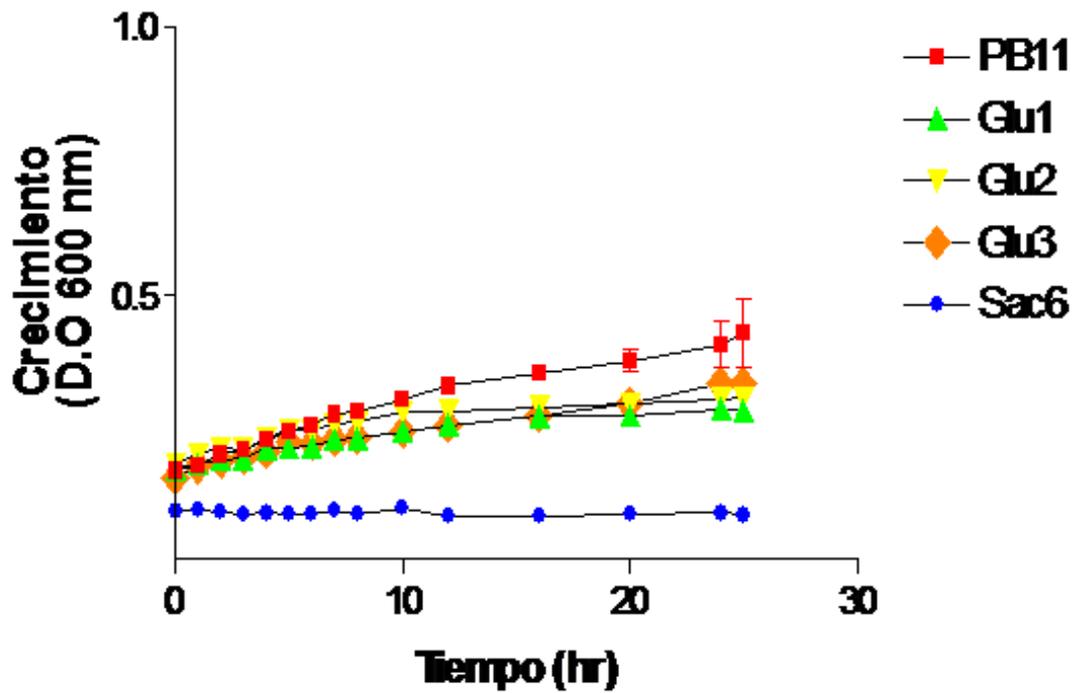


Figura 14. Crecimiento de *E. coli* PB11 (PTS-, Glc-) y clonas metagenómicas. *E. coli* PB11 ■ y transformada con las clonas metagenómicas Glu1 ▲, Glu2 ▼ y Glu3 ◆ . La clona Sac6 ● posee el vector pJET1.2/blunt sin inserto (control negativo).

7. CONCLUSIONES

- I. El banco metagenómico del pulque construido posee un tamaño equivalente a 23,424 genomas de *Escherichia coli* (0.11 Gb). De acuerdo a lo reportado en la literatura, este banco se puede considerar comparable a otros bancos reportados previamente en los que se utilizan plásmidos como vectores de clonación.
- II. El uso del banco metagenómico del pulque permitió aislar varios genes que restituyen el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* PB11 (PTS⁻, Glc⁻) en medio mínimo M9 con glucosa bajo condiciones anaerobias.
- III. La secuenciación de las 3 clonas metagenómicas permitió identificar a la región ITS1 (Internal Transcribed Spacer) de *Acetobacter pasteurianus*, cepa L5; además de una proteína putativa (retrotransposón sin clasificar) de *Oryza sativa* para la clona Glu1; una timidilato cinasa de *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4 en la clona Glu2 y finalmente una FOF1 ATP sintasa subunidad A de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5 en la clona Glu3.
- IV. Este trabajo muestra el potencial del uso de bancos metagenómicos en la búsqueda de genes que codifican funciones metabólicas de interés en cepas hospederas con fenotipos específicos.

8. PERSPECTIVAS

- ❖ Continuar con la caracterización de la clona Glu3, sobre el efecto específico que puede tener la subunidad A FOF1 de la ATP sintasa de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PA1 5 codificada en este inserto metagenómico.
- ❖ Explotar aún más este banco metagenómico del pulque, empleando cepas hospederas de *Escherichia coli* con fenotipos específicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Berry, A., Cjicchini, C., Selby, T., Sosio, M. and E. Wellington. 2003. Isolation of high molecular weight DNA from soil for cloning into BAC vectors. *FEMS Microbiology Letters*. **223**: 15-20.
2. Bolívar, F. 2004. Ingeniería genética: Las herramientas moleculares y los métodos para aislar, caracterizar y manipular el DNA. *In: Fundamentos y Casos Exitosos de la Biotecnología Moderna*. Bolívar, F. (Ed). El Colegio Nacional, México : 57-84.
3. Borneman, J., Skroch, P., O'Sullivan, K., Palus, J., Rumjanek, N., Jansen, J., Nienhuis, J. and E. Triplett. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 1935-1943.
4. Brennan, Y., Callen, W., Chistoffersen, L., Dupree, L., Goubet, F., Healey, S., Hernández, M., Keller, M., Li, K., Palackal, N., Sittenfeld, A., Tamayo, G., Wells, S., Hazlewood, G., Nathur, E., Short, J., Robertson, D., Steer, D. 2004. Unusual microbial xylanases from insect guts. *Applied and Environmental Microbiology*. **70**: 3609-3617.
5. Chellapandian, M., C. Larios, M. Sanchez-Gonzalez, and A. Lopez-Munguia. 1998. Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque', a traditional Aztec alcoholic beverage. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **21**: 51-56.
6. Corcuera de Mancera, S. 1997. El fraile, el indio y el pulque. 2da reimpression. Fondo de Cultura Económica, México, D.F. Pág.20.

7. Courtois, S., Frostegard, A., Goransson, P., Depret, G., Jeannin, P. And P. Simonet. 2001. Quantification of bacterial subgroups in soil: comparison of DNA extracted directly from soil or from cell as previously released by density gradient centrifugation. *Environmental Microbiology*. **3**: 431-439.
8. Courtois, S., Capelliano, C., Ball, M., Francou, F., Normand, P., ck, G., Martínez, A., Kolvek, S., Hopke, J., Osburne, M., August, P., Nalin, R., Guérneau, M., Jeannin, P., Simonet, P. and J. Pernodet. 2003. Recombinante environmental libraries provide access to microbial diversity for drugs discovery from natural products. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 49-55.
9. Cruz-Guerrero, A., Olvera, J., García-Garibay, M., y Gómez-Ruiz, L. 2006. Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces sp.* isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **22**: 115-117.
10. Daniel, R. 2005. The metagenomics of soil. *Nature*. **3**: 470-478.
11. Escalante, A., Wachter, C., Farrés, A. 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*. **64**: 21-31.
12. Escalante, A., Rodríguez, M.E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., Gosset, G. 2004. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a tradicional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*. **235**: 273-279.
13. Escalante-Lozada, A., Gosset-Lagarda, G., Martínez-Jiménez, A., y Bolívar-Zapata, F. 2004. Diversidad Bacteriana del Suelo: Métodos de Estudio no dependientes del Cultivo Microbiano e Implicaciones Biotecnológicas. *Agrociencia*. **38**: 583-592.

14. Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M.S., López-Munguía, A., Gosset, G. and F. Bolívar. 2008. Análisis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*. **124**: 126-134.
15. Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolívar, F., Valle, F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*. **14**: 620-623.
16. Frostegard, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Jeannin, P., Nesme, X. And P. Simonet. 1999. Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 5409-5420
17. García-Garibay y López-Munguía. 1993. Bebidas alcohólicas no destiladas. En: García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R. y López-Munguía, A. (Eds) *Biología Alimentaria*. Ed. Limusa, México, D. F. Pp: 301-306.
18. Gillespie, D., Brady, S., Bettermann, A., Cianciotto, N., Liles, M., Rondon, M., Clardy, J., Goodman, R. and J. Handelsman. 2002. Isolation of turbomycin A and B from metagenomic library soil microbial DNA. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**:4301-4306.
19. Godoy, P. A. 1987. Recopilación bibliográfica sobre los aspectos: histórico, etnobiológico, microbiológico y químico de bebidas alcohólicas no destiladas, indígenas de México. Tesis Licenciatura (Biología) UNAM, D.F. México.
20. Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **68**: 669-685.

21. Handelsman, J., Liles, M., Mann, D., Riesenfeld, C. and R. M. Goodman. 2002. Cloning the metagenome: culture- independent access to the diversity and functions of the uncultivable microbial world. *In: Methods in microbiology*, vol. 33. Functional Genomics. Wren, B. and Dorrel, N. (eds). Academic Press. Amsterdam, The Netherlands. Pp 241-255.
22. Holben, W. E., Jansso, J. K., Chelm, B. K. and J. Tiedje. 1998. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 703-711.
23. Keller, M. and K. Zengler. 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Reviews*. **2**:141-150.
24. Krsek, M. and E. Wellington. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods*. **39**: 1-16.
25. Lappe, P. y Ulloa, M. 1993. Microbiología del pulque. En: Wachter, C. y Lappe, P. (Eds.) *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp: 75-79.
26. Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F. and J. Erick. 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Current Opinion in Microbiology*. **13**: 572-577.
27. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring N. Y.: Cold spring Harbor Laboratory Press. Pp: 68-69.
28. McDougald, D., Rice, S., Weichart, D. and S. Kjellberg. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 1-9.

29. Rondon, M., Goodman, M. and J. Handelsman. 1999. The earth's bounty: assessing and accessing the soil microbial diversity. *Trends in Biotechnology*. 17:403-409.
30. Rondon, M., Augist, P., Bettermann, A., Brady, S., Grossman, T., Loiacono, K., Lynch, B., MacNeil, I., Minor, C., Lai Tiong, C., Gilman, M., Osburne, M., Clardy, J., Handelsman, J. and R. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**:2541-2547.
31. Schloss, P. D., y Handelsman J. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*. **14**:303-310.
32. Tiedje, J., M. and J. L. Stein. 1999. Microbial diversity: strategies for its recovery. *In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. A. L. Demain and J. E. Davies (eds). ASM Press. Washington, D. C. USA. Pp: 682-692.
33. Torsvik, V. and L. Øvreas. 2002. Microbial diversity function in soil: from genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. **5**:240-245.
34. Torsvik, V., Øvreas, L. and T. F. Thigstad. 2002. Prokaryotic diversity- Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*. **296**: 1064- 1066.
35. Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H. and H. O. Smith. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*. **304**:66-74.

36. Voget, S., Leggewie, C., Uesbeck, A., Raasch, C., Jaeger, K. H. and W. R. Streit. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**:6235-6242.
37. Watts, J. E. M., Huddleston- Anderson, A. S. and E. M. H. Wellington. 1999. Bioprospecting. *In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. A. L. Demain and J. E. Davies (eds). ASM Press. Washington, D. C. USA. Pp:631-641.
38. Zengler, K., Toledo, G., Rappé, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M. and M. Sëller. 2002. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **99**: 15681-15686.
39. Zhou, J., Bruns, M. and J. Tiedje. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*. **62**: 316-322.
40. www.ncbi.nlm.nih.gov
41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/producttable.shtml#blastx>
43. www.fermentas.com/reviewer
44. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
45. <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/morelos/Municipios/17009a.htm>
46. www.britanialab.com/productos/302_hoja_tecnica_es.pdf

APÉNDICE I

METODOLOGÍAS

a) EXTRACCIÓN PREPARATIVA DE ADN GENÓMICO BACTERIANO

1. Crecer un cultivo bacteriano de 100 mL a saturación.

Centrifugar las células 10 minutos a 4000 x *g*.

2. Resuspender las células en 9.5 mL de TSE.

Solución I (Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M, pH 8.0, Sacarosa 8%).

Agregar 0.5 mL de SDS 10 % y la punta de una espátula de lisozima, mezclar por inversión, e incubar por 1 hora a 37°C.

3. Adicionar 1.8 mL de NaCl 5 M y mezclar a fondo.

Adicionar 1.5 mL de CTAB/NaCl, mezclar e incubar 20 minutos a 65°C.

4. Agregar 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico, al extracto y centrifugar 10 minutos a 6000 x *g* a temperatura ambiente (TA).

Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo con la ayuda de una pipeta.

5. Agregar 1 volumen de fenol/cloroformo/isoamílico, extraer la fase acuosa y centrifugar 10 minutos a 6000 x *g* a TA.

Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo con pipeta.

6. Agregar 0.6 volumen de isopropanol y mezclar por inversión suavemente hasta que el ADN precipite.

Transferir el precipitado con una pipeta Pasteur sellada a un tubo con 1 mL de etanol al 70% y lavarlo.

7. Centrifugar 5 minutos a 10 000 x *g* y descartar el sobrenadante.

Resuspender el pellet en 4 mL ml de buffer TE ó bien en H₂O estéril.

8. Medir la concentración de ADN con un espectrofotómetro y ajustar a 50-100 µg/ mL.

b) CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

Protocolo

- Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* empleando un medio de cultivo libre de sales.

A. Preparación de células competentes.

1. crecer en medio YENB un cultivo fresco de toda la noche.

YENB:

- Extracto de levadura 0.75%
- Caldo nutriente 0.8%

Esto es muy importante, ya que elimina todos los pasos requeridos para remover las sales. Se sabe que las sales reducen la eficiencia de la electrotransformación y causan areos en la cubeta de electroporación.

2. Inocular 1 litro de medio YENB fresco con 5-10 mL de un precultivo de toda la noche y crecer las células a 37°C con agitación. Las células deben de ser cosechadas a una absorbancia de 0.5-0.9 (DO_{600 nm}).

(Si las células están sobrecrecidas, diluir a una absorbancia de 0.2 (DO_{600 nm}) y recrecer a la densidad óptica deseada).

3. Para cosechar las células, enfriar el matraz en hielo por aproximadamente 5 minutos y centrifugar a 4000 x g por 10 minutos a 4°C. Es importante no centrifugar a un valor de g mayor: la aplicación de una fuerza mayor ejercida por un período más largo reduce la viabilidad del cultivo, esto reduce la eficiencia de electrotransformación.

4. Remover y descartar el medio. Ya que el medio no contiene sales agregadas, no es importante remover las trazas de medio, tal y como lo requieren los protocolos

originales. Lavar el pellet dos veces con 100 mL de agua fría y centrifugar como en el paso 3.

Remover y descartar el sobrenadante.

5. Resuspender en 20 mL de glicerol frío al 10%. Centrifugar como en el paso 3, remover y desechar el sobrenadante.

6. Resuspender las células (de 1 litro de cultivo) en un volumen final de 2-3 mL de glicerol frío al 10%. El número de células debe ser de $2-4 \times 10^{10}$ UFC/mL.

Estas células competentes pueden ser utilizadas frescas o congeladas para su futuro uso.

7. Para congelar las células competentes alicuotar en tubos de centrifuga (40 mL) y colocar los tubos en hielo seco hasta que se congelen. Almacenar a -70°C .

Calentar en hielo antes de usar.

Estas células competentes son buenas por 1-2 años.

B. Electrotransformación.

1. A una alícuota de 40 μl de células competentes, agregar 1-5 μl de ADN en buffer TE (10 Mm Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA).

Mezclar bien y mantener en hielo aproximadamente por 1 minuto.

2. Transferir la mezcla de células y ADN a una cubeta de electroporación (Bio Rad, Hercules, CA, USA) y electroporar en un Bio-Rad. Gene Pulser according to the manufacturer's instructions. Esto produce un pulso con un tiempo constante de 4-5 ms, consistente con el valor publicado.

3. Remover la cubeta de la cámara y agregar inmediatamente 1 mL de medio YENB en la cubeta. (Se puede emplear medio SOC: Triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl_2 10 mM, MgSO_4 10 mM y glucosa 20 mM).

Resuspender las células. Transferir la suspensión a un tubo de polipropileno (17 x 100 mm) e incubar con o sin agitación a 37°C por 1-3 horas.

4. Plaquear las células en medio selectivo (YENB con antibiótico) e incubar toda la noche a 37°C .

c) OBTENCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Minipreparaciones de ADN plasmídico (miniprep's) por lisis alcalina.

Para la obtención de ADN plasmídico en bajas cantidades (5-15 µg) se realizaron minipreparaciones de ADN por lisis alcalina a partir de 3 mL de medio de cultivo.

- 1) Crecer un cultivo hasta saturación. Centrifugar 1.5 mL del cultivo por 2 min. Eliminar el sobrenadante.
- 2) Resuspender el pellet en 150 µl de solución I fría y 5 µl de RNAasa.
- 3) Adicionar 350 µl de la solución II. Mezclar por inversión. Incubar 10 min en hielo.
- 4) Adicionar 250 µl de la solución III fría. Mezclar por inversión.
- 5) Incubar 30 min en hielo. Centrifugar 15 min a 10,000 rpm.
- 6) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, desechar el pellet.
- 7) Llenar el tubo con isopropanol a temperatura ambiente, mezclar por inversión.
- 8) Centrifugar 15 min a 10,000 rpm, decantar el sobrenadante.
- 9) Lavar con 1mL de etanol al 70%. Mezclar por inversión.
- 10) Centrifugar 10 minutos a 10,000 rpm, decantar el sobrenadante
- 11) Secar a 37°C. resuspender en 50 µl de buffer TE o agua miliQ estéril.
- 12) Guardar a -20°C.

Reactivos:

- Buffer TE (TRIS-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)
- SDS 10%
- RNAasa (5mg/mL)
- Solución I (Solución de recuperación): Tris-HCl 0.05 M, EDTA 0.05 M, pH 8.0, sacarosa 8%
- Solución II (Solución de lisis): SDS 1%, NaOH 0.2 M (1:1)
- Solución III (Solución de precipitación proteica): Acetato de sodio 3M, pH 5.2

d) MAXIPREP DE PLÁSMIDOS POR LISIS ALCALINA

1. Inocular 250 mL de LB con el antibiótico apropiado con un precultivo de la cepa con el plásmido a extraer. Incubar ON (toda la noche) a 37°C hasta saturación.
2. Centrifugar 10 minutos a 6000 x *g* a 4°C. Resuspender el pellet en 2.5 mL de la solución SET I y transferir a un tubo de centrifuga de alta velocidad (capacidad de unos 20 mL) y agregar 50 µl de RNAasa.
3. Agregar directamente al tubo un espatulazo de lisozima (25 mg/mL). Resuspender las células e incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La lisozima ayuda a lisar más rápido las células.
4. Adicionar 5 mL de NaOH 0.4N/ SDS 2% (1:1) solución recién preparada y mezclar suavemente con una pipeta hasta que la solución se torne homogénea, clara y viscosa. Incubar durante 10 minutos en hielo.
5. Agregar 3.75 mL de acetato de potasio (Solución III) y mezclar suavemente con una pipeta hasta reducir la viscosidad y se forme un precipitado. Incubar en hielo por 10 minutos.
6. Centrifugar 20 minutos a 12 000 rpm a 4°C. Decantar el sobrenadante en un tubo limpio. Filtrar con gasa si se observa material flotando.
7. Adicionar 0.6 volumen de isopropanol, mezclar por inversión e incubar de 5-10 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar 20 minutos a 15 000 x *g*, a temperatura ambiente.
9. Lavar el pellet con 2 mL de etanol al 70% y centrifugar levemente. Aspirar el etanol y secar el pellet al vacío.
- 9^a. Resuspender en 2 mL de agua o buffer TE.
10. El pellet puede ser guardado de forma indefinida a 4°C.

APÉNDICE II

MEDIOS DE CULTIVO

e) CALDO LURIA (LB)

Bacto-triptona	10.0 g
Bacto-extracto de levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g
H ₂ O	1000.0 mL

Disolver en agua caliente, ajustar pH a 7.4 con NaOH 1.0 M y esterilizar 20-25 minutos en autoclave a 121°C.

f) AGAR LURIA (LB) 2%

Caldo Luria	1000.0 mL
Bacto-agar	20.0 g

Disolver el bacto-agar en el caldo Luria antes de esterilizar en autoclave a 121°C por 20-25 minutos.

g) AGAR MacCONKEY

Agar selectivo para el aislamiento de Salmonellas, Shigellas y bacterias coliformes, a partir de heces, orina, alimentos, aguas residuales, etc. Según MacCONKEY (1905).

Fundamento

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de

sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El agar es el agente solidificante.

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

Composición (g/litro)

Peptona de caseína 17,0; peptona de carne 3,0; cloruro sódico 5,0; glucosa 10,0; mezcla de sales biliares 1,5; Rojo neutro 0,03; violeta cristal 0,001; Agar-agar 13,5.

Preparación y conservación

Art. Num. 1.05465. Agar MacCONKEY (500 g / 5 kg)

Utilizable hasta la fecha de caducidad cuando se almacena en lugar seco y perfectamente cerrado entre 15 y 25°C. Proteger de la luz. Una vez abierto, el contenido del frasco puede utilizarse hasta la fecha de caducidad siempre que se almacene en lugar seco y perfectamente cerrado entre 15 y 25°C.

Disolver 50 g/litro, esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C) y verter en placas.

pH: 7,1 +/- 0,2 a 25°C.

Los medios de cultivo preparados son claros y de color rojo parduzco a rojo oscuro.

Las colonias glucosa-negativas son incoloras y las glucosa-positivas son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares.

Aspecto de las colonias	Microorganismo
Grandes, rojas, halo turbio.	<i>Escherichia coli</i>

h) MEDIO MINERAL MÍNIMO M9

Contiene por litro de agua estéril c. b. p:

Sales M9 10x

Na ₂ HPO ₄	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	1 g

La solución deberá esterilizarse en autoclave a 121°C y dejarse a enfriar a 50-55°C antes de adicionar el resto de soluciones.

MgSO ₄ 1M	2 mL
CaCl ₂ 1M	0.1 mL
Glucosa 20%	50 mL
Vitamina B1 0.1%	100 µl

Cada una de las soluciones deberá esterilizarse por separado por filtración. La mezcla deberá hacerse en condiciones de esterilidad.

MEDIOS SELECTIVOS CON ANTIBIÓTICOS

Una vez esterilizados los medios líquidos o agares en autoclave a 121°C, dejar enfriar a 50-55°C antes de adicionar el antibiótico para evitar que sea inactivado por el calor.

KANAMICINA. Preparar una solución con 30 mg / mL de sulfato de kanamicina en agua. Esterilizar por filtración y guardar en alícuotas a -20°C. Adicionar al medio estéril enfriado a 50-55°C para tener una concentración final de 40 µg / mL.

AMPICILINA. Preparar una solución con 100 mg / mL de sal sódica de ampicilina en agua. Esterilizar por filtración y guardar en alícuotas a -20°C. Adicionar al medio estéril enfriado a 50-55°C para tener una concentración final de 100 µg / mL.

Nota: Las cajas o tubos con antibióticos deben mantenerse en refrigeración a 4°C hasta su uso (sólo 1-2 semanas) para evitar que se inactiven los antibióticos.