



TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO
DE LICENCIADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

**Construcción y análisis funcional de
bibliotecas multigenómicas generadas a
partir de aislamientos antárticos**

Autor

Bach. Diego M. Roldán

Orientadora

Dra. Vanesa Amarelle

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable
Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas

Montevideo, Uruguay

Diciembre, 2018

*“Si algo es lo
suficientemente
importante, incluso
si las
probabilidades
están en tu contra,
debes seguir
haciéndolo”*

Elon Musk

AGRADECIMIENTOS



gradezco a los integrantes del laboratorio y todas aquellas personas que me han ayudado y aconsejado durante mi pasantía, en especial a mi orientadora de tesis, una importante referente con la cual pude compartir mis incertidumbres y recibir consejo para poder seguir adelante.

Quiero agradecer especialmente a mis padres, Stella y Luis, por su apoyo durante todo este tiempo y brindarme las posibilidad de alcanzar mis metas, además de forjar mi carácter, ya sea desde un laboratorio o levantando una pala de mezcla, lo único verdaderamente imposible es rendirse.

En particular a mi compañera de vida, Micaela, por haber compartido todo este tiempo junto a mí, brindándome su apoyo incondicional y amor a pesar de mi locura, siendo el pilar que sin lugar a dudas me ha ayudado a llegar a donde estoy sin importar los obstáculos.

No olvidar a mi abuela del corazón y “alumna más chica”, Nélide, que supo apoyarme desde el principio brindándome la sabiduría, el cariño y la alegría de sus años.

A esos amigos que siempre estuvieron desde que tengo memoria, ya sea por esas aventuras vividas en largas caminatas con destinos insospechados con Federico, las noctámbulas conversaciones con Jessica cuando todos se dormían y yo seguía estudiando y el positivismo de Mariela que me presentó una nueva forma de visualizar las cosas y cumplir las metas. Sandra y Nelson, amigos y testigos silenciosos de los cambios por los que he pasado, con las cuales pude desarrollar una mente crítica y evolucionar mi persona al compartir desde mi adolescencia sus formas de ver el mundo.

A mis compañeros que han formado parte de esta travesía que ha sido la carrera, por tantas horas de estudio y exámenes rendidos, tanto café y fotocopias no han sido en vano.

¡Gracias!

TABLA DE CONTENIDOS

Agradecimientos.....	3
Índice de Figuras	7
Índice de Tablas.....	9
Abreviaturas utilizadas	10
Resumen	11
1. Introducción.....	14
1.1. Los desafíos de las bajas temperaturas y las adaptaciones de sus sobrevivientes	14
1.2. Bacterias endolíticas: “semillas de vida en tierras infértiles”	15
1.3. Metales: toxicidad & tolerancia	16
1.4. Pigmentos: su importancia en microorganismos antárticos.....	18
1.5. Metagenómica y multigenómica funcional: herramientas de bioprospección. 18	
1.5.1. Hospederos alternativos: el problema de la expresión heteróloga	20
1.5.2. Vectores híbridos: el nexo entre el ADN metagenómico/multigenómico y los distintos hospederos	22
2. Hipótesis & Objetivos	24
2.1. Hipótesis	24
2.2. Objetivo general.....	24
2.3. Objetivos específicos	24
3. Metodología.....	25
3.1. Construcción de un vector híbrido para la elaboración de genotecas.....	25
3.1.1. Minipreparación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina.....	25
3.1.2. Amplificación del pCG100ori	26
3.1.3. Clonado del pCG100ori en el vector pSEVA232.....	28
3.1.4. Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 α con el producto de ligación.....	29

3.1.5.	Verificación de la presencia del origen de replicación en la construcción pSEVA232::pCG100.....	31
3.2.	Hospederos alternativos: Selección y puesta a punto de protocolos.....	31
3.2.1.	Selección de hospederos	32
3.2.2.	Inducción de la competencia y transformación de <i>Arthrobacter</i>	33
3.2.3.	Conjugación.....	34
3.2.4.	Inducción de la competencia y transformación de <i>Pseudomonas</i>	35
3.3.	Construcción de la multigenoteca.....	35
3.3.1.	Extracción de ADN genómico de aislamientos endolíticos antárticos.....	35
3.3.2.	Puesta a punto de la digestión parcial del ADN multigenómico con Sau3AI y generación de la multigenoteca	37
3.3.3.	Generación de la multigenoteca en <i>E. coli</i> DH5 α	38
3.3.4.	Análisis funcional	39
3.3.5.	Verificación del fenotipo de tolerancia a metales	40
4.	Resultados.....	42
4.1.	Construcción de un vector híbrido para la elaboración de genotecas.....	42
4.2.	Hospederos alternativos: Selección y puesta a punto de protocolos.....	46
4.3.	Extracción de ADN genómico de aislamientos endolíticos antárticos	50
4.4.	Construcción de la multigenoteca.....	51
4.5.	Análisis funcional	52
5.	Discusión	56
5.1.	Vector híbrido y hospederos alternativos para multigenotecas	56
5.2.	Construcción de la multigenoteca y análisis funcional.....	58
6.	Conclusiones & Perspectivas.....	60
7.	Referencias Bibliográficas.....	62
Anexo	69
A.1.	Lisis alcalina	69
A.2.	Electroforesis en gel de agarosa	69

A.3. Medios de cultivo	70
A.4. Metales.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los hábitats de los microorganismos líticos... ..	15
Figura 2. Representación del cuello de botella en un análisis metagenómico... ..	19
Figura 3. Esquema de la construcción de una multigenoteca funcional.....	20
Figura 4. Esquema de la estructura modular de los plásmidos SEVA.	22
Figura 5. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de las minipreparaciones plasmídicas.....	42
Figura 6. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del origen de replicación pCG100 por PCR.....	43
Figura 7. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de la digestión del vector pSEVA232 y pCG100.....	43
Figura 8. Esquema del vector híbrido pSEVA232::pCG100.	44
Figura 9. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del origen de replicación pCG100 Kb por PCR de colonia.	45
Figura 10. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de minipreparaciones de ADN plasmídico y productos de PCR de colonia utilizando los cebadores para pCG100 en cepas de <i>Arthrobacter</i>	46
Figura 11. Curvas de crecimiento de <i>Arthrobacter</i> sp. II en medio de recuperación post-electroporación.	48
Figura 12. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de las extracciones de ADN genómico de los microorganismos endolíticos antárticos.	50
Figura 13. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de la optimización de la digestión parcial del ADN multigenómico con Sau3AI.	52

Figura 14. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de las construcciones presentes en clones de la biblioteca que presentaron tolerancia a metales, y su perfil de restricción..	54
Figura 15. Colonias tolerantes a Co^{+2}	55
Figura A.1. Marcadores de peso molecular.....	69
Figura A.2. Mapa del vector pSEVA232.....	71
Figura A.3. Comparación de las secuencias del inserto amplificado a partir de la ufc20 y el origen de replicación pCG100 del pART2... ..	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos y plásmidos utilizados para la construcción del vector híbrido.....	25
Tabla 2. Secuencias de nucleótidos y Tm de los cebadores diseñados.....	27
Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación.....	27
Tabla 4. Condiciones de ciclado para la amplificación del origen de replicación pCG100.....	27
Tabla 5. Reacción de digestión del producto de PCR.....	28
Tabla 6. Reacción de digestión del vector pSEVA232.....	29
Tabla 7. Reacción de ligación del producto de PCR al vector pSEVA232.....	29
Tabla 8. Microorganismos utilizados para la selección de hospederos alternativos.....	32
Tabla 9. Microorganismos utilizados para la extracción de ADN genómico.	36
Tabla 10. Reacción de digestión parcial del ADN multigenómico.	37
Tabla 11. Reacción de digestión del vector pSEVA232.	38
Tabla 12. Reacción de ligación del ADN multigenómico al vector pSEVA232.....	39
Tabla 13. Selección de hospederos alternativos, <i>Arthrobacter</i>	47
Tabla 14. Eficiencia del protocolo de transformación, <i>Pseudomonas</i>	49
Tabla 15. Concentración de los ADN genómicos obtenidos a partir de los aislamientos endolíticos antárticos... ..	51
Tabla 16. Tolerancia a metales, <i>Pseudomonas</i>	53
Tabla 17. Ensayo de tolerancia a metales de los 275 clones de la multigenoteca.	53

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNasas: Desoxirribonucleasas.

ADNdc: ADN doble cadena.

Ap: Ampicilina.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNasas: Ribonucleasas.

ATP: Adenosín trifosfato.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

Cm: Cloranfenicol.

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfato.

DO: Densidad óptica.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EtOH: Etanol.

G: Glicina.

Kb: Kilopares de bases.

Km: Kanamicina.

L: Lisozima.

LB: Luria-Bertani (Medio de cultivo).

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*.

Ori: Origen de replicación.

P: Penicilina.

pb: Pares de bases de nucleótidos.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH: Potencial de Hidrógeno.

R2A: Reasoner's 2A (Medio de cultivo).

SDS: Dodecilsulfato sódico.

TAE: Solución de equilibrio Tris, Acetato y EDTA.

Tm: Temperatura de desnaturalización

ufc: Unidades formadoras de colonias.

RESUMEN

Los microorganismos psicotolerantes pueden sobrevivir y reproducirse a bajas temperaturas superando los límites impuestos por ambientes permanentemente fríos. Una estrategia exitosa empleada por los mismos es colonizar el interior de las rocas, un hábitat que proporciona amortiguación térmica y estabilidad física. Mediante metagenómica descriptiva con foco en el metabolismo microbiano se han encontrado un número considerable de genes implicados en la tolerancia/resistencia a metales en estas comunidades. Entender la interacción de los microorganismos endolíticos con metales contribuye al conocimiento sobre mecanismos muy poco estudiados en estas comunidades y también podría derivar en potenciales aplicaciones en procesos de bioremediación.

En nuestro laboratorio contamos con una colección de 26 aislamientos de bacterias endolíticas antárticas que presentaron tolerancia a distintos metales. Nos planteamos entonces el uso de la multigenómica funcional como herramienta de bioprospección para la identificación de genes que codifiquen mecanismos involucrados en la tolerancia a metales y producción de pigmentos en dichos aislamientos. Una de las grandes limitantes que tiene esta aproximación es que la identificación de una función dependerá de una correcta expresión heteróloga del ADN ambiental en el hospedero seleccionado. Habitualmente, las bibliotecas metagenómicas/multigenómicas funcionales utilizan como hospedero a *Escherichia coli*, evaluando las distintas actividades a 37°C. En el caso de enzimas psicrófilas, esto puede resultar en la inactivación o en una disminución considerable de su actividad. Como aproximación novedosa planteamos la utilización de hospederos psicotolerantes para la construcción de las bibliotecas, estrategia que no se ha implementado hasta el momento.

La presente tesis procura contribuir al conocimiento de las comunidades bacterianas endolíticas de ambientes fríos a través de la construcción de vectores híbridos, selección y puesta a punto de hospederos alternativos, así como la construcción de multigenotecas funcionales, buscando clones tolerantes a distintos metales.

Con este objetivo en mente, se diseñó una estrategia para la construcción de un plásmido híbrido replicable en *Pseudomonas* y *Arthrobacter* psicotolerantes que fueron

previamente aisladas en nuestro laboratorio. Este plásmido híbrido se basa en la utilización de los vectores modulares SEVA y la incorporación en dicho andamio de un origen de replicación (pCG100) funcional en *Arthrobacter*. Mediante esta aproximación se logró construir el vector híbrido pSEVA231-pCG100. Este vector se replicó satisfactoriamente en *E. coli*, *Pseudomonas putida* y aislamientos de *Pseudomonas* antárticas. Si bien el vector no fue capaz de replicarse en *Arthrobacter*, no podemos descartar que sea debido a la incapacidad de inducir el estado de competencia o de introducir ADN foráneo en estos hospederos psicotolerantes. Sin embargo, mutaciones en la secuencia del pCG100 parecería ser la explicación más plausible.

Paralelamente se caracterizó la colección de aislamientos de *Arthrobacter* y de *Pseudomonas* y se seleccionaron potenciales hospederos. Se logró inducir la competencia y transformar las cepas de *Pseudomonas* con eficiencias del orden de 10^6 . Si bien se utilizaron varias estrategias para transformar *Arthrobacter*, no se logró aún usando el vector pART2, el cual ha sido reportado en otras cepas de este género. Las posibles causas son discutidas.

En una primera aproximación, se decidió poner a punto la construcción de multigenotecas utilizando una mezcla de ADN genómico de los 22 aislamientos endolíticos antárticos y *E. coli* DH5 α como cepa hospedera. La biblioteca se construyó utilizando el vector pSEVA232, el cual contiene el origen de replicación pBBR1. Esta región es funcional en *Pseudomonas* por lo que la biblioteca o clones particulares pueden ser transferidos a este hospedero alternativo. Se generó en *E. coli* una biblioteca de 275 clones, los cuales fueron analizados funcionalmente evaluando tolerancia a distintos metales. Se evaluó tolerancia a Ag^{+1} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} y Zn^{+2} . Se identificaron 5 clones que presentaron tolerancia a Ag^{+1} y 5 a Co^{+2} . Se confirmó la asociación del fenotipo de tolerancia con la presencia del plásmido para 3 de los clones con resistencia a Co^{+2} pero ninguno de los clones con resistencia a Ag^{+1} confirmó la asociación del fenotipo con la presencia del plásmido.

Los 3 plásmidos que confieren resistencia a Co^{2+} presentan distinto perfil de restricción, sugiriendo que contienen fragmentos de ADN multigenómico distintos. Como perspectiva inmediata de este trabajo proponemos la secuenciación de estos plásmidos de manera de determinar si se pueden inferir posibles genes relacionados con el metabolismo de metales a partir de la comparación con bases de datos. También planteamos la introducción de estos plásmidos en los aislamientos de *Pseudomonas*

antárticas seleccionadas, de manera de determinar si también otorgan tolerancia a Co^{+2} en este hospedero o si la función codificada depende del contexto genómico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los desafíos de las bajas temperaturas y las adaptaciones de sus sobrevivientes

La capacidad de los microorganismos psicrotolerantes de sobrevivir e incluso reproducirse a bajas temperaturas implica poder superar los límites impuestos por ambientes permanentemente fríos. Estos desafíos incluyen: actividad enzimática reducida, disminución de la fluidez de la membrana, transporte alterado de nutrientes y productos de desecho, disminución de las tasas de transcripción, traducción y división celular, desnaturalización de proteínas, plegamiento inadecuado de proteínas, y formación de hielo intracelular^{1,2}.

Estos microorganismos han desarrollado con éxito distintas adaptaciones para superar los efectos desfavorables de las bajas temperaturas y permitir su desarrollo en entornos extremos. El pilar de estas adaptaciones se concentra en las proteínas, siendo éstas las protagonistas para el desarrollo sustentable del flujo metabólico, ralentizado por las bajas temperaturas. Gracias a una mayor flexibilidad en regiones claves de su estructura molecular, las proteínas adaptadas al frío pueden compensar los efectos de la congelación en su estructura tridimensional¹⁻⁶, logrando, de esta manera, controlar el equilibrio entre los sustratos y los productos, marcando los límites para el correcto influjo de nutrientes, la salida de productos de desecho, los ensamblajes macromoleculares, la dinámica de ácidos nucleicos y el plegamiento apropiado².

Las enzimas adaptadas al frío poseen una mayor flexibilidad que sus contrapartes mesófilas, proporcionándoles una alta actividad específica a pH neutro y temperaturas moderadas. Estas propiedades generan interés por su gran potencial biotecnológico ya que son enzimas capaces de llevar a cabo procesos bioquímicos a temperaturas moderadas, lo que implica menores costos al no ser necesario invertir en energía para poner en marcha un proceso dependiente de temperatura. En base a estas características, los ambientes fríos son sitios plausibles para la bioprospección de nuevas especies, procesos, y enzimas con potencial aplicación biotecnológica^{1,3-7}.

1.2. Bacterias endolíticas: “semillas de vida en tierras infértiles”

Grande es la curiosidad que despierta el entender la vida e incluso ir más allá, hasta los orígenes de ésta. Fue el químico sueco y premio Nobel Svante August Arrhenius quien, en 1908, propuso la palabra “*panspermia*” para explicar los comienzos de la vida en la Tierra⁸. A grandes rasgos, plantea la llegada de ésta a través de “*semillas*” desde fuera de nuestro planeta, meteoritos que cayeron sobre la faz de la Tierra cargados de microorganismos.

Antes de poder evaluar la posibilidad de que la vida resiste viajes interplanetarios, es necesario evidenciar su desarrollo dentro de rocas en ambientes tan extremos como las regiones permanentemente frías de nuestro planeta. En ambientes extremadamente áridos una estrategia exitosa empleada por los microorganismos para afrontar las dificultades ambientales es colonizar el interior de las rocas, un hábitat que proporciona amortiguación térmica y estabilidad física. Además otorga protección contra la radiación UV incidente y frente a eventos de congelación-descongelación. Pero por sobre todo, la retención de agua en la red de poros y fisuras de las rocas otorga la humedad necesaria para sustentar la vida⁹⁻¹¹.

Es entonces el espacio poroso de las rocas un hábitat microbiano ubicuo y una interfaz entre la biología y la geología⁹. Los microorganismos líticos se diferencian en aquellos que colonizan la superficie de la roca (epilitos) y los que viven en la zona en contacto con el suelo (hipolitos). Aquellos que viven propiamente dentro de la roca se denominan endolitos y, dependiendo si se encuentran habitando fisuras, cavidades, o bien penetran activamente la roca degradando el sustrato, se les

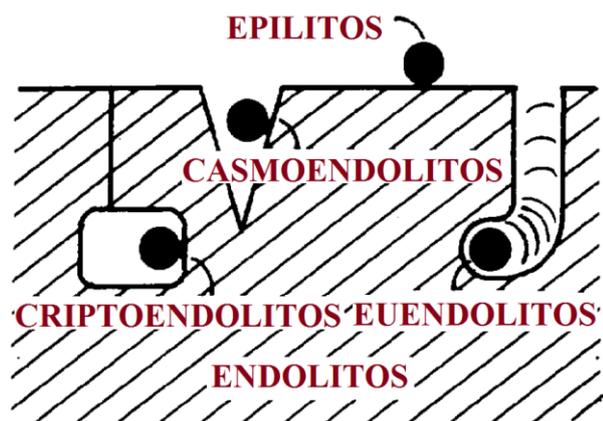


Figura 1. Esquema de los hábitats de los microorganismos líticos. Los microorganismos epiliticos habitan la superficie de la roca mientras que los hipolíticos la parte inferior en contacto con el suelo. Los endolíticos habitan en el interior de la roca, ya sea en poros (criptoendolíticos) o fisuras (casmoendolíticos). Modificado de Golubik, *et al.*¹²

clasifica como casmoendolitos, criptoendolitos y euendolitos, respectivamente (Figura 1)^{10,12}.

Se estima que las comunidades endolíticas son las más simples conocidas, ofreciendo sistemas modelo para la ecología microbiana, geobiología y astrobiología, donde los patrones de interacción entre su biodiversidad y el ambiente pueden ser escalados a los observados en sistemas más complejos⁹.

La naturaleza física y química de los ambientes endolíticos y su influencia en los patrones de colonización microbiana sugieren que las comunidades endolíticas están adaptadas de manera única a la vida en ambientes donde las condiciones son extremas. Curiosamente, los organismos encontrados en un mismo ambiente lítico están estrechamente relacionados en todo el mundo⁹. Pese a su gran capacidad de adaptación metabólica a las condiciones impuestas por el ambiente, poco se conoce de los mecanismos que sustentan dicha adaptación, constituyendo así un área de investigación científica a explorar¹⁰.

El actualismo afirma que los fenómenos actuales operan de modo similar a los del pasado. Según esta teoría, las comunidades endolíticas junto con los procesos geobiológicos hoy en día estudiados, proporcionarían pistas sobre la historia de la vida en la Tierra y permitirían idear dónde existe potencial para la vida en otras partes del Sistema Solar⁹.

1.3. Metales: toxicidad & tolerancia

Las comunidades endolíticas se caracterizan por formar complejas matrices extracelulares que estructuran una base de contacto directo con las superficies minerales. Las sustancias poliméricas extracelulares y las biomoléculas asociadas a las mismas (enzimas extracelulares, sideróforos y ácidos orgánicos), están involucradas en procesos que disuelven o alteran los minerales con el consecuente secuestro de nutrientes como hierro (Fe), fósforo (P), calcio (Ca), magnesio (Mg) y metales trazas^{9,13}.

Los metales varían en sus características fisicoquímicas, lo que conlleva a diversas interacciones entre éstos y los seres vivos, dependiendo del rol biológico que cumplen en su metabolismo o formando parte del entorno que los rodea^{14,15}. La utilización microbiana de ciertos metales traza puede proporcionar información sobre la

antigüedad y la evolución de los grupos microbianos, así como los mecanismos metabólicos subyacentes^{16,17}.

Los metales se pueden clasificar en cuatro grandes grupos de acuerdo a su función biológica, toxicidad y concentración en las células vivas. El primero está compuesto por metales como sodio (Na), magnesio (Mg), potasio (K) y calcio (Ca), que están presentes en alta concentración (mM) en las células. Estos metales son necesarios para un correcto desarrollo celular, ya que están involucrados en el metabolismo básico como la producción de energía o el mantenimiento de la integridad de las paredes bacterianas^{14,18,19}. El segundo grupo engloba a un buen número de los metales de transición ubicados en la primera fila de la tabla periódica, como manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu) y zinc (Zn). Están presentes en baja concentración en las células (μM) y participan en muchos procesos biológicos, como la producción de energía y las reacciones de óxido-reducción, y también estabilizan la estructura de las proteínas¹⁷⁻²¹. El tercer grupo incluye metales tóxicos con muy pocas funciones biológicas como vanadio (V) y molibdeno (Mo)^{19,22}. El cuarto y último grupo incluye aquellos metales considerados altamente tóxicos, sin función biológica conocida, cuya presencia dentro de las células es tóxica y letal¹⁴.

A pesar de sus potenciales funciones biológicas, el segundo y tercer grupo de metales también son tóxicos a altas concentraciones y su adquisición y acumulación en células bacterianas está, por lo tanto, finamente regulada¹⁹. Las bacterias poseen distintos mecanismos implicados en la detoxificación y transformación de metales. Estos pueden involucrar fenómenos de transporte que contribuyen a la disminución de la captación y/o aumento del eflujo. Otros mecanismos afectan las transformaciones redox e implican quelación y/o precipitación intracelular. También pueden inducir la mineralización al causar cambios fisicoquímicos en el ambiente²³, por ejemplo la mineralización de Ca y Mg en estromatolitos²⁴.

Existe un enorme potencial que recae en la capacidad que tienen los microorganismos de generar cambios en la especiación, toxicidad y movilidad de los metales, así como la formación de minerales, su disolución o el deterioro de los mismos. Dichos mecanismos son componentes importantes de los ciclos biogeoquímicos naturales para los metales, así como de los elementos asociados en la biomasa, el suelo, las rocas y los minerales²³.

Puntualmente, para comunidades endolíticas antárticas, hay antecedentes recientes del uso de aproximaciones metagenómicas con foco en el metabolismo microbiano, donde se han encontrado un número considerable de genes implicados en la tolerancia/resistencia a metales²⁵. Por lo tanto, es interesante conocer aquellas características funcionales que impulsan la supervivencia y el ensamblaje de dichas comunidades en ambientes extremos, así como los procesos biogeoquímicos involucrados. Entender, por ejemplo, la interacción de los microorganismos endolíticos con metales podría derivar en potenciales aplicaciones en procesos de biorremediación²⁵.

1.4. Pigmentos: su importancia en microorganismos antárticos

Las rocas son, en su mayoría, ambientes oligotróficos capaces de sustentar la vida microbiana. La poca disponibilidad de nutrientes implica que los ecosistemas endolíticos microbianos dependen de productores primarios, generalmente de microorganismos fotoautótrofos²⁶. Éstos, y otros microorganismos fotótrofos, con frecuencia habitan a unos pocos milímetros de la superficie de la roca que se encuentra expuesta a los rayos de luz. Los factores que controlan la distribución y abundancia de microorganismos fotótrofos, así como sus distintas pigmentaciones en dichos ecosistemas no se conocen^{9,27}.

Se ha reportado una alta prevalencia de aislamientos pigmentados obtenidos a partir de distintas muestras de ambientes fríos, sugiriendo que los pigmentos cumplen una función relevante en dichos ambientes^{28,29}. Una hipótesis es que cumplen un rol en la respuesta al estrés ambiental ayudando a su capacidad de supervivencia²⁹, habiendo evidencia de casos donde se aumenta su síntesis en presencia de metales³⁰.

1.5. Metagenómica y multigenómica funcional: herramientas de bioprospección

La biodiversidad presente en nuestro planeta, particularmente la microbiana, es la mayor fuente de recursos biotecnológicos. La búsqueda de nuevos biocatalizadores por medio del cultivo de microorganismos es una estrategia comúnmente utilizada. Esta aproximación limita el estudio sólo a aquellos microorganismos que pueden crecer en

condiciones de laboratorio, representando una parte muy pequeña de la diversidad microbiana en múltiples ecosistemas (1-5%)³¹⁻³⁵.

Surge así la metagenómica funcional como herramienta de bioprospección, permitiendo acceder al potencial genético de todos los microorganismos que habitan un ambiente, incluyendo aquellos que no se ajustan a las condiciones de cultivo del laboratorio. Esta aproximación tiene como grandes ventajas la posibilidad de acceder a genes novedosos para la función buscada, y el poder evaluar varias funciones de interés simultáneamente³⁶⁻³⁸. En síntesis, el método consiste en el aislamiento del ADN total de una muestra, la creación de bibliotecas metagenómicas en bacterias de uso corriente en el laboratorio, y el posterior análisis funcional de las bibliotecas^{31,39}. Esta aproximación presenta múltiples sesgos que van desde el método de extracción de ADN utilizado, hasta los medios de cultivo seleccionados para la búsqueda de funciones. Esto implica que existe un gran cuello de botella, no pudiendo acceder a todo el potencial presente en una muestra ambiental (Figura 2). Sin embargo, este abordaje experimental ha permitido la identificación de múltiples enzimas, así como también compuestos antimicrobianos y genes de resistencia a antibióticos, entre otros³⁸.

De todas maneras, la creación de colecciones de microorganismos cultivables y su análisis funcional sigue siendo una aproximación simple, rápida y no muy costosa para identificar funciones de interés biotecnológico. Una de las limitantes de la aproximación clásica es determinar qué gen/genes son responsables de las funciones observadas, ya que implica contar con herramientas genéticas para los distintos microorganismos o tener información de secuencias con función similar que permita su detección mediante técnicas moleculares. Una estrategia alternativa para evitar estas



Figura 2. Representación del cuello de botella en un análisis metagenómico. Modificado de Ekkers, *et al.*³¹

dificultades es la multigenómica funcional, donde el material genético de partida para la construcción de las bibliotecas es ADN multigenómico, es decir, de todos aquellos microorganismos cultivables que presentan funciones de interés⁴⁰ (Figura 3).

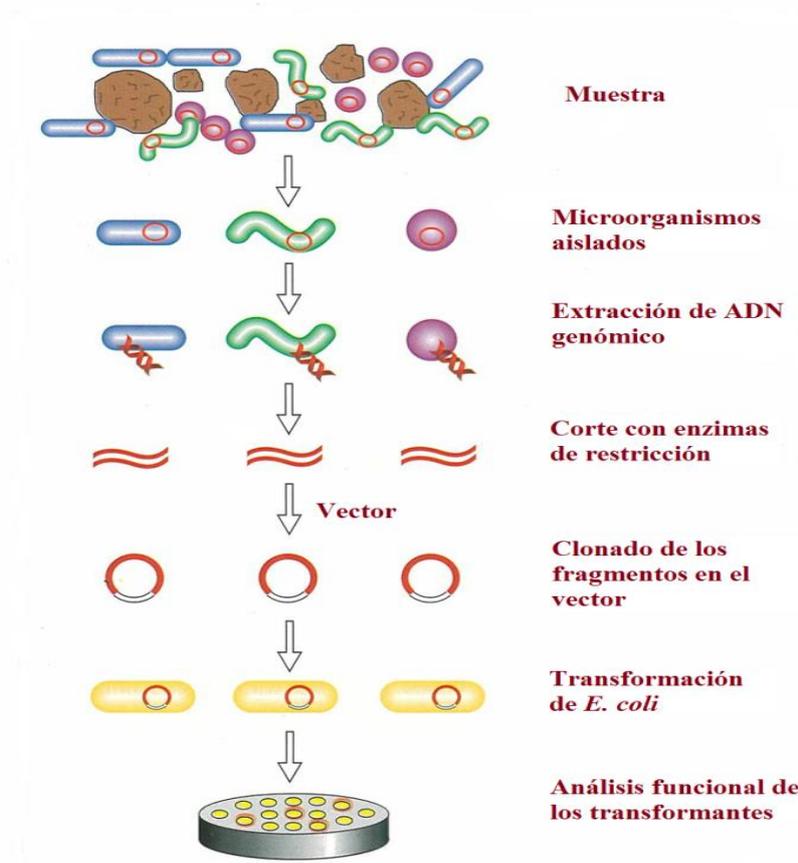


Figura 3. Esquema de la construcción de una multigenoteca funcional. El ADN se extrae de los microorganismos cultivables aislados de la muestra, se mezclan y digieren con enzimas de restricción, se clonan en un vector y se introducen en la célula hospedera generando una biblioteca multigenómica. Los clones de la biblioteca se seleccionan en base a su fenotipo en ensayos funcionales. Modificado de Handelsman, *et al.*³⁹

1.5.1. Hospederos alternativos: el problema de la expresión heteróloga

Una de las grandes limitantes de la metagenómica/multigenómica funcional es que la identificación de una función dependerá de una correcta expresión heteróloga del ADN ambiental en el hospedero seleccionado. Es frecuente la utilización de *Escherichia coli* para la construcción de las bibliotecas, sin embargo, muchos de los genes de metagenomas complejos se expresan a niveles muy bajos o no se expresan en absoluto en este hospedero. Esto puede deberse a diferencias en la maquinaria transcripcional,

traduccional y post traduccional entre el organismo del cual proviene el ADN y la cepa hospedera⁴¹. De acuerdo a estudios *in silico* realizados en 32 genomas bacterianos, la probabilidad de que un gen se exprese en *E. coli* es en promedio 40% existiendo diferencias significativas en distintos grupos taxonómicos, desde un 7% para genes pertenecientes a *Actinobacterias* a un 73% para *Firmicutes*⁴². Por otro lado, utilizar un hospedero mesófilo como *E. coli* puede resultar en algunos casos en la inactivación o en una disminución considerable de la actividad en el caso de enzimas provenientes de ambientes con temperaturas extremas.

Una manera de minimizar este sesgo es ampliar el rango de hospederos utilizados en la construcción de las bibliotecas metagenómicas/multigenómicas, lo que ha demostrado ser de utilidad en varios estudios^{38,41,43,44}. Sin embargo, hasta la fecha no se han utilizado hospederos psicrófilos/psicrotolerantes para la construcción de bibliotecas metagenómicas funcionales. En trabajos previos en nuestro laboratorio se generaron colecciones de bacterias cultivables aisladas de distintas muestras antárticas, entre ellas bacterias cultivables endolíticas y de suelo, donde se identificó una gran prevalencia de aislamientos de los géneros *Arthrobacter sp*²⁸ y *Pseudomonas sp*⁷, respectivamente. Estos microorganismos psicrófilos/psicrotolerantes serían plausibles de ser utilizados como hospederos cuyo trasfondo celular permita la correcta expresión heteróloga del ADN procedente de comunidades antárticas.

Las bacterias del género *Arthrobacter* son microorganismos aerobios, varían morfológicamente entre coco y bacilo de acuerdo al ambiente y la fase de crecimiento (bacilo en fase exponencial, coco en fase estacionaria), Gram positivos e inmóviles pertenecientes a la clase Actinobacteria⁴⁵. Las especies de este género son ubicuas en los suelos y con frecuencia constituyen una fracción importante e incluso dominante de la comunidad microbiana cultivable en los mismos. Presentan una gran versatilidad metabólica que les otorga la capacidad de crecer en medios simples utilizando una variedad de compuestos como fuente de carbono y nitrógeno⁴⁶, facilitando así su manipulación en el laboratorio. Por otro lado, las bacterias del género *Pseudomonas* son microorganismos aerobios, bacilos Gram negativos y flagelados, fácilmente cultivables en medios de uso común en un laboratorio⁴⁷. Las especies de este género también son ubicuas y frecuentes en aislamientos de suelos antárticos^{7,28,48}.

Ambos géneros presentan características que los hacen adecuados para su trabajo en el laboratorio, otorgando dos contextos genéticos distintos para la expresión heteróloga de genes^{31,41,49}.

1.5.2. Vectores híbridos: el nexo entre el ADN metagenómico/multigenómico y los distintos hospederos

Para que un plásmido sea replicable en distintos hospederos debe contar con orígenes de replicación que sean reconocidos en cada uno de ellos, lo que constituye la esencia de un vector híbrido. El poder superar las barreras de especie entre un hospedero y otro, abre un abanico de posibilidades y con ello se incrementa el potencial de las bibliotecas funcionales para la identificación de diversas actividades⁵⁰. Si estos vectores híbridos son además modulares, las posibilidades se amplían aún más.

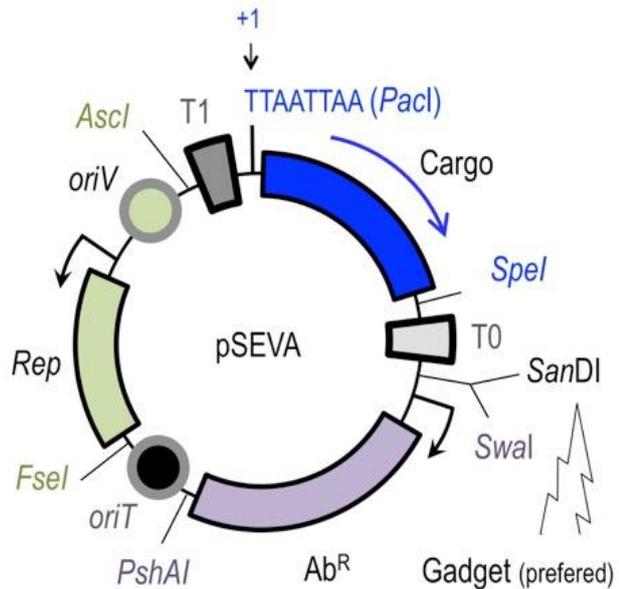


Figura 4. Esquema de la estructura modular de los plásmidos SEVA. Los vectores SEVA están conformados por tres módulos básicos: un cargo (azul), un origen de replicación del plásmido (verde) y un marcador antibiótico (magenta). Se indican los sitios de restricción que limitan los módulos en todos los constructos. Extraído de Martínez-García, *et al.*⁵²

Los vectores SEVA se caracterizan por poseer distintos módulos (Figura 4), entre ellos, un módulo de origen de replicación, un módulo de marcador de selección y otro módulo al que se denomina carga. El módulo carga puede presentar sitios de clonado múltiple, fusiones con genes reporteros, etc. Cada módulo está delimitado por dos sitios de restricción únicos que permite el intercambio de los mismos. Por ejemplo, es posible cambiar el gen que otorga resistencia a un antibiótico por otro gen de resistencia más útil o apropiado, dependiendo de la actividad a realizar^{51,52}.

La construcción de un vector híbrido que presente distintos orígenes de replicación sobre la base de vectores modulares permitiría no sólo aumentar el rango de hospederos, sino también la posibilidad de intercambiar los distintos módulos de

acuerdo al tipo de ensayo a realizar, por ejemplo de acuerdo a la resistencia intrínseca de las cepas a utilizar como hospederos.

Elaborar un vector híbrido replicable en *Pseudomonas sp* y *Arthrobacter sp* psicotolerantes, permitiría: *i*) ampliar el rango de hospederos para la generación de genotecas, incorporando hospederos psicotolerantes, algo que no se ha implementado hasta el momento; esto aumentaría la posibilidad de una correcta expresión heteróloga de enzimas provenientes de ambientes fríos y por lo tanto de hallar enzimas con potencial aplicación biotecnológica; *ii*) evaluar el efecto del contexto genómico sobre una función, ya que el vector podría extraerse de un hospedero e introducirse en otro fácilmente.

2. HIPÓTESIS & OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Planteamos como hipótesis que: **1)** El empleo de bacterias psicotolerantes como hospederas en la construcción de multigenotecas funcionales permitirá la detección de actividades enzimáticas provenientes de bacterias endolíticas antárticas; **2)** El genoma de bacterias endolíticas antárticas posee genes de tolerancia a metales y producción de pigmentos, aún poco caracterizados o desconocidos.

2.2. Objetivo general

Contribuir al conocimiento de las comunidades bacterianas endolíticas de ambientes fríos y detectar actividades metabólicas de potencial interés biotecnológico.

2.3. Objetivos específicos

- a) Poner a punto la construcción de multigenotecas funcionales en *Escherichia coli* (mesófila), *Arthrobacter* sp. (psicotolerantes) y *Pseudomonas* sp. (psicotolerante).
- b) Identificar clones portadores de genes que confieren resistencia a metales, en particular Ag^{+1} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} y Zn^{+2} .
- c) Identificar clones portadores de genes que confieren la capacidad de producir pigmentos.

3. METODOLOGÍA

3.1. Construcción de un vector híbrido para la elaboración de genotecas

Para generar un único vector para la construcción de bibliotecas metagenómicas en distintos hospederos, éste debe contener orígenes de replicación que sean reconocidos por cada hospederos. Nos planteamos entonces la creación de un vector híbrido conteniendo el origen de replicación pCG100 del plásmido pART2, replicable en *Arthrobacter*, y el origen de replicación pBBR1 del vector pSEVA232, replicable en *Escherichia coli*. y *Pseudomonas*. Los microorganismos y plásmidos utilizados en la construcción del vector híbrido se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Microorganismos y plásmidos utilizados para la construcción del vector híbrido

Cepas bacterianas	Descripción	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> <i>ΔlacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan 1983 ⁵³
Plásmidos		
pSEVA232	Km ^R ; 3,5Kb; pBBR1ori; <i>lacZα</i> -pUC19	seva.cnb.csic.es ⁵¹ (Figura A.2)
pART2	Km ^R ; 4,6Kb; pCG100ori; ColE1ori	Sandu <i>et al</i> 2005 ⁵⁴
pBSK	Ap ^R ; 2,9Kb; pUCori	Short <i>et al</i> 1989 ⁵⁵
pRK600	Cm ^R ; 4,8Kb; ColE1ori; RP4tra ⁺ RP4oriT	Kessler <i>et al</i> 1992 ⁵⁶

3.1.1. Minipreparación de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina

A partir de colonias aisladas de las cepas de *E. coli*, DH5 α (pSEVA232) y DH5 α (pART2) se realizaron precultivos en 5mL de LB (Anexo) Km 50 μ g/mL y se incubaron durante 16h a 37°C y agitación 200rpm. Se colectaron 2mL por centrifugación a 2000xg durante 30s, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200 μ L de la Solución I (Anexo), con el fin de mantenerlas en una solución isotónica y evitar la acción de ADNAsas. Para ocasionar la lisis celular y la desnaturalización del ADN se

agregó 200µL de la Solución II (Anexo) y se mezcló 5 veces por inversión. La solución II contiene el detergente SDS que favorece la lisis celular al desestabilizar la membrana bacteriana, y NaOH que genera un ambiente alcalino favorable para que el ADN liberado sea desnaturalizado. Para la renaturalización del ADN se agregaron 200µL de la Solución III (Anexo), homogeneizando por inversión 5 veces e incubando el tubo en hielo durante 5min. Esta solución contiene ácido acético que neutraliza el pH de la mezcla favoreciendo la renaturalización del ADN. El plásmido, al ser más pequeño y encontrarse covalentemente cerrado, renaturaliza más rápido que el ADN genómico, el cual forma precipitados al aglomerarse con proteínas que permite separarlo de este último por medio de una extracción orgánica. Con esta finalidad se agregaron 200µL de cloroformo, se emulsionó y se separaron las fases por centrifugación a 12000xg durante 10min. Se recolectó la fase acuosa donde se encuentra el ADN plasmídico, y se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol 100% durante 10min a temperatura ambiente. La deshidratación del ADN provoca una falta de contención por las fuerzas hidrostáticas en la cadena de fosfatos y precipita. Posteriormente, se centrifugó a 12000xg durante 10min, se descartó el sobrenadante y se lavó el ADN con 500µL de EtOH 70% (v/v) frío para eliminar sales remanentes. Se centrifugó nuevamente a 12000xg por 10min, se descartó el sobrenadante y se secó el ADN plasmídico mediante centrifugación al vacío para eliminar cualquier resto de EtOH.

Finalmente, se resuspendió el ADN en 75µL de H₂O milliQ, se agregó 2µL de ARNasa (20mg/mL, Thermo Fisher Scientific), se incubó durante 30min 37°C y se guardó a -20°C.

El control de calidad del ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v) en una solución de equilibrio TAE 1X (Anexo), durante 45 minutos a 9V/cm. Se reveló mediante el uso del agente intercalante GoodViewTM (SBS Genetech Co., Ltd.), utilizando 5µL cada 100mL de agarosa, y se visualizó por exposición en luz UV. Tanto éste como los demás ADNs trabajados fueron cuantificados por espectrofotometría de microgota (nanodrop)

3.1.2. Amplificación del pCG100ori

Con el objetivo de amplificar la secuencia que corresponde al origen de replicación pCG100 se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron cebadores específicos basados en la secuencia nucleotídica de esta región

obtenida del GenBank (DQ191047.1), seleccionando aquel par de cebadores con una temperatura de desnaturalización (Tm) similar, y baja probabilidad de generar estructuras secundarias o dímeros de cebadores. Se utilizó el programa Primer3plus para determinar estos parámetros. Para simplificar el clonado del producto de PCR, se adicionó a ambos cebadores el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción KpnI. En la Tabla 2 se detallan las secuencias y Tm para los cebadores diseñados.

Tabla 2. Secuencias de nucleótidos y Tm de los cebadores diseñados

Secuencia amplificada	Cebador	Secuencia nucleotídica*	Tm (°C)
pCG100	Directo	5'-GGGGTACCTTGGGAGCAGTCCTTGTG-3'	65
	Reverso	5'-GGGGTACCTCGTCACAGAGCTGGAAG-3'	64

*Se resalta en otro color el sitio de corte para la enzima de restricción KpnI

Se puso a punto la amplificación utilizando un gradiente de temperaturas de hibridación, con el objetivo de obtener un amplicón único del tamaño esperado (1.906pb). Se testearon 12 condiciones de amplificación en un rango de temperaturas de 48,1°C a 63,9°C. Se utilizó como ADN molde el plásmido pART2. La mezcla de

Tabla 3. Mezcla de reacción para la amplificación

Reactivo	Concentración final
Buffer Taq	1x
dNTPs	0,2mM
Cebador directo	0,5µM
Cebador reverso	0,5µM
MgCl ₂	1,5mM
Taq	0,02U/µL
ADN molde (pART2)	~4,0ng/µL
Volumen final de la reacción: 25µL	

Tabla 4. Condiciones de ciclado para la amplificación del origen de replicación pCG100

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5min	1
Desnaturalización	95	30s	
Hibridación	48,1 – 63,9	30s	30
Extensión	72	2min	
Extensión final	72	10min	1

reacción y el programa de PCR utilizado se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente. Como control negativo se realizó una reacción sin el agregado de ADN molde. La presencia de un amplicón del tamaño esperado se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa como se detalla en el punto 3.1.1.

Se seleccionó la condición de amplificación más apropiada para la obtención de un amplicón apto para realizar el clonado utilizando la enzima Pfu polimerasa (Thermo Fisher Scientific). La enzima Pfu, a diferencia de la Taq polimerasa, posee actividad exonucleasa 3'-5' que resulta en una alta fidelidad de secuencia en el producto de amplificación resultante. Esto es importante ya que la incorporación de nucleótidos erróneos podría afectar el funcionamiento del origen de replicación.

3.1.3. Clonado del pCG100ori en el vector pSEVA232

Para el clonado del origen de replicación pCG100 en el vector pSEVA232 se purificó el origen de replicación pCG100 obtenido por PCR utilizando el kit comercial PureLink® PCR Purification Kit, con el fin de eliminar los cebadores, dNTPs, sales, y restos de enzima. El kit se basa en el uso de una membrana de sílica de unión selectiva al ADNdc en presencia de sales caotrópicas que alteran la estructura del agua. Se siguieron las recomendaciones del fabricante para purificar 50µL de reacción y se eluyó el ADN con 50µL de Tris-HCl 10mM, pH 8,5. Posteriormente se digirió con la endonucleasa de restricción KpnI (Thermo Fisher Scientific) según se detalla en la Tabla 5, y se purificó utilizando el kit comercial PureLink® PCR Purification Kit, para eliminar la enzima de restricción y sales.

Tabla 5. Reacción de digestión del producto de PCR

Reactivo	Concentración final
Producto PCR	13,8ng/µL
Buffer	1x
KpnI	0,7U/µL
Volumen final de reacción: 30µL	

La digestión se realizó durante 1h a 37°C

Asimismo, se digirió el plásmido pSEVA232 con la enzima KpnI como se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6. Reacción de digestión del vector pSEVA232

Reactivo	Concentración final
pSEVA232	~200ng/ μ L
Buffer X	1x
KpnI	1U/ μ L
Volumen final de reacción: 30μL	

La digestión se realizó durante 1h a 37°C

El producto de digestión fue sometido a electroforesis en gel de agarosa (ver 3.1.1) de manera de purificar el plásmido abierto de 3,5Kb. Se visualizó el gel con luz azul la cual no causa daño al ADN como sí lo hace el UV al formar dímeros e hidratos de pirimidinas, los cuales pueden derivar en mutaciones no deseadas. Se recortó la banda del gel y se purificó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante con el kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), el cual se basa en la liberación del ADN por acción térmica y su unión a una membrana de sílica. Se eluyó el ADN en 50 μ L de una solución 10mM Tris-HCl pH 8,5.

Se clonó el inserto en el vector mediante una reacción de ligación con la enzima T4 ADN ligasa (Thermo Fisher Scientific) según se describe en la Tabla 7. Esta enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre el extremo 5'fosfato y el 3'hidroxilo terminal del ADN doble hebra.

Tabla 7. Reacción de ligación del producto de PCR al vector pSEVA232

Reactivo	Concentración final
Producto de PCR	3,3ng/ μ L
pSEVA232	1,2ng/ μ L
Buffer T4 ligasa	1x
T4 ADN ligasa	0,5U/ μ L
Volumen final de reacción: 10μL	

La ligación se realizó durante 1h a 25°C / Relación vector:inserto (5:1)

3.1.4. Transformación de células *E. coli* DH5 α con el producto de ligación

Para la inducción de competencia en la cepa de *E. coli* DH5 α se utilizó un método químico, el cual altera la membrana externa bacteriana aumentando la

permeabilidad al ADN de origen exógeno⁵⁷. Brevemente, a partir de una colonia aislada se inocularon 5mL de LB y se incubó durante 16h a 37°C y agitación a 200rpm. Posteriormente, se realizó una dilución 1/100 (v/v) en 50mL de LB y se incubó hasta una DO_{600nm} de 0,2-0,3. Las células se recolectaron por centrifugación a 4°C durante 5 minutos a 2000xg en tubos previamente enfriados en hielo. Se resuspendió el *pellet* bacteriano en 20mL de CaCl₂ 0,1M frío por cada 50mL de cultivo original y se dejó en hielo 20 minutos. Posteriormente se recolectaron las células por centrifugación con los parámetros ya descritos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 0,5mL de CaCl₂ 0,1M frío por cada 50mL de cultivo original. La resuspensión se realizó con pequeños golpeteos alternando con períodos de frío dado que las células en este punto ya se encuentran en estado de competencia y son muy frágiles. Se agregó glicerol estéril a una concentración final de 25% (v/v), se alicuotaron las células de a 100μL y se guardaron a -80°C. Como control de viabilidad de las células luego de la inducción de la quimiocompetencia, se plaquearon 100μL en LB sólido sin antibiótico y se incubaron 16h a 37°C.

Para la transformación de *E. coli* DH5α con el producto de ligación se utilizó el método de choque térmico, el cual favorece la formación de poros en la membrana que facilitan el ingreso del ADN exógeno. Se agregó 10μL de reacción de ligación a 100μL de células competentes, se dejó durante 10min en hielo, se calentó a 42°C durante 90s, y rápidamente se colocó en hielo durante 2 minutos. Se agregó 1mL de LB y se incubó 1h a 37°C con agitación a 200rpm para permitir a las células expresar la resistencia al antibiótico. Como control negativo se realizó el mismo procedimiento con 100μL de células competentes sin agregado de ADN. Para verificar que la purificación del vector lineal no se contaminó con moléculas de plásmido cerrado, se transformaron 100μL de células con 1μL del vector digerido sin ligar. Para determinar la eficiencia de la transformación, se agregó 10ng del vector pBSK a 100μL de células competentes (control positivo).

Para la selección de células transformadas con el producto de ligación, se concentraron las células 10X mediante centrifugación a 12000xg durante 30s y se plaquearon los 100μL en LB Km 100μg/mL. Para el control negativo y el control de plásmido lineal, se plaquearon 100μL en LB Km 100μg/mL. Para el control negativo se plaquearon además 100μL en LB sin antibiótico para corroborar que el choque térmico no fue deletéreo para las células. Se plaquearon 100μL del control positivo en LB Ap

50µg/mL y se determinó la eficiencia de la transformación como el número de unidades formadoras de colonia por microgramo de ADN. Todas las placas se incubaron durante 16hs a 37°C.

3.1.5. Verificación de la presencia del origen de replicación en la construcción pSEVA232::pCG100

Para verificar la presencia del inserto en las células transformadas se realizó PCR de colonia utilizando las mismas condiciones de ciclado descritas en la Tabla 4, utilizando 63,5°C como temperatura de hibridación de los cebadores. Para lisar las células y permitir la liberación del ADN plasmídico, que actuará como molde, se agregó una etapa adicional previa de 20min a 95°C utilizando la mezcla de reacción descrita en la Tabla 3, sin el agregado de la enzima. Posteriormente, se pausó el termociclador, se adicionó la polimerasa y se prosiguió con el programa.

Se determinó la presencia del amplicón esperado mediante electroforesis en gel de agarosa (ver 3.1.1). Se seleccionaron 3 colonias positivas las cuales fueron inoculadas en 5mL de medio LB Km 50µg/mL, incubadas durante 16h a 37°C y agitación de 200rpm y guardadas a -80°C en glicerol 25% (v/v).

Para corroborar que el inserto clonado en pSEVA232 era el fragmento pCG100 y verificar la ausencia de mutaciones, que pudiera afectar la correcta función del origen de replicación, se secuenció el inserto en ambas direcciones. Se envió a secuenciar a Macrogen, Corea del Sur y se utilizaron los cebadores detallados en la Tabla 2. Se utilizó el programa DNA Baser para el ensamblado de las secuencias obtenidas y se comparó el *contig* con la secuencia del origen de replicación pCG100 del plásmido pART2 presente en la base de datos (GenBank: DQ191047.1) mediante el algoritmo BLAST del NCBI.

3.2. Hospederos alternativos: Selección y puesta a punto de protocolos

En la Tabla 8 se muestran las cepas utilizadas para su evaluación como posibles hospederos para la construcción de bibliotecas multigenómicas/metagenómicas.

Tabla 8. Microorganismos utilizados para la selección de hospederos alternativos

Cepa	Género	Número de acceso ADNr 16S (GenBank)
I1	<i>Arthrobacter</i>	JF778672
I2	<i>Arthrobacter</i>	EF459532
I20	<i>Arthrobacter</i>	JF313068
I21	<i>Arthrobacter</i>	JX827191
I36	<i>Arthrobacter</i>	KF424288
Cu512	<i>Arthrobacter</i>	KF528714
Cu712	<i>Arthrobacter</i>	AM403315
Cu723	<i>Arthrobacter</i>	KP177318
Co732	<i>Arthrobacter</i>	JX133217
P13	<i>Arthrobacter</i>	AM292605
LI2^T	<i>Arthrobacter</i>	GQ406811
UYIF15	<i>Pseudomonas</i>	KP744585
UYIF20	<i>Pseudomonas</i>	KP744588
UYIF21	<i>Pseudomonas</i>	KP744589
UYIF24	<i>Pseudomonas</i>	KP744592
UYIF25	<i>Pseudomonas</i>	KP744593
UYIF26	<i>Pseudomonas</i>	KP744594
UYIF27	<i>Pseudomonas</i>	KP744595
UYIF28	<i>Pseudomonas</i>	KP744596
UYIF29	<i>Pseudomonas</i>	KP744597
UYIF30	<i>Pseudomonas</i>	KP744598
UYIF31	<i>Pseudomonas</i>	KP744599
UYIF36	<i>Pseudomonas</i>	KP744603
UYIF37	<i>Pseudomonas</i>	KP744604
UYIF39	<i>Pseudomonas</i>	KP744606
UYIF40	<i>Pseudomonas</i>	KP744607
UYIF41	<i>Pseudomonas</i>	KP744608
UYIF43	<i>Pseudomonas</i>	KP744610

3.2.1. Selección de hospederos

Se evaluó la sensibilidad a Km de los aislamientos, ya que tanto el plásmido pART2 como el pSEVA232 brindan resistencia a este antibiótico. Se testearon las cepas de *Arthrobacter* y *Pseudomonas* en medio LB sólido, en concentraciones de Km 100µg/mL y Km 50µg/mL, respectivamente.

Previo a inducir la competencia en las cepas de *Arthrobacter* se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico por el método de lisis alcalina para determinar la presencia de plásmidos crípticos. También se realizó PCR de colonia con los cebadores diseñados (Tabla 3), con el fin de determinar la presencia de un replicón tipo pCG100 que pueda volver incompatible la coexistencia con el vector construido.

3.2.2. Inducción de la competencia y transformación de Arthrobacter

Para la inducción de la competencia y transformación por electroporación de las cepas de *Arthrobacter* seleccionadas se siguió un protocolo previamente optimizado en el que se trabajó con el vector pART2^{58,59}.

Como primera aproximación se evaluó el efecto del medio de recuperación post electroporación en la sobrevivencia de nuestras cepas seleccionadas, mediante la construcción de curvas de crecimiento. Se evaluaron los perfiles de crecimiento en los medios LB, LB suplementado con 0,5M sorbitol, LB suplementado con 0,5M sorbitol, 20mM MgCl₂ y 20mM CaCl₂, y LB suplementado con 20mM MgCl₂ y 20mM CaCl₂. Para ello, a partir de un cultivo primario en 5mL de LB, incubado a 25°C durante 16h, se diluyó 1/10 (v/v) en cada medio a testear en un volumen final de 200µL en placas de 96 pocillos, y se incubó a 25°C durante 72h midiendo la DO_{600nm} cada 2h.

Para la preparación de células electrocompetentes se inocularon 5ml de LB con la cepa *Arthrobacter* II, se cultivó a 25°C y agitación de 200rpm hasta fase estacionaria, se diluyó 1/100 (v/v) en 100mL de medio LB y se incubó a 25°C y agitación de 200rpm hasta una DO_{600nm} de 0,3-0,5. Para debilitar la pared celular bacteriana, volviéndola más proclive al pasaje de ADN exógeno, se evaluó el efecto de 3 agentes: penicilina G, lisozima y glicina, a concentraciones finales de 30µg/mL, 4µg/mL y 1%, respectivamente. Se incubaron los cultivos con estos agentes durante 1h, se colocaron rápidamente en agua helada durante 10min y se recolectaron por centrifugación a 2000xg y 4°C durante 15min. Se lavaron las células tres veces con 10mL de solución de electroporación fría (10% glicerol, 0,5 M sorbitol), resuspendiendo suavemente por breves intervalos de tiempo, alternando con inmersiones en hielo y recuperado las células por centrifugación a 2000xg y 4°C durante 15 minutos en cada lavado.

Finalmente, las células electrocompetentes se concentraron 100 veces en la solución de electroporación y la suspensión se distribuyó en alícuotas de 60µL a -80°C. Como control de viabilidad se plaquearon 100µL de células electrocompetentes en LB sin antibiótico y se incubó 16h a 25°C.

Para la transformación de *Arthrobacter*, se mezclaron 50µL de células competentes con 1ng, 10ng, 100ng y 1.000ng de plásmido pART2 y se transfirió cada mezcla a una cubeta de electroporación de 0,1 cm fría. La mezcla se sometió a un único pulso de 1,8kV, E=18kV/cm, usando el programa Ec1 (Bacteria) del electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad Laboratories). Inmediatamente después del pulso eléctrico, se agregó 800µL de medio LB con 0,5M de sorbitol y se incubaron a 25°C y agitación de 200rpm durante 8h para permitir la expresión de la resistencia antibiótica. Como control negativo se sometieron 50µL de células competentes al mismo proceso sin el agregado de ADN. Se plaquearon 100µL de células post-recuperación en placas de LB Km 100µg/mL. La eficiencia de transformación se definió como el número de transformantes por microgramo de ADN utilizado.

Se siguió el mismo procedimiento para las cepas de *Arthrobacter* Cu512, Cu712, I2 y LI2^T utilizando lisozima 4µg/mL como agente para debilitar la pared celular bacteriana y 100ng del vector pART2.

3.2.3. Conjugación

Con el fin de ampliar las posibilidades de incorporar la construcción pSEVA232::pCG100 en bacterias del género *Arthrobacter* y verificar la función del origen de replicación, se realizó un ensayo de conjugación triparental. Para el mismo se utilizaron las cepas: DH5α (pRK600) (*Helper*, brinda la expresión de genes *tra* para que se dé la transferencia), DH5α (pSEVA232::pCG100) (donadora con el plásmido de interés) y *Arthrobacter livingstonensis* LI2^T (receptora).

A partir de un cultivo primario de LI2^T en 5mL de LB, incubado a 25°C durante 16h, se realizó una dilución 1/100 (v/v) en 5mL de LB y se incubó durante 4h. Lo mismo se realizó con las cepas de DH5α pero a 37°C.

La mezcla de conjugación se realizó en tubos Eppendorf conteniendo 200µL de cada DH5α y 300µL de LI2^T. Como controles se utilizaron, por un lado 200µL de cada DH5α (control de *E. coli*) y por otro 300µL de LI2^T (control de *Arthrobacter*). Se

colectaron las células por centrifugación durante 5min a 2000xg y 25°C, se resuspendió cada tubo en 20µL de LB y se sembraron en forma de gota en placas de LB sin antibiótico. Se incubaron las placas durante 16h a 25°C con la gota hacia arriba de manera que ocurra la conjugación (de corresponder). Al día siguiente, las células crecidas en cada gota se levantaron con un ansa, se resuspendieron en 1mL de LB y se plaquearon 100µL de cada condición en LB Km 50µg/mL y se incubaron a 10°C.

3.2.4. Inducción de la competencia y transformación de Pseudomonas

Para la inducción de la competencia y transformación se seleccionaron las cepas de *Pseudomonas* sp. UYIF39 y UYIF41, se sembraron 10mL de LB y se crecieron a 25°C y agitación de 200rpm hasta una $DO_{600nm} \approx 1$. Alícuotas de 2mL se centrifugaron durante 1min a 12000xg y 25°C, se lavaron las células 3 veces con 1mL de H₂O estéril, y finalmente se resuspendieron en 100µL de H₂O estéril. Para determinar la eficiencia de competencia se utilizó 10ng de pSEVA232 y como control negativo las células competentes sin el agregado de ADN. Se utilizaron las mismas condiciones de electroporación que para *Arthrobacter*, con la diferencia que todo el proceso se realizó a temperatura ambiente. Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregó 1mL de LB y se incubaron durante 4h a 30°C y agitación de 200rpm para permitir la expresión de la resistencia antibiótica.

Para la selección de las células transformadas, se plaquearon 100µL en placas de LB Km 50µg/mL. Como control negativo se sometieron 100µL de células competentes al mismo proceso sin el agregado de ADN. La eficiencia de transformación se determinó como el número de transformantes por microgramo de ADN utilizado. Se utilizó *Pseudomonas putida* KT2440 como control del proceso.

3.3. Construcción de la multigenoteca

3.3.1. Extracción de ADN genómico de aislamientos endolíticos antárticos

Se realizó la extracción de ADN genómico de los aislamientos endolíticos antárticos (Tabla 9), los cuales fueron seleccionados previamente en nuestro laboratorio por su capacidad de producir pigmentos y su tolerancia a metales. En este trabajo se realizaron las extracciones de las cepas: Cu511, Cu731, Co722 y Ni724. Las restantes 22 extracciones fueron realizadas con anterioridad.

Tabla 9. Microorganismos utilizados para la extracción de ADN genómico

Cepa	Género	Número de acceso
Ag 731	<i>Hymenobacter</i>	LC076740
Ag 732	<i>Cryobacterium</i>	EF451671
Ag733	<i>Sphingomonas</i>	JQ977525
Co721	<i>Arthrobacter</i>	JX869972
Co722	<i>Hymenobacter</i>	FR682721
Co724	<i>Mycobacterium</i>	AB741467
Cu511	<i>Arthrobacter</i>	EF423370
Cu711	<i>Mucilaginibacter</i>	GU113038
Cu722	<i>Mucilaginibacter</i>	EU642850
Cu731	<i>Mucilaginibacter</i>	JX847597
Mn211	<i>Janibacter</i>	JN644568
Mn621	<i>Frigoribacterium</i>	AB545756
Mn731	<i>Sphingomonas</i>	-
Ni724	<i>Mucilaginibacter</i>	EU642850
Zn732	<i>Cryobacterium</i>	-
P1	<i>Pedobacter</i>	HQ824869
P4	<i>Arthrobacter</i>	JF346423
P5	<i>Rhodococcus</i>	AJ576249
P6	<i>Arthrobacter</i>	FM955881
P10	<i>Agrococcus</i>	JX949725
P11	<i>Massilia</i>	KF911334
P12	<i>Arthrobacter</i>	FM955881
P14	<i>Rhodococcus</i>	AJ576249
P24	<i>Frigoribacterium</i>	DQ125830
P25	<i>Mucilaginibacter</i>	EU642850
P33	<i>Paracoccus</i>	JX097010

Se cultivaron los microorganismos en medio R2A (Anexo) a 25°C y agitación de 200rpm hasta obtener una $DO_{600nm} \approx 1$. Se centrifugaron los cultivos durante 10min a 2000xg y 25°C, y se resuspendieron en 200µL de agua cada 50-100mg de peso húmedo

de *pellet* bacteriano. Se utilizó el kit comercial Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit, de Zymo Research según las recomendaciones del fabricante. El kit se basa en la lisis bacteriana por acción física y química, y la posterior purificación del ADN genómico por membranas de sílica en columnas. Se eluyó el ADN en 100µL de una solución 10mM Tris-HCl pH 8,5, y se verificó la calidad y cantidad del ADN obtenido mediante corrida electroforética en gel de agarosa (ver 3.1.1).

3.3.2. Puesta a punto de la digestión parcial del ADN multigenómico con Sau3AI y generación de la multigenoteca

Para la construcción de la multigenoteca se preparó el ADN multigenómico mezclando cantidades iguales (70ng) de ADN genómico de cada uno de los 26 aislamientos. Se puso a punto el tiempo y la concentración de enzima Sau3AI a utilizar, de manera de obtener fragmentos de ADN de aproximadamente 3-10Kb. Esta enzima se caracteriza por presentar una alta frecuencia de corte ya que su sitio de reconocimiento es de 4pb (GATC), lo que la hace ideal para generar fragmentos de ADN de distintos tamaños. A su vez, Sau3AI es izoesquizómera de BamHI lo que permite clonar los fragmentos digeridos en el sitio BamHI del vector. Se evaluaron 2 concentraciones finales de enzima (Tabla 10) y distintos tiempos de digestión (3, 5, 7 y 10min a 37°C). Para evidenciar la presencia de ADNasas intrínsecas, se incubó el ADN multigenómico sin el agregado de la enzima de restricción durante 10min a 37°C.

Se evaluó la restricción mediante corrida electroforética en gel de agarosa (ver 3.1.1) y se seleccionó la condición más apropiada para la obtención de fragmentos del tamaño deseado. Se purificaron del gel fragmentos de 3-5Kb y de 5-10Kb utilizando el kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), ya descripto anteriormente (ver 3.1.3).

Tabla 10. Reacción de digestión parcial del ADN multigenómico

Reactivo	Concentración final
ADN multigenómico	27,0ng/µL
Buffer	1x
Sau3AI (Bsp143I)	0,002 U/µL o 0,2U/µL
Volumen final de reacción: 60µL	

Paralelamente, se digirió el plásmido pSEVA232 con la enzima BamHI que reconoce un sitio de 6pb (GGATCC), según se detalla en la Tabla 11.

Se purificó a partir de un gel de agarosa el fragmento de 3,5Kb, correspondiente al plásmido lineal, utilizando el kit comercial QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN), ya descrito con anterioridad (3.1.3).

Tabla 11. Reacción de digestión del vector pSEVA232

Reactivo	Concentración final
pSEVA232	~200ng/μL
Buffer	1x
BamHI	1U/μL
Volumen final de reacción: 30μL	

La digestión se realizó durante 1h a 37°C

Se realizaron 2 reacciones de ligación independientes mediante la acción de la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs® Inc.), según se detalla en la Tabla 12.

Tabla 12. Reacción de ligación del ADN multigenómico al vector pSEVA232

Reactivo	Concentración final
ADN multigenómico (3-5Kb)	10,6ng/μL
pSEVA232	1,8ng/μL
Buffer T4 ligasa	1x
T4 ADN ligasa	2,7U/μL
Volumen final de reacción: 30μL	
ADN multigenómico (5-10Kb)	9,7ng/μL
pSEVA232	1,1ng/μL
Buffer T4 ligasa	1x
T4 ADN ligasa	1,6U/μL
Volumen final de reacción: 50μL	

Las ligaciones se realizaron durante 1h a temperatura ambiente y se inactivaron durante 10min a 65°C

3.3.3. Generación de la multigenoteca en *E. coli* DH5α

Las reacciones de ligación se utilizaron para transformar *E. coli* DH5α según el procedimiento detallado anteriormente (3.1.4), utilizando 20μl de reacción de ligación por cada 100μl de células competentes. Luego de la recuperación se concentraron las

células 5X mediante centrifugación a 12000xg durante 30s, se plaquearon 200µL en LB Km 100µg/mL suplementado con X-gal 20µg/mL y se incubaron durante 16h a 37°C. La cepa DH5α (*lacZAM15*) expresa el péptido ω de la enzima β-galactosidasa el cual es complementado por el péptido α proveniente del vector (*lacZ'*), dando lugar a la enzima funcional por complementación α-ω. La enzima funcional es capaz de degradar el sustrato X-gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) generando el producto 5,5'-Dibromo-4,4'-dicloroindigo, que otorga a las colonias un color azul. Si la secuencia que codifica para el péptido α en el vector se ve interrumpida por un inserto, no se dará la complementación y las colonias serán blancas. Se seleccionaron y re-aislaron en placas de LB Km 100µg/mL aquellas colonias blancas como producto de la interrupción en el vector pSEVA232 de la secuencia que codifica el péptido α, por la presencia de un inserto.

Los clones de la biblioteca multigenómica se picaron con palillos estériles, se ordenaron en placas de 96 pocillos conteniendo 100µL de LB Km 100µg/mL y se incubaron a 25°C durante 16h. Estas placas fueron utilizadas para los ensayos funcionales y posteriormente se les adicionó glicerol a una concentración final de 25% (v/v) y se guardaron a -80°C con el fin de preservar la multigenoteca construida.

Se seleccionaron 10 clones al azar con el fin de verificar la presencia de plásmidos y la existencia de una población heterogénea de éstos. Se recuperaron los plásmidos mediante lisis alcalina como se detalla en 3.1.1 y posteriormente se digirieron con la enzima KpnI según las condiciones detalladas en la Tabla 6. Se compararon los plásmidos y los perfiles de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa como se detalla en 3.1.1.

3.3.4. Análisis funcional

Para poder identificar clones portadores de fragmentos de ADN multigenómico que brinden a la cepa hospedera tolerancia aumentada a distintos metales, se debe establecer su sensibilidad a los mismos. Con esta finalidad, se evaluó cómo *E. coli* se ve afectada en su crecimiento en medio sólido a concentraciones crecientes de distintos iones metálicos. Se evaluó la tolerancia a Ag⁺¹, Co⁺², Cu⁺², Mn⁺², Ni⁺² y Zn⁺² (Anexo). Una vez establecidas las concentraciones adecuadas para el análisis funcional de la multigenoteca, las placas de 96 pocillos fueron transferidas por *replica plater* a las placas conteniendo los distintos metales. También se transfirieron a placas de LB Km

100µg/mL para confirmar la viabilidad de los clones. En todos los ensayos se utilizó como control negativo la cepa *E. coli* DH5α (pSEVA232). Las placas fueron incubadas a 25°C y evaluadas todos los días durante 7 días.

En paralelo, se evaluó la presencia de enzimas capaces de oxidar el Mn^{+2} . Con esta finalidad las placas de 96 pocillos fueron transferidas por *replica plater* a placas de LB Km 100µg/mL suplementadas con 0,25mM de Mn^{+2} y se incubaron a 25°C por 72h. Posteriormente, se detectó la presencia de óxidos de manganeso mediante la utilización del sustrato azul de Leucoberbelina (LBB). La LBB es un colorante órgano-sulfurado que se oxida en presencia de Mn^{+2} a Mn^{+7} , cambiando de color celeste a azul⁶⁰. Se agregó a cada colonia 5µL de LBB 0,04% (m/V) en una solución acuosa de ácido acético 45mM.

También se evaluó la tolerancia de las cepas de *Pseudomonas* sp. UYIF39, UYIF41 y *Pseudomonas putida* KT2440 a concentraciones crecientes de los distintos metales de manera de determinar su potencial como hospederos alternativos para los análisis detallados a continuación. Se evaluó la tolerancia a Ag^{+1} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Ni^{+2} y Zn^{+2} .

3.3.5. Verificación del fenotipo de tolerancia a metales

Los clones con tolerancia aumentada a metales fueron seleccionados y en un ensayo independiente se volvieron a someter a las mismas condiciones con la finalidad de determinar que el fenotipo se mantuviera.

A los clones que verificaron un fenotipo de tolerancia aumentada a metales se les extrajo el ADN plasmídico (ver 3.1.1) y se retransformó el hospedero con dichos plásmidos (ver 3.1.4), para determinar si el fenotipo observado está ligado al vector. Con esta finalidad, las transformantes se plaquearon en las mismas concentraciones de metal utilizadas en el análisis funcional (ver 3.3.4).

Para determinar si la tolerancia a metales de los distintos clones se debían a la presencia de un mismo plásmido, se evaluó la heterogeneidad de las construcciones mediante el análisis de los perfiles de restricción obtenidos por digestión con KpnI (ver Tabla 6)

Finalmente, dado el fenotipo particular de los clones resistentes (pequeñas colonias separadas dentro de los márgenes del inóculo), se evaluó la tasa de aparición de

mutantes espontáneos. Para ello, se partió de cultivos primarios de los distintos clones crecidos en LB Km 50µg/mL durante 16h a 37°C y agitación constante a 200rpm. Como control se utilizó la cepa con el vector pSEVA232. Se realizaron por triplicado diluciones seriadas al décimo (v/v) plaqueándose 20µL en placas de LB con y sin el metal correspondiente. Las placas se incubaron a 25°C hasta ver la aparición de colonias y poder determinar la frecuencia de aparición de células tolerantes en el total de células inoculadas.

4. RESULTADOS

4.1. Construcción de un vector híbrido para la elaboración de genotecas

Como material de partida para la construcción del vector híbrido se utilizaron los plásmidos pSEVA232 y pART2. Como primer paso se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico. Como se muestra en la Figura 5, el perfil electroforético obtenido se corresponde con lo esperado para la presencia de plásmidos. Se observan bandas

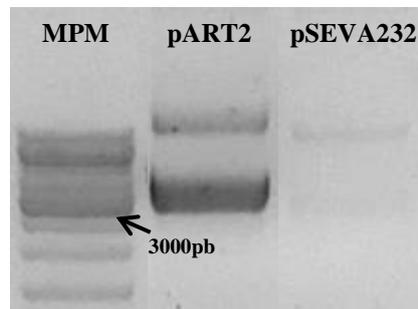


Figura 5. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de las minipreparaciones plasmídicas. MPM: GeneRuler 1Kb DNA Ladder. En cada caso se sembró 5 μ L de la minipreparación

correspondientes a los vectores pART2 y pSEVA232 en distintas conformaciones, pudiendo ser éstas: circular, enrollado y superenrollado a distintos niveles, lo que no permite una aproximación directa de su tamaño con el MPM (ADN lineal). En el caso del plásmido pART2 se obtuvo mayor cantidad de plásmido a partir de un mismo número de células en comparación con el pSEVA232. No se evidenciaron bandas de bajo peso molecular, sugiriendo que la preparación está libre de ARN, y el ADN no presenta signos de degradación. Se puede concluir entonces que se logró obtener ADN de buena calidad y en el caso de pART2 en muy buena cantidad. Igualmente la cantidad y calidad del plásmido pSEVA232 obtenido es suficiente para las siguientes aplicaciones, verificado a *posteriori* por cuantificación en nanodrop (datos no mostrados).

Usando el vector pART2 como molde, se pusieron a punto las condiciones para amplificar la secuencia correspondiente al origen de replicación pCG100. Como se muestra en la Figura 6, para todas las temperaturas de hibridación utilizadas se observó un amplicón de tamaño esperado (1,9Kb). En ninguna de las temperaturas del gradiente

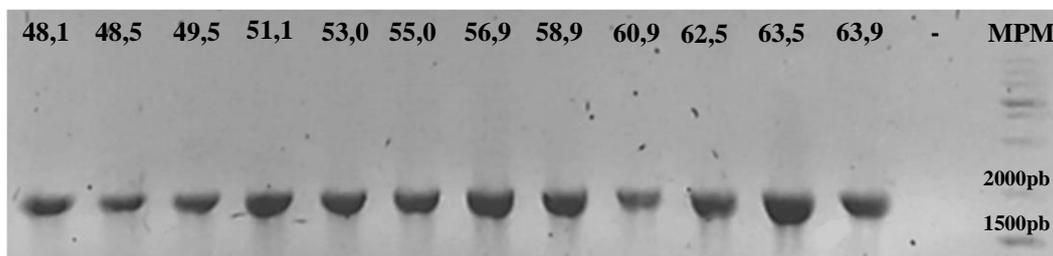


Figura 6. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del origen de replicación pCG100 por PCR. Sobre cada carril se indica la temperatura de hibridación (°C) utilizada en el gradiente. El control negativo (-), corresponde a la mezcla de PCR sin ADN molde. MPM: GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus. En cada caso se sembró 5µL de reacción de PCR.

se identificó amplificación de productos adicionales, indicando especificidad de la reacción. Se seleccionó 63,5°C como temperatura óptima a utilizar en sucesivas amplificaciones, dado que una mayor temperatura asegura una mayor especificidad y que en esta condición se obtuvo mayor cantidad de producto. Si bien se intentaron varias amplificaciones utilizando la enzima Pfu de manera de asegurar la fidelidad de la secuencia amplificada, no se logró obtener el amplicón deseado. Dado que la enzima Taq incorpora un nucleótido erróneo cada 9Kb por ciclo⁶¹, y que el origen de replicación pCG100 tiene 1,9Kb, decidimos continuar con el amplicón obtenido con la

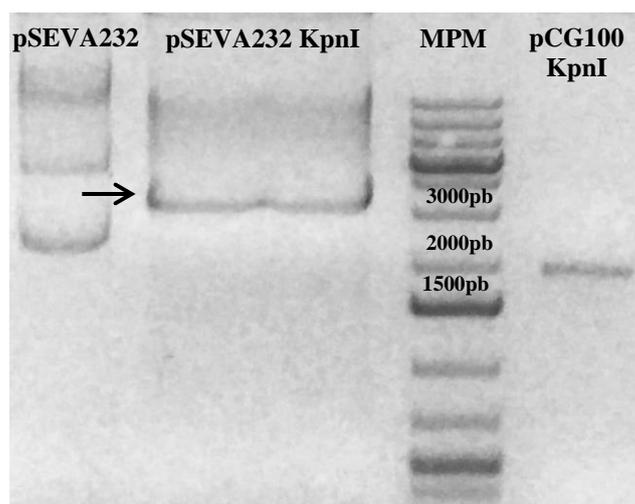


Figura 7. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de la digestión del vector pSEVA232 y del amplicón correspondiente al origen de replicación pCG100. De izquierda a derecha: control del vector sin digerir (5µL), vector digerido con KpnI (30µL), MPM: GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus, producto de PCR digerido y purificado. Se indica con la flecha la banda purificada del vector digerido.

enzima Taq ya que existe una baja probabilidad de que se incorporen nucleótidos erróneos.

El producto de PCR y el vector pSEVA232 se digirieron con la enzima de restricción KpnI. Como se muestra en la Figura 7, el vector sin digerir presenta 3 conformaciones, correspondientes a las descritas con anterioridad, y el vector digerido presenta una banda mayoritaria, indicada por la flecha, del tamaño esperado (3,5Kb). Esta banda mayoritaria corresponde a la conformación lineal del mismo, evidenciando la acción de la enzima de restricción KpnI. Se observa también la banda correspondiente al producto de amplificación del origen de replicación pCG100, previamente digerido y purificado. La banda de 3,5Kb se purificó del gel, obteniendo el vector listo para clonar el origen de replicación.

Luego de la ligación del vector purificado y el producto de amplificación, se podría haber generado el vector híbrido pSEVA232::pCG100 (Figura 8) y se transformaron células DH5 α , seleccionándose colonias blancas en presencia del sustrato X-Gal, posibles clones con el inserto de interés. Se detectaron 37 colonias blancas de las cuales 8 verificaron la presencia del inserto por PCR de colonia (datos no mostrados).

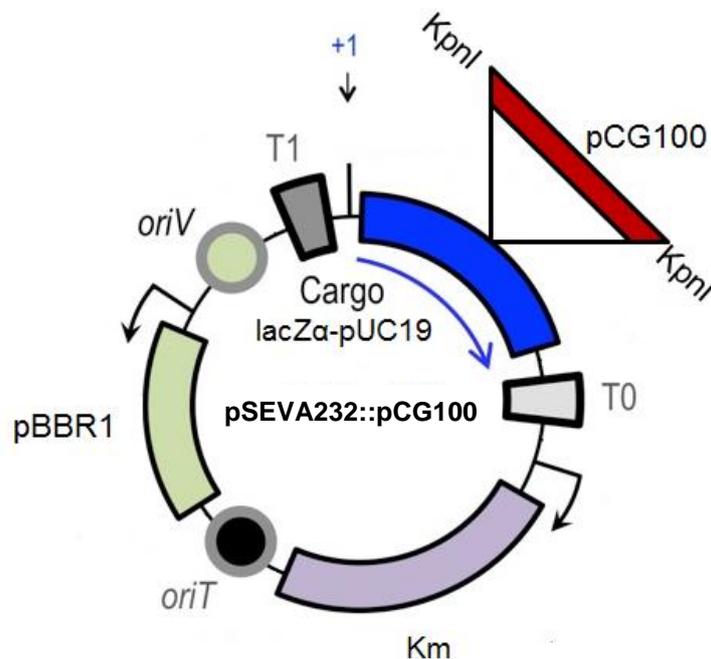


Figura 8. Esquema del vector híbrido pSEVA232::pCG100. Plásmido construido a partir del origen de replicación pCG100 amplificado del pART2 y clonado en el pSEVA232. Modificado de Martínez-García, *et al.*⁵²

En la Figura 9 se muestran los productos de PCR obtenidos a partir de las 8 colonias que verificaron la presencia del inserto de tamaño esperado (1,9Kb). Se puede observar que los amplicones obtenidos presentan el mismo perfil electroforético que los controles positivos de reacción, donde se utilizó como molde el vector pART2 purificado (+) y la cepa que contenía dicho vector (+c). Por lo tanto, se verificó en 8 colonias, de un total de 37, la presencia del posible inserto esperado (origen de replicación pCG100) en el vector construido (pSEVA232::pCG100).

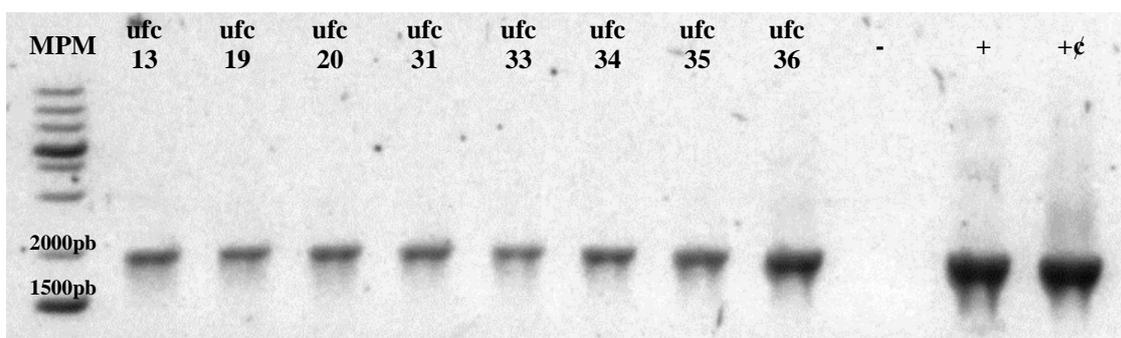


Figura 9. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del origen de replicación pCG100 por PCR de colonia. MPM: GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus. Sobre cada carril se indica el aislamiento utilizado como molde. Los controles positivos (+, +c), corresponden al vector pART2 y la cepa que incluye dicho vector, respectivamente. Control negativo (-), sin ADN molde. En cada caso se sembró 5µL del producto de PCR.

Para verificar que el origen de replicación pCG100 no haya sufrido alguna mutación durante la amplificación que pueda inhabilitar su función, se envió a secuenciar el plásmido de la ufc20. En la Figura A.3 del anexo se muestra el BLAST entre la secuencia del origen de replicación pCG100 clonado en el pSEVA232 y la secuencia presente en el vector pART2 (del cual se partió para la construcción del vector híbrido pSEVA232::pCG100) disponible en la base de datos del NCBI. Se halló un 99% de identidad entre ambas secuencias con un 1% de gaps, que corresponde a 21 gaps en total. Lo mismo se observó una vez secuenciado el pCG100 del pART2 que fue utilizado como material de partida.

4.2. Hospederos alternativos: Selección y puesta a punto de protocolos

Para la selección de hospedadores alternativos en una primera instancia se descartaron las cepas de *Arthrobacter* resistentes al antibiótico a utilizar (Km) o que presentaran plásmidos, ya que podrían ser incompatibles con el plásmido pSEVA232::pCG100.

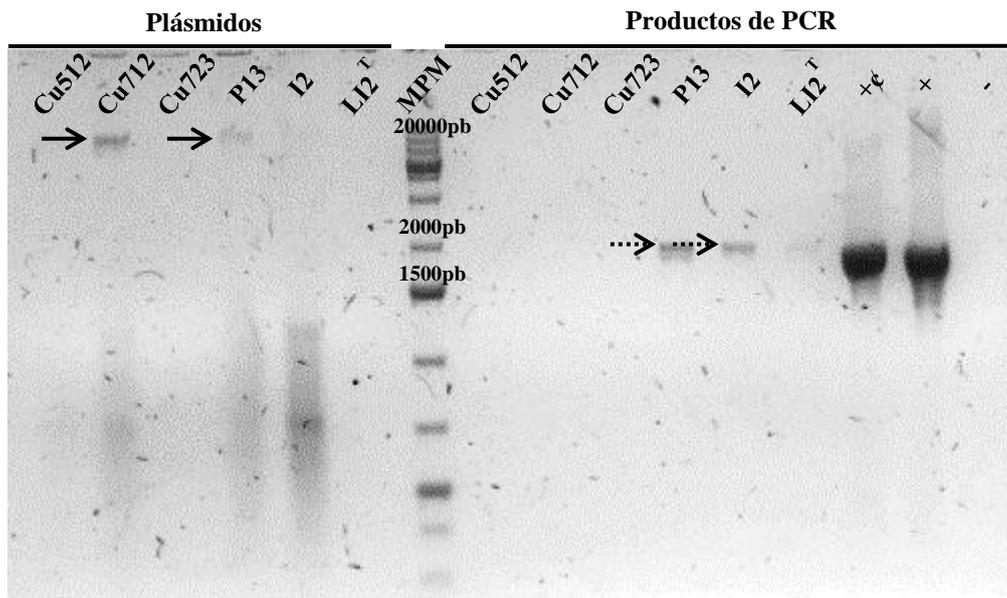


Figura 10. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de minipreparaciones de ADN plasmídico y productos de PCR de colonia utilizando los cebadores para pCG100 de cepas de *Arthrobacter*. Se indica con flechas continuas las bandas correspondientes a posibles plásmidos y flechas punteadas las correspondientes a amplicones. MPM: GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus. En cada caso se sembró 5μL.

En el ensayo de resistencia antibiótica se detectó que las cepas I20, I21, I36 y Co732 presentaban resistencia natural a Km por lo que no se continuó su análisis en busca de plásmidos u orígenes de replicación.

Como se muestra en la Figura 10, tras realizar minipreparaciones de ADN plasmídico, se puede observar la presencia de bandas de alto peso molecular en los carriles de las cepas Cu712 y P13 que podrían evidenciar la presencia de plásmidos. Estas bandas de alto peso molecular podrían deberse también a la co-purificación de ADN genómico, lo cual es habitual en algunas preparaciones plasmídicas. También se observa un degradé de bandas no definidas de bajo peso molecular que sugieren la presencia de ARN. Respecto a la presencia de replicones del tipo pCG100 (que amplifiquen con los cebadores que diseñamos), se puede observar que las cepas P13 e

I2 presentan un amplicón del mismo tamaño que los controles positivos (1,9Kb). Esto indica la posible presencia de un origen de replicación pCG100 o similar. Considerando que P13 podría contener un plásmido y que da lugar a un amplicón con los cebadores diseñados para pCG100 por PCR, es posible que contenga un plásmido que posea dicho origen de repliación. En cuanto a I2, no se descarta la posible presencia de un plásmido que contenga un replicón similar a pCG100 y que por lo tanto resulte incompatible con el plásmido híbrido construido, por más que no se haya evidenciado la presencia de plásmido en la minipreparación.

La Tabla 13 resume los resultados obtenidos para la selección de *Arthrobacter* como hospedero alternativo. En base a la misma se seleccionaron aquellas cepas que no presentaban otros plásmidos con orígenes de replicación similares al pCG100, eran sensibles a Km y presentaban un buen crecimiento a 25°C en LB, testado por el crecimiento en placa. Se seleccionaron: I1, Cu512, Cu712, Cu723 y LI2^T para continuar trabajando

Tabla 13. Selección de hospederos alternativos, *Arthrobacter*

Cepa	Crecimiento 25°C	Resistencia Km(100µg/mL)	Plásmido	PCR pCG100	Seleccionados
I1	+	-	-	-	✓
I2	+	-	-	+	x
I20	+	+	ND*	ND	x
I21	+	+	ND	ND	x
I36	+	+	ND	ND	x
Cu512	+	-	-	-	✓
Cu712	+	-	+	-	✓
Cu723	+	-	-	-	✓
Co732	+	+	ND	ND	x
P13	+	-	+	+	x
LI2 ^T	+	-	-	-	✓

*ND.: No determinado.

Para la selección de *Pseudomonas* como hospedadores alternativos, previo a probar el protocolo de transformación, también se descartaron aquellas cepas que presentaran resistencia intrínseca a Km.

De las cepas propuestas como posibles hospederos de *Pseudomonas* en la Tabla 9, todas presentaron un buen crecimiento a 25°C en LB, testado por siembra directa en placas en dichas condiciones. Sólo UYIF31 fue descartada por presentar resistencia a Km 50µg/mL y 100µg/mL. Se seleccionaron las cepas UYIF39, UYIF41 y KT2440 para continuar trabajando.

Previo a la preparación de células electrocompetentes y electroporación de *Arthrobacter* se evaluó cómo afectaba el medio de recuperación post-electroporación a las células, ya que podría afectar la sobrevivencia de nuestra cepa y en el protocolo publicado⁵⁹ no queda claro el medio utilizado. Se seleccionó la cepa II para determinar las curvas de crecimiento en medio LB suplementado con distintos compuestos. Como se muestra en la Figura 11, II presenta un perfil de crecimiento en los 4 medios. Se determinó un tiempo de generación de aproximadamente 3h para la cepa en las distintas condiciones. Sin embargo, para los medios LB y LB suplementado con Mg⁺²/Ca⁺² no se evidencia una fase de latencia de 2h como en los otros medios. En LB suplementado con Mg⁺²/Ca⁺² se alcanza una fase estacionaria con mayor cantidad de células, de acuerdo a la densidad óptica relativa a las curvas correspondientes a los otros medios.

Al identificar que ninguno de los componentes agregados al LB afectaba el

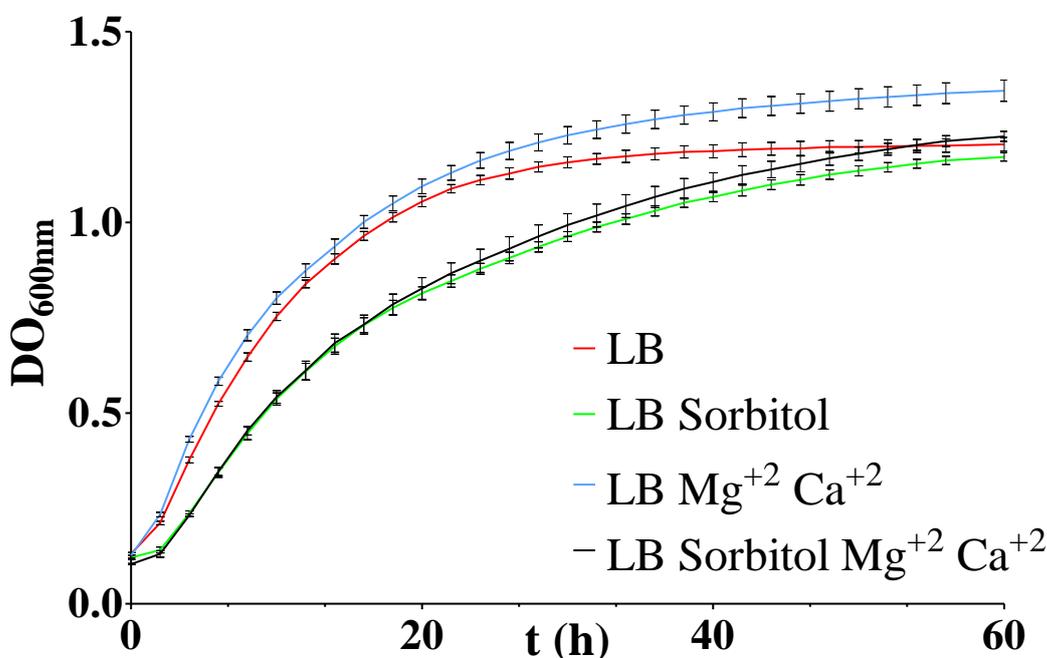


Figura 11. Curvas de crecimiento de *Arthrobacter* II. LB (Triptona 10g/Extracto de levadura 5g/NaCl 4g). LB Sorbitol (0,5M) CaCl₂ (20mM) MgCl₂ (20mM). LB Sorbitol. LB CaCl₂ MgCl₂.

correcto desarrollo de las células se decidió continuar con LB Sorbitol como el medio de recuperación post electroporación elegido, dado que el mismo fue testeado y otorgó mejores rendimientos de electroporación, en el protocolo optimizado con el que se trabaja^{58,59}.

Posteriormente se ensayaron distintas sustancias para facilitar la entrada del plásmido pART2 al debilitar la pared bacteriana y distintas concentraciones de ADN a la hora de electroporar. Los ensayos de electroporación con el plásmido pART2 y todas las cepas de *Arthrobacter* (I1, Cu512, Cu712, Cu723 y LI2^T) evaluadas no permitieron obtener clones resistentes a Km. El protocolo de electroporación fue evaluado usando distintos agentes debilitadores de pared celular (penicilina G, lisozima o glicina) y distintas cantidades de plásmido.

Se verificó la sobrevivencia de las células luego de los tratamientos con el fin de verificar que éste no tuviera un efecto deletéreo que pudiera explicar la ausencia de transformantes. La penicilina G en las concentraciones utilizadas resultó mortal para las cepas mientras que tanto la lisozima como la glicina no afectaron la viabilidad (datos no mostrados).

Dado que no se logró introducir el vector pART2 ni la construcción pSEVA232::pCG100 por electroporación, se recurrió a la conjugación triparental utilizando el vector híbrido que presenta el origen de transferencia del pSEVA232. Con esta aproximación tampoco se logró transferir la construcción a la cepa de *Arthrobacter livingstonensis* LI2^T.

El protocolo de transformación utilizado en las cepas de *Pseudomonas* logró introducir el vector pSEVA232 eficientemente en los distintos hospederos ensayados. (Tabla 14). Estas eficiencias son adecuadas para la construcción de bibliotecas, sugiriendo que las *Pseudomonas* antárticas podrían ser utilizadas como hospederos alternativos.

Tabla 14. Eficiencia del protocolo de transformación, *Pseudomonas*

Cepa	Eficiencia (ufc/μg ADN)
UYIF39	10 ⁵
UYIF41	10 ⁶
KT2440	10 ⁶

4.3. Extracción de ADN genómico de aislamientos endolíticos antárticos

Como se muestra en la Figura 12 se logró obtener ADN genómico de la mayoría de los aislamientos de *Arthrobacter*. Si bien de los aislamientos Ag731, P24 y P25 no se obtuvo ADN suficiente, de los demás aislamientos se consiguió ADN de calidad aceptable para la construcción de multigenotecas, ya que si bien la degradación es parcial, hay ADN de alto peso molecular ($> 10\text{Kb}$). Los datos obtenidos mediante cuantificación espectrofotométrica (Tabla 15) coinciden con los observados en el gel. Todas las muestras presentaron un coeficiente $260/180 \geq 1,8$ (datos no mostrados) sugiriendo que no hay contaminación significativa de proteínas. En base a estos resultados se descartaron las muestras Ag731, P24 y P25.

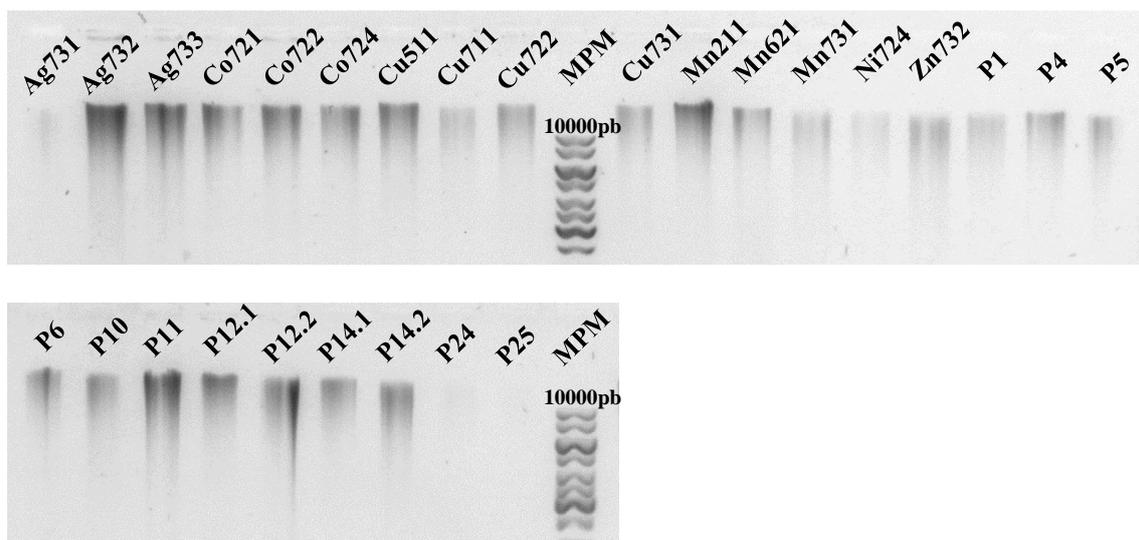


Figura 12. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de las extracciones de ADN genómico de los microorganismos endolíticos antárticos. Se indica sobre cada carril el nombre de la cepa. MPM: GeneRuler 1Kb DNA Ladder. En cada caso se sembró 100ng de ADN genómico.

Tabla 15. Concentración de los ADN genómicos obtenidos a partir de los aislamientos endolíticos antárticos

Cepa	Concentración (ng/μL)
Ag 731	15,6
Ag 732	87,0
Ag733	236,3
Co721	102,3
Co722	50,9
Co724	96,0
Cu511	52,8
Cu711	58,6
Cu722	67,8
Cu731	83,0
Mn211	206,3
Mn621	96,2
Mn731	29,4
Ni724	52,8
Zn732	59,0
P1	94,3
P4	117,4
P5	107,0
P6	175,1
P10	97,2
P11	224,7
P12	139,6
P14	129,0
P24	51,1
P25	19,8
P33	57,7

4.4. Construcción de la multigenoteca

Dado que el vector híbrido construido no pudo replicarse en cepas de *Arthrobacter*, se decidió realizar la multigenoteca utilizando el vector pSEVA232 y *E. coli* DH5α como hospedero. Se seleccionó este hospedero porque no se contaba aún con la puesta a punto de la transformación de las cepas de *Pseudomonas*.

Con el objetivo de obtener fragmentos de ADN multigenómico del tamaño deseado (3-10Kb), se mezclaron los ADNs genómicos de 26 de las cepas y se puso a

punto la digestión con la enzima de restricción Sau3AI, optimizando los tiempos de digestión y la concentración de enzima utilizada.

Como se muestra en la Figura 13, al digerir con 0,002U/ μ L el perfil electroforético del ADN mezcla fue similar al del control sin digerir. Al aumentar la concentración de enzima a 0,2U/ μ L se observa digestión parcial en todos los tiempos evaluados, obteniéndose fragmentos de menor tamaño a medida que el tiempo de incubación aumenta. En base a estos resultados se seleccionó 3 minutos de incubación a 37°C con 0,2U/ μ L de Sau3AI como las condiciones óptimas de digestión.

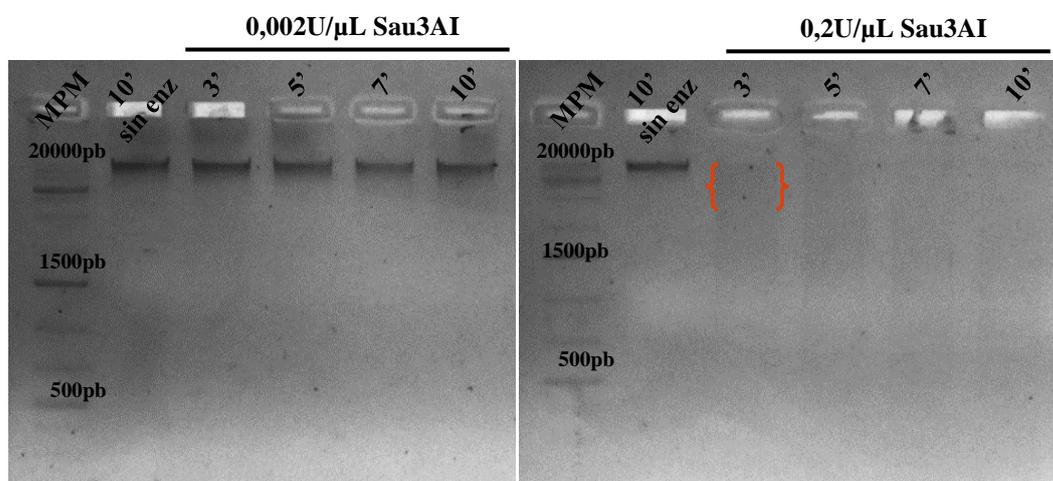


Figura 13. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de la optimización de la digestión parcial del ADN multigenómico con Sau3AI. Sobre cada carril se indica el tiempo de incubación (minutos) y si se utilizó enzima. Las llaves indican la zona a purificar (3-10Kb). MPM: GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus. En cada caso se sembró 10 μ L de mezcla de digestión.

El ADN multigenómico se clonó en el sitio BamHI del vector pSEVA232 y se transformaron células de *E. coli* DH5 α , obteniendo un total de 275 colonias blancas en presencia del sustrato X-Gal. Esta biblioteca fue sometida al análisis funcional.

4.5. Análisis funcional

El análisis se centró en la búsqueda de clones tolerantes a metales o que produjeran pigmentos visibles a simple vista o bajo radiación UV

Previo a la evaluación de tolerancia de la biblioteca construida, se estableció una línea de base a partir de la cual la cepa hospedera no tolerara los metales ensayados. Determinamos que *E. coli* DH5 α tolera concentraciones elevadas de metales, fijando las concentraciones adecuadas para el *screening* funcional en: 0,15 mM Ag⁺¹, 2,5mM Co⁺², 5mM Cu⁺², 60mM Mn⁺², 5mM Ni⁺² y 7,5mM Zn⁺².

Un ensayo similar se hizo para *Pseudomonas*, con el objetivo a futuro de construir y buscar, en bibliotecas en estos microorganismos, fenotipos de tolerancia a partir de aislamientos endolíticos. No se lograron establecer concentraciones adecuadas para un análisis funcional. Como se muestra en la Tabla 16, las cepas estudiadas presentan tolerancia a los distintos metales en las concentraciones ensayadas. No se encontró ninguna que fuera sensible en su totalidad a los metales testeados pero delimita una línea de base sobre la cual seguir trabajando para identificar los máximos de tolerancia para estos posibles hospederos alternativos.

Tabla 16. Tolerancia a metales, *Pseudomonas*

Cepa	Ag ⁺¹ 0,2mM	Co ⁺² 2,5mM	Cu ⁺² 2,5mM	Mn ⁺² 2,5mM	Ni ⁺² 2,5mM	Zn ⁺² 2,5mM
UYIF39	-	-	+	+	+	-
UYIF41	-	+/-	+	+	+	+/-
KT2440	-	-	+	+	+	+

El *screening* funcional de tolerancia a metales de los clones de la biblioteca multigenómica identificó 5 aislamientos tolerantes a Co⁺² y 5 a Ag⁺¹ (Tabla 17). Con la finalidad de comprobar el fenotipo de tolerancia observado, los clones se replaquearon en los medios de cultivo conteniendo las sales de los iones metálicos en estudio y se observó que en Ag⁺¹ no volvieron a mostrar el fenotipo de tolerancia. Sin embargo, las cepas tolerantes a Co⁺² mantuvieron su tolerancia al metal. Ninguno de los 275 clones presentó actividad manganeso oxidasa ni tampoco producción de pigmentos.

Tabla 17. Ensayo de tolerancia a metales de los 275 clones de la multigenoteca.

Metal	Tolerantes
0,15mM Ag ⁺¹	5
2,5mM Co ⁺²	5
5mM Cu ⁺²	0
5mM Ni ⁺²	0
7,5mM Zn ⁺²	0

Con la finalidad de verificar que los aislamientos poseían construcciones distintas y que no fueran clones entre sí, se evaluó el perfil de restricción de los 5 plásmidos tolerantes a Co y del plásmido tolerante a Ag. Como muestra la Figura 14, los plásmidos presentan distintos perfiles de restricción validando el desarrollo de la multigenoteca. Dado que la enzima utilizada (KpnI) digiere el vector en un único sitio, a no ser que el fragmento de ADN multigenómico clonado contenga un sitio de reconocimiento para esta enzima, esperamos obtener el plásmido lineal. Como se observa en la Figura 14, las digestiones presentan una banda de mayor peso molecular que la correspondiente al vector pSEVA232 digerido (3,5Kb). Esto concuerda con lo esperado ya que se clonaron fragmentos de entre 3 a 10Kb aproximadamente.

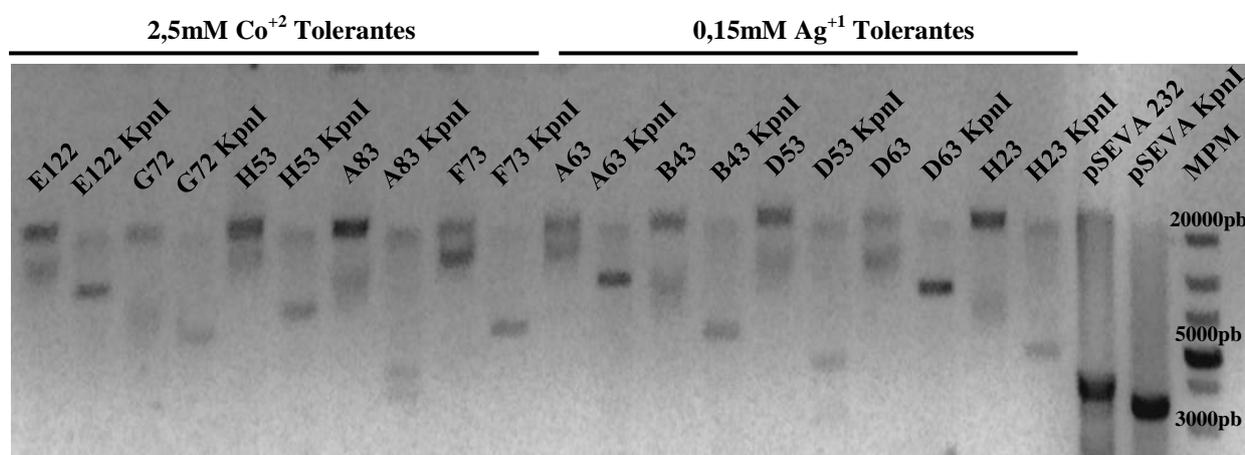


Figura 14. Perfil de electroforesis en gel de agarosa de las construcciones presentes en clones de la biblioteca que presentaron tolerancia a metales, y su perfil de restricción. MPM: GeneRuler 1Kb DNA Ladder Plus. En cada caso se sembró 5µL del vector o mezcla de digestión.

Para corroborar que la tolerancia a Co^{+2} se debía a la presencia de los plásmidos y no a eventos fortuitos, éstos se utilizaron para re-transformar *E. coli* y comprobar la ganancia de función. Las cepas conteniendo los plásmidos pSEVA232_G72, H53 y F73 recuperaron el fenotipo de tolerancia, mientras que las cepas conteniendo los plásmidos pSEVA232_E122 y A83 no lo recuperaron.

Interesantemente, las cepas conteniendo los plásmidos pSEVA232_G72, H53 y F73 al someterlas al metal no crecían de manera homogénea en la gota dispuesta en la placa. Como se muestra en la Figura 15(I), dentro de la gota crecían colonias pequeñas que sugerían la aparición de mutantes espontáneos de *E. coli* DH5α. Se decidió entonces calcular la frecuencia de aparición de estas colonias con respecto al total de células sembradas para las cepas G72, H53 y F73. Como se muestra en la Figura 15(II), la frecuencia de aparición de colonias resistentes a Co^{2+} con respecto al total de células

plaqueadas fue del orden de 10^{-8} - 10^{-9} aproximadamente. No se evidenció la aparición de ninguna colonia en la gota del control negativo (pSEVA232), lo que sugiere que el fenotipo observado está asociada a la presencia de los insertos clonados.

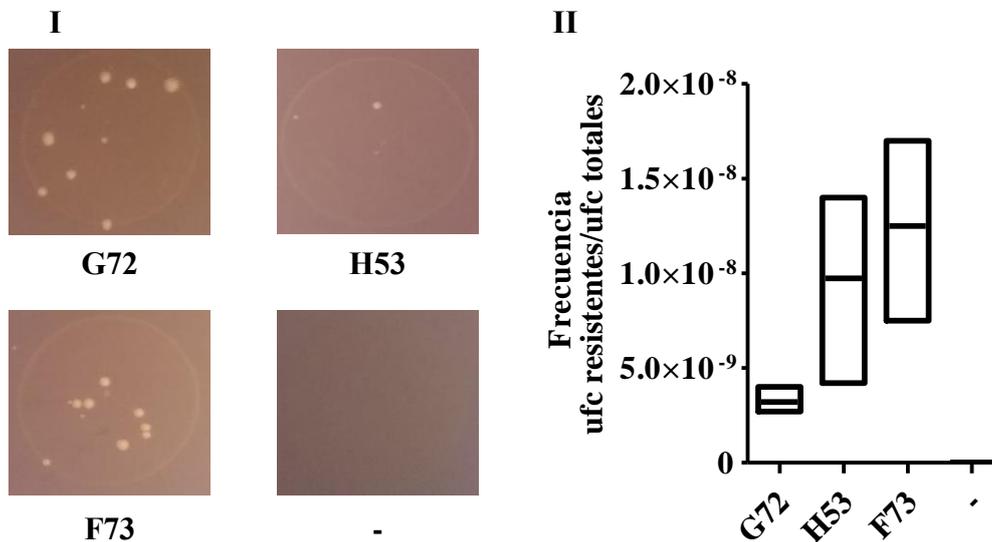


Figura 15. Colonias tolerantes a Co^{+2} . **I.** Clones espontáneos tolerantes a Co^{+2} 2,5mM en una gota de 20 μL de cultivo incubado 16h de los aislamientos obtenidos y el control negativo. El ensayo se realizó por triplicado. **II.** Frecuencia promedio \pm mínimo y máximo de aparición de clones tolerantes a Co^{+2} 2,5mM de los aislamientos G72, H53 y F73 de la biblioteca multigenómica y del control negativo (DH5 α conteniendo el vector pSEVA232).

5. DISCUSIÓN

5.1. Vector híbrido y hospederos alternativos para multigenotecas

Como punto de partida de este trabajo se propuso la construcción de un vector híbrido replicable en *Arthrobacter* (Gram positiva), *E. coli* y *Pseudomonas* (Gram negativas) con el fin de minimizar el sesgo ocasionado al utilizar un único hospedero a la hora de construir una genoteca funcional, cuyas limitantes van desde la correcta expresión génica hasta la compatibilidad metabólica de los productos^{38,41,42}.

Si bien se logró construir el vector híbrido pSEVA232::pCG100, conteniendo los orígenes pBBR1 y pCG100, no fue posible transformar *Arthrobacter* con este plásmido. Tampoco se consiguió con el plásmido pART2, el cual fue utilizado como control. Considerando que se tomaron como referencia protocolos de transformación en los que se habían testeado múltiples condiciones y donde se lograron eficiencias del orden del 10^5 - 10^9 utilizando el vector pART2^{58,59}, las posibilidades son: *i*) no se logró inducir el estado de competencia en estos aislamientos introduciendo el ADN foráneo al interior celular, *ii*) el origen de replicación pCG100 no es reconocido. Una posible explicación para todos estos sesgos podría ser el hecho de que en este trabajo se utilizaron aislamientos antárticos de *Arthrobacter*. Quizá estos aislamientos, por ser microorganismos psicrotolerantes, tengan propiedades particulares y como resultado los protocolos diseñados para inducción de competencia y transformación en *Arthrobacter* mesófilas no son apropiados. Lamentablemente no se contó con las cepas de los trabajos publicados para utilizarlas como controles y así corroborar la función del vector pART2 y la construcción pSEVA232::pCG100.

Las propiedades descriptas también podrían explicar que estos aislamientos no reconozcan el origen de replicación pCG100 y por lo tanto éste no es funcional en los mismos. Este origen de replicación se ha reportado en varios artículos como un origen de replicación reconocido en el género *Arthrobacter* y por este motivo fue seleccionado. También podría deberse, dada la ubicuidad de las endonucleasas^{62,63}, a que estos microorganismos posean mecanismos particulares de defensa contra ADN foráneo que

reconozcan el vector, degradándolo y afectando su viabilidad en la célula a pesar de estar metilado.

Otra posible explicación sería que el origen de replicación pCG100 presente en el plásmido de partida (pART2) haya sufrido alguna modificación y no sea funcional o que en el proceso de construcción del vector híbrido se hayan generado modificaciones en esta secuencia. Mediante secuenciación del origen de replicación pCG100 clonado en el vector híbrido, determinamos que éste presenta una identidad de secuencia de 99% con la secuencia depositada en el NCBI⁵⁴. Estas diferencias a nivel de secuencia podrían implicar una pérdida de función. Mediante la secuenciación del origen de replicación pCG100 presente en el vector pART2 (vector de partida y que nos fue cedido por el autor Mihãşan, M.), determinamos que también presenta diferencias con la secuencia depositada en la base de datos. Ambas secuencias presentaron un 100% de identidad, sugiriendo que las modificaciones no surgieron como consecuencia de la manipulación, sino que ya se encontraban presentes en el plásmido pART2 de partida.

Las causas que podrían explicar las modificaciones presentes en la secuencia pCG100 del pART2, y consecuentemente de la construcción realizada en este trabajo, es la frecuente inestabilidad de los plásmidos híbridos recién construidos. A nivel estructural se dan reordenamientos y con frecuencia pérdida de material plasmídico por supresiones⁶⁴, o dada la imposibilidad de corregir el número de copias ante la incompatibilidad de replicones, se produce un aumento en la probabilidad de mutaciones⁶⁵. A esto se suma la tendencia a pérdida de plásmidos por desbalances energéticos en el microorganismo. Destinar recursos al mantenimiento de elementos que no son usados u ocasionan conflictos por los recursos que la bacteria no puede superar, es una situación que ésta debe resolver. Como resultado, es habitual la aparición de mutaciones en el origen de replicación de manera de ajustar el número de copias o eventualmente eliminarlo a futuro⁶⁵.

Interesantemente, se evidenció la presencia de plásmidos en varias de las cepas de *Arthrobacter* analizadas, e incluso, para la cepa P13, se podrían correlacionar la presencia de un plásmido con la amplificación de una posible secuencia pCG100. Esto sugiere que plásmidos con un origen de replicación similar al pCG100 estarían presentes en aislamientos de *Arthrobacter* antárticos sugiriendo la viabilidad de este tipo de replicones. Curiosamente, este tipo de origen de replicación fue aislado originalmente de un plásmido de *Corynebacterium glutamicum* distribuido en múltiples

cepas⁶⁶⁻⁶⁹, lo que sugiere una amplia distribución y funcionalidad de este replicón a nivel global y de géneros, ya que no sólo estaría limitada a *Corynebacterium* sp. en la naturaleza.

Es destacable la presencia de plásmidos en aislamientos antárticos (materia prima para encontrar posibles orígenes de replicación) dado que no es infrecuente encontrarse con ellos, aunque depende significativamente de las condiciones de cultivo⁷⁰, llegándose a estudiar múltiples aislamientos sin hallar plásmido alguno⁷¹.

5.2. Construcción de la multigenoteca y análisis funcional

Teniendo en cuenta que la biblioteca construida consta de 275 clones y que se partió de fragmentos entre 3-10Kb, podemos estimar una cobertura de $0,83 \times 10^3$ - $2,75 \times 10^3$ Kb. Si consideramos un genoma bacteriano promedio como el de *E. coli* que ronda los 4×10^3 Kb⁷², podemos estimar que la multigenoteca construida tendría una cobertura equivalente 20-70% de un genoma bacteriano. Escalando a los 22 genomas utilizados, la cobertura total sería un escaso 1-3%. Sin embargo, a pesar de la baja cobertura, en la multigenoteca construida se hallaron 3 clones tolerantes a Co^{+2} .

Interesantemente, aquellos clones tolerantes a Co^{+2} presentaron un fenotipo crecimiento particular en presencia del metal, ya que presentaba pequeñas colonias aisladas dentro de la gota de cultivo sembrada. Pudimos determinar que este fenotipo estaba estrechamente ligado a la presencia del ADN multigenómico. Dicho fenotipo, observado en bajas frecuencias, podría deberse a mutaciones dentro del inserto que ajustara un promotor ajeno a *E. coli* DH5 α facilitando la lectura por la maquinaria de transcripción del hospedero o ajustando el uso de codones para sintetizar una proteína funcional.

El daño ocasionado por cobalto en las células se da al interferir con funciones relacionadas a proteínas con grupos Fe/S o a nivel oxidativo. Los mecanismos de tolerancia más comunes se pueden clasificar en tres grupos: bombas de eflujo que expulsan el metal, factores que interaccionen regulando los procesos de biogénesis de proteínas Fe/S o bien limitar la captación de cobalto y así evitar la incorporación de éste^{73,74}.

De los mecanismos descritos el más plausible de estar presente en los plásmidos que otorgaron una mayor tolerancia al metal, son genes asociados bombas de eflujo. Si bien las secuencias que las codifican varían en tamaño y habitualmente están compuestos por varios genes, éstos suelen estar en la misma región genómica. A su vez también hay bombas de eflujo codificadas por un único gen⁷⁵. Esto sugiere que este mecanismo podría encontrarse en los plásmidos identificados. A lo dicho se suma la existencia de antecedentes de bombas de eflujo que median las concentraciones intracelulares tóxicas de metales⁷⁵⁻⁷⁷.

Cabe destacar que la fisiología y el relacionamiento de las bacterias con su ambiente están estrechamente vinculadas, al punto de desarrollar evolutivamente adaptaciones que les permite potenciar su *fitness* biológico. Teniendo en cuenta el ambiente polar y la relación con los minerales de las rocas, tales condiciones podrían moldear determinados rasgos de manera novedosa^{78,79}.

Este trabajo partió de aislamientos de *Arthrobacter* con resistencia aumentada a metales²⁸, la cual fue definida en base a reportes previos donde se establecieron concentraciones de diversos metales de manera de poder clasificar los microorganismos en base a las mismas. Nunca se planteó que hospederos como *E. coli* o *Pseudomonas* pudieran tolerar concentraciones extremadamente altas de metales, mucho más altas que las presentadas por las cepas endolíticas. Sin embargo, utilizar un hospedador con alta tolerancia no influyó en el análisis funcional al buscar un mecanismo de tolerancia proveniente de las mismas ya que se logró identificar clones con resistencia aumentada.

6. CONCLUSIONES & PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se logró diseñar una estrategia adecuada para construir el vector híbrido pSEVA232::pCG100. Éste sumaría las ventajas del uso del vector modular pSEVA232 y la incorporación del origen de replicación para bacterias Gram positivas, pCG100, además del que ya tenía para Gram negativas, pBBR1. Si bien no se logró replicar este vector en las cepas antárticas de *Arthrobacter*, para poder descartar que se deba a particularidades de los aislamientos psicotolerantes deberíamos contar con cepas de *Arthrobacter* donde previamente se ha demostrado la funcionalidad del vector pART2. De esta manera podremos realizar en paralelo los protocolos de inducción de competencia y transformación y determinar si es un efecto cepa-específico o si se debe a que el vector pART2 de partida presentaba modificaciones que afectan su funcionalidad. Hemos solicitado a los autores las cepas previamente reportadas pero no hemos conseguido aún ninguna de ellas.

Como perspectiva a futuro, se plantea la amplificación del posible origen de replicación pCG100 del plásmido críptico de la cepa de *Arthrobacter* P13, que pueda ser utilizado en la construcción del vector híbrido utilizando la misma estrategia planteada en este trabajo. También sería interesante evaluar si el plásmido críptico *per se* es replicable en los distintos aislamientos antárticos de *Arthrobacter*, también en *Pseudomonas* y *E. coli*. Si bien su uso como herramienta molecular implicaría conocer su secuencia completa, conocer su estabilidad estructural y de segregación en los distintos hospederos, de ser éste un plásmido híbrido podríamos cuestionarnos evaluar estos parámetros y plantearnos su modificación para convertirlo en un plásmido apropiado para el clonado, de manera de poder utilizarlo en la construcción de bibliotecas multigenómicas/metagenómicas.

Podemos concluir que se construyó una multigenoteca en *E. coli* de 275 clones, conteniendo aproximadamente $0,83 \times 10^3$ - $2,75 \times 10^3$ Kb de información donde se identificaron tres clones (G72, H53 y F73) que presentaron tolerancia a Co^{+2} . Se verificó que la tolerancia era otorgada por la presencia del plásmido de la multigenoteca, corroborando la hipótesis de que en el genoma de dichas bacterias se encuentran genes de tolerancia a metales. Como perspectiva nos planteamos transformar las cepas de *Pseudomonas* con estas construcciones y determinar si en estos hospederos

también otorgan resistencia a Co^{2+} . Se secuenciarán estas construcciones, las cuales serán analizadas en búsqueda de genes que pudieran explicar el fenotipo observado.

También planteamos ampliar la biblioteca de manera de tener una mejor cobertura y a la vez someter a la biblioteca a nuevos ensayos con el fin de aumentar las probabilidades de hallar funciones novedosas. Dada la eficiencia de transformación obtenida en *Pseudomonas* psicotolerantes, también podría pensarse a futuro su utilización como hospederos alternativos.

De acuerdo al potencial que presentan los microorganismos endolíticos al constituir una interfaz activa entre la biología y la geología, continuar estudiando los procesos que allí se desarrollan podría dar lugar a múltiples aplicaciones biotecnológicas. Puntualmente, respecto a este trabajo quedan abiertas múltiples alternativas para continuar investigando que se detallaron anteriormente.

Para finalizar, retomando el objetivo general planteado para esta tesis, se puede concluir que se ha aportado un granito de arena más al conocimiento general de las comunidades endolíticas de ambientes fríos así como las técnicas de bioprospección que pueden ser utilizadas para su análisis.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Margesin, R. & Schinner, F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *J. Biotechnol.* **33**, 1–14 (1994).
2. D'Amico, S., Collins, T., Marx, J. C., Feller, G. & Gerday, C. Psychrophilic microorganisms: Challenges for life. *EMBO Rep.* **7**, 385–389 (2006).
3. Cavicchioli, R. *et al.* Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microb. Biotechnol.* **4**, 449–460 (2011).
4. Cavicchioli, R., Siddiqui, K. S., Andrews, D. & Sowers, K. R. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 253–261 (2002).
5. Feller, G. & Gerday, C. Psychrophilic enzymes : Hot topics in cold adaptation. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 200–208 (2003).
6. Feller, G. & Gerday, C. Psychrophilic enzymes : molecular basis of cold adaptation. *C. Cell. mol. life sci* **53**, 830–841 (1997).
7. Ferrés, I., Amarelle, V., Noya, F. & Fabiano, E. Identification of Antarctic culturable bacteria able to produce diverse enzymes of potential biotechnological interest. *Adv. Polar Sci.* **26**, 71–79 (2015).
8. Cuesta, L. Astrobiología: Universo y vida. *Zoé - Rev. Astrobiol.* **1**, 1–32 (2011).
9. Walker, J. J. & Pace, N. R. Endolithic Microbial Ecosystems. *Annu. Rev. Microbiol.* **61**, 331–347 (2007).
10. Wierzchos, J., de los Ríos, A. & Ascaso, C. Microorganisms in desert rocks: The edge of life on Earth. *Int. Microbiol.* **15**, 173–183 (2012).
11. Friedmann, E. I. & Ocampo, R. The antarctic cryptoendolithyc ecosystem: Relevance to exobiology. *Orig. Life* **14**, 771–776 (1984).
12. Golubik, S., Friedmann, I. & Schneider, J. The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganism. *J. Sediment. Petrol.* **51**, 475–478 (1981).
13. De Los Ríos, A., Wierzchos, J., Sancho, L. G. & Ascaso, C. Exploring the physiological state of continental Antarctic endolithic microorganisms by

- microscopy. *FEMS Microbiol. Ecol.* **50**, 143–152 (2004).
14. Cunrath, O., Geoffroy, V. A. & Schalk, I. J. Metallome of *Pseudomonas aeruginosa*: a role for siderophores. *Environ. Microbiol.* **18**, 3258–3267 (2016).
 15. Williams, R. J. P. & Fraústo Da Silva, J. J. R. Evolution was chemically constrained. *J. Theor. Biol.* **220**, 323–343 (2003).
 16. Cameron, V., House, C. H. & Brantley, S. L. A first analysis of metallome biosignatures of hyperthermophilic archaea. *Archaea* **2012**, 1–12 (2012).
 17. Barton, L. L. *et al.* The bacterial metallome: Composition and stability with specific reference to the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *BioMetals* **20**, 291–302 (2007).
 18. Heldal, M., Norland, S. & Tumyr, O. X-ray microanalytic method for measurement of dry matter and elemental content of individual bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1251–1257 (1985).
 19. Krezel, A. Metal Ions in Life Sciences, Vol. 12: Metallomics and the Cell. Edited by Lucia Banci. *ChemBioChem* **15**, 473–474 (2014).
 20. Guerra, A. J. & Giedroc, D. P. Metal site occupancy and allosteric switching in bacterial metal sensor proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **519**, 210–222 (2012).
 21. Waldron, K. J. & Robinson, N. J. How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 25–35 (2009).
 22. Outten, C. E. & O’Halloran, T. V. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science (80-.)*. **292**, 2488–2492 (2001).
 23. Gadd, G. M. Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* **156**, 609–643 (2010).
 24. Spadafora, A., Perri, E., Mckenzie, J. A. & Vasconcelos, C. Microbial biomineralization processes forming modern Ca:Mg carbonate stromatolites. *Sedimentology* **57**, 27–40 (2010).
 25. Chan, Y., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Pointing, S. B. & Farrell, R. L. Functional ecology of an Antarctic Dry Valley. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 8990–8995 (2013).
 26. Roldán, M., Ascaso, C. & Wierzchos, J. Fluorescent fingerprints of endolithic

- phototrophic cyanobacteria living within halite rocks in the atacama desert. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2998–3006 (2014).
27. Matthes, U., Turner, S. J. & Larson, D. W. Light Attenuation by Limestone Rock and Its Constraint on the Depth Distribution of Endolithic Algae and Cyanobacteria. *Int. J. Plant Sci.* **162**, 263–270 (2012).
 28. Carrasco, V. Análisis y caracterización de una colección de bacterias endolíticas cultivables de origen antártico. (Universidad de la República (Uruguay), 2016).
 29. Dieser, M., Greenwood, M. & Foreman, C. M. Carotenoid Pigmentation in Antarctic Heterotrophic Bacteria as a Strategy to Withstand Environmental Stresses. *Arctic, Antarct. Alp. Res.* **42**, 396–405 (2010).
 30. Nair, S., Chandramohan, D. & Loka Bharathi, P. A. Differential sensitivity of pigmented and non-pigmented marine bacteria to metals and antibiotics. *Water Res.* **26**, 431–434 (1992).
 31. Ekkers, D. M., Cretoiu, M. S., Kielak, A. M. & Van Elsas, J. D. The great screen anomaly-a new frontier in product discovery through functional metagenomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1005–1020 (2012).
 32. Curtis, T. P. & Sloan, W. T. Prokaryotic diversity and its limits: Microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 221–226 (2004).
 33. Nichols, D. Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol. Ecol.* **60**, 351–357 (2007).
 34. Staley, J. T. & Konopka, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 321–346 (1985).
 35. Torsvik, V. & Øvreås, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **5**, 240–245 (2002).
 36. Delavat, F. *et al.* Amylases without known homologues discovered in an acid mine drainage: Significance and impact. *Sci. Rep.* **2**, 1–6 (2012).
 37. Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D. & Handelsman, J. Metagenomics: Genomic Analysis of Microbial Communities. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 525–552 (2004).

38. Taupp, M., Mewis, K. & Hallam, S. J. The art and design of functional metagenomic screens. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 465–472 (2011).
39. Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J. & Goodman, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* **5**, R245–R249 (1998).
40. Vester, J. K., Glaring, M. A. & Stougaard, P. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles* **19**, 17–29 (2015).
41. Liebl, W. *et al.* Alternative hosts for functional (meta)genome analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 8099–8109 (2014).
42. Gabor, E. M., Alkema, W. B. L. & Janssen, D. B. Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. *Environ. Microbiol.* **6**, 879–886 (2004).
43. Martinez, A. *et al.* Genetically Modified Bacterial Strains and Novel Bacterial Artificial Chromosome Shuttle Vectors for Constructing Environmental Libraries and Detecting Heterologous Natural Products in Multiple Expression Hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2452–2463 (2004).
44. McMahon, M. D., Guan, C., Handelsman, J. & Thomas, M. G. Metagenomic analysis of *Streptomyces lividans* reveals host-dependent functional expression. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3622–3629 (2012).
45. Zhi, X. Y., Li, W. J. & Stackebrandt, E. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 589–608 (2009).
46. Cacciari, I. & Lippi, D. *Arthrobacters*: Successful arid soil bacteria. A Review. *Arid Soil Res. Rehabil.* **1**, 1–30 (1987).
47. Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H. & Oyaizu, H. Phylogenetic affiliation of the *Pseudomonas* based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1563–1589 (2000).
48. Reddy, G. S. N., Matsumoto, G. I., Schumann, P., Stackebrandt, E. & Shivaji, S.

- Psychrophilic *Pseudomonas* from Antarctica: *Pseudomonas antartica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 713–719 (2004).
49. Stanislauskiene, R. *et al.* Construction of *Escherichia coli*-*Arthrobacter-Rhodococcus* shuttle vectors based on a cryptic plasmid from *Arthrobacter rhombi* and investigation of their application for functional screening. *FEMS Microbiol. Lett.* **327**, 78–86 (2012).
 50. Aakvik, T. *et al.* A plasmid RK2-based broad-host-range cloning vector useful for transfer of metagenomic libraries to a variety of bacterial species. *FEMS Microbiol. Lett.* **296**, 149–158 (2009).
 51. Silva-Rocha, R. *et al.* The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res.* **41**, 666–675 (2013).
 52. Martínez-García, E., Aparicio, T., Goñi-Moreno, A., Fraile, S. & De Lorenzo, V. SEVA 2.0: An update of the Standard European Vector Architecture for de-/reconstruction of bacterial functionalities. *Nucleic Acids Res.* **43**, D1183–D1189 (2015).
 53. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580 (1983).
 54. Sandu, C., Chiribau, C. B., Sachelaru, P. & Brandsch, R. Plasmids for nicotine-dependent and -independent gene expression in *Arthrobacter nicotinovorans* and other *Arthrobacter* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8920–8924 (2005).
 55. Alting-Mees, M. A. & Short, J. M. Pbluescript II: Gene mapping vectors. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9494 (1989).
 56. Kessler, B., Lorenzo, V. De & Timmis, K. N. A general system to integrate lacZ fusions into the chromosomes of gram-negative eubacteria : regulation of the Pm promoter of the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet.* **233**, 293–301 (1992).
 57. Morrison, D. Transformation in *Escherichia coli* - Cryogenic Preservation of Competent Cells. *J. Bacteriol.* **132**, 349–351 (1977).
 58. Luo, J. *et al.* Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter*

- simplex. Lect. Notes Electr. Eng.* **444**, 393–402 (2018).
59. Zhang, H. H., Li, Y. T., Chen, X. M., Sheng, H. M. & An, L. Z. Optimization of electroporation conditions for *Arthrobacter* with plasmid PART2. *J Microbiol Methods* **84**, 114–120 (2011).
 60. Krumbein, W. E. & Altmann, H. J. . A new method for the detection and enumeration of manganese oxidizing and reducing microorganisms. *Helgoländer wiss. Meeresunters* **25**, 347–356 (1973).
 61. Tindall, K. & Kunkel, T. Fidelity of DNA Synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA Polymerase. *Biochemistry* **27**, 6008–6013 (1988).
 62. Jeltsch, A. Maintenance of species identity and controlling speciation of bacteria: A new function for restriction/modification systems? *Gene* **317**, 13–16 (2003).
 63. Vasu, K. & Nagaraja, V. Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 53–72 (2013).
 64. Primrose, S. B. & Ehrlich, S. D. Isolation of plasmid deletion mutants and study of their instability. *Plasmid* **6**, 193–201 (1981).
 65. Novick, R. P. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381–395 (1987).
 66. Yoshihama, M. *et al.* Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **162**, 591–597 (1985).
 67. Ozaki, A., Katsumata, R., Oka, T. & Furuya, A. Functional expression of the genes of *Escherichia coli* in gram-positive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 175–8 (1984).
 68. Kiyoshi, M. *et al.* Construction of novel shuttle vectors and a cosmid vector for the glutamic acid-producing bacteria *Brevibacterium lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **39**, 281–286 (1985).
 69. Trautwetter, A. & Blanco, C. Structural organization of the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pCG100. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2093–2101 (1991).
 70. Kobori, H., Sullivan, C. & Shizuya, H. Bacterial Plasmids in Antarctic. *Appl Env. Microbiol* **48**, 515–518 (1984).
 71. Leiking, D. Occurrence of plasmid DNA in bacteria from the South Shetland Islands, Antarctica. (Universiti Malaysia Sabah (Malaysia), 2010).

72. Blattner, F. R. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* (80-.). **277**, 1453–1462 (1997).
73. Nies, D. H. Resistance to Cadmium , Cobalt , Zinc , and Nickel in Microbes. *Plasmid* **27**, 17–28 (1992).
74. Fantino, J., Py, B., Fontecave, M. & Barras, F. A genetic analysis of the response of *Escherichia coli* to cobalt stress. *Environ. Microbiol.* **12**, 2846–2857 (2010).
75. Rensing, C., Fan, B., Sharma, R., Mitra, B. & Rosen, B. P. CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 652–656 (2000).
76. Kulathila, R., Kulathila, R., Indic, M. & van den Berg, B. Crystal structure of *Escherichia coli* CusC, the outer membrane component of a heavy metal efflux pump. *PLoS One* **6**, 1–7 (2011).
77. Bruins, M. R., Kapil, S. & Oehme, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 198–207 (2000).
78. Vazquez, S. C., Coria, S. H. & Mac Cormack, W. P. Extracellular proteases from eight psychrotolerant antarctic strains. *Microbiol. Res.* **159**, 157–166 (2004).
79. Feller, G. & Coll., E. Temperature dependence of growth, enzyme secretion and activity of psychrophilic Antarctic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 477–479 (1994).

A.1.Lisis alcalina

Solución I	Solución II	Solución III
Glucosa 50mM	NaOH 0,2N	Acetato de Potasio 3M
Tris-HCl pH 8 25mM	SDS 1%	Ácido acético 11,5% (v/v)
EDTA pH 8 10mM		

A.2.Electroforesis en gel de agarosa

Gel de agarosa 1% **Buffer de electroforesis TAE 25x**

1g Agarosa

100mL TAE 1x

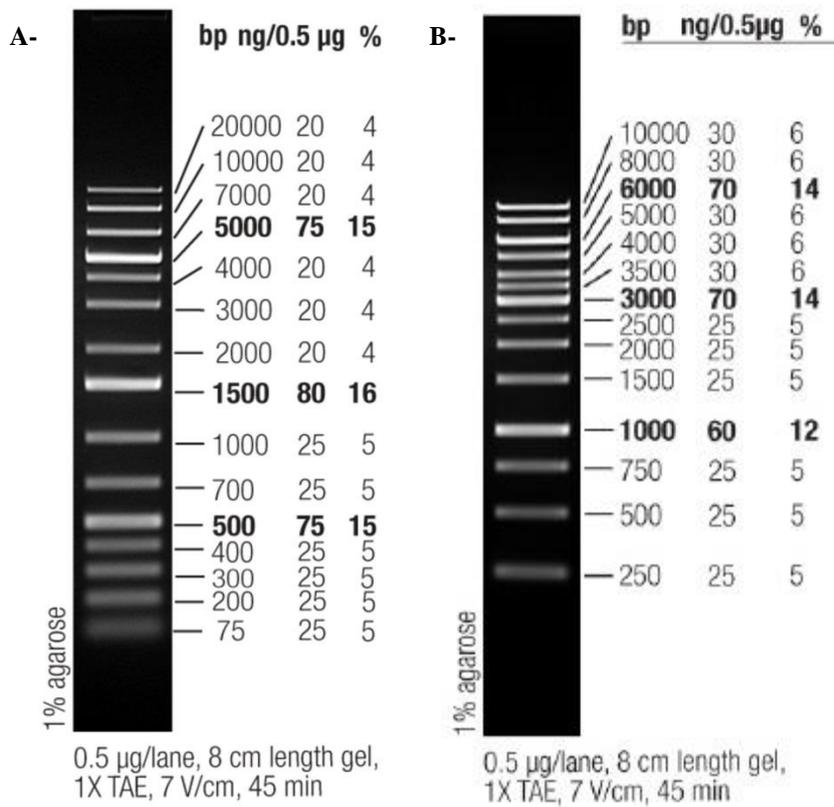


Figura A.1. Marcadores de peso molecular. A- Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1Kb Plus DNA Ladder B- Thermo Scientific™ GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder.

A.3. Medios de cultivo

Luria Bertani Caldo (LB)

Triptona 10g/L

Extracto de levadura 5g/L

NaCl 10g/L

Agua destilada c.s.p. 1L

LB Agar

Caldo LB

Agar 15g/L

R2A Caldo

Extracto de levadura 0,5g/L

Proteasa peptona N°3 0,5g/L

Casaminoácidos 0,5g/L

Glucosa 0,5g/L

Almidón soluble 0,5g/L

K₂HPO₄ 0,3g/L

Piruvato de Sodio 0,3g/L

MgSO₄.7H₂O 0,05g/L

Agua destilada c.s.p. 1L

A.4. Metales

AgNO₃.5H₂O (100 mM)

CoCl₂.6H₂O (100 mM)

CuSO₄.5H₂O (100 mM)

MnCl₂.4H₂O (1000 mM)

NiCl₂.6H₂O (100 mM)

ZnSO₄.7H₂O (100 mM)

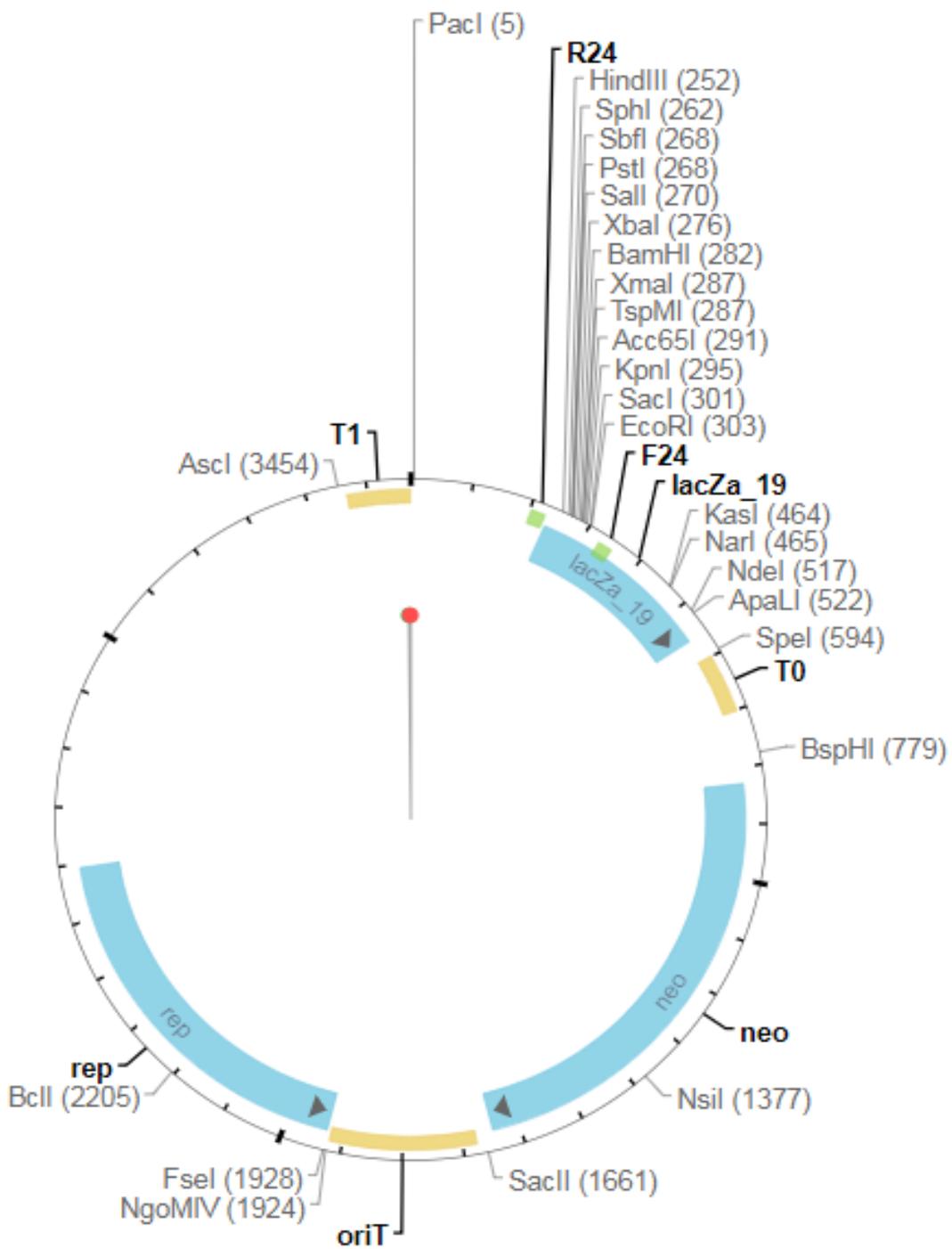


Figura A.2. Mapa del vector pSEVA232

Constitutive expression vector pART2, complete sequence
 Sequence ID: [DQ191047.1](#) Length: 4634 Number of Matches: 2

Range 1: 2891 to 4598 [GenBank](#) [Graphics](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3022 bits(1636)	0.0	→ 1697/1722(99%)	→ 21/1722(1%)	Plus/Plus
Query 50	ATTTACTGGGAAGCTTTACGGCGCTCCTCGTGGAAAGTTCAATGCCCGCAGAC-CTTAAGTGC			108
Sbjct 2891	ATTTACTGGGAAGCTTT-CGGCGCTCCTCGTGGAAAGTTCAATGCCCGCAGACCTTAAGTGC			2949
Query 109	TCTATTACGGTCTGACGTGACACGCTAAATTAGACATAGCTTCATTGATTGTGGGCCA			168
Sbjct 2950	TCTATTACGGTCTGACGTGACACGCTAAATTAGACATAGCTTCATTGATTGTGGGCCA			3009
Query 169	CGAGCCAGTCTCTCCCTCAACAGTCATAAACCAACCTGCAATGGTCAAGCGATTTCCCTT			228
Sbjct 3010	CGAGCCAGTCTCTCCCTCAACAGTCATAAACCAACCTGCAATGGTCAAGCGATTTCCCTT			3069
Query 229	AGCTTTCCTAGCTTGTGCTTACTGGACTTAGCTAGTTTTTCTCGCTGTGCTCGGGCGTA			288
Sbjct 3070	AGCTTTCCTAGCTTGTGCTTACTGGACTTAGCTAGTTTTTCTCGCTGTGCTCGGGCGTA			3129
Query 289	CTCACTGTTTGGGTCTTCCAGCGTTCTGCGGCCCTTTTACCGCCACGCTTCCCATAGT			348
Sbjct 3130	CTCACTGTTTGGGTCTTCCAGCGTTCTGCGGCCCTTTTACCGCCACGCTTCCCATAGT			3189
Query 349	GGCCAGAGCTTTTCGCCCTCGGCT-GCTCTGCTCTCTGTCTGACGAGCAGGGACGACTG			407
Sbjct 3190	GGCCAGAGCTTTTCGCC-TCGGCTGGCTCTGCTCTGTCTGACGAGCAGGGACGACTG			3248
Query 408	GCTGGCCTTAGCGAGTAGCCGCGCACAGCTCGCG-CC-AT-CGCTGGCGGTACGCA			464
Sbjct 3249	GCTGGCCTTAGCGAGTAGCCGCGCACAGCTCGCGCCCAATCCGCTGGCGGTAC-AG			3307
Query 465	T-CGGCGGCAGATCAGGCTACGGCCGCTGCTCCGACCGCTGAGCGACGGGTAGGCA			523
Sbjct 3308	TCCGGCGGCAGATCAGGCTACGGCC-TC--CTCCGACCGCTGAGCGACGGGTAGGCA			3364
Query 524	CGCTCGTAGGCGTCGATGA-TCTTGGTGTCTTTAGGCGCTCACCAGCCGCTTTAAGTG			582
Sbjct 3365	CGCTCGTAGGC-TCGATGACCTTGGTGTCTTTAGGCGCTCACCAGCCGCTTTAAGTG			3423
Query 583	GTATCCACAGTCAAAGCGTGGCGAAAAGCCGCTCATCACGGCGGCACGCCCTGGAGC			642
Sbjct 3424	GTATCCACAGTCAAAGCGTGGCGAAAAGCCGCTCATCACGGCGGCACGCCCTGGAGC			3483
Query 643	AGTCCAGAGGACACGGACGCCGTCGATCAGCTCTCCAGACGCTTCAGCGCGCTCGGCAG			702
Sbjct 3484	AGTCCAGAGGACACGGACGCCGTCGATCAGCTCTCCAGACGCTTCAGCGCGCTCGGCAG			3543
Query 703	GCTTGCTTCAAGCGTGGCAAGTGTCTTTGCTTCCGACGTGGCTTTCTTGGCCGCTTCGAT			762
Sbjct 3544	GCTTGCTTCAAGCGTGGCAAGTGTCTTTGCTTCCGACGTGGCTTTCTTGGCCGCTTCGAT			3603
Query 763	ACGTGCCCTCCGCTAGAAAACCTCTGCTCATAGCGTTTTTAGGTTTTCTGTGCTCGA			822
Sbjct 3604	ACGTGCCCTCCGCTAGAAAACCTCTGCTCATAGCGTTTTTAGGTTTTCTGTGCTCGA			3663
Query 823	GATCATGCGAGCAACTCCATAAAGATCAGCTAGGCGATCCACGCGATTGTGCTGGGCATG			882
Sbjct 3664	GATCATGCGAGCAACTCCATAAAGATCAGCTAGGCGATCCACGCGATTGTGCTGGGCATG			3723
Query 883	CCAGCGGTACGCGTGGGATCGTCCGAGACGTCAGTGGCCACCGGCTCAGCCTATGTGA			942
Sbjct 3724	CCAGCGGTACG-CTGGGATCGTCCGAGA-GTCAAGTGGCCA-CGGCTCAGCCTATGTGA			3780
Query 943	AAAAGCCTGGTCAGCGCCGAAAACGCGGGTCATTTCTCGGTCGTTGACGCCAGCAGGCG			1002
Sbjct 3781	AAAAGCCTGGTCAGCGCCGAAAACGCGGGTCATTTCTCGGTCGTTGACGCCAGCAGGCG			3840
Query 1003	CATATTCCGGCTGCTCATGCTGCTGCGGCATACACCGGATCAATGAGCCAGATGAGCTG			1062
Sbjct 3841	CATATTCCGGCTGCTCATGCTGCTGCGGCATACACCGGATCAATGAGCCAGATGAGCTG			3900
Query 1063	GCATTTCCCGCTCAGTGGATTACGCGCGATCCAAAGCTGGCGCTTTTCCAGGCGTGCCCA			1122
Sbjct 3901	GCATTTCCCGCTCAGTGGATTACGCGCGATCCAAAGCTGGCGCTTTTCCAGGCGTGCCCA			3960
Query 1123	GGCTCCAAAATCGCGTAGACCTCGGGGTTACGTGCTCGATTTCCCGCCGGCCTGGTG			1182
Sbjct 3961	GGCTCCAAAATCGCGTAGACCTCGGGGTTACGTGCTCGATTTCCCGCCGGCCTGGTG			4020
Query 1183	GCTCGGCACATCAATGTCAGGACAAGCACGGCTGCGTGTGCGCGTGTGCTCAGAGCAAC			1242
Sbjct 4021	GCTCGGCACATCAATGTCAGGACAAGCACGGCTGCGTGTGCGCGTGTGCTCAGAGCAAC			4080
Query 1243	ATACTGGCACCAGGCAAGCGATTTGAACCAACTCGGTATAAATTCGGCTGTGTTCTCC			1302
Sbjct 4081	ATACTGGCACCAGGCAAGCGATTTGAACCAACTCGGTATAAATTCGGCTGTGTTCTCC			4139
Query 1303	CGTGTCCGGGCTTTGATCCAAGCGCTGGCGAAGTCCGCGGCTTGTGCTGCCCTGGAAAT			1362
Sbjct 4140	CGTGTCCGGGCTTTGATCCAAGCGCTGGCGAAGTCCGCGGCTTGTGCTGCCCTGGAAAT			4199
Query 1363	TTCTCTGCCAGGTGAGCGAGGAATTCGCGCGGCTTTCGCTCGTCCAGCCACGTGATCG			1422
Sbjct 4200	TTCTCTGCCAGGTGAGCGAGGAATTCGCGCGGCTTTCGCTCGTCCAGCCACGTGATCG			4259
Query 1423	CAGCGCGAGCTCGGGATGGGTGTGAAACAGATCAGCGGAAAATTTCCAGGCGGTTGTGTC			1482
Sbjct 4260	CAGCGCGAGCTCGGGATGGGTGTGAAACAGATCAGCGGAAAATTTCCAGGCGGTTGTGTC			4319
Query 1483	AATGTCTCGTGAATCCGCTAGAGTCATTTTGGAGCGCTTCTCCAGGTTTGGACTGGGG			1542
Sbjct 4320	AATGTCTCGTGAATCCGCTAGAGTCATTTTGGAGCGCTTCTCCAGGTTTGGACTGGGG			4379
Query 1543	GTTAGCCGACGCCCTGTGAGTTACCGCTCACGGGGCGTTCAACATTTTTCAGGTATTCGT			1602
Sbjct 4380	GTTAGCCGACGCCCTGTGAGTTACCGCTCACGGGGCGTTCAACATTTTTCAGGTATTCGT			4439
Query 1603	GCAGCTTATCGCTTCTTGGCCGCTGTGCGCTTTTTCGACGCGCGACGCTGCTGCCGATT			1662
Sbjct 4440	GCAGCTTATCGCTTCTTGGCCGCTGTGCGCTTTTTCGACGCGCGACGCTGCTGCCGATT			4499
Query 1663	GGTGCAGGTGGTGGCGGCGCTGACAGCTCCTGGGCGGCCACGGCCACAGAAACGCGGCA			1722
Sbjct 4500	GGTGCAGGTGGTGGCGGCGCTGACAGCTCCTGGGCGGCCACGG-CACAGAAACGCGGCA			4558
Query 1723	TTTACGATGTTTGTGATGCTGCGGGCACCGCGCCACGATCG		1764	
Sbjct 4559	TTTACGATGTTTGTGATGCTGCGGGCACCGC-C-ACGATCG		4598	

Figura A.3. Comparación de las secuencias del inserto amplificado a partir de la ufc20 y el origen de replicación pCG100 del pART2. BLAST extraído del NCBI. Se indica con flechas el porcentaje de identidad y de gaps encontrados entre la secuencia del inserto en la construcción (Query) y el vector de partida (Sbjct).