



Tesina para optar por el Grado de Licenciado
en Ciencias Biológicas

**Uso de la metagenómica funcional como
herramienta para la búsqueda de
enzimas bacterianas de interés
biotecnológico presentes en muestras
colectadas en la Península Antártica**



Ignacio Ferrés Cáceres

Orientadora: Lic. Vanesa Amarelle

Tribunal: Dra. Silvia Batista, Dra. Silvana Alborés

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de
Investigaciones Biológicas Clemente Estable - MEC

Julio 2015

Índice de Contenidos

Lista de abreviaturas utilizadas.....	4
Índices de Tablas y Figuras.....	6
RESÚMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Biocatálisis.....	9
1.2 Bioprospección de ambientes fríos.....	10
1.3 Metagenómica funcional.....	10
1.4 Biotecnología aplicada a la producción de biocombustibles.....	14
1.5 Hidrolasas.....	14
1.5.1 Hidrolasas de ésteres carboxílicos.....	15
1.5.1.1 Carboxilesterasas.....	15
1.5.1.2 Lipasas.....	15
1.5.2 Celulasas.....	16
1.5.3 Xilanasas.....	16
1.6 Oxidorreductasas.....	16
1.6.1 Lacasas.....	16
1.6.2 Peroxidasas.....	17
1.6.2.1 Lignina Peroxidasa.....	17
1.6.2.2 Manganeso Peroxidasa.....	17
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Hipótesis.....	18
2.2 Objetivo general.....	18
2.3 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 Colecta de la muestra.....	19
3.2 Aislamiento de ADN metagenómico.....	20
3.3 Determinación de la concentración y calidad del ADN obtenido.....	20
3.4 Construcción de la biblioteca metagenómica.....	21
3.4.1 Fundamento del sistema CopyControl™ Fosmid Library Production Kit. .	21
3.4.2 Titulación de los extractos y cálculo de eficiencia de empaquetado.....	22
3.4.3 Concentración y reparación del ADN metagenómico.....	23

3.4.4	Ligación de los fragmentos de ADN metagenómico al vector.....	23
3.4.5	Empaquetado e infección.....	23
3.5	Organización y almacenamiento de la metagenoteca.....	24
3.6	Ensayos funcionales.....	24
3.6.1	Actividad lipolítica.....	24
3.6.2	Actividad celulolítica.....	25
3.6.3	Actividad xilanasas.....	25
3.6.4	Uso de Avicel como única fuente de carbono.....	25
3.6.5	Producción de oxidorreductasas.....	26
3.7	Aislamiento de clones positivos.....	26
3.8	Confirmación del fenotipo.....	27
3.8.1	Purificación de fósmidos.....	27
3.8.2	Perfiles de restricción.....	28
3.8.3	Preparación de células EPI300™ -T1R electrocompetentes y electroporación.....	28
3.9	Caracterización del clon oxidador de manganeso (MnOx).....	29
3.9.1	Determinación del pH del sobrenadante.....	29
3.9.2	Confirmación de actividad MnOx en medio sólido.....	29
3.9.3	Secuenciación del fósido MnOx y análisis de secuencias.....	29
4.	RESULTADOS.....	30
4.1	Construcción de la biblioteca metagenómica.....	30
4.1.1	Extracción y selección de ADN metagenómico.....	30
4.1.2	Titulación y eficiencia de empaquetado de los extractos.....	31
4.1.3	Número esperado y obtenido de clones.....	31
4.2	Análisis funcional de la biblioteca.....	31
4.2.1	Actividad lipolítica.....	31
4.2.2	Actividad celulolítica.....	33
4.2.3	Actividad manganeso-oxidasa (MnOx).....	34
4.3	Caracterización del clon MnOx.....	36
4.4	Secuenciación del fósido del clon MnOx y análisis bioinformático.....	38
5.	DISCUSIÓN.....	42
6.	CONCLUSIONES.....	47
7.	PERSPECTIVAS.....	47

Bibliografía.....	49
ANEXOS.....	58
Anexo 1: Medios de Cultivo.....	58
Anexo 2: Soluciones Tampón.....	59

Lista de abreviaturas utilizadas:

1. ABTS: 2,2' azinobis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonato)
2. ADN: Ácido desoxirribonucleico
3. Ara: Arabinosa
4. ATP: Adenosín trifosfato
5. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
6. BOM: Bacterias oxidadoras de Mn
7. CcP: Citocromo-c Peroxidasa
8. Cm: cloramfenicol
9. CMC: Carboximetilcelulosa
10. COG: Cluster of Orthologous Groups (Cluster de Grupos Ortólogos)
11. dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato
12. DO: Densidad óptica
13. EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
14. EtOH: Etanol
15. FAD: Flavín adenín dinucleótido
16. Gb: Gigapares de bases
17. Kb: Kilopares de bases
18. LB: Luria-Bertani
19. LBB: Azul de Leucoberbelina
20. LBCm: Luria-Bertani suplementado con cloramfenicol
21. LBCmAra: Luria-Bertani suplementado con cloramfenicol y arabinosa
22. LBMM: Luria-Bertani suplementado con $MnSO_4$ y maltosa
23. MCO: Multicobre oxidasa
24. MnOx: Manganeso Oxidasa
25. NCBI: National Center for Biotechnology Information
26. ORF: Open Reading Frame (Marco Abierto de Lectura)
27. pb: pares de bases
28. PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
29. PDB: Phage Dilution Buffer (Tampón de dilución de fago)
30. pH: Potencial de Hidrógeno
31. RCF: Relative Centrifugal Force (Fuerza Centrífuga Relativa)

- 32. rpm: Revoluciones por minuto
- 33. TAE: Solución tampón Tris, Acetato y EDTA
- 34. T₁₀E₁: Solución tampón Tris 10 mM, EDTA 1 mM

Índices de Tablas y Figuras

Índice de Tablas

Tabla 1. Resultados para la búsqueda de ORFs y la asignación de COG mediante el servidor WebMGA.....	39
--	----

Índice de Figuras

Figura 1. Esquema de los distintos métodos utilizados para realizar bioprospección.....	12
Figura 2. Ubicación del sitio donde fue tomada la muestra.....	19
Figura 3. Representación esquemática de la construcción de una metagenoteca con el kit CopyControl™ Fosmid Library Production.....	22
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción ADN1.....	30
Figura 5. Ejemplo de un pool con actividad lipolítica en medio conteniendo una emulsión de tributirina.....	32
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de las extracciones fosmídicas de 3 clones con actividad lipolítica seleccionados.....	32
Figura 7. Perfiles de restricción de las extracciones fosmídicas de los 3 clones lipolíticos seleccionados (Lip1, Lip2 y Lip3).....	33
Figura 8. Ejemplo de un pool con actividad celulolítica en medio conteniendo CMC.....	34
Figura 9. Aislamiento de uno de los clones oxidadores de Mn a partir del pool que presentó precipitados.....	34
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de las extracciones fosmídicas de 3 clones con actividad MnOx.....	35
Figura 11. Perfiles de restricción de las extracciones fosmídicas de los 3 clones oxidadores de Mn.....	35
Figura 12. Confirmación de la actividad manganeso oxidasa (MnOx).....	36
Figura 13. Determinación del rango de resolución de los ensayos para observar la actividad MnOx.....	37
Figura 14. Representación de los contigs obtenidos de la secuenciación del	

fósmido de uno de los clones MnOx, con ORFs y otras secuencias anotadas.. .40

Figura 15. Representación del ORF 1.18, una citocromo c peroxidasa, de acuerdo al análisis del ProSite.....41

Figura 16. Predicción de péptido-senial de exportación.....42

RESÚMEN

Con el fin de realizar una prospección de enzimas ambientales bacterianas adaptadas al frío con potencial aplicación biotecnológica, particularmente en la producción de biocombustibles, se construyó una biblioteca metagenómica a partir de ADN extraído de una muestra de agua de deshielo colectada en la Península Antártica durante la expedición ANTARKOS XXIX del verano austral 2012-2013. Dicha metagenoteca, de aproximadamente 52.000 clones, se construyó empleando como hospedero la cepa EPI300™-T1R de *Escherichia coli* y como vector el fósido PCC1FOS. Asumiendo que cada clon cuenta con insertos de ADN metagenómico de aproximadamente 35-40 Kb de longitud, estimamos que la metagenoteca posee aproximadamente 2 Gb de información metagenómica. La biblioteca se sometió a un análisis funcional para distintas actividades enzimáticas. Se detectaron setenta y cinco clones productores de esterasas, 2 clones productores de celulasas y 2 clones capaces de crecer con Avicel como única fuente de carbono. Se identificaron también 3 clones que formaban precipitados marrones cuando eran cultivados en medio suplementado con $MnCl_2$. El perfil de restricción de los fósidos indicó que los 3 clones contenían el mismo inserto por lo que se decidió seguir caracterizando sólo uno de ellos. Mediante un ensayo con Azul de Leucoberbelina se determinó que dichos precipitados eran debidos a la oxidación del Mn^{2+} . Se secuenció el fósido mediante la tecnología Ion Torrent. El análisis de homología de la secuencia nucleotídica del inserto indicó que poseía similitud con secuencias provenientes de bacterias de la familia Rhodobacteraceae, mientras que mediante el análisis de las secuencias aminoacídicas no se pudo identificar ningún marco de lectura abierto con similitud a multicobre-oxidasas (las manganeso oxidasas más comunes) aunque sí se detectaron dos posibles genes codificantes uno para oxidasas dependientes de FAD y otro para una citocromo-c peroxidasa los cuales podrían ser responsables de la actividad observada según trabajos disponibles en la literatura.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biocatálisis

La catálisis de procesos químicos consiste en la disminución de la energía de activación de una reacción dada, con el fin de acelerar la obtención del (o los) producto (s) a partir de los sustratos correspondientes¹. Puede realizarse tanto de forma física, química, como biológica. En los seres vivos, prácticamente todas las reacciones biológicas están catalizadas por enzimas. El uso de enzimas o directamente de las células que las producen, se conoce como biocatálisis o biotransformación.

En las industrias el empleo de distintos métodos catalíticos para transformar la materia prima en un producto de mayor valor agregado es una práctica común, siendo los procesos químicos los habitualmente usados. Sin embargo, la demanda de procesos más amigables con el medio ambiente, junto al avance en el campo de la biología molecular ha llevado a considerar cada vez más, el uso de enzimas como catalizadores bioquímicos². El empleo de enzimas en procesos químicos ofrece numerosas ventajas dado que presentan alta especificidad por el sustrato, brindan alta pureza al producto, evitan la necesidad de utilizar solventes orgánicos, se derivan de recursos renovables y son biodegradables, lo que reduce el impacto ambiental³. Esto ha dado lugar en las últimas décadas, a un importante incremento en el uso de enzimas en procesos industriales como una alternativa amigable con el medio ambiente y a su vez económicamente rentable.

Las enzimas de origen bacteriano son preferentemente seleccionadas para las reacciones de biocatálisis debido a que presentan mayor facilidad de manipulación, sobre todo a nivel de su producción en forma recombinante. Ésto ha incentivado la búsqueda de bacterias productoras de enzimas, proceso llamado bioprospección. Las muestras ambientales son habitualmente elegidas para realizar la bioprospección debido a la gran diversidad de microorganismos presentes⁴. La correcta elección del ambiente en función de la actividad buscada es un paso crítico a fin de aprovechar las características evolutivas de dichos microorganismos.

1.2 Bioprospección de ambientes fríos

Se estima que un 75% de la biosfera terrestre se corresponde a ambientes fríos, con temperaturas menores a 5°C durante todo el año⁵. Los ambientes fríos son el hábitat de microorganismos especialmente adaptados a vivir en esas condiciones, denominando microorganismos psicrófilos a aquellos cuya temperatura óptima es menor o igual a 15°C y su temperatura máxima de crecimiento es igual o menor a 20°C, y microorganismos psicrotolerantes o psicrotófros a aquellos capaces de crecer a temperaturas cercanas a los 0°C pero que su temperatura óptima y máxima superan los 15°C y 20°C, respectivamente. Estos microorganismos suelen poseer diferentes adaptaciones fisiológicas que le permiten llevar a cabo sus funciones vitales a bajas temperaturas, siendo la producción de enzimas psicrófilas uno de los principales mecanismos^{6,7}.

Una característica buscada en muchos procesos biotecnológicos es la adaptación al frío, ya que las enzimas adaptadas a trabajar a bajas temperaturas tienen alta actividad específica a pH y temperaturas moderadas, flexibilidad en su estructura molecular, y no requieren de temperaturas excesivamente elevadas para su inactivación. Estas características son interesantes desde el punto de vista biotecnológico ya que permiten llevar a cabo procesos bioquímicos a temperaturas moderadas lo que a su vez redundaría en menores costos ya que no es necesario invertir en energía para etapas de calentamiento⁸. Debido a estos factores, los ambientes fríos son un recurso atractivo para la identificación de nuevas especies, nuevos procesos, y nuevas enzimas con potencial aplicación industrial.

1.3 Metagenómica funcional

Diversas técnicas se han desarrollado para la búsqueda de enzimas de origen bacteriano. Los abordajes clásicos implican el aislamiento de microorganismos a partir de muestras ambientales y la detección de cultivos o colonias celulares productoras de la/s actividad/es enzimática/s de interés. La identificación suele hacerse empleando medios de cultivo con el agregado de indicadores enzimáticos específicos o evaluando directamente la actividad enzimática en cultivos puros. Si bien es una metodología sencilla y que se sigue utilizando,

este abordaje está limitado por el bajo número de especies bacterianas capaces de crecer en los medios de cultivos conocidos. Se estima que menos del 1% de los microorganismos pueden ser cultivados^{9,10}. A su vez, la identificación del/los gen/es responsable/s de dicha actividad implica contar con herramientas genéticas para dicho microorganismo en particular o tener cierta información de secuencias de función similar que permita su detección mediante técnicas de biología molecular como PCR o hibridización de ADN. En este último caso, se limita la posibilidad de encontrar secuencias completamente novedosas ya que la detección estará sesgada a aquellas secuencias que guardan cierta homología con genes ya descritos. Para evitar dichos sesgos y dificultades es que se desarrolla la metagenómica. El metagenoma se define como el conjunto de genomas de una comunidad, y la metagenómica representa un conjunto de técnicas capaces de abordar dicha diversidad mediante el estudio directo de las comunidades en su entorno natural, evitando la necesidad de aislar y cultivar cada una de las especies que componen la comunidad. Dentro de la metagenómica encontramos al menos dos abordajes posibles para realizar bioprospección¹¹**(Figura 1)**.

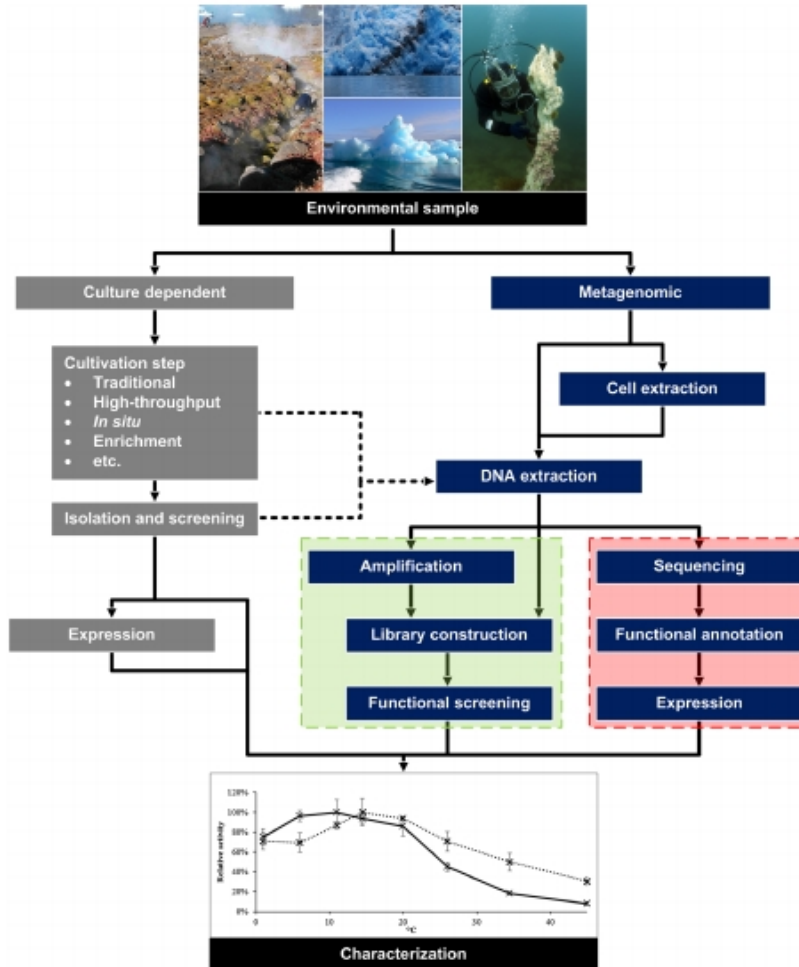


Figura 1. Esquema de los distintos métodos utilizados para realizar bioprospección. Los métodos dependientes de cultivo se muestran en gris, mientras que los métodos independientes de cultivo (metagenómica) se muestran en azul. El ADN extraído puede utilizarse tanto para un abordaje bioinformático (cuadro rojo), como para un abordaje funcional (cuadro verde). Las actividades identificadas de aislamientos cultivables o de proteínas expresadas recombinantemente son luego caracterizadas (en negro). Es posible vincular ambas técnicas obteniendo ADN de cultivos enriquecidos o cepas aisladas (línea punteada). Tomada de Jan Kjølhede Vester et al.(2015)¹¹.

Mediante el abordaje bioinformático a partir del ADN extraído de la muestra ambiental, se realiza la secuenciación masiva de todo el ADN metagenómico y se procesa la información *in silico*. Esta aproximación permite identificar genes presentes en la comunidad, determinar su composición, inferir rutas metabólicas presentes y establecer cómo funciona dicha comunidad, entre otras aplicaciones. Asimismo, a partir de la información obtenida se pueden

seleccionar secuencias de interés para su análisis funcional. Dichas secuencias pueden ser amplificadas por PCR, clonadas en vectores apropiados, introducidas en bacterias de uso corriente en el laboratorio y enfrentadas a medios diferenciales que permitan comprobar la función esperada. Esta aproximación no permite la identificación de funciones codificadas por secuencias completamente novedosas ya que existe el sesgo inherente a la información que se encuentra disponible en las bases de datos.

El abordaje funcional consiste en clonar el ADN metagenómico en vectores apropiados e introducirlo en bacterias fácilmente cultivables obteniéndose una biblioteca genética o metagenoteca, en la que se encuentran representados los genomas de todas las especies que integran la comunidad. Dicha biblioteca es posteriormente evaluada funcionalmente como se detalló anteriormente para el abordaje dependiente de cultivo¹²⁻¹⁴. Dado que no se seleccionan secuencias de forma selectiva sino que se clona todo el ADN presente en la muestra ambiental, se puede tener acceso a genes posiblemente desconocidos para la función buscada. En aquellos clones que presenten la actividad de interés se puede identificar el/los gen/es responsable/s de dicha función mediante técnicas de biología molecular como el sub-clonado o la mutagénesis. Posteriormente se pueden aislar y caracterizar a las enzimas codificadas. La metagenómica funcional ha logrado aplicarse con éxito a distintos ambientes, permitiendo la identificación de diversas actividades enzimáticas de interés, entre ellas: enzimas lipolíticas^{15,16}, celulolíticas¹⁷⁻¹⁹, y oxidorreductasas, entre otras²⁰. También se han identificado compuestos antimicrobianos²¹ así como genes que codifican para la resistencia a distintos antibióticos²².

La metagenómica también se ha utilizado para el estudio de las comunidades microbianas en la Antártida, incluyendo sus capacidades funcionales. Este abordaje ha permitido encontrar enzimas adaptadas al frío como proteasas, lipasas/esterasas, amilasas y celulasas, incluso nuevas enzimas previamente desconocidas²³⁻²⁵.

1.4 Biotecnología aplicada a la producción de biocombustibles

Nuestro grupo de trabajo ha centrado una de sus líneas de investigación en la búsqueda y caracterización de enzimas con aplicación en la industria de los biocombustibles, especialmente para la producción de bioetanol y biodiesel.

La producción de bioetanol consiste en la degradación de polisacáridos complejos en azúcares simples y en la posterior fermentación alcohólica de éstos. En la actualidad, se utilizan principalmente el almidón del maíz y la sacarosa de la caña de azúcar. Sin embargo, es la lignocelulosa el polisacárido complejo más abundante, barato y mejor distribuido del mundo²⁶.

La lignocelulosa es el principal componente de las paredes vegetales y de la madera. Está compuesta esencialmente por celulosa, hemicelulosa y lignina en una estructura supramolecular altamente resistente a la degradación y oxidación. El proceso de obtención de etanol a partir de lignocelulosa consiste en un pretratamiento químico y físico, un tratamiento enzimático con celulasas y hemicelulasas, la fermentación de los azúcares resultantes por levaduras y la separación del etanol²⁷. Las enzimas hidrolíticas que se emplean son caras de producir, lábiles y lentas por lo que mejoras en este aspecto serían de gran utilidad.

El biodiesel es un combustible sintético líquido que se obtiene mediante procesos industriales de esterificación y transesterificación de lípidos naturales como aceites vegetales o animales²⁸, e incluso se considera el uso de algas como fuente de lípidos para su obtención²⁹ así como también a partir de levaduras y otros microorganismos. La esterificación o transesterificación generalmente se logra mediante procesos de catálisis química^{30,31}, aunque poco a poco se empieza a considerar el uso de lipasas dado que los catalizadores químicos son menos específicos y requieren un paso de neutralización³².

En este trabajo, en particular, nos focalizamos en la búsqueda de enzimas con potencial aplicación tanto en la producción de bioetanol (lignocelulasas, lacasas y peroxidasas) así como de biodiesel (esterasas/lipasas).

1.5 Hidrolasas (EC 3)

Son enzimas capaces de hidrolizar enlaces químicos. Se encuentran

ampliamente distribuidas ya que son relevantes para el catabolismo de nutrientes. Muchas son extracelulares y suficientemente robustas como para resistir las condiciones adversas del medio extracelular. Por lo general no requieren coenzimas. Estas características las hacen idóneas para su uso en la industria. Dentro de las hidrolasas encontramos:

1.5.1 Hidrolasas de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1). Es una clase de hidrolasas que catalizan la hidrólisis de ésteres a ácidos carboxílicos y alcoholes. Se encuentran muy distribuidas en la naturaleza. Los dos principales grupos dentro de esta clase son:

1.5.1.1 Carboxilesterasas (EC 3.1.1.1). Estas enzimas, también llamadas esterasas 'verdaderas', hidrolizan ésteres simples, y usualmente sólo triacilglicéridos compuestos de ácidos grasos de cadena corta (<C6). Es un grupo diverso y ampliamente distribuido³³.

1.5.1.2 Lipasas (EC 3.1.1.3). Comprende un grupo de enzimas capaces de hidrolizar triacilglicerol a glicerol y ácidos grasos libres. Se definen por su capacidad de actuar sobre ésteres de ácidos grasos de cadena larga de acilglicerol insolubles, teniendo acción en la interfase agua-ácido graso, y por estructuras particulares alrededor de su sitio activo³⁴. En general se define a los ésteres de ácidos grasos de cadena larga como aquellos cuya longitud es mayor a diez carbonos (C>10)³⁵, pero también se ha visto que son capaces de hidrolizar ésteres de cadena menor a diez carbonos. Su capacidad de actuar en la interfase agua-lípido les otorga valor biotecnológico.

La aplicación en biotecnología de las lipasas es muy amplia. Por ejemplo, en la síntesis de fármacos, la esteroespecificidad es una característica muy buscada y se sabe que las lipasas suelen brindar dicha característica en la especificidad por el sustrato y los productos liberados. En la industria alimentaria, los ácidos grasos liberados de la hidrólisis de triglicéridos son usados como saborizantes en distintos productos como queso, manteca y dulces, entre otros. Las lipasas se utilizan directamente en detergentes para mejorar la remoción de grasas y aceites, favorecidas por su amplia especificidad de sustrato y su estabilidad a pH alcalinos. La producción de biodiesel también se ha visto marcada por la utilización de lipasas, ya que la hidrólisis de triacilglicéridos permite la obtención de los ácidos grasos necesarios para dicho proceso³⁶⁻³⁸.

1.5.2 Celulasas. Se les llama genéricamente celulasas a aquellas enzimas que son capaces de degradar la celulosa. Para la completa degradación de la celulosa en glucosa son necesarios distintos tipos de celulasas. Las endocelulasas (EC 3.2.1.4) hidrolizan al azar enlaces glucosídicos β -1,4 de la celulosa. Las exocelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), comúnmente llamadas exocelulasas, liberan unidades de celobiosa desde los extremos del polímero. Por último las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) hidrolizan las unidades de celobiosa en glucosa³⁹. Las aplicaciones más comunes para estas enzimas incluyen un papel en el procesamiento de algodón, el reciclado de papel, en la producción de detergentes, extracción de jugos frutales, y en la producción de bioetanol⁴⁰.

1.5.3 Xilanasas. Son glucosidasas que catalizan la endohidrólisis del enlace β -1,4-D-xilosídico en el xilano, un tipo de hemicelulosa. Dada la complejidad y heterogeneidad, la degradación completa del xilano requiere varias enzimas que actúan cooperativamente. Existen incluso enzimas que participan en dicha degradación que no actúan sobre el enlace β -1,4, sino sobre otros residuos laterales, y aun así se consideran enzimas xilanólíticas ya que forman parte de ese proceso⁴¹. Las xilanasas se pueden clasificar en endo-1,4- β -D-xilanasas (EC 3.2.1.8) que rompen al azar la cadena principal y en β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37) que escinden monómeros de xilosa. Las aplicaciones en la industria alimentaria han sido las más prominentes para este tipo de enzimas, aunque sobresalen también las aplicaciones en la industria del papel y textil⁴⁰.

1.6 Oxidorreductasas (EC 1)

Catalizan reacciones de óxido-reducción que impliquen transferencia de electrones, o de átomos de H u O. Están involucradas en vías metabólicas centrales¹. Algunos ejemplos de enzimas oxidoreductasas son:

1.6.1 Lacasas (EC 1.10.3.2). Pertenecen al grupo de las metaloenzimas de cobre. Contienen cuatro átomos de cobre por molécula. El mecanismo de oxidación implica ciclos de cuatro reacciones de oxidación del sustrato para la reducción de una molécula de oxígeno. Este mecanismo requiere que la proteína almacene cuatro electrones antes de la reducción del oxígeno. El sustrato pierde un único electrón en la oxidación catalizada por la lacasa, formando un radical libre. Este radical puede o no ser oxidado nuevamente por

la enzima⁴². Las lacasas tienen especificidad muy amplia lo que les permite llevar a cabo la oxidación de una gran variedad de sustratos polifenólicos ⁴³. Las aplicaciones biotecnológicas de las lacasas son muy amplias, incluyendo deslignificación en las industrias de papel, textil y de biocombustibles, degradación oxidativa en procesos de biorremediación, y oligomerización oxidativa en la industria farmacéutica⁴⁴.

1.6.2 Peroxidasas (EC 1.11.1). Son proteínas que oxidan compuestos utilizando peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones. Están muy distribuidas en la naturaleza. Pueden ser agrupadas en aquellas que contienen grupo hemo o en aquellas que no lo contienen. Las hemoperoxidasas se puede agrupar en dos superfamilias basándose en la similitud de secuencia. Ambas superfamilias incluyen peroxidasas bacterianas y fúngicas mientras que las animales y vegetales se agrupan por separado, cada una dentro de una de las superfamilias. Dentro de la primer superfamilia, en la cual se incluye a las peroxidasas vegetales, se definen tres clases encontrándose las lignina peroxidasas y las manganeso peroxidasas en la clase II⁴⁵. Las aplicaciones potenciales más importantes incluyen biorremediación medioambiental⁴⁶ y deslignificación en las industrias del papel y de biocombustibles⁴⁷.

1.6.2.1 Lignina Peroxidasa (EC 1.11.1.14). Son peroxidasas de origen no animal que participan en la mineralización de la lignina y catalizan la primera etapa de la degradación de la misma⁴⁵.

1.6.2.2 Manganeso Peroxidasa (EC 1.11.1.13). Son peroxidasas de origen no animal del grupo de las glicoproteínas que muchas veces se presentan en varias isoformas. Su ciclo catalítico es similar al de las otras hemo peroxidasas, pero tienen mayor afinidad por el Mn^{2+} como donador de electrones. La formación de Mn^{3+} lleva a la oxidación de distintos compuestos fenólicos⁴⁸.

2. OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

En este trabajo planteamos la utilización de la metagenómica funcional como herramienta para la búsqueda de enzimas bacterianas adaptadas al frío que presenten actividad de interés biotecnológico en la industria de los biocombustibles. Basándonos en la hipótesis que las bacterias adaptadas al frío presentan enzimas también adecuadas a dichos ambientes, realizaremos la búsqueda a partir de muestras colectadas en la Antártida.

2.2 Objetivo general

Buscar, detectar e identificar distintas enzimas adaptadas al frío con potencial aplicación en la industria de los biocombustibles mediante una aproximación metagenómica funcional.

2.3 Objetivos específicos

- i.** Construir una biblioteca metagenómica a partir de una muestra ambiental proveniente de la Antártida.
- ii.** Llevar a cabo un análisis funcional de la metagenoteca, buscando enzimas con potencial aplicación biotecnológica.
- iii.** Selección de algunos de los clones positivos para una caracterización detallada de la actividad presentada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de la muestra

Se colectaron de forma aséptica 50 ml de agua de deshielo de un charco cercano a la costa en la Península Antártica (Antártida continental) (S 63° 13' 12.8"; W 057° 13') durante el mes de enero de 2013, en la campaña ANTARKOS XXIX organizada por el Instituto Antártico Uruguayo (IAU) (**Figura 2**). Por encontrarse este sitio en un lugar de difícil acceso por tierra y alejado de las bases científicas, se puede considerar un punto con baja o nula intervención humana. Se detectó la presencia de pingüinos *Pygoscelis adeliae* a metros del lugar de colecta. La muestra de agua colectada presentó un pH de 9,0 y la temperatura al momento de la colecta fue de 1°C. La muestra fue transportada en hielo durante aproximadamente una hora, hasta que la extracción de ADN metagenómico fue realizada en el buque ROU 04 General Artigas. Otra extracción se realizó a los 9 días, al arribar la muestra a Montevideo.

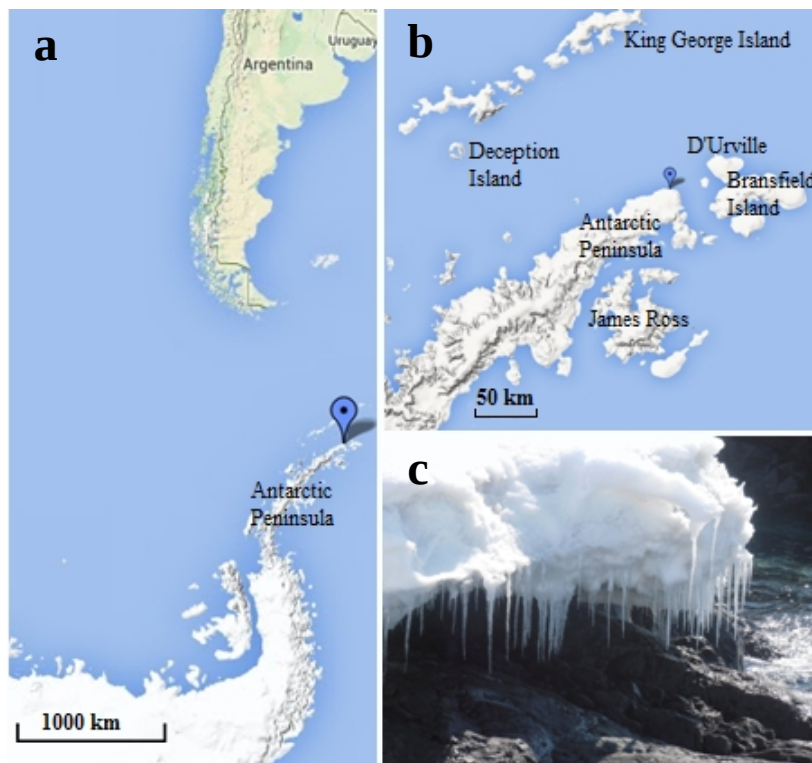


Figura 2. Ubicación del sitio donde fue tomada la muestra. (a): ubicación relativa del punto de colecta respecto a la Península Antártica y a la región más austral de Sud-América. (b): acercamiento de (a) mostrando el punto de colecta respecto a las islas D'Urville y King George, y a la Península. (c): fotografía del punto de colecta al momento de la toma de la misma.

3.2 Aislamiento de ADN metagenómico

La extracción de ADN metagenómico fue realizada utilizando el kit PowerSoil DNA Isolation, de MOBIO Laboratories Inc.. Este kit combina métodos químicos y físicos para lisar las células. Se colocaron 300 µl de muestra en tubos que contienen una solución diseñada para disolver los ácidos húmicos y proteger el ADN de degradación. Contiene además pequeñas cuentas que al ser agitadas favorecen la homogeneización y la ruptura mecánica de la muestra. La muestra se agitó vigorosamente en posición horizontal durante 10 minutos, se agregaron 60 µl de la solución C1 que contiene agentes que contribuyen a la lisis celular, se transfirieron 500 µl de la mezcla a otro tubo y se agregaron 250 µl de la solución C2, cuya función es la precipitación de sustancias húmicas, restos celulares y proteínas, manteniendo protegido el ADN de la degradación por nucleasas. Se centrifugó a 10.000 RCF durante 1 minuto a 25°C, se transfirieron 600 µl de sobrenadante a un tubo limpio y se agregaron 200 µl de la solución C3 (función similar a C2). Se centrifugó a 10.000 RCF durante 1 minuto a 25°C, se transfirieron 750 µl de sobrenadante a un tubo nuevo y se agregaron 1,2 ml de la solución C4 cuya finalidad es aumentar la fuerza iónica y de esta forma la afinidad del ADN a la membrana de sílica de una columna de centrifugación. El ADN se unió a la membrana en tres pasos sucesivos de centrifugación a 10.000 RCF durante 1 minuto cada uno. Se lavó la membrana con 500 µl de la solución C5, la cual contiene etanol que sirve para remover sales residuales y ácidos húmicos, y el líquido remanente se sacó de la membrana mediante dos centrifugaciones consecutivas a 10.000 RCF durante 30 segundos a 25°C. Se eluyó el ADN con 100 µl de la solución C6, que disminuye la fuerza iónica provocando la liberación del ADN de la membrana, mediante centrifugación de 30 segundos a 10.000 RCF a 25°C. Se realizaron dos extracciones, una en el barco a las pocas horas de la colecta, y otra en Montevideo a 9 días. En el segundo caso el ADN se eluyó de la columna con solución tampón T₁₀E₁ (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) , para prevenir la degradación del ADN.

3.3 Determinación de la concentración y calidad del ADN obtenido

Se cuantificó el ADN obtenido mediante espectrofotometría con un NanoDrop

(Thermo Scientific). Se determinó la calidad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa 0,7% en TAE 1X (Tris-acético 0,04 M, EDTA 0,001 M, pH=8,0), a 90 V. Para la visualización del ADN se utilizó 1,2 µl del agente GoodView® incluido cada 50 ml de gel. Se sembró una alícuota de 5 µl de la preparación de ADN metagenómico. El peso molecular aproximado de los fragmentos obtenidos fue determinado por comparación con el marcador de peso molecular GenRuler™ 1 Kb Ladder y con un fragmento de ADN lineal de 35 Kb provisto por el kit CopyControl™. Para la construcción de la biblioteca se seleccionó la extracción que presentó mayor cantidad de ADN del tamaño deseado.

3.4 Construcción de la biblioteca metagenómica

3.4.1 Fundamento del sistema CopyControl™ Fosmid Library Production Kit. Para la construcción de la biblioteca metagenómica se utilizó el kit CopyControl™ Fosmid Library Production, con el vector PCC1FOS de Epicentre Biotechnologies (Madison, WI, USA).

El vector pCC1FOS es un fósrido lineal de 8,139 Kb que tiene la capacidad de acomodar fragmentos de ADN de hasta 40 Kb formando un concatémero de ADN. Este vector tiene también un sitio COS que permite su reconocimiento y empaquetado por el fago lambda. Dado que el fago lambda reconoce dos sitios COS que disten aproximadamente 45 Kb, se empaquetarán sólo aquellos vectores que contengan insertos de 30-40 Kb, asegurando fragmentos de gran tamaño en cada clon de la biblioteca (**Figura 3a**). El pCC1FOS contiene además un gen de resistencia a cloramfenicol (Cm) como marcador de selección y dos orígenes de replicación, uno de ellos de copia única (*ori2*) y el otro de multicopia (*oriV*). El inicio de replicación a partir del *oriV* requiere el producto del gen *trfA*, que se encuentra codificado en el genoma de la cepa hospedera *E. coli* EPI300™-T1R bajo el control de un promotor inducible por L-arabinosa.

Este sistema permite la estabilidad de los fósridos dentro de *E. coli* EPI300™-T1R manteniéndose en copia simple, y la posibilidad de aumentar el número de copias a demanda al inducir la expresión de *trfA* y por consiguiente la replicación a partir del *oriV*. De esta forma, es esperable que si en el inserto se

encuentra la secuencia de un gen cuya actividad enzimática es buscada, el aumento en el número de copias del fósido redunde en un aumento en el número de copias del gen, de su ARN mensajero y de la proteína que codifica, con un consecuente aumento en la actividad (**Figura 3b**).

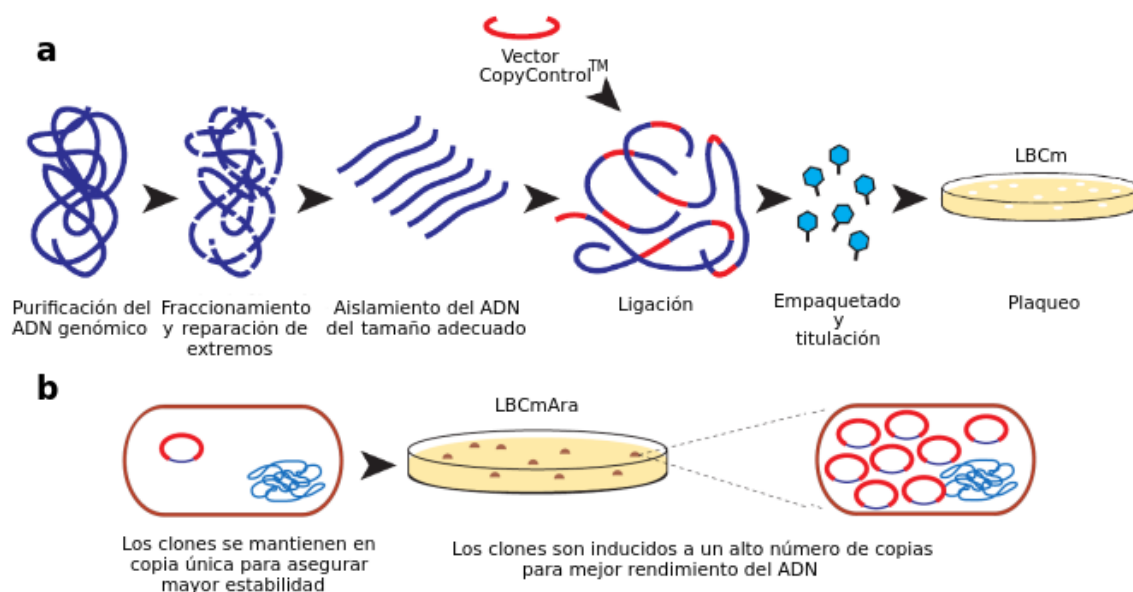


Figura 3. Representación esquemática de la construcción de una metagenoteca con el kit CopyControl™ Fosmid Library Production(a) y posterior inducción de la multicopia fósídica (b). Adaptado del manual del kit.

3.4.2 Titulación de los extractos y cálculo de eficiencia de empaquetado.

Se determinó la eficiencia del empaquetado y el título de la infección mediante la utilización de la cepa *E. coli* LE392PM, la cual es susceptible a la lisis por el fago lambda infectivo, y extractos del fago lambda MaxPlax™. Estos extractos están formados por lisados de dos cepas lisogénicas de *E. coli* complementarias, cada una deficiente en la producción de una proteína de la cápside distinta. Al combinar los extractos, se obtienen cápsides de fago Lambda para un empaquetado eficiente del ADN.

Se sembró *E. coli* LE392PM en 5 ml de LB líquido (ver **anexo 1**)⁴⁹ suplementado con MgSO₄ 10 mM y maltosa 0,2% (m/V) (LBMM) y se incubó 16 hs a 37°C y a 200 rpm. Se inocularon 50 ml de LBMM líquido con 5 ml del cultivo primario, se incubó a 37°C durante 4 hs a 200 rpm y se conservaron las células a 4°C hasta un máximo de 72 hs. Dado que el receptor del fago lambda en *E. coli* es el receptor LamB encargado de la internalización de maltosa, la presencia de maltosa en el medio de cultivo favorece la expresión del receptor y por lo tanto

la posterior infección⁵⁰.

Para formar los fagos lambda infectivos, se incubaron 25 µl de extracto MaxPlax™ en presencia de 0,2 µg del ADN del fago lambda durante 90 minutos a 30°C. Posteriormente se agregaron 25 µl más de extracto a la mezcla y se dejó incubando otros 90 minutos a 30°C. Se agregó 1 ml del Phage Dilution Buffer (PDB) (ver **anexo 2**) y 25 µl de cloroformo. Se realizaron diluciones seriadas en PDB (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6}), se tomaron alícuotas de 100 µl de cada dilución para infectar 100 µl del cultivo de *E. coli* LE392PM y se incubó 15 minutos a 37°C. A cada una de las mezclas de infección (de 200 µl cada una) se le agregaron 3 ml de LB-Soft Agar (**anexo 1**) a 45°C y se utilizó para cubrir placas de LB sólido. Se incubaron las placas 16 hs a 37°C y mediante recuento de las unidades formadoras de placas de lisis (ufp) se calculó el título (ufp/ml) y la eficiencia de empaquetado (ufp/µg), según detalla el protocolo.

3.4.3 Concentración y reparación del ADN metagenómico. Para clonar los fragmentos de ADN metagenómico en el vector PCC1FOS, es necesario que el ADN se encuentre a una concentración adecuada según lo recomendado por el fabricante y que tengan los extremos romos y fosforilados en 5'. Con esta finalidad se buscó llevar el ADN a una concentración de al menos 64 ng/µl mediante evaporación con trampa de vacío (SpeedVac, LABCONCO®) y se realizó la reparación según el protocolo sugerido. Se utilizó 1 µl de End-Repair Enzyme Mix, 1 µl de 10X End-Repair Buffer, 1 µl de ATP 10 mM, 1 µl de dNTP Mix 2,5 mM, 4 µl de H₂O mQ y 12 µl del ADN concentrado a 140 ng/µl. Se incubó 45 minutos a 25°C y se detuvo la reacción incubando 10 minutos a 70°C.

3.4.4 Ligación de los fragmentos de ADN metagenómico al vector. El vector pCC1FOS viene linearizado y desfosforilado de manera que se encuentra pronto para clonar el ADN metagenómico reparado. Se realizó la ligación según el protocolo sugerido por el fabricante. Se utilizaron 3 µl de la reacción de reparación del paso anterior, 1 µl de 10X Fast-Link Ligation Buffer, 1 µl de ATP 10 mM, 1 µl del vector pCC1FOS (0,5 µg/µl), 1 µl de Fast-Link DNA Ligase y 3 µl de H₂O mQ. Se incubó 4 horas a 25°C y se detuvo la reacción incubando 10 minutos a 70°C

3.4.5 Empaquetado e infección. El empaquetado de las reacciones de

ligación se realizó de forma análoga a como se detalla en el apartado 3.4.2, utilizando el ADN metagenómico reparado y ligado al vector PCC1FOS y células EPI300™-T1R. Se empleó una alícuota de 100 µl de cultivo para ser infectada con 10 µl del empaquetado, se incubó durante 1 hora a 37°C y se plaqueó en LB-Agar suplementado con Cm 12,5 µg/ml (LBCm). Se incubó a 37°C durante 24 hs y en base al número de ufc obtenidas, se infectó y se plaqueó el resto del empaquetado en la relación apropiada para obtener aproximadamente 200 ufc por placa.

3.5 Organización y almacenamiento de la metagenoteca

Los clones obtenidos en el apartado 3.4.5 se ordenaron en placas de 96 pocillos, de forma que cada pocillo con 100 µl de medio LBCm contuviera aproximadamente 30 clones, los cuales fueron inoculados utilizando palillos estériles. Se incubaron las placas a 30°C durante 16 hs y se repicaron con replica-plater de 48 puntas en placas con los distintos medios selectivos y diferenciales a evaluar en los ensayos funcionales. Las placas de 96 pocillos fueron guardadas a -80°C en LBCm y glicerol 25% (V/V).

3.6 Ensayos funcionales

Una vez sembrados los pooles en los medios finales, se incubaron a 30°C durante 16 hs para permitir el crecimiento de la cepa hospedera. Luego se incubaron a 25°C para facilitar la expresión de aquellas proteínas adaptadas al frío que estuviesen codificadas en el inserto de ADN del fósido. Las placas fueron observadas periódicamente por un lapso no mayor a 30 días. Aquellos medios finales que requerían un tratamiento posterior para evidenciar la actividad fueron incubados durante un plazo de 10 días, luego del cual se procedió al revelado de la actividad. Los medios de cultivo finales, salvo se indique expresamente, tenían como base LB-Agar con el agregado de 12,5 µg/ml de Cm, L-Arabinosa 0,01% (m/V) (LBCmAra) y los distintos sustratos a ser evaluados.

3.6.1 Actividad lipolítica. Para la detección de clones con actividad lipolítica se utilizaron 3 sustratos: tributirina⁵¹, tricaprilina y trioleína⁵². Todos ellos son triglicéridos y se diferencian en el largo de la cadena y grado de saturación de

sus ácidos grasos. La tributirina con 4 carbonos (C4) y la tricaprilina con 8 carbonos (C8) no presentan insaturaciones mientras que la trioleína con 18 carbonos presenta una insaturación (C18:1). Como se mencionó anteriormente, mientras que las carboxilesterasas presentan actividad en ésteres simples y triacilglicéridos de cadena corta, las lipasas tienen actividad preferencial por los triacilglicéridos de cadena larga con lo cual, a efectos prácticos, la trioleína se utiliza para detectar lipasas⁵² y la tributirina y la tricaprilina para detectar carboxilesterasas. Los sustratos se utilizaron en una concentración final del 1% (V/V), obteniéndose una emulsión con el medio de cultivo. La actividad lipolítica se evidenció por la formación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia como consecuencia de la liberación de los ácidos grasos del glicerol por la ruptura del enlace éster.

3.6.2 Actividad celulolítica. Para detectar endocelulasas y exocelulasas se utilizaron como sustratos la sal disódica de la carboximetilcelulosa (CMC) y Avicel respectivamente. En ambos casos el sustrato se agregó a una concentración final de 0,5% (m/V). El revelado de la actividad se realizó a los 10 días de inoculados los medios, para lo cual se removieron las colonias con un algodón embebido en agua, se agregaron 5 ml de una solución de rojo congo 0,05% (m/V) sobre el medio sólido y se dejó actuar 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó el medio con NaCl 1 M durante 10 minutos y se evaluó la actividad celulolítica^{53,54}. El rojo congo forma complejos con polímeros de polisacáridos interaccionando con los enlaces β -D-1,4. Si hay hidrólisis de dichos enlaces, el colorante no se une formando un halo amarillo sobre el fondo rojo, alrededor o debajo de donde se encontraban las colonias positivas⁵⁵.

3.6.3 Actividad xilanasa. La actividad xilanasa fue evaluada utilizando como sustrato xilano de madera de haya 0,5% (m/V)^{56,57}. El revelado de la actividad se realizó de forma análoga a la detallada para la actividad celulolítica.

3.6.4 Uso de Avicel como única fuente de carbono. La capacidad de utilizar avicel como única fuente de carbono permite evidenciar la presencia de celulasas y β -glucosidasas. Se utilizó el medio mínimo M9-Agar (ver **anexo 1**) suplementado con Cm 12,5 μ g/ml, L-Ara 0,01% (m/V) y además leucina 200 mM y timina 400 mM dado que la cepa EPI300™-T1R es auxótrofa para estos

compuestos. Se incorporó Avicel 0,5% (m/V) como única fuente de carbono. Los clones positivos serían aquellos que logren crecer en este medio.

3.6.5 Producción de oxidorreductasas. Para evaluar la capacidad de los clones de la biblioteca de producir oxidorreductasas capaces de oxidar compuestos similares a la lignina, se evaluó la producción de lignina-peroxidasas, manganeso-peroxidasas y lacasas. Para detectar las peroxidasas se utilizó como sustrato el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) a una concentración final de 0,025% (m/V) y en el caso de las Mn-peroxidasas además se agregó 0,5 mM de $MnCl_2$. Las actividades se revelaron a los 10 días con el agregado de peróxido de hidrógeno 1,25% (V/V). Los clones positivos se detectan por presentar una coloración azul-celeste como consecuencia de la oxidación del ABTS⁵⁸. En el caso de las peroxidasas, el mecanismo de oxidación es directo mientras que en las Mn-peroxidasas es indirecto ya que los óxidos de Mn producidos son los que oxidan el ABTS. Para detectar lacasas se utilizó como sustrato Guaiacol 2,4 mM y se suplementó el medio con $CuSO_4$ 0,16 mM. El Cu es utilizado como centros de transferencia electrónica por algunos tipos de lacasas como las multicobre-oxidases. Los clones positivos se detectan por la presencia de un halo marrón alrededor de la colonia o una coloración marrón de la misma, consecuencia de la oxidación enzimática del Guaiacol que pasa de incoloro a marrón⁵⁹.

3.7 Aislamiento de clones positivos

Para el aislamiento de los clones positivos dentro de los pools que presentaron actividad, se inoculó el pool en forma de estría en los medios selectivos adecuados de manera de obtener colonias aisladas y se seleccionaron aquellas colonias que presentaron actividad. En el caso de los ensayos destructivos donde se requiere revelado, se inoculó el pool en forma de estría en LBCm de manera de obtener colonias aisladas y se sembraron en placas de 96 pocillos conteniendo 100 μ l de medio LBCm. Se incubó a 30°C por 16 hs y se replicó la placa con replica-plater en el medio selectivo adecuado y en un medio LBCm empleado como placa molde. Los medios selectivos fueron incubados y revelados según la actividad. Los clones positivos fueron identificados luego del revelado y seleccionados en la placa molde de acuerdo

a su posición. Los clones positivos se guardaron a -80°C en LBCm conteniendo glicerol 25% (V/V).

3.8 Confirmación del fenotipo

Para verificar que la actividad enzimática observada estaba codificada en el inserto de ADN del fósido, se aislaron los fósidos y se reintrodujeron en la cepa EPI300™-T1R. Las transformantes se plaquearon en el medio selectivo adecuado para verificar que hubieran adquirido la función.

3.8.1 Purificación de fósidos. Los clones positivos se sembraron en 5 ml de LBCm, se incubaron 16 hs a 37°C a 200 rpm y se utilizaron 100 μl como inóculo primario en 5 ml de LBCm. El cultivo secundario se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) a 620 nm = 0,2-0,3 (aproximadamente 2 horas) y se indujo un aumento en el número de copias del fósido con L-Ara 0,01% (m/V) durante 4-5 horas a 37°C y 200 rpm. Los fósidos fueron aislados mediante el método de lisis alcalina⁴⁹. Brevemente, se cosecharon 5 ml de cultivo por centrifugación durante 1 minuto a 12.100 RCF, se resuspendieron las células en 300 μl de la solución I (ver **anexo 2**) cuya función es mantener las células en una solución isotónica y evitar la acción de ADNasas. Se adicionaron 300 μl de la solución II (ver **anexo 2**), provocando la lisis celular y la desnaturalización del ADN. Se mezcló por inversión y se dejó en hielo para evitar la acción de ADNasas. Se agregaron 300 μl de la solución III (ver **anexo 2**) para promover la renaturalización del ADN. Como el fósido es pequeño y se encuentra cerrado covalentemente, se re-hibrida fácilmente mientras que el ADN genómico no. El ADN genómico desnaturalizado forma precipitados con las proteínas y son fácilmente separados del fósido que se mantiene en solución. Se realizó una extracción orgánica con 300 μl de cloroformo y se centrifugó a 12.100 RCF durante 10 minutos. En la fase orgánica y en la interfase en forma de disco blanco quedan las proteínas y el ADN genómico mientras que en la fase acuosa se mantiene el ADN fósido en solución. Se colocó la fase acuosa en un tubo y se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol para deshidratar y precipitar el ADN. Se dejó precipitar 10 minutos en hielo, se centrifugó durante 10 minutos a 12.100 RCF, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet de ADN con 500 μl de EtOH 70% (V/V) para

eliminar sales remanentes. Se centrifugó a 12.100 RCF durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se secó el ADN eliminando los restos de EtOH que hayan podido quedar mediante centrifugación al vacío en SpeedVac. El pellet se resuspendió en 100 μ l de H₂O mQ, se agregaron 3 μ l de ARNasa (10 μ g/ml), se incubó 15 minutos a 37°C y se guardó la purificación a -20°C. La calidad y cantidad de ADN obtenido se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,7% (m/V).

3.8.2 Perfiles de restricción. Para verificar que los fósmidos contenidos en los clones con la misma actividad eran distintos, se analizaron sus perfiles de restricción. La restricción se realizó de la siguiente manera: 20 μ l de ADN fosmídico, 2,4 μ l de 10X Buffer FastDigest® y 2 μ l de enzima de restricción FastDigest® ya sea EcoRI o HindIII (Fermentas, ThermoScientific). Se incubaron 40 minutos a 37°C y los perfiles de restricción se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,7% (m/V).

3.8.3 Preparación de células EPI300™-T1R electrocompetentes y electroporación. Se sembró la cepa EPI300™-T1R en 5 ml de LB, se incubó 16 hs con agitación a 37°C y se inocularon 200 ml de LB con 1 ml del cultivo primario. Se incubó con agitación a 37°C hasta alcanzar una DO_{620nm} = 0,5. Se cosecharon las células durante 5 minutos a 1664 RCF y 4°C, se lavaron con 50 ml de agua destilada y posteriormente con 50 ml de glicerol 10% (V/V). Se centrifugó durante 7 minutos a 2600 RCF y 4°C, se resuspendieron las células en 5 ml de glicerol 10% (V/V), se alicuotaron de a 100 μ l y se guardaron a -80°C hasta su uso.

Se transformaron 100 μ l de células EPI300™-T1R electrocompetentes con 1 μ l de ADN fosmídico mediante electroporación. Como control negativo y positivo se electroporaron las células sin el agregado de ADN o con el plásmido pBlueScript, respectivamente. Se utilizó un pulso de 1800 V, se agregó 1 ml de LB y se dejaron recuperar las células durante 1 hora a 37°C. Se plaquearon 100 μ l en LBCm y LBCmAra suplementado con MnCl₂ 0,5 mM para el caso del ADN fosmídico y del control negativo, y 100 μ l en medio LB conteniendo ampicilina 50 μ g/ml en el caso del control positivo. Las placas se incubaron a 30°C durante 16 hs y posteriormente a 25°C según lo detallado en el apartado 3.6.

3.9 Caracterización del clon oxidador de manganeso (MnOx)

3.9.1 Determinación del pH del sobrenadante. Dado que el Mn^{2+} se oxida espontáneamente a pH básico⁶⁰ se verificó que los óxidos no fueran formados por la alcalinización del medio ocasionada por la presencia del fósforo. Se incubó el clon MnOx y otro clon que no presentó esta actividad como control negativo en 5 ml de LBCmAra. Se incubaron durante 16 hs a 30°C con agitación en ambos casos y se determinó el pH del sobrenadante con tiras de papel indicador.

3.9.2 Confirmación de actividad MnOx en medio sólido. Para determinar el rango de resolución de los ensayos a utilizar para la caracterización fenotípica del clon MnOx se sembraron 10 μ l de cultivo, provenientes del clon positivo o de un clon sin esta actividad, en 1 ml de LBCmAra sólido y concentraciones crecientes de $MnCl_2$ en placas de 24 pocillos. Los cultivos se incubaron 4 días a 30°C y se revelaron con 200 μ l de azul de Leucoberbelina (LBB) 0,04% (m/V) en ácido acético 45 mM. La LBB es un colorante orgánico-sulfurado que se oxida en presencia de Mn^{3+} a Mn^{7+} , cambiando de color de celeste a azul⁶¹.

3.9.3 Secuenciación del fósforo MnOx y análisis de secuencias. El fósforo con actividad MnOx fue purificado y secuenciado masivamente mediante el Ion Torrent del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Los reads fueron depurados y ensamblados. Los contigs obtenidos fueron comparados contra la base de datos del NCBI a nivel de nucleótidos utilizando el algoritmo Blast. Mediante el servidor WebMGA se buscaron marcos abiertos de lectura (ORFs) en las secuencias, se tradujeron a secuencias aminoacídicas y se buscó similitud con clusters de genes ortólogos (COG) para así asignar una funcionalidad a las mismas. Se buscaron características generales de las proteínas codificadas por los genes identificados como candidatos a ser responsables de las actividades observadas mediante el servidor ProSite, se determinaron algunos parámetros teóricos de dichas proteínas mediante el servidor ProtParam, y se buscaron dominios transmembrana y señales de exportación mediante los servidores TMHMM v. 2.0 y PrediSi, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1 Construcción de la biblioteca metagenómica

4.1.1 Extracción y selección de ADN metagenómico. Para obtener ADN metagenómico apropiado para la construcción de la biblioteca se realizaron dos extracciones distintas de ADN de la muestra de agua, una a las pocas horas de la colecta en el buque ROU 04 General Artigas (ADN1) y otra nueve días después de la colecta (ADN2). Se determinó la concentración de ambas muestras observándose una concentración mayor (23,4 ng/μl) en el caso de la muestra de ADN1 que para el ADN2 (6,3 ng/μl). Mediante electroforesis en gel de agarosa 0,7% se comprobó que el ADN1 contenía fragmentos del tamaño buscado (aproximadamente 35-40 Kb) y que no se encontraba degradado (**Figura 4**). Por lo tanto se utilizó el ADN1 para la construcción de la metagenoteca.

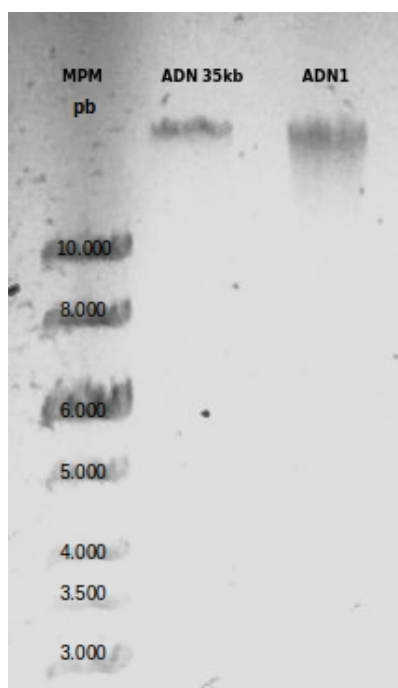


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción ADN1. En el carril 1 (a partir de la izquierda) se indica el marcador de peso molecular GenRuler™ 1Kb Ladder (MPP), en el carril 2 se muestra un fragmento de ADN lineal de 35 Kb, y en carril 3 se muestra el ADN1.

4.1.2 Titulación y eficiencia de empaquetado de los extractos. Los conteos de placas de lisis arrojaron los siguientes resultados para las distintas diluciones: 10^{-2} no contable; 10^{-4} 82 ufp; 10^{-5} 7 ufp y 10^{-6} 0 ufp. Utilizando los conteos correspondientes a las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} se calculó un título promedio de $7,6 \times 10^6$ ufp/ml, y una eficiencia de empaquetado promedio de 4×10^7 ufp/ μ g. Este resultado permitió concluir que los extractos estaban en condiciones para ser utilizados ya que según el manual del fabricante, una eficiencia óptima sería del orden de 1×10^9 pfu/ μ g.

4.1.3 Número esperado y obtenido de clones. Según el ensayo de control, se obtuvieron alrededor de 20 colonias por μ l de fago. Por consiguiente, a partir de los 980 μ l de fago infeccioso restantes, se esperaba obtener aproximadamente 20.000 clones. Sin embargo, se recuperaron aproximadamente 52.000 clones. Partiendo del supuesto que cada clon posee unos 35-40 kb, se puede estimar que la metagenoteca contiene alrededor de 1,8 Gb de información metagenómica.

4.2 Análisis funcional de la biblioteca

A partir de los clones obtenidos, se formaron pooles de aproximadamente 30 clones cada uno, los cuales se distribuyeron en 18 placas multipocillo. El análisis funcional de los pooles reveló que 75 pooles presentaban actividad esterasa/lipasa, 2 pooles actividad celulolítica, y 2 eran capaces de crecer con Avicel como única fuente de carbono. No se detectaron pooles con actividad lacasa, peroxidasa o manganeso peroxidasa. Interesantemente se identificaron 3 pooles que mostraron precipitados rojizo-amarronados cuando eran crecidos en medio conteniendo manganeso.

4.2.1 Actividad lipolítica. Al cabo de 18 días de incubación en medios conteniendo tributirina, se detectaron 75 pooles capaces de hidrolizar dicho sustrato (**Figura 5**).

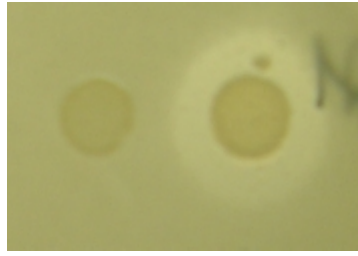


Figura 5. Ejemplo de un pool con actividad lipolítica en medio conteniendo una emulsión de tributirina. Se observa un halo de degradación en el pool con la actividad mencionada (derecha), mientras que en el otro (izquierda) no se observa actividad

Para determinar si presentaban actividad lipasa verdadera o esterasa, los 75 pooles se crecieron en medio con tricaprilina o trioleína, no observándose la formación de halo alrededor de ninguno de ellos. Para continuar caracterizando en mayor profundidad, se seleccionaron los 10 pooles que formaron el halo de hidrólisis de tributirina en menor tiempo de incubación. A partir de cada pool con actividad, se aislaron los clones positivos y se purificaron los fósmidos de 3 de ellos (**Figura 6**).

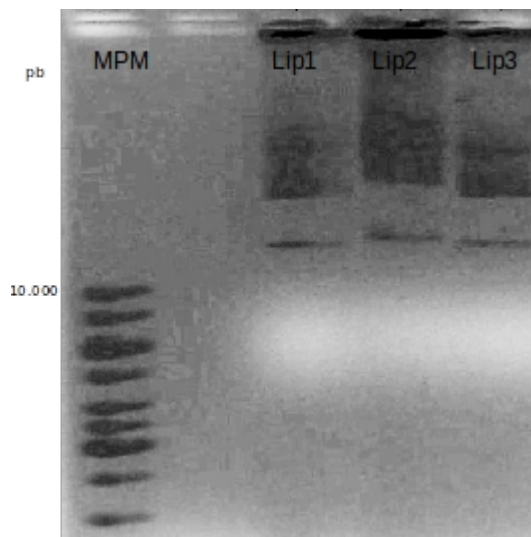


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de las extracciones fosmídicas de 3 clones con actividad lipolítica seleccionados. En el primer carril (a la izq.) se muestra el marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb Ladder. Los carriles 3, 4 y 5 muestran las extracciones correspondientes a 3 clones lipolíticos seleccionados (Lip1, Lip2, Lip3).

Como se muestra en la **figura 7**, los perfiles de restricción de los fósmidos

difirieron entre sí, indicando que los fósmidos contienen distintos fragmentos de ADN metagenómico.

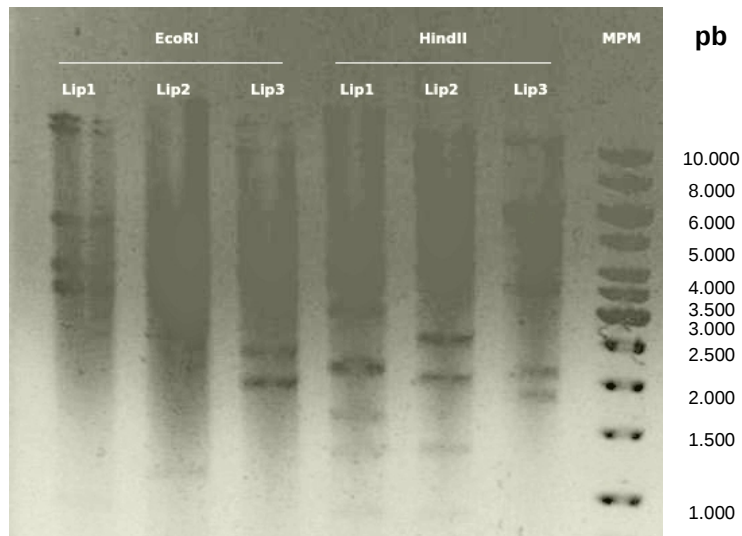


Figura 7. Perfiles de restricción de las extracciones fosmídicas de los 3 clones lipolíticos seleccionados (Lip1, Lip2 y Lip3). Los carriles 1, 2 y 3 (a partir de la izq.) corresponden a la digestión con EcoRI, los carriles 4, 5 y 6 a la digestión con HindIII, y el carril 7 a el marcador de peso molecular GeneRuler™ 1Kb Ladder.

Para verificar que la actividad esterasa era debida a la presencia del fósrido, una vez purificado éste, se introdujo en células de *E. coli* EPI300™-T1R mediante electroporación. Se observó que las colonias recuperadas, adquirirían el fenotipo esperado confirmando la hipótesis anterior.

4.2.2 Actividad celulolítica. Si bien se detectaron dos pooles capaces de hidrolizar CMC, no fue posible aislar el clon portador de actividad dentro de los pooles. En la **figura 8** se muestra un ejemplo de un pool capaz de hidrolizar CMC. También se detectaron 2 clones capaces de crecer en medio M9 con Avicel como única fuente de carbono. Si bien su crecimiento fue lento (se observó la aparición de las colonias luego de 1 mes de incubación), se pudo confirmar el fenotipo al crecer los clones aislados, nuevamente en medio M9 Avicel. No se detectaron clones capaces de hidrolizar Avicel en medio rico, ni clones con actividad xilanasa.

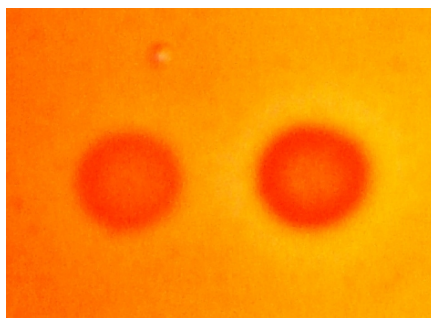


Figura 8. Ejemplo de un pool con actividad celulolítica en medio conteniendo CMC. Se observa un halo de degradación amarillo en el pool con la actividad mencionada (derecha), mientras que en el otro (izquierda) no se observa actividad.

4.2.3 Actividad manganeso-oxidasa (MnOx). Tres pooles mostraron precipitados rojizo-amarronados cuando eran crecidos en el medio utilizado para la detección de manganeso peroxidadas (**Figuras 9a y 9b**). No obstante, el fenotipo esperado para la detección de esta actividad (generación de color azul cuando se agrega peróxido de hidrógeno) no fue observada.

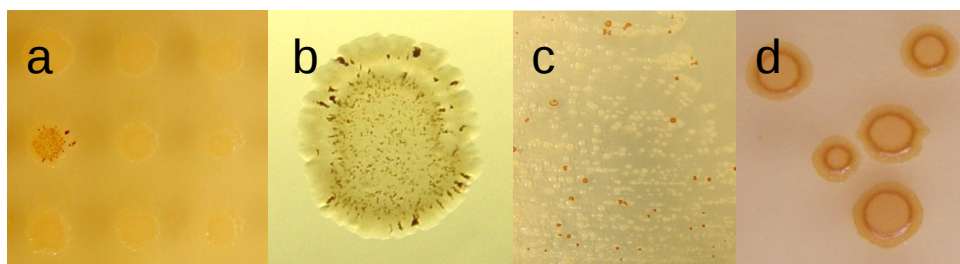


Figura 9. Aislamiento de uno de los clones oxidadores de Mn a partir del pool que presentó precipitados. (a): se muestra el pool que presentó precipitados rojizo-amarronados cuando fue crecido en medio conteniendo $MnCl_2$, junto con otros pooles negativos. (b): Detalle de uno de los pooles que presentó dichos precipitados. (c): aislamiento por estrías del clon productor de la actividad observada. (d): colonias aisladas de clones oxidadores de Mn.

De cada pool se aislaron las colonias que formaban precipitado marrón, seleccionando una colonia por pool (**Figuras 9c y 9d**). Se purificaron los fósmidos de estos tres clones y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (**Figura 10**).

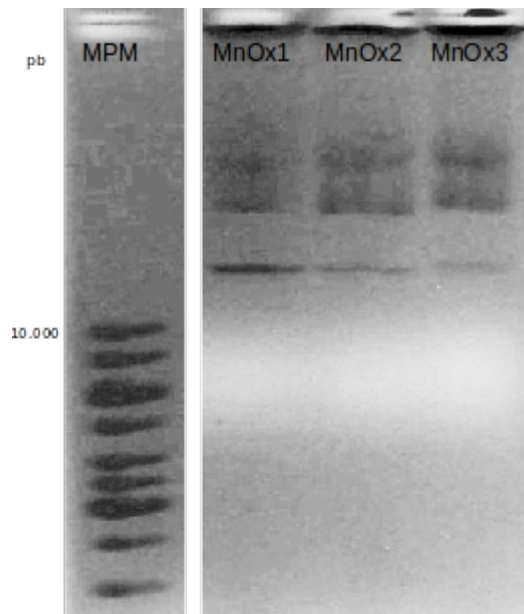


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de las extracciones fosmídicas de 3 clones con actividad MnOx. En el carril 1 (a la izquierda) se muestra el marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb Ladder. Los carriles 2, 3 y 4 muestran las extracciones correspondientes a los 3 clones oxidadores de Mn (MnOx1, MnOx2, MnOx3).

Como se muestra en la **figura 11**, los perfiles de restricción de los tres fósmidos son iguales indicando que seguramente contengan el mismo inserto de ADN metagenómico, por lo que se seleccionó uno sólo de los clones para seguir analizando.

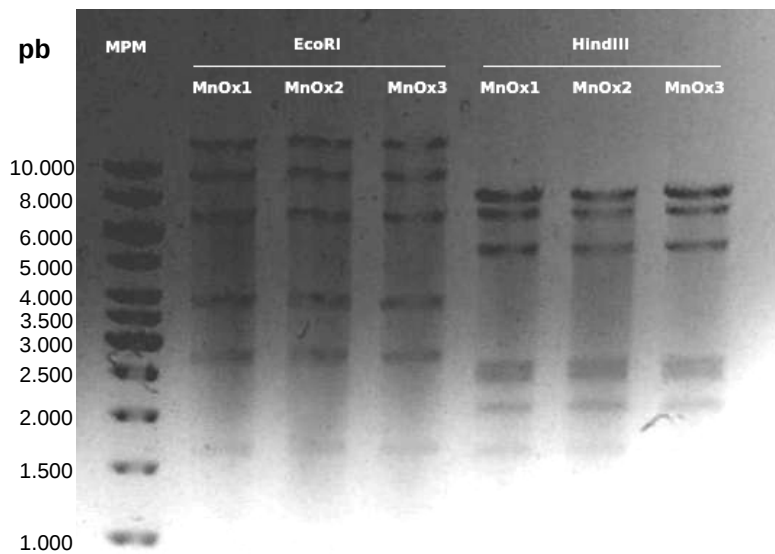


Figura 11. Perfiles de restricción de las extracciones fosmídicas de los 3 clones oxidadores de Mn (MnOx1, MnOx2 y MnOx3). En el carril 1 (a la izquierda) el marcador de peso molecular GeneRuler™ 1Kb Ladder, en los carriles 2, 3 y 4 se muestra la digestión con EcoRI, y en los carriles 5, 6 y 7 la digestión con HindIII.

A partir de la transformación de células de *E. coli* EPI300™-T1R con este fósido, se obtuvieron clones que también formaron precipitados marrón-rojizo confirmando que la actividad se debía a la presencia del fósido.

La formación de precipitados marrones se produjo aún en ausencia de ABTS indicando que este fenotipo no se debía a una actividad peroxidasa. Se evaluó el fenotipo en medio con y sin el agregado de manganeso, y se observó que el precipitado sólo se formaba en el medio suplementado con manganeso. Este fenotipo es el esperable para un clon que codifique una manganeso oxidasa. El agregado de LBB sobre colonias provenientes de dichos clones crecidas en presencia de manganeso reveló un cambio de color del reactivo de celeste a azul, mientras que dicho cambio no se observó en colonias que no contenían el fósido, como se muestra en la **figura 12**. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la formación de precipitados se debe a la actividad manganeso oxidasa resultante de la presencia del fósido.



Figura 12. Confirmación de la actividad manganeso oxidasa (MnOx). Se muestran colonias de clones MnOx a la izquierda, y de un control negativo (C-) a la derecha, crecidas en medio LBCmAra sólido con el agregado de $MnCl_2$. A las colonias de la fila inferior se les agregó una gota de LBB y se observa como dicho reactivo se torna azul al contacto con la colonia MnOx, mientras que se mantiene incoloro en el caso del control, confirmando que la actividad observada es la oxidación de Mn^{2+} .

4.3 Caracterización del clon MnOx

Dado que no se encontró en la bibliografía ninguna referencia a la detección de actividad MnOx mediante una aproximación metagenómica funcional, nos interesó la caracterización de este clon. Como primera aproximación se analizó la dependencia del fenotipo con respecto a la concentración de Mn. Con esta finalidad se evaluó tanto el fenotipo de precipitación de Mn (precipitado

marron-rojizo) como la oxidación de LBB en función de la concentración de Mn. El color rojizo-amarronado sobre el clon MnOx pudo ser detectado a concentraciones de MnCl₂ entre 50 y 500 μM, mientras que con el uso de LBB se pudo detectar la actividad a concentraciones de MnCl₂ entre 5 y 50 μM, permitiendo de esta manera una disminución en el límite de detección al utilizar LBB. A concentraciones de MnCl₂ mayores a 50 μM los óxidos espontáneamente formados en el control negativo sugieren que a altas concentraciones la LBB no es un buen indicador (**Figuras 13a y 13b**).

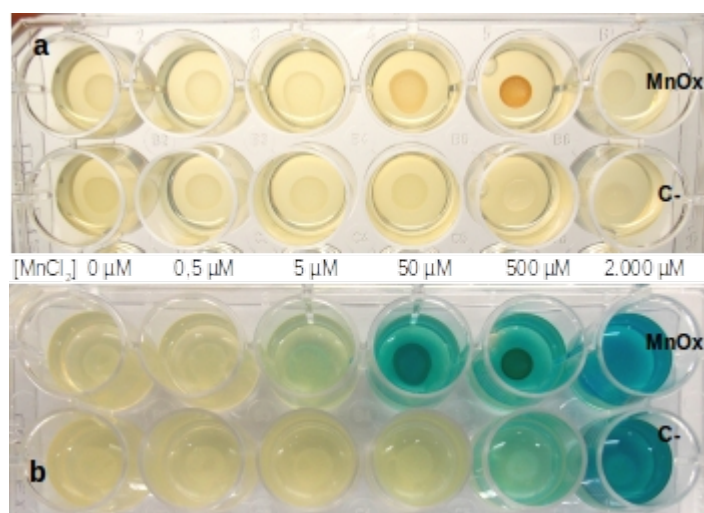


Figura 13. Determinación del rango de resolución de los ensayos para observar la actividad MnOx. (a): en la fila superior el clon MnOx, y en la fila inferior un control negativo para dicha actividad, ambos crecidos en medio sólido LBCmAra, y concentraciones crecientes de MnCl₂ como indica la imagen. La coloración rojiza-amarronada se observa a concentraciones de MnCl₂ entre 50 μM y 500 μM, mientras que no se observa en el caso del control. (b): Ídem que (a) con el agregado de 200 μl de LBB. El reactivo se torna azul a concentraciones de 5 μM o mayores para el clon MnOx, mientras que en el caso del control negativo, la oxidación espontánea del Mn hace que a concentraciones de 500 μM en adelante la LBB se vuelva azul.

Dado que la formación de óxidos de manganeso está favorecida a pH alcalino⁶⁰, se evaluó el pH del medio de cultivo para descartar que la actividad observada fuera debida a cambios en el pH del medio y no debido a la actividad manganeso oxidasa. Los resultados obtenidos mostraron que no hubo alcalinización del medio por parte del clon MnOx, manteniéndose en un pH cercano a 7, al igual que el clon utilizado como control negativo.

4.4 Secuenciación del fósido del clon MnOx y análisis bioinformático

Utilizando el equipo de secuenciación Ion Torrent se obtuvieron 115.359 reads de un largo promedio de 209 pb con las que se lograron ensamblar cinco contigs de 18.232 pb (C_1), 6.954 pb (C_2), 7.194 pb (C_3), 1.316 pb (C_4), y 1.472 (C_5) sumando un total de 35.168 pb. El contig 1 corresponde a una secuencia perteneciente al inserto de ADN en el cual un 34% de la secuencia muestra un 80% de identidad con *Octadecabacter antarcticus* una Alfabroteobacteria marina perteneciente al orden de las Rhodobacterales. Presenta 16 ORFs (**Figura 14a**) cuya funcionalidad asociada por homología se detalla en la **Tabla 1**. Tanto el contig 2 como el 4 presentan secuencias pertenecientes al vector pCC1FOS (**Figuras 14b y 14d respectivamente, Tabla 1**), sumando entre los dos un total de 8.270 pb, lo cual sugiere que contiene al menos 81 pb de inserto. El contig 3 no presenta ORFs (**Figura 14c**) ni tampoco muestra similitud a nivel nucleotídico con ninguna secuencia depositada en el genbank. El contig 5 contiene un ORF que muestra homología con una transposasa (**Figura 14e**) la cual a nivel aminoacídico presenta una identidad del 88% con una transposasa de *Shigella sonnei* (**Tabla 1**)

Tabla 1. Resultados para la búsqueda de ORFs y la asignación de COG mediante el servidor WebMGA. Se muestra también el organismo al cual pertenece la secuencia con mayor identidad para cada ORF, identificados mediante BLASTp del GenBank (NCBI).

ORF	Hit	E-valor	Identidad	Score	Query-start	Query-end	Query-length	Hit-start	Hit-end	Hit-length	Descripción	clase	Homología (aa) – BLASTp	ID %
18E5_C_1.02	COG3777	4.0E-56	37	211	1	276	280	1	273	273	Proteína conservada no caracterizada	S	<i>Roseobacter litoralis</i>	68
18E5_C_1.10	COG0404	4.0E-22	35	97.6	1	149	152	233	376	379	Proteína T del sistema de clivaje de Glycina (aminometiltransferasa)	E	<i>Sediminimonas qiaohouensis</i>	76
18E5_C_1.12	COG1653	1.0E-35	22	144	4	432	437	10	433	433	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente periplásmico	G	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	86
18E5_C_1.14	COG1175	1.0E-24	40	105	1	134	137	158	290	295	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente permeasa	G	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	96
18E5_C_1.15	COG3839	1.0E-127	53	448	1	343	350	1	338	338	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente ATPasa	G	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	88
18E5_C_1.18	COG1858	3.0E-37	30	149	25	360	449	37	322	364	Citocromo c peroxidasa	P	<i>Roseobacter</i> sp. CCS2	97
18E5_C_1.23	COG2301	6.0E-47	41	181	9	264	268	1	274	283	Citrato liasa, subunidad beta	G	Rhodobacteraceae bacterium HTCC2083	60
18E5_C_1.24	COG0451	2.0E-15	17	76.5	34	258	321	1	265	314	Azúcar nucleósido-difosfato epimerasa	MG	<i>Roseobacter</i> sp. CCS2	61
18E5_C_1.27	COG0404	3.0E-19	31	86.8	1	117	118	70	187	379	Proteína T del sistema de clivaje de Glycina (aminometiltransferasa)	E	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	70
18E5_C_1.41	COG1804	6.0E-44	28	172	1	394	402	11	396	396	Predicted acyl-CoA transferases/carnitine dehydratase	C	Rhodobacteraceae bacterium HTCC2083	84
18E5_C_1.50	COG0665	2.0E-40	27	160	3	360	474	29	386	387	Glicina/D-aminoácido oxidasa (deaminación)	E	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	80
18E5_C_1.50	COG0404	3.0E-14	43	73.4	388	474	474	1	68	379	Proteína T del sistema de clivaje de Glycina (aminometiltransferasa)	E	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	80
18E5_C_1.53	COG1175	4.0E-11	29	59.9	2	88	98	1	87	295	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente permeasa	G	<i>Roseovarius</i> sp. MCTG156(2b)	90
18E5_C_1.54	COG0395	3.0E-54	37	205	1	274	278	3	276	281	Sistema de transporte de azúcar tipo ABC, componente permeasa	G	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	96
18E5_C_1.69	COG0583	1.0E-20	31	93.1	12	157	200	1	145	297	Regulador transcripcional	K	<i>Octadecabacter antarcticus</i>	82
18E5_C_1.76	COG0583	5.0E-29	26	122	8	298	350	1	295	297	Regulador transcripcional	K	<i>Rhodobacter</i> sp. SW2	60
18E5_C_1.92	COG4286	8.0E-70	35	257	1	301	305	2	305	306	Proteína conservada no caracterizada relacionada a la familia MYG1	S	<i>Octadecabacter arcticus</i>	84
18E5_C_2.04	COG4845	6.0E-48	36	183	8	214	219	5	213	219	Cloranfenicol O-acetiltransferasa	V	<i>Clostridium scindens</i> ATCC 35704	100
18E5_C_2.27	COG1192	1.0E-36	27	147	109	388	391	2	259	259	ATPasa involucrada en partición celular	D	<i>Escherichia coli</i> K-12	100
18E5_C_2.36	COG4974	4.0E-10	34	56.4	19	79	110	221	276	300	recombinasa sitio-específica XerD	L	<i>Acinetobacter venetianus</i>	100
18E5_C_2.40	COG5527	2.0E-16	25	80.1	52	242	251	34	219	342	Proteína involucrada en la iniciación de la replicación plasmídica	L	<i>Escherichia coli</i> K-12	100
18E5_C_2.42	COG1475	1.0E-09	22	57.6	79	248	323	18	186	240	Regulador transcripcional	K	<i>Escherichia coli</i> K-12	100
18E5_C_5.02	COG2963	4.0E-08	26	50.6	6	108	143	1	106	116	Transposasa y derivados inactivos	L	<i>Shigella sonnei</i>	88

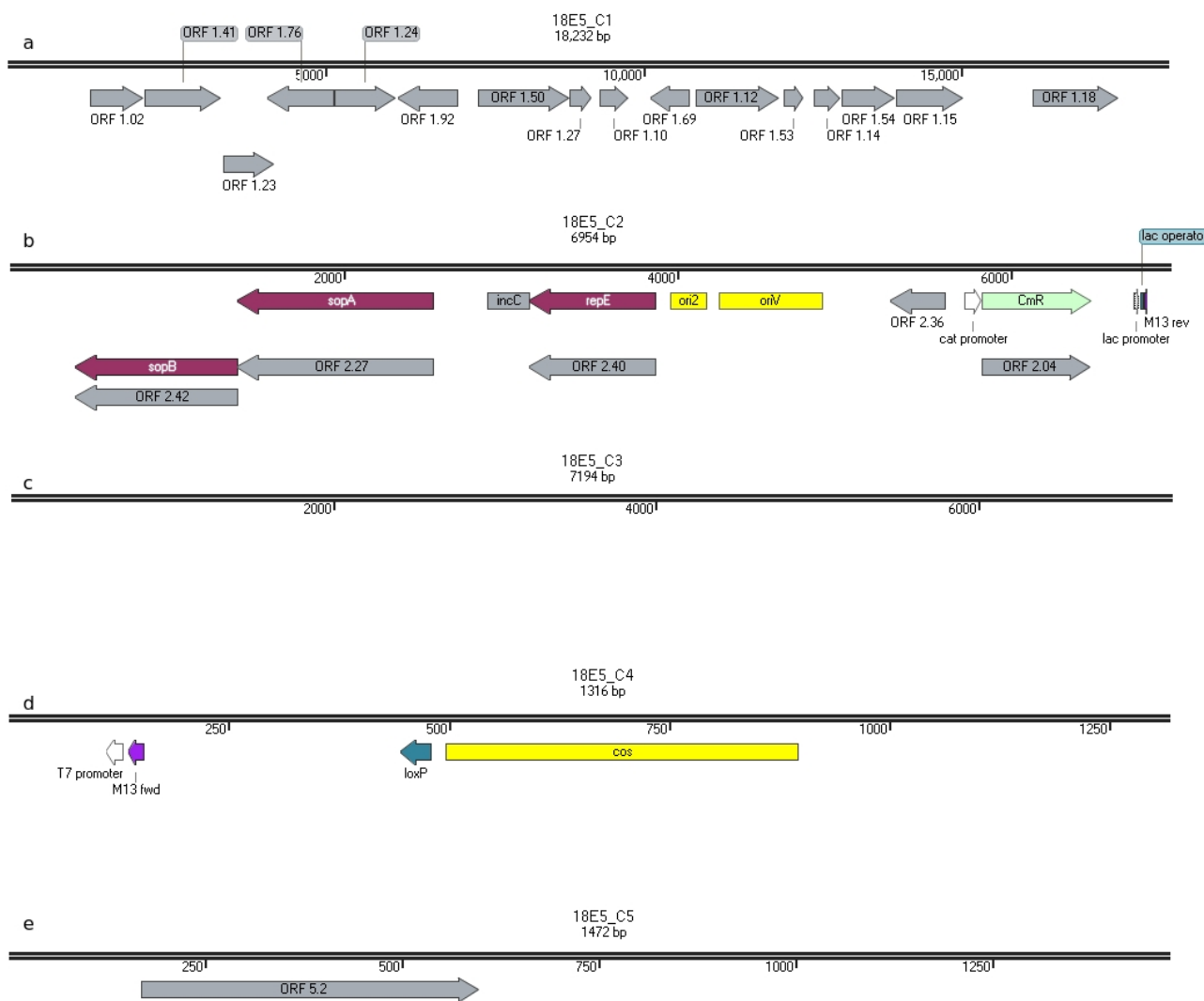


Figura 14. Representación de los contigs obtenidos de la secuenciación del fósforo de uno de los clones MnOx, con ORFs y otras secuencias anotadas. Los ORFs encontrados y anotados mediante el servidor WebMGA se muestran en gris. Sitios COS, ori2 y oriV se muestran en amarillo. Gen de resistencia a Cm se encuentra en turquesa. Se muestran superpuestos los ORFs detectados mediante el servidor WebMGA que coinciden con aquellos reconocidos del vector PCC1FOS. (a) Contig 1, (b) contig 2, (c) contig 3, (d) contig 4 y (e) contig 5., Imagen generada con SnapGene® Viewer 2.7.3.

La mayoría de las manganeso oxidasas estudiadas pertenecen al grupo de las Multicobre-oxidasas (MCO)⁶²⁻⁶⁴. Ninguno de los ORF's encontrados en los distintos contigs codificarían para MCO conocidas.

El ORF 1.18, que codificaría para una citocromo c peroxidasa (CcP), podría ser el responsable de la actividad MnOx, como han reportado Caspi y colaboradores⁶⁵ quienes observaron la pérdida de la actividad MnOx en mutantes que eran incapaces de formar el complejo Citocromo-c en *Pseudomonas putida* MnB1, y que perdían por completo la actividad citocromo-

c oxidasa. El parecido en las reacciones de oxidación y reducción llevadas a cabo por ambos tipos de enzimas pueden ser un indicio de una vía común de oxidación del Mn. La secuencia aminoacídica deducida de CcP mostró un 97% de identidad con la CcP de la cepa *Roseobacter* sp. CCS2.

Mediante el servidor Prosite se detectaron en la CcP dos motivos de unión a grupos hemo (CXXCH) donde las cisteínas unen covalentemente al grupo hemo y la histidina es uno de los dos ligandos axiales del hierro (**Figura 15**), sugiriendo que se trata de una di-hemo citocromo tipo c peroxidasa.

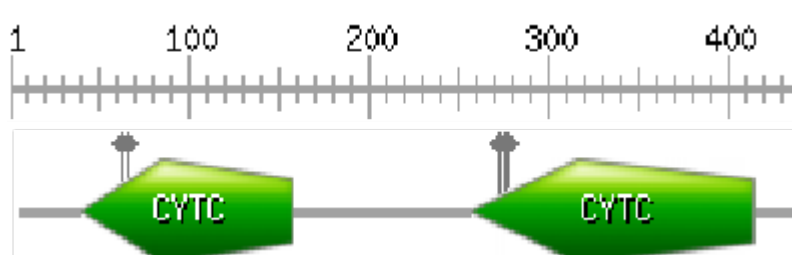


Figura 15. Representación del ORF 1.18, una citocromo c peroxidasa, de acuerdo al análisis del ProSite. En verde se muestran los dominios de unión a grupos hemo, en gris los sitios de unión del hemo a las cisteínas y las histidinas que corresponden a uno de los 2 ligandos axiales de cada hemo. Adaptado de Prosite.

Utilizando la herramienta ProtParam (ExPasy, SwissProt) se determinó que la proteína de 449 aminoácidos tendría un peso molecular de aproximadamente 47,5 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 4,83.

Mediante el servidor PrediSi se predijo un péptido señal de exportación hacia el medio extracelular o periplasma, con el sitio de clivado en el Asp31 (**Figura 16**), lo cual coincide con proteínas homólogas reportadas. Utilizando el servidor TMHMM v. 2.0 se determinó la ausencia de dominios transmembrana.

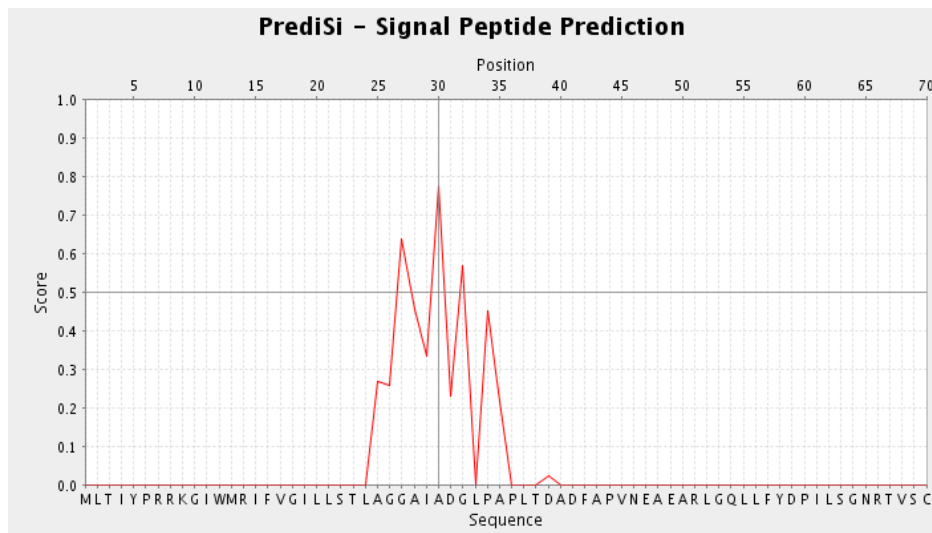


Figura 16. Predicción de péptido-senial de exportación. Se muestran los primeros 70 aminoácidos del ORF 1.18, con su score correspondiente para la predicción de sitio de clivaje. El máximo se observa entre la Ala30 y el Asp31. Tomado del servidor PrediSi.

Por otro lado, utilizando la base de datos del NCBI, los ORFs 1.10, 1.27 y 1.50 presentan alta identidad a nivel aminoacídico (>50%) con oxidorreductasas dependientes de FAD pertenecientes a bacterias de la familia Rhodobacteraceae. Estas oxidorreductasas pueden participar en la producción de superóxidos de forma no fotoquímica, los cuales a su vez podrían promover la oxidación del Mn^{2+} , a diferencia del oxígeno molecular el cual es inerte energéticamente al Mn^{2+} . Este mecanismo de oxidación de Mn ya ha sido reportado para el género *Roseobacter* perteneciente a la familia Rhodobacteraceae^{66,67}, así como para otros organismos⁶⁸.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se generó una metagenoteca de aproximadamente 52.000 clones a partir de una muestra de agua de deshielo colectada en la península antártica. Si consideramos que cada clon contiene un inserto de ADN ambiental de 40 Kb, la biblioteca entonces contiene unos 2 Gb de información metagenómica. Teniendo en cuenta que el genoma de *E. coli* posee alrededor de 4 Mb de información, la biblioteca construida representaría unos 500 equivalentes genómicos. Esto último no significa que la totalidad del ADN metagenómico provenga de bacterias. Si bien se sabe que los eucariotas

representan una baja proporción respecto a los microorganismos procariotas en un ambiente (menos del 0,1% del número total de células), el ADN eucariota puede representar alrededor del 90% del ADN ambiental total debido al mayor tamaño de su genoma⁶⁹. Dado que no se realizó un enriquecimiento en microorganismos procariotas previo a la extracción del ADN metagenómico, es esperable que la biblioteca contenga un número apreciable de clones con insertos de ADN de origen eucariota. Asumiendo en promedio que un genoma eucariota es 10.000 veces más grande que un genoma procariota y que su ADN es incapaz de ser expresado por la maquinaria de *E. coli*, necesitaríamos un número mucho mayor de clones para cubrir la misma información proveniente únicamente de procariotas. Considerando estos datos, podríamos estimar que los clones de nuestra biblioteca que efectivamente contienen insertos de ADN procariota es 10 veces menor que el número de clones totales, es decir 5200⁶⁹.

Si bien se obtuvieron aproximadamente 52.000 clones, de acuerdo a un primer plaqueo de referencia (ver apartado 4.2.4) el número esperado era de aproximadamente 20.000 clones. Este aumento de casi tres veces en el número de clones obtenidos con respecto al número esperado puede deberse a un error de manipulación. Luego de la infección, la biblioteca debe ser plaqueada rápidamente de manera de impedir que los clones se repliquen. Dado que el tiempo de generación de *E. coli* en medio LB a 30°C es de aproximadamente 30 minutos, la biblioteca debería haber sido plaqueada en un tiempo menor para evitar la duplicación celular y por lo tanto la sobrerrepresentación del número total de los clones en la biblioteca.

Otro indicio de esta sobrerrepresentación es el hecho que los fósidos de los tres clones con actividad Mn oxidasa presentaron el mismo perfil de restricción, es decir el mismo inserto. Dado el carácter azaroso de la fragmentación del ADN, incluso si consideramos que la bacteria de la cual se originó el inserto fuera muy abundante en la muestra, es muy improbable que se genere el mismo fragmento. Todo lo anterior sugiere una sobrerrepresentación de cada inserto en la biblioteca de alrededor 3 veces.

Sin embargo, incluso teniendo en cuenta estos inconvenientes, se obtuvieron resultados interesantes ya que se encontraron 75 clones con actividad

esterasa, 2 capaces de hidrolizar CMC, 2 capaces de crecer en Avicel como única fuente de carbono y 3 con actividad manganeso oxidasa. Expresado de otra manera, 0,144 % de los clones presentaron actividad esterasa, 0,039% hidrolizaron CMC, 0,039% utilizaron avicel como fuente de carbono y 0,058% mostraron actividad manganeso oxidasa. Berlemont y colaboradores²³ identificaron por medio de una biblioteca metagenómica generada a partir de suelo Antártico 14 clones productores de esterasas/lipasas de un total de 31.818 clones evaluados (lo cual representa un 0,044%) y 11 clones productores de celulasas de un total de 9.167 clones analizados (0,12%). Estos resultados indican un incremento de 3 veces el número de clones lipolíticos de nuestra biblioteca respecto a la de suelo citada. Teniendo en cuenta la probable sobrerrepresentación ya discutida de nuestra biblioteca, los porcentajes respecto al número total de clones se asemejan para esta actividad. A priori no sería esperable obtener porcentajes similares para muestras tan distintas como suelo y agua de deshielo ya que una muestra de suelo por lo general contiene más abundancia de microorganismos que una muestra de agua. En un trabajo recientemente publicado por nuestro grupo⁷⁰ se realizaron recuentos de cultivables tanto de la misma muestra que se empleó en este trabajo así como de otras muestras colectadas en la zona, algunas de ellas de suelo, observándose que las muestras de suelo presentaban recuentos mayores que las muestras de agua. Lo mismo es constatado por otros trabajos que reportaron conteos de órdenes similares para diferentes tipos de suelo de la Antártida^{71,72}.

La actividad enzimática presente en mayor número de pooles fue la lipolítica, detectada a través de la degradación de la tributirina. Ninguno de los clones capaces de hidrolizar este sustrato fue capaz de hidrolizar tricaprilina o trioleína, indicando se trataba de esterasas, y no de lipasas verdaderas. El halo de degradación formado por los clones positivos fue fácilmente apreciado en las primeras 48 hs de incubación en la mayoría de los casos. Se sabe que este tipo de enzimas son ubicuas entre los microorganismos⁷³. Esta característica podría ser más pronunciada en los microorganismos que habitan ambientes oligotróficos, como la Antártida, donde la presencia de carbohidratos como fuente potencial de energía es escasa. En este sentido, se ha reportado que en

fitoplankton el carbono es principalmente fijado en forma de lípidos o proteínas, respecto al anabolismo de polisacáridos⁷⁴. Otra posible explicación es que la estrategia seguida en este trabajo para la construcción de la biblioteca metagenómica da mejores resultados de expresión en *E. coli* para la actividad esterasa extracelular.

Por otra parte, está reportado que existen lipasas con preferencia por sustratos de cadena larga³⁵ y que no son capaces de utilizar triglicéridos de cadena corta como sustratos. Este hecho también fue constatado en un trabajo realizado con bacterias antárticas cultivables⁷⁰. En este trabajo los sustratos tricaprilina y trioleína fueron ensayados sólo en aquellos clones capaces de hidrolizar el sustrato tributirina, lo que posiblemente impidió la detección de clones capaces de hidrolizar únicamente triglicéridos de cadena larga (C>10). Esto último sugiere que los screenings para los sustratos tricaprilina y trioleína deberían realizarse teniendo en cuenta la totalidad de los clones.

En el caso de la actividad celulolítica, sólo se detectaron dos pooles capaces de degradar CMC y dos clones capaces de crecer con Avicel como única fuente de carbono, aunque resta verificar la asociación entre la presencia del fósido y la actividad para estos casos.

Si bien es esperable que aquellos clones capaces de crecer con Avicel como única fuente de carbono también tengan actividad degradadora de Avicel en medio rico, éste no fue el caso. Este hecho puede deberse a que el medio rico puede inhibir la expresión de celulasas ya que frente a la abundancia de una fuente de carbono y energía sencilla como la glucosa se hace innecesaria la expresión de enzimas degradadoras de un sustrato más complejo como la celulosa⁷⁵. Esto llevaría a que la expresión de exocelulasas en ambos medios sea distinta. El bajo número de clones capaces de degradar compuestos celulósicos puede deberse a que las fuentes relevantes de celulosa en la Antártida son las algas y la muestra fue tomada de una laguna de agua dulce de deshielo donde esta fuente no estaría presente en cantidades apreciables, y el aporte de celulosa por parte de plantas superiores antárticas (*Deschampsia antarctica* y *Colobanthus quitensis*) no parece ser significativo. Al no ser tan disponible como fuente de carbono y energía, no existirían presiones selectivas importantes sobre estos microorganismos para desarrollar estrategias

enzimáticas para aprovechar la celulosa. El aporte de celulosa por parte de musgos, sin embargo, puede ser considerado relevante a nivel ecológico en estos ambientes, especialmente favorecido por la actividad ornitogénica en esta zona. Además se han detectado celulasas de ambientes fríos capaces de polimerizar celobiosa para formar celulosa⁷⁶ y se ha reportado, a su vez, que la producción de exopolisacáridos por parte de bacterias puede promover la formación de biofilms⁷⁷ el cual es un mecanismo frecuentemente usado por las bacterias en este tipo de ambientes⁷⁸. Esto podría indicar que la obtención de energía a partir de la celulosa de algas y plantas puede no ser la única ni la más importante función ecológica que cumplen estas enzimas.

Interesantemente se detectaron 3 pools con la capacidad de oxidar Mn^{2+} , una actividad que no fue deliberadamente buscada, siendo el primer reporte de esta actividad hallada mediante un abordaje metagenómico funcional. Las bacterias oxidadoras de Mn (BOM) cumplen un rol de suma importancia en el ciclo biogeoquímico de este metal, ya que si bien la oxidación de Mn se da de forma espontánea, la catálisis biológica acelera este proceso varios órdenes de magnitud⁷⁹. El Mn^{2+} soluble se libera de fluidos hidrotermales o de la meteorización de rocas de dicho metal en forma de silicatos y carbonatos, y la oxidación por parte de los microorganismos se cree que genera la mayor parte de los óxidos presentes en el ambiente⁸⁰. Se han encontrado microorganismos oxidadores de Mn^{2+} en grupos filogenéticamente diversos y están presentes en gran diversidad de ambientes⁶⁰. La pregunta de por qué estas BOMs oxidan el Mn contiene muchas respuestas factibles. Se ha sugerido que dicha actividad es una ocurrencia accidental de interacciones no específicas entre la enzima y el Mn⁸¹, aunque la diversidad de bacterias capaces de realizar dicho proceso⁸²⁻⁸⁶, así como también la diversidad de enzimas implicadas que evolucionaron independientemente unas de otras sugieren que existen razones evolutivas por las cuales dicha actividad provee alguna ventaja. La capacidad de algunas BOMs de cubrirse de estos óxidos también sugiere una funcionalidad⁶⁰. Los beneficios potenciales que podrían tener estos óxidos son protección frente a la predación, como aceptor de electrones⁸⁷, actividad anti-oxidante⁸⁸, protección frente a la radiación ionizante⁸⁹, al UV, al ataque viral y a la toxicidad por

metales⁶⁰, así como también permitir el lisado de sustancias húmicas a compuestos de bajo peso molecular que podrían ser usados como sustratos para el crecimiento microbiano⁹⁰. La mayoría de las manganeso oxidasas estudiadas pertenecen al grupo de las Multicobre-oxidasas, aunque algunas hemo-peroxidasas también han sido reportadas⁹¹. El fósido fue secuenciado y no se encontraron homólogos a las manganeso oxidasas clásicas, aunque un ORF similar a una citocromo c peroxidasa fue identificado así como también oxidorreductasas que indirectamente podrían causar la actividad observada.

6. CONCLUSIONES

Se logró construir una biblioteca metagenómica de 52.000 clones a partir del ADN metagenómico extraído de una muestra de agua de deshielo Antártica, y se evaluó la misma mediante un análisis funcional. Se detectaron clones productores de carboxilesterasas, celulasas, y oxidadores de Mn^{2+} capaces de expresar su actividad a 25°C. Se caracterizó uno de los clones oxidadores de Mn^{2+} tanto a nivel fenotípico como a nivel genómico mediante el análisis de secuencias. Si bien el interés inicial del trabajo era la bioprospección enfocada a la producción de biocombustibles y la actividad manganeso oxidasa no fue deliberadamente buscada, los resultados obtenidos permitieron ampliar las ideas de posibles aplicaciones biotecnológicas.

7. PERSPECTIVAS

Dado que mediante la secuenciación total del fósido con actividad MnOx no fue posible adjudicar dicha función a una secuencia en particular, como perspectivas se intentará identificar el gen o genes responsables de dicha función. Para ello se están considerando 3 estrategias. En primer lugar mutagénesis *in vitro* de los fósidos mediante un transposón que contiene un gen de resistencia a kanamicina. Mediante dicho abordaje se busca la pérdida de actividad al incorporarse aleatoriamente el transposón en el gen responsable. Al conocer la secuencia del transposón es posible diseñar cebadores para secuenciar hacia “afuera” del mismo y determinar la secuencia del inserto colindante. Una vez que se tiene la secuencia es posible compararla

con las bases de datos existentes para, de ser posible, adjudicarle una función en base a homología de secuencias.

Un segundo abordaje consiste en fragmentar el inserto de ADN y subclonarlo en plásmidos, transformar una cepa con dichos plásmidos y ensayar la actividad buscada. Una vez obtenido un clon con actividad es posible secuenciar el inserto a partir de secuencias del plásmido y determinar *in silico* el gen responsable de la función observada. El tercer abordaje consiste en realizar un zimograma, es decir evaluar la actividad de los extractos celulares en una corrida electroforética en gel de poliacrilamida en ausencia de agentes desnaturizantes. Una vez finalizada la corrida es posible determinar la actividad enzimática mediante la incubación con Mn. Aquellas proteínas con actividad MnOx se evidenciarán por la acumulación de óxidos de Mn que podrán ser detectados con más sensibilidad al utilizar LBB para teñir el gel posteriormente. Una vez identificada la proteína con actividad MnOx, es posible extraerla del gel y hacer un análisis mediante espectrometría de masas (MS) para identificar la proteína.

Una vez identificado el gen responsable, se amplificará la secuencia por PCR, se clonará en el vector de expresión pET14b y se transformarán células de *E. coli* de la cepa BL21DE3(pLysS) para sobreexpresar dicha proteína. El plásmido pET14b contiene un promotor fuerte inducible por IPTG adyacente al sitio de clonado de modo de aumentar la expresión del gen blanco cuando se requiera. También contiene una región que codifica para una serie de histidinas que quedan fusionadas en el extremo N-terminal de la proteína, de modo que permite purificar la enzima utilizando una columna con una matriz que contiene Ni²⁺ inmovilizado. Una vez purificada la enzima, el siguiente paso sería determinar las características bioquímicas, poniendo especial énfasis en la temperatura óptima de actividad de modo de determinar si se trata o no de una enzima adaptada al frío, determinar los parámetros cinéticos, el efecto de inhibidores y evaluar su posible aplicación industrial, ya sea como oxidante indirecto de compuestos fenólicos como la lignina o para la producción de biofiltros de remoción de Mn en aguas.

Bibliografía

1. Illanes, A. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. (Springer Science & Business Media, 2008).
2. Lorenz, P. & Eck, J. Metagenomics and industrial applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 510–516 (2005).
3. Cherry, J. R. & Fidantsef, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 438–443 (2003).
4. De Pascale, D., De Santi, C., Fu, J. & Landfald, B. The microbial diversity of Polar environments is a fertile ground for bioprospecting. *Mar. Genomics* **8**, 15–22 (2012).
5. Margesin, R. & Höggblom, M. M. Thematic issue: Microorganisms in cold environments: Editorial. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59**, 215–216 (2007).
6. Hoyoux, A. *et al.* Extreme catalysts from low-temperature environments. *J. Biosci. Bioeng.* **98**, 317–330 (2004).
7. Tindall, B. J. Prokaryotic diversity in the Antarctic: the tip of the iceberg. *Microb. Ecol.* **47**, 271–283 (2004).
8. Cavicchioli, R., Siddiqui, K. S., Andrews, D. & Sowers, K. R. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 253–261 (2002).
9. Giovannoni, S. J., Britschgi, T. B., Moyer, C. L. & Field, K. G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**, 60–63 (1990).
10. Staley, J. T. & Konopka, A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 321–346 (1985).
11. Vester, J. K., Glaring, M. A. & Stougaard, P. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extrem. Life Extreme Cond.* **19**, 17–29 (2015).
12. Cowan, D. *et al.* Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends Biotechnol.* **23**, 321–329 (2005).

13. De Lorenzo, V. Problems with metagenomic screening. *Nat. Biotechnol.* **23**, 1045; author reply 1045–1046 (2005).
14. Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **68**, 669–685 (2004).
15. Shao, H., Xu, L. & Yan, Y. Isolation and characterization of a thermostable esterase from a metagenomic library. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 1211–1222 (2013).
16. López-López, O., Cerdán, M. E. & Gonzalez-Siso, M. I. New Extremophilic Lipases and Esterases from Metagenomics. *Curr. Protein Pept. Sci.* (2014).
17. Kim, S.-J. *et al.* Characterization of a gene encoding cellulase from uncultured soil bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **282**, 44–51 (2008).
18. Mai, Z., Su, H., Yang, J., Huang, S. & Zhang, S. Cloning and characterization of a novel GH44 family endoglucanase from mangrove soil metagenomic library. *Biotechnol. Lett.* (2014). doi:10.1007/s10529-014-1531-4
19. Zhang, L. *et al.* Isolation and characterization of a novel endoglucanase from a *Bursaphelenchus xylophilus* metagenomic library. *PloS One* **8**, e82437 (2013).
20. Ferrer, M., Beloqui, A. & Golyshin, P. N. Screening metagenomic libraries for laccase activities. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **668**, 189–202 (2010).
21. Iqbal, H. A., Craig, J. W. & Brady, S. F. Antibacterial enzymes from the functional screening of metagenomic libraries hosted in *Ralstonia metallidurans*. *FEMS Microbiol. Lett.* (2014). doi:10.1111/1574-6968.12431
22. López-Pérez, M., Mirete, S., Jardón-Valadez, E. & González-Pastor, J. E. Identification and modeling of a novel chloramphenicol resistance protein detected by functional metagenomics in a wetland of Lerma, Mexico. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* **16**, 103–111 (2013).
23. Berlemont, R. *et al.* Exploring the Antarctic soil metagenome as a source of novel cold-adapted enzymes and genetic mobile elements. *Rev. Argent. Microbiol.* **43**, 94–103 (2011).

24. Cieśliński, H. *et al.* Identification and molecular modeling of a novel lipase from an Antarctic soil metagenomic library. *Pol. J. Microbiol. Pol. Tow. Mikrobiol. Pol. Soc. Microbiol.* **58**, 199–204 (2009).
25. Heath, C., Hu, X. P., Cary, S. C. & Cowan, D. Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from antarctic desert soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4657–4659 (2009).
26. Paulová, L., Patáková, P., Branská, B., Rychtera, M. & Melzoch, K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnol. Adv.* (2014). doi:10.1016/j.biotechadv.2014.12.002
27. Saha, B. C., Qureshi, N., Kennedy, G. J. & Cotta, M. A. Enhancement of xylose utilization from corn stover by a recombinant *Escherichia coli* strain for ethanol production. *Bioresour. Technol.* **190**, 182–188 (2015).
28. Knothe, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process. Technol.* **86**, 1059–1070 (2005).
29. Li, X., Xu, H. & Wu, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **98**, 764–771 (2007).
30. Ma, F. & Hanna, M. A. Biodiesel production: a review¹. *Bioresour. Technol.* **70**, 1–15 (1999).
31. Gerpen, J. V. Biodiesel processing and production. *Fuel Process. Technol.* **86**, 1097–1107 (2005).
32. Fukuda, H., Kondo, A. & Noda, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 405–416 (2001).
33. Bornscheuer, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 73–81 (2002).
34. Nardini, M., Lang, D. A., Liebeton, K., Jaeger, K. E. & Dijkstra, B. W. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. The prototype for family I.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* **275**, 31219–

31225 (2000).

35. Eggert, T., Pencreac'h, G., Douchet, I., Verger, R. & Jaeger, K. E. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase. *Eur. J. Biochem. FEBS* **267**, 6459–6469 (2000).
36. Robles-Medina, A., González-Moreno, P. A., Esteban-Cerdán, L. & Molina-Grima, E. Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnol. Adv.* **27**, 398–408 (2009).
37. Joseph, B., Ramteke, P. W. & Thomas, G. Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments. *Biotechnol. Adv.* **26**, 457–470 (2008).
38. Anobom, C. D. *et al.* From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Res. Int.* **2014**, 684506 (2014).
39. Ibrahim, A. S. S. & El-diwany, A. I. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **1**, 473–478 (2007).
40. Bhat, M. K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* **18**, 355–383 (2000).
41. Collins, T., Gerday, C. & Feller, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 3–23 (2005).
42. Ducros, V. *et al.* Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **5**, 310–316 (1998).
43. Aehle, W. *Enzymes in Industry: Products and Applications*. (John Wiley & Sons, 2006).
44. Kudanga, T. & Roes-Hill, M. L. Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 6525–6542 (2014).
45. Le Roes-Hill, M., Khan, N. & Burton, S. G. Actinobacterial peroxidases: an unexplored resource for biocatalysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**, 681–

713 (2011).

46. Bansal, N. & Kanwar, S. S. Peroxidase(s) in environment protection. *ScientificWorldJournal* **2013**, 714639 (2013).
47. Fernández-Fueyo, E. *et al.* Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 2 (2014).
48. Kuan, I. C., Johnson, K. A. & Tien, M. Kinetic analysis of manganese peroxidase. The reaction with manganese complexes. *J. Biol. Chem.* **268**, 20064–20070 (1993).
49. Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
50. Ryter, A., Shuman, H. & Schwartz, M. Intergration of the receptor for bacteriophage lambda in the outer membrane of Escherichia coli: coupling with cell division. *J. Bacteriol.* **122**, 295–301 (1975).
51. Fryer, T. F., Lawrence, R. C. & Reiter, B. Methods for Isolation and Enumeration of Lipolytic Organisms. *J. Dairy Sci.* **50**, 477–484 (1967).
52. Kouker, G. & Jaeger, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 211–213 (1987).
53. Teather, R. M. & Wood, P. J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 777–780 (1982).
54. Wood, T. M. & Bhat, K. M. in *Methods in Enzymology* (ed. Willis A. Wood, S. T. K.) **Volume 160**, 87–112 (Academic Press, 1988).
55. Lynd, L. R. & Zhang, Y. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, 467–475 (2002).
56. Wakiyama, M., Yoshihara, K., Hayashi, S. & Ohta, K. Purification and

- properties of an extracellular beta-xylosidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene. *J. Biosci. Bioeng.* **106**, 398–404 (2008).
57. Kulkarni, P. & Gupta, N. Screening and evaluation of soil fungal isolates for xylanase production. *Recent Res. Sci. Technol.* **5**, (2013).
58. Hofrichter, M., Bublitz, F. & Fritsche, W. Fungal attack on coal II. Solubilization of low-rank coal by filamentous fungi. *Fuel Process. Technol.* **52**, 55–64 (1997).
59. Kiiskinen, L.-L., Rättö, M. & Kruus, K. Screening for novel laccase-producing microbes. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 640–646 (2004).
60. Tebo, B. M., Johnson, H. A., McCarthy, J. K. & Templeton, A. S. Geomicrobiology of manganese(II) oxidation. *Trends Microbiol.* **13**, 421–428 (2005).
61. 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).
62. Dick, G. J., Torpey, J. W., Beveridge, T. J. & Tebo, B. M. Direct identification of a bacterial manganese(II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1527–1534 (2008).
63. Su, J. *et al.* CotA, a multicopper oxidase from *Bacillus pumilus* WH4, exhibits manganese-oxidase activity. *PloS One* **8**, e60573 (2013).
64. Butterfield, C. N., Soldatova, A. V., Lee, S.-W., Spiro, T. G. & Tebo, B. M. Mn(II,III) oxidation and MnO₂ mineralization by an expressed bacterial multicopper oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11731–11735 (2013).
65. Caspi, R., Tebo, B. M. & Haygood, M. G. c-type cytochromes and manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3549–3555 (1998).

- 66.Learman, D. R., Voelker, B. M., Vazquez-Rodriguez, A. I. & Hansel, C. M. Formation of manganese oxides by bacterially generated superoxide. *Nat. Geosci.* **4**, 95–98 (2011).
- 67.Learman, D. R. & Hansel, C. M. Comparative proteomics of Mn(II)-oxidizing and non-oxidizing Roseobacter clade bacteria reveal an operative manganese transport system but minimal Mn(II)-induced expression of manganese oxidation and antioxidant enzymes. *Environ. Microbiol. Rep.* **6**, 501–509 (2014).
- 68.Diaz, J. M. *et al.* Widespread production of extracellular superoxide by heterotrophic bacteria. *Science* **340**, 1223–1226 (2013).
- 69.Gabor, E. M., de Vries, E. J. & Janssen, D. B. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **44**, 153–163 (2003).
- 70.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).
- 71.Shivaji, S. *et al.* Antarctic ice core samples: culturable bacterial diversity. *Res. Microbiol.* **164**, 70–82 (2013).
- 72.Aislabie, J. M. *et al.* Bacterial composition of soils of the Lake Wellman area, Darwin Mountains, Antarctica. *Extrem. Life Extreme Cond.* **17**, 775–786 (2013).
- 73.Ghosh, P. K., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P. & Davidson, S. Microbial lipases: production and applications. *Sci. Prog.* **79 (Pt 2)**, 119–157 (1996).
- 74.Henderson, R. J., Olsen, R. E., and Eilertsen, H. C. Lipid composition of phytoplankton from the Barents Sea and environment on the distribution patten of carbon among photosynthetic end products. *Polar Res.* **10**, 229–237 (1991).
- 75.Holtzapple, M., Cognata, M., Shu, Y. & Hendrickson, C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **36**,

275-287 (1990).

76. Berlemont, R. *et al.* Insights into bacterial cellulose biosynthesis by functional metagenomics on Antarctic soil samples. *ISME J.* **3**, 1070-1081 (2009).
77. Matthyse, A. G. *et al.* The Effect of Cellulose Overproduction on Binding and Biofilm Formation on Roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **18**, 1002-1010 (2005).
78. Poli, A., Anzelmo, G. & Nicolaus, B. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Mar. Drugs* **8**, 1779-1802 (2010).
79. Tebo, B. M. *et al.* BIOGENIC MANGANESE OXIDES: Properties and Mechanisms of Formation. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **32**, 287-328 (2004).
80. Shiller, A. M. & Stephens, T. H. Microbial Manganese Oxidation in the Lower Mississippi River: Methods and Evidence. *Geomicrobiol. J.* **22**, 117-125 (2005).
81. Edwards, K. J., Bach, W. & Rogers, D. R. Geomicrobiology of the ocean crust: a role for chemoautotrophic Fe-bacteria. *Biol. Bull.* **204**, 180-185 (2003).
82. De Vrind, J. P. *et al.* Manganese oxidation by spores and spore coats of a marine bacillus species. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 1096-1100 (1986).
83. Okazaki, M. *et al.* Partial purification and characterization of manganese-oxidizing factors of *Pseudomonas fluorescens* GB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4793-4799 (1997).
84. Adams, L. F. & Ghiorse, W. C. Characterization of extracellular Mn²⁺-oxidizing activity and isolation of an Mn²⁺-oxidizing protein from *Leptothrix discophora* SS-1. *J. Bacteriol.* **169**, 1279-1285 (1987).
85. Larsen, E. I., Sly, L. I. & McEwan, A. G. Manganese(II) adsorption and oxidation by whole cells and a membrane fraction of *Pedomicrobium* sp. ACM 3067. *Arch. Microbiol.* **171**, 257-264 (1999).
86. Templeton, A. S., Staudigel, H. & Tebo, B. M. Diverse Mn(II)-Oxidizing

- Bacteria Isolated from Submarine Basalts at Loihi Seamount. *Geomicrobiol. J.* **22**, 127–139 (2005).
87. Tebo, B. M., Ghiorse, W. C., Waasbergen, L. G. van, Siering, P. L. & Caspi, R. Bacterially mediated mineral formation; insights into manganese(II) oxidation from molecular genetic and biochemical studies. *Rev. Mineral. Geochem.* **35**, 225–266 (1997).
88. Archibald, F. S. & Fridovich, I. Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* **146**, 928–936 (1981).
89. Daly, M. J. *et al.* Accumulation of Mn(II) in *Deinococcus radiodurans* facilitates gamma-radiation resistance. *Science* **306**, 1025–1028 (2004).
90. Sunda, W. G. & Kieber, D. J. Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low-molecular-weight organic substrates. *Nature* **367**, 62–64 (1994).
91. Anderson, C. R. *et al.* Mn(II) oxidation is catalyzed by heme peroxidases in 'Aurantimonas manganoxydans' strain SI85-9A1 and *Erythrobacter* sp. strain SD-21. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4130–4138 (2009).

ANEXOS

Anexo 1: Medios de Cultivo

Luria Bertani Caldo (LB)

Extracto de levadura 5 g/L

Triptona 10 g/L

NaCl 10 g/L

LB-Agar

LB-Caldo

Agar 15 g/L

LB-Soft Agar

LB-Caldo

Agar 7 g/L

Medio Mínimo M9

CaCl₂ 0,1 mM

MgSO₄ 2 mM

Na₂HPO₄·7H₂O 48 mM

KH₂PO₄ 22 mM

NaCl 8,6 mM

NH₄Cl 18 mM

Anexo 2: Soluciones Tampón

Phage Dilution Buffer

Tris.HCl (pH 8,3) 10 mM

NaCl 10 mM

MgCl₂ 10 mM

Lisis Alcalina

Solución I

Glucosa 50 mM

Tris.HCl (pH 8,0) 25 mM

EDTA (pH 8,0) 10 mM

Solución II

NaOH 0,2 N

SDS 1%

Solución III

Acetato de Potasio 3M

Ácido acético 11,5% (V/V)