

UNIVERSIDAD DE CUENCA



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AMBIENTAL**

**“IDENTIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE FOSFATASA EN
MUESTRAS DE AGUA Y LODO DE LA PLANTA DE TRATAMIENTO DE
AGUAS RESIDUALES DE UCUBAMBA DE LA CIUDAD DE CUENCA”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO
A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AMBIENTAL**

AUTORA:

TANIA CARINA VILLEGAS LITUMA

C.I. 0105506869

DIRECTOR:

ANTONIO JAVIER VALLECILLO MAZA, PhD

C.I. 0151059417

CUENCA – ECUADOR

2017



Resumen

Las actividades industriales, agrícolas, farmacéuticas y domésticas constituyen fuentes de contaminación de ambientes naturales (suelo, agua, aire) con metales pesados. Esta contaminación deriva en pérdida de biodiversidad, disminución de actividades socioeconómicas y aumento de enfermedades. Diferentes estudios han descrito a las enzimas fosfatasa como aptas para la remoción de metales pesados, por lo que esta investigación buscó proteínas con actividad enzimática fosfatasa en muestras de agua y lodos de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca. Para ello se llevó a cabo el análisis histoquímico de bibliotecas metagenómicas generadas a partir de productos de PCR de fosfatasa ácida (PhoN) clonados en el vector pET302/NT-His, expresados en *E. coli* BL21 (DE₃) Start. Para ser identificada la actividad de fosfatasa se empleó el medio indicador LB-agar suplementado con difosfato fenoltaleína y verde de metilo. Con lo anterior, se logró detectar actividad enzimática de fosfatasa en todas las muestras de agua y lodo residual, siendo más frecuente en las clonas del agua de las Lagunas de maduración.

Palabras clave: *Agua residual, Lodo residual, Biblioteca metagenómica, Fosfatasas*



Abstract

The industrial, agricultural, pharmaceutical and domestic operations are sources of pollution to natural environments (soil, water, air) with heavy metals. This contamination produces loss of biodiversity, decrease of socio-economic activities and increase in diseases. Different studies have reported that phosphatase enzymes can remove heavy metals, so, this research looked for proteins with phosphatase enzymatic activity from wastewater and sewage of the Wastewater Treatment Plant of Ucubamba in the Cuenca city. The histochemical screening of metagenomics libraries built from PCR products of acid phosphatase (PhoN) cloned in the pET302/NT-His vector, expressed in *E.coli* BL21 (DE₃) Start were carried out. For being identified phosphatase activity used an indicator medium LB-agar supplemented with phenolphthalein diphosphate and methyl green. With the above was achieved detecting enzymatic phosphatase activity in all the samples of wastewater and sewage, being more frequent in clones from wastewater de maturation lagoons.

Key words: *Wastewater, Sewage, Metagenomic library, Phosphatases*



Contenido

Resumen.....	2
Abstract.....	3
Contenido.....	4
Figuras	6
Tablas.....	7
1. Introducción	13
1.1. Enzimas	14
1.1.1. Enzima fosfatasa.....	14
1.2. Proteínas recombinantes	15
1.2.1. Secreción de enzima fosfatasa en <i>Escherichia coli</i>	15
1.3. Métodos de estudio de entes biológicos	16
1.3.1. Cultivo microbiológico.....	16
1.3.2. Métodos metagenómicos	16
2. Materiales y métodos.....	21
2.1. Colecta de muestras	21
2.2. Procesamiento de muestras y extracción de ADN total	22
2.3. Biblioteca metagenómica a partir de ADN total metagenómico	22
2.3.1. Fragmentación de ADN total metagenómico.....	22
2.3.2. Precipitación de ADN total.....	23
2.3.3. Reparación de extremos de los inserto de ADN.....	23
2.3.4. Ligación	24
2.3.5. Empacado	24
2.3.6. Selección de bibliotecas metagenómicas.....	25
2.4. Biblioteca metagenómica a partir de amplicones que codifican para fosfatasas	26
2.4.1. Diseño de oligonucleótidos.....	26
2.4.2. Ensamble de secuencia de péptido señal	29
2.4.3. Amplificación de secuencia de fosfatasa PhoN a partir de muestras ambientales.....	30
2.4.4. Preparación del vector de clonación pET302/NT-His para la clonación de los amplicones de PhoN	33
2.4.5. Construcción de biblioteca metagenómica a partir de mezcla de amplicones.....	35
2.4.6. Construcción de biblioteca metagenómica por producto de PCR..	40



2.4.7. Selección de biblioteca metagenómica	42
3. Resultados.....	43
3.1. ADN total.....	43
3.2. Identificación de actividad enzimática de fosfatasas en la biblioteca metagenómica generada a partir de ADN total.....	44
3.3. Identificación de actividad enzimática de fosfatasas en la biblioteca metagenómica generada a partir de productos de PCR que codifican para PhoN.....	44
4. Discusión	50
5. Conclusiones	54
6. Perspectivas y/o recomendaciones	55
7. Referencias.....	56
8. Anexos.....	61
Anexo 1	61
Anexo 2	62
Anexo 3	71
Anexo 4	74
Anexo 5	77
Anexo 6	78



Figuras

Figura 1. Puntos de colecta de muestras de agua y lodo residual. 21

Figura 2. ADN total..... 43

Figura 3. Mapa de restricción de pET2-PhoN con EcoRV..... 45

Figura 4. Mapa de restricción de pET2SgP-PhoN con EcoRV y XbaI..... 46

Figura 5. Clonas positivas (+) y negativas (-) por muestras ambiental..... 49



Tablas

Tabla 1. Procedimiento para precipitar ADN.	23
Tabla 2. Reactivos para la reparación de terminales de insertos de ADN.	23
Tabla 3. Mezcla de reactivos para la ligación.	24
Tabla 4. Mezcla para diluciones de empacado.	25
Tabla 5. Mezcla de reacción de síntesis de las cadenas complementarias de los oligonucleótidos SGPEndRev1 y SGPEndFor2.	29
Tabla 6. Mezcla de reacción de síntesis de las cadenas complementarias de los oligonucleótidos SGPEndRev2 y SGPEndFor1.	30
Tabla 7. Mezcla de reacción de amplificación de PhoN para curva de temperatura de alineamiento.	31
Tabla 8. Curva de temperatura de alineamiento para amplificación de PhoN. 31	
Tabla 9. Mezcla de reacción de amplificación de PhoN a 50 °C.	32
Tabla 10. Perfil de temperaturas de amplificación de PhoN a 50 °C.	32
Tabla 11. Digestión de productos de PCR de secuencias de fosfatasa (PhoN) con EcoRI.	33
Tabla 12. Digestión de pET302/NT-His con BamHI.	33
Tabla 13. Reparación de extremos de pET302/NT-His.	34
Tabla 14. Digestión de pET302/NT-His con EcoRI.	34
Tabla 15. Mezcla de reactivos para la ligación.	35
Tabla 16. Mezcla de reactivos para mapa de restricción con EcoRV.	37
Tabla 17. Digestión de pET2-PhoN y del péptido señal.	37
Tabla 18. Mezcla de reactivos para la ligación de pET2-PhoN y péptido señal.	38
Tabla 19. Digestión de pET2SgP-PhoN con EcoRV y XbaI.	39
Tabla 20. Digestión de pET2SgP-PhoN con BamHI.	40
Tabla 21. Digestión de pET2SgP-PhoN con EcoRI.	40
Tabla 22. Digestión de productos de PCR con EcoRI.	41
Tabla 23. Mezcla de reactivos para la ligación de cada uno de los productos de PCR de PhoN y el vector pET2-SgP-PhoN.	41
Tabla 24. Concentración de ADN por fluorometría.	44
Tabla 25. Cuantificación de clonas en bibliotecas metagenómicas.	47



**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional**

Tania Carina Villegas Lituma en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Identificación de actividad enzimática de fosfatasas en muestras de agua y lodo de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 26 de octubre del 2017.

Tania Carina Villegas Lituma

C.I: 0105506869



Cláusula de Propiedad Intelectual

Tania Carina Villegas Lituma, autora del trabajo de titulación **“Identificación de actividad enzimática fosfatasa en muestras de agua y lodo de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 26 de octubre del 2017.

Tania Carina Villegas Lituma

C.I: 0105506869



Cuenca, 26 de octubre 2017

Lcda.

Rocío Campoverde Carpio

Directora del Centro de Documentación Regional "Juan Bautista Vázquez"

Su despacho.-

Reciba un cordial saludo, a través del presente pongo en su conocimiento que soy Tutor del trabajo de titulación: "Identificación de actividad enzimática de fosfatasa en muestras de agua y lodo de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca", realizado por la estudiante Tania Carina Villegas Lituma con número de cédula 0105506869 de la Carrera de Ingeniería Ambiental, documento que será publicado en una revista científica.

Para cumplir con el correspondiente proceso de publicación solicito a Ud. que en el Repositorio Institucional solo se visibilicen los metadatos de este documento y el archivo digital se mantenga en embargo hasta el 26 de octubre del 2019.

Por la favorable atención que se digne dar a la presente, le anticipo mi agradecimiento.

Atentamente,



Antonio Javier Vallecillo Maza

CI.: 0151059417



Agradecimiento

A mis tíos Rita, Luz y Juan por hacer de mi niñez algo extraordinario y fuera de lo normal, por ser ejemplos de honestidad, ética y trabajo.

A las innumerables experiencias dadas en Llano Largo, una comunidad entre montañas semejante a una familia, a Milagros por volvernos niños otra vez y alegrarnos nuestras vidas.

A mis amigos, Tamy, Ismael, Galito, Giova, Gaby, Liss, Pollo, Fer y Jorge por todas las risas y aventuras compartidas, a todos los que fueron parte del tiempo más gratificante de mi carrera universitaria: la Asociación Escuela 2013 – 2014 y en este sentido a Julián Estrella por ser simplemente él, a personas especiales de este mundo que te impulsan a soñar, que toman acción, que se aferran a la idea que las cosas que están mal pueden cambiar como Pancho, Caro Plaza, Maggy, Chio, Andre, Maca, Irina, Caio, Chris Quezada y René que también sueña con la astronomía, a Bruno, por enamorarse de mis sueños y financiar este trabajo con alegría, apoyo y energía positiva.

A los docentes - investigadores y estudiantes del Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, de forma especial a los doctores Antonio Vallecillo y Eduardo Chica por ser más que docentes, amigos, por preguntar cada día si ya tengo datos, a Diego Clavijo, por las conversaciones, pizzas futuras y por inculcarme el arte de leer, todo ha empezado con José Saramago y desde ahí ha sido mágico.

A quienes forman la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca, especialmente al Ing. Luis Díaz por brindarme apoyo para la colecta de muestras.



Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a todas las circunstancias, personas, situaciones o coincidencias posibles que hicieron posible este trabajo y para que yo esté aquí en este preciso momento.

A mi mejor amigo, Enrique, que lo sigo recordando alegremente como una de las mejores personas que este mundo pudo tener, sus características resumidas en el amor por la familia y las comunidades campesinas, ha hecho que me convenza que siempre se puede hacer algo para mejorar o cambiar una realidad. Hoy particularmente, espero representar esto a través de este proyecto. Si estuvieras aquí apuesto que reirías, Pa, no soy contadora, soy ingeniera.

A mi madre, María, por darnos la libertad de tomar decisiones, formándonos como seres conscientes de nuestros actos, por escuchar, respetar y apoyar lo que pienso y creo, por demostrar que el amor de una madre es lo más noble que existe en este mundo. Gracias por las madrugadas, sacrificios y sonrisas para que sólo estemos bien.

A Fernando (El Fer), mi hermano menor, por ser una persona que me ha motivado a ser mejor a través de las conversaciones interesantes, enseñanzas morales y pasión por el ambiente, ciertamente, él ha sido el responsable de que este proyecto se plantee, gracias por cambiar de canal a Discovery Channel mientras yo quería ver una película sin importancia en el desayuno.

A Bruno, mi hermano, por ser el causante de nuestras risas desde que tengo memoria, por escucharme, aconsejarme y estar pendiente de nosotros, por ser aquel hombre que vela por el bien común.



1. Introducción

Los metales pesados son elementos cuyas densidades son mayores a 5 g/cm^3 (incluyendo metaloides), que están caracterizados por su persistencia, toxicidad y no biodegradabilidad en el ambiente (Adriano, 2001; Zhao *et al.*, 2015). Estos constituyen fuentes de contaminación originadas de dos formas: natural, por procesos de erosión o erupciones volcánicas; y antropogénica, debido a actividades en las que se producen o usan productos que contienen metales o derivados de los mismos, como en la agricultura, industrias y labores domésticas (He *et al.*, 2005 & Shallari *et al.*, 1998 en Tchounwou *et al.*, 2012), afectando compartimentos ambientales y produciendo problemas a la salud humana.

A nivel ecológico, la cadena alimenticia se ve afectada iniciando con los productores primarios o plantas, por la influencia directa de estos elementos en el intercambio gaseoso, fijación de CO_2 , respiración y absorción de nutrientes. Así, metales como Zn, Cd, Cu, Cr, Pb, Ni, Mn, Fe producen efectos fitotóxicos como necrosis, clorosis, retardo de crecimiento, estrés, daño en las funciones de la membrana celular, ADN y proteínas (Sanita di Toppi & Gabbrielli, 1999; Wojcik & Tukiendorf, 2004; Mohanpuria *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2002; de Dorlodot *et al.*, 2005 en Nagajyoti *et al.*, 2010). A consecuencia de esto, niveles superiores de la cadena trófica sufren efectos negativos acumulativos que pueden llegar a ser tóxicos, mutagénicos y carcinógenos provocando reducción de poblaciones naturales y aumento de enfermedades (Alloway, 1995; Hadjiliadis, 1997; Diels, van der Lelie *et al.*, 2002 en Rajkumar *et al.*, 2009). Adicionalmente, pérdida de la calidad de la tierra de cultivo, contaminación del suelo y agua superficial conllevan al decrecimiento de actividades agroeconómicas (Sallaku *et al.*, 2001).

Estos efectos pueden ser atenuados mediante técnicas de biorremediación que se definen como mecanismos biológicos basados en el uso de organismos y sus productos para eliminar o reducir la concentración de contaminantes hasta volverlos inocuos, a costos y técnicas tecnológicas relativamente bajas (Azubuike *et al.*, 2016; Vidali, 2011) gracias al rol que cumplen las enzimas.



1.1. Enzimas

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos que aceleran las reacciones bioquímicas en organismos vivos (Robinson, 2015), por lo que se constituyen como una de las principales ejecutoras de cambios en el ambiente, ya que debido a sus características de catálisis, especificidad y fácil movilidad puede producir grandes transformaciones de las propiedades estructurales y toxicológicas de los contaminantes (Rao *et al.*, 2010).

Estas potenciales propiedades han hecho posible su uso en procesos industriales y otras aplicaciones como el tratamiento de aguas residuales, desechos sólidos o residuos peligrosos (Karam & Nicell, 1997), incluyendo aquellos que poseen metales pesados, respecto a los últimos, Macaskie *et al.*, (1987) mostraron que la enzima fosfatasa presenta potencialidad cercana al 90% para la remoción de metales pesados (Cd, Pb, Cu, U y Sr) a partir de soluciones contaminadas, razón por la cual la identificación de las enzimas con actividad de fosfatasas es objeto de estudio en esta investigación.

1.1.1. Enzima fosfatasa

La enzima fosfatasa rompe los enlaces fosfoéster y fosfoanhídridos de sustratos orgánicos en el proceso de mineralización para producir fósforo inorgánico (Bobadilla & Rincón, 2008; Correa, 2012). Se encuentra clasificada dentro del grupo de las enzimas hidrolasas, según la Comisión sobre la Nomenclatura de las Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (Peña *et al.*, 2004) y están divididas en monoésterfosfato hidrolasa, diésterfosfato hidrolasa, trifosfato monoéster hidrolasa, difosfato monoéster hidrolasa, triésterfosfato hidrolasa, de acuerdo al tipo de enlace y compuestos sobre los que actúan (Bobadilla & Rincón, 2008) y según las condiciones ácidas o alcalinas del medio son clasificadas en fosfatasa ácida y alcalina, las dos con la capacidad para precipitar metales pesados. Entre los ejemplos conocidos podemos destacar los siguientes:

La fosfatasa ácida tipo PhoN de *Serratia sp.*, libera fosfato monohidrógeno (HPO_4^{2-}) a partir de fosfato orgánico disponible y precipita estequiométricamente



fosfato ácido metálico insoluble en la superficie de la célula (Basnakova *et al.*, 1998 en Paterson-Beedle & Macaskie, 2005). De acuerdo a Paterson-Beedle & Macaskie (2004) en Paterson-Beedle & Macaskie (2005), a partir de soluciones acuosas diluidas con concentración de metales conocida y acción de *Serratia sp.*, se consiguió la remoción de Ni, U, Sr y Cs.

En el grupo de fosfatasas alcalinas se distinguió a la fosfatasa alcalina de mamíferos encontrada en la mucosa intestinal de ternero que precipita Cr^{6+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+} desde soluciones iónicas simples y de efluentes de industria de cuero y galvanizado (Chaudhuri *et al.*, 2013). Además, la fosfatasa alcalina PhoK de las células de *Sphingomonas sp.*, contribuye a la precipitación de contaminantes radioactivos como U desde soluciones alcalinas (Nilgiriwala *et al.*, 2008).

Así, la propiedad de remoción de metales pesados que presentan estas enzimas pueden ser estudiada desde el enfoque biotecnológico. Actualmente, un importante factor en la biotecnología moderna y en las economías basadas en la biomasa es la producción de proteínas recombinantes (Low *et al.*, 2013).

1.2. Proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes también llamadas proteínas quiméricas son el resultado de la expresión del ADN recombinante dentro de las células vivas. Al proceso de producción de recombinantes frecuentemente es llamado clonación de ADN o clonación de genes y en este proceso se emplea un vector de clonación, un inserto de ADN y un ente microbiano que actúe como hospedero, el más usado es *Escherichia coli* (*E. coli*) (Carroll, 2001; Choi & Lee, 2004).

1.2.1. Secreción de enzima fosfatasa en *Escherichia coli*

Una proteína recombinante puede ser sintetizada en *E. coli*, secretada y/o plegada en sus cinco compartimentos o estructuras celulares (citoplasma, membrana interna o externa, periplasma o medio extracelular) gracias a sus sistemas de secreción (Choi *et al.*, 2000). Adicionalmente, investigaciones han reportado que proteínas con actividad fosfatasa son originadas en el citoplasma



de forma prematura y exportadas hacia el periplasma con la ayuda de una secuencia identificadora denominada péptido señal, cuya función es direccionarla hasta este compartimento y allí convertirse en una proteína madura funcional (Choi & Lee, 2004).

1.3. Métodos de estudio de entes biológicos

Las enzimas aplicadas en procesos biotecnológicos pueden ser obtenidas y caracterizadas mediante dos técnicas: cultivo microbiológico y métodos metagenómicos (Vester *et al.*, 2015).

1.3.1. Cultivo microbiológico

El cultivo microbiológico es una técnica tradicional de laboratorio basada en el uso de medios de cultivo para el aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos a partir de una muestra ambiental. Esta técnica presenta limitaciones ya que permite cultivar no más del 1% de la diversidad total de organismos presentes en un determinado ambiente (Amann *et al.*, 1995 en Vester *et al.*, 2015); adicional a lo anterior, las condiciones de cultivo como: concentraciones y proporciones de oligoelementos, sustratos requeridos (Kaeberlein *et al.* 2002; Stevenson *et al.*, 2004 en Cabrera, 2014), exceso de compuestos inhibidores, temperatura, pH, presión adecuada, acumulación de desechos tóxicos, tasa de crecimiento (Kaeberlein *et al.*, 2002; Zengler *et al.*, 2002 en Vakhlu *et al.*, 2008) y simbiosis entre organismos, ha limitado el desarrollo de esta técnica, expresando funcionalidad enzimática nula de microorganismos en condiciones *in vitro*.

1.3.2. Métodos metagenómicos

Los métodos metagenómicos permiten analizar la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas en un ambiente particular (Salvador & Lara, 2015), a través del estudio de los genomas de los miembros de la comunidad (Walker & Dundee, 2009). Por tanto, usa un enfoque basado en la expresión o en la secuenciación de genomas o sus fragmentos al construir bibliotecas metagenómicas (Riesenfeld *et al.*, 2004; Schloss & Handelsman, 2003 en Schloss & Handelsman, 2005; Singh *et al.*, 2009), permitiendo tener información



del 99% de los microorganismos, incluso de aquellos provenientes de ambientes extremos, sin intervención humana o de difícil acceso.

La construcción de una biblioteca metagenómica de forma general consiste en: extracción y purificación de ADN, reparación y selección de los terminales del inserto de ADN, selección de su tamaño dado en pares de bases (pb), selección y ligación con el vector de clonación de acuerdo al tamaño del inserto de ADN (Plásmidos: 10 kpb; Cósmidos: 25 – 35 kpb; Fósmidos: 25 y 40 kpb y Cromosomas Artificiales Bacterianos: 100 y 200 kb (Uchiyama & Miyazaki, 2009)). Finalmente, transducción o transformación de las cepas bacterianas hospederas de estos vectores.

En cuanto al análisis de las bibliotecas metagenómicas se puede realizar mediante dos metodologías: análisis basado en la secuenciación de los insertos y análisis basado en detección funcional. El análisis basado en la secuencia consiste en secuenciar los extremos o la totalidad del inserto de ADN clonado (Rodríguez, 2013) o en generar cebadores a partir de regiones conservadas o filogenéticas de genes conocidos (Daniel, 2005; Handelsman, 2004 en Simon & Daniel, 2009) para utilizarlos en Reacciones en Cadena de Polimerasa (PCR) con el fin de amplificar regiones homólogas de genes de interés e indicar el grupo del que es origen el fragmento de ADN (Vakhlu *et al.*, 2008). Este análisis se limita a identificar miembros de familias con genes conocidos y presenta un análisis laborioso cuando se trata de clonas generadas con largos insertos de ADN (Singh *et al.*, 2009). El análisis basado en la detección funcional permite descubrir nuevos genes diferentes a los conocidos ya que no involucra una comparación con secuencias conocidas (Martin *et al.*, 2013), aquí las clonas identificadas expresan rasgos o fenotipos en las librerías metagenómicas por la adición de sustratos e indicadores, aunque este método se ve limitado por la incertidumbre de que los genes se expresen en el microorganismo hospedero seleccionado para la clonación (Vakhlu *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2009).

La generación de bibliotecas y su posterior análisis, han permitido la identificación de numerosas enzimas con potenciales aplicaciones



biotecnológicas. Por ejemplo, Lorenz & Eck (2005) identificaron a través de bibliotecas metagenómicas, enzimas de uso industrial como estereasas, lipasas, amidasas, amilasas, proteasas, celulasas, las dos primeras a partir de suelo y ecosistemas arenosos, las cuatro siguientes desde suelo y la última desde sedimentos enriquecidos. Además, enzimas como oxigenasas, deshidrogenasas, enzimas lignolíticas han sido descritas para la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Haritash & Kauskit, 2009 en Malachowska-Jutz & Niesler, 2015). Por otra parte, proteasas, enzimas degradadoras de polisacáridos, lipasas y β -galactosidasas han sido descubiertas mediante análisis de microorganismos psicrófilos por técnicas de PCR y clonación (Ma *et al.*, 2007; Zhang & Zeng, 2007; Stefanidi & Vorgias, 2008; Zhang & Zeng, 2008; Białkowska *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010 en Cavicchioli *et al.*, 2011). De igual forma, la propiedad de precipitar metales pesados dada por la enzima fosfatasa puede ser potencializada a partir de la construcción de bibliotecas metagenómicas con fines de biorremediación.

En este sentido, la identificación de actividad enzimática de fosfatasas constituye una trascendente aportación tecnológica al proceso de transformación de la matriz productiva y energética de nuestro país, específicamente al sector minero. En efecto, la capacidad que poseen estas enzimas hace posible el desarrollo de futuras técnicas biomineras para la prevención o mitigación de los impactos derivados de esta actividad.

En Ecuador, de acuerdo a la Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo (2015) a través de la Agenda Zonal 6, la visión del Plan Nacional del Buen Vivir 2013 – 2017 basa el cambio de la matriz productiva y energética de nuestro país en la gestión económica, industrial, social, científica y ambiental, la cual es impulsada por el Gobierno Nacional a través del emplazamiento de proyectos nacionales estratégicos algunos de ellos mineros, situados en la Zona 6, más concretamente en el cantón Cuenca, provincia del Azuay.

En el cantón Cuenca según el Ilustre Consejo Cantonal de Cuenca (2015) en su Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial, existen 113 concesiones mineras



de las cuales 88 se encuentran dentro del cantón y el resto en su periferia, algunas de ellas forman parte de proyectos estratégicos mineros como: Proyecto Minero Río Blanco, Junefield Mineral Resources Holdings Limited y Proyecto Minero Loma Larga. El primero posee cuatro concesiones mineras con una superficie de 5,175 ha, asentadas cerca del Parque Nacional Cajas de la cual el 32 % corresponde a bosque natural y el 47.05 % a páramo de pajonal; el segundo, comprende una superficie de 12,500 ha, la mayor parte de esta es cobertura de páramo típico de Andes centrales ecuatorianos, cuyas concesiones están ubicadas en un área declarada como “Bosque y Vegetación Protectora” de la cuenca del Río Paute y microcuencas de los ríos Yanuncay e Irquis, con lo que es evidente la necesidad del desarrollo de innovaciones tecnológicas para la disminución de los potenciales impactos ambientales derivados de la actividad minera.

Además, al considerar la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) como lugar de muestreo se maximiza la posibilidad de identificar actividad enzimática fosfatasa en este sitio, ya que confluyen afluentes de diverso origen con lo que su biomasa activada representa una fuente potencial de enzimas a causa de la degradación de la materia orgánica y acumulación de metales pesados allí sucedido.

Por tanto, la presente investigación constituye una base para la generación de futuras investigaciones acerca de los tipos de fosfatasas y su funcionalidad en el campo de la biominería, con lo cual, condiciones de sostenibilidad y sustentabilidad son posibles para el cantón Cuenca y nuestro país.

En este sentido, el objetivo general de la presente investigación es identificar proteínas con actividad enzimática de fosfatasa en muestras de agua y lodos de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca, derivando en los siguientes objetivos específicos: (1) Identificar actividad enzimática de fosfatasa mediante el tamizado de una biblioteca metagenómica construida con ADN total de muestras de agua y lodos de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de



Cuenca. (2) Identificar actividad enzimática de fosfatasa mediante tamizado de una biblioteca genómica construida con productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos degenerados para las secuencias codificantes de estas enzimas y ADN total de muestras de agua y lodos de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca.

2. Materiales y métodos

2.1. Colecta de muestras

Se tomó 12 muestras ambientales en total derivadas en muestras de agua y lodo que fueron colectadas por triplicado en cuatro áreas de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba ubicada al noroeste de la ciudad de Cuenca a una altura aproximada de 2.550 m.s.n.m (Figura 1), las cuatro áreas fueron: Canales de derivación, salida de Lagunas de maduración, Espesadores de lodos y Filtros de banda, los dos últimos generadores de lodo hidratado y deshidratado respectivamente.

Para la colecta de las muestras se utilizó tubos Falcón de 50 ml y fundas herméticas. En el caso de las Lagunas de maduración y Espesadores de lodos que se presentaron por duplicado, se mezcló las muestras para conseguir homogeneidad. Posterior a ello, se transportaron las muestras al laboratorio en un recipiente con hielo dentro de 4 h posteriores a la colecta, para su conservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

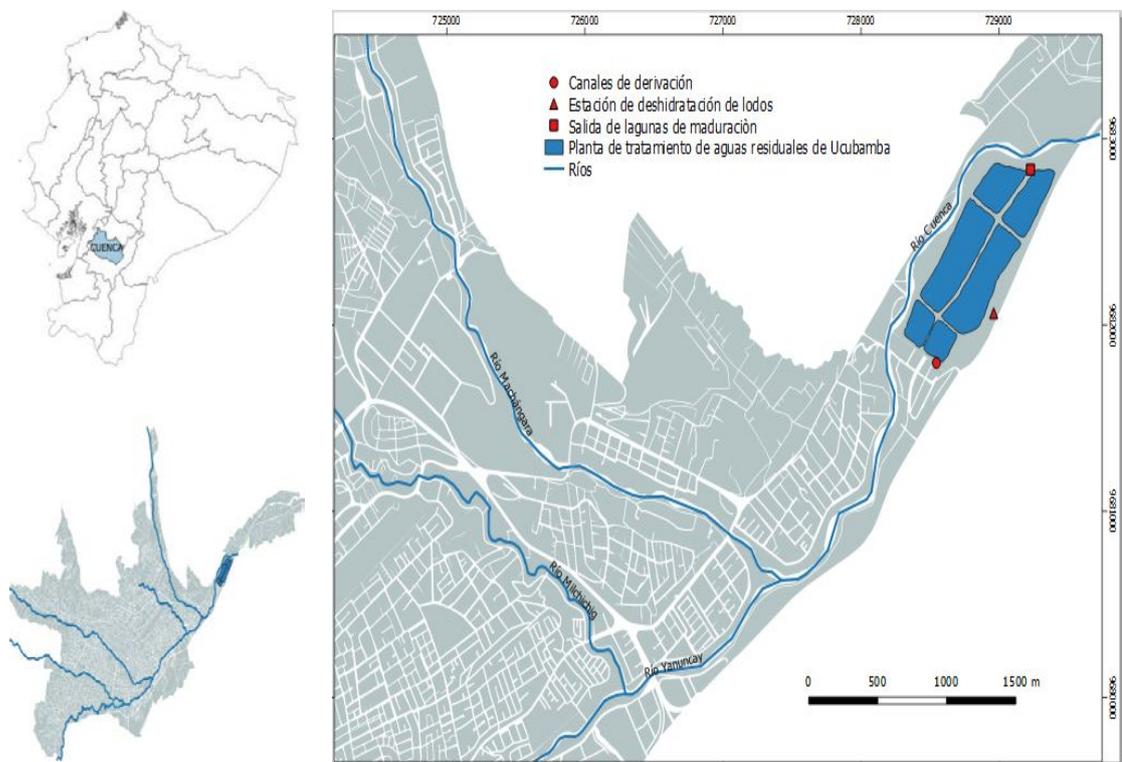


Figura 1. Puntos de colecta de muestras de agua y lodo residual.



2.2. Procesamiento de muestras y extracción de ADN total

Se centrifugó 50 ml de agua colectada de los Canales de derivación y Lagunas de Maduración a 12,000 x *g* por 5 min a temperatura ambiente, formando una pastilla de aproximadamente de 0.5 g. De igual forma, 25 ml de lodo hidratado proveniente de los Espesadores de lodos, fueron centrifugados a las mismas condiciones, también se pesó 0.5 g de lodo deshidratado.

A partir de los pastillas formadas y muestra pesada, se extrajo y purificó el ADN metagenómico total con el Kit PowerSoil DNA Isolation (Laboratorios MoBio, Cat. No.: 12888-100) de acuerdo a su protocolo descrito en el Anexo 2. Posteriormente, al tomar una alícuota de 5 µl se evaluó su integridad y tamaño (expresado en pares de bases, pb), mediante electroforesis en gel de agarosa - TAE teñido con Bromuro de etidio. De igual forma, se midió la concentración de ADN utilizando el Fluorómetro Qubit 3.0 (Life Technologies, Cat. No.: 32850) de acuerdo al Anexo 3 utilizando 2 µl de ADN total de cada muestra para en el proceso de medición.

2.3. Biblioteca metagenómica a partir de ADN total metagenómico

La generación de esta biblioteca se realizó con el kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production (Epicentre, Cat. No.: CCFOS059), de acuerdo al procedimiento comprendido entre los apartados 2.3.3 y 2.3.6 usando el pCC2FOS como vector de clonación y la cepa *E. coli* EPI300-T1^R para la transducción ya que no presenta actividad fosfatasa.

2.3.1. Fragmentación de ADN total metagenómico

Considerando las características de pCC2FOS, el cual permite insertos con tamaños entre 25 y 40 kpb, el ADN extraído de cada muestra ambiental no necesita fragmentación, ya que los tamaños observados del material genético obtenido corresponden aproximadamente a 20 kpb.



2.3.2. Precipitación de ADN total

Debido a que los valores de las concentraciones de ADN total extraído resultaron inferiores a $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (concentración mínima requerida por el kit para la construcción de las bibliotecas), se procedió a precipitar el ADN total (Tabla 1).

Tabla 1. Procedimiento para precipitar ADN.

Paso N°	Procedimiento
1	Se adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M.
2	Se agregó 5 volúmenes de etanol absoluto.
3	Se centrifugó a $14,700 \times g$ por 10 min.
4	Se adicionó etanol al 70%.
5	Se volvió a centrifugar a $14,700 \times g$ por 10 min.
6	Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por toda la noche.
7	Finalmente, se resuspendió la pastilla de ADN en agua a grado biología molecular.

Nota: Posterior a cada adición de reactivo se realizó inversiones, luego de cada centrifugación se retiró el sobrenadante.

2.3.3. Reparación de extremos de los inserto de ADN

Seguido al proceso de precipitación, se reparó los terminales de los insertos de ADN, para lo cual se descongeló los reactivos listados a continuación y se los mezcló en un medio con hielo de acuerdo a la Tabla 2.

Tabla 2. Reactivos para la reparación de terminales de insertos de ADN.

Volumen (μl)	Reactivos
2.5	Agua grado biología molecular
1.0	10X End-Repair Buffer
1.0	2.5 mM dNTP Mix
1.0	10 mM ATP
4.0	ADN
0.5	End-Repair Enzyme Mix
10	Volumen total



La mezcla de estos reactivos se incubaron a temperatura ambiente por 45 min para la reacción de reparación y a 70 °C por 10 min para inactivar las enzimas. Finalmente, se volvió a precipitar de acuerdo a lo ya especificado en la Tabla 1.

2.3.4. Ligación

El ADN con sus extremos reparados correspondiente a cada muestra ambiental se ligaron a pCC2FOS según como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de reactivos para la ligación.

Volumen (µl)	Reactivos
1	10X Fast-Link Ligation Buffer
1	10 mM ATP
1	pCC2FOS Vector (0.5 µg/µl)
6	ADN
1	Fast-Link DNA Ligase
10	Volumen total

La mezcla de la reacción de la reacción de ligación se incubó durante toda la noche en refrigeración (4 °C) y la enzima fue inactivada por 10 min a 70 °C.

2.3.5. Empacado

La cepa *E. coli* EPI300-T1^R fue utilizada para la transducción de las partículas virales generadas (empacadas). En primera instancia, se verificó la funcionalidad de los reactivos para el proceso del empacado usando *E. coli* LE392MP de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Un día previo a realizar las reacciones de empaque, se inoculó la cepa *E. coli* LE392MP en 50 ml de LB (Luria-Bertani) suplementado con 500 µl de MgSO₄ 1 M y se dejó por una noche en incubación a 37 °C y en agitación constante a 200 r.p.m.
2. Se adicionó a 100 ml de LB, 1 ml de MgSO₄ 1 M, 1 ml de Maltosa al 20 % y 1 ml de cultivo inoculado en el paso 1, se dejó por 2 horas en incubación a 37 °C y en agitación a 200 r.p.m.



3. Simultáneamente a los pasos anteriores, a 25 μl del extracto MaxPlax Lambda Packing, se adicionó 10 μl de Ligated Lambda Control DNA, se incubó por 90 min a 30 °C, pasado este tiempo se agregó 500 μl del Buffer de dilución de fagos (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 100 mM NaCl y 10 mM MgCl_2) y 25 μl de Cloroformo.
4. Con la suspensión de partículas virales resultantes de los pasos anteriores, se realizaron 4 diluciones: 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} según la Tabla 4.

Tabla 4. Mezcla para diluciones de empacado.

Diluciones	10^{-2}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Buffer de dilución de fago (μl).	990 +	990 +	900 +	900 +
Extracto MaxPlax Lambda Packing (μl). Paso 3.	10 μl	10 μl	100 μl	100 μl
Volumen total (μl)	1000	1000	1000	1000

5. Del volumen total de cada dilución se tomó 100 μl que se colocaron en un tubo Eppendorf nuevo (1.5 ml) y se le adicionó 100 μl de *E.coli* LE392MP (Ver paso 2).
6. Cada disolución se mezcló con 2 ml de Top agar (Medio LB con 0.7 % de agar microbiológico y 10 mM de MgSO_4) y se vertió en placas de LB agar con 12.5 $\mu\text{g/ml}$ de Cloranfenicol).
7. Finalmente, las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

2.3.6. Selección de bibliotecas metagenómicas

No se pudo seleccionar clonas debido a que no hubo colonias resultantes.



2.4. Biblioteca metagenómica a partir de amplicones que codifican para fosfatasas

Considerando las características del vector de clonación pET302/NT-His (Invitrogen), se diseñó una biblioteca metagenómica a construir con los productos de PCR que se amplificarían con las secuencias codificantes de fosfatasas ácidas similares a PhoN. Las fosfatasas son enzimas donde su funcionalidad se ve afectada cuando se mantienen en el citoplasma bacteriano, por lo que se hace necesario dirigir su secreción hacia el periplasma, por tanto en el diseño de la biblioteca se consideró la inclusión de un péptido señal para la secreción de las potenciales enzimas a identificar.

A continuación, se describe los procesos seguidos para generar una biblioteca metagenómica a partir de la mezcla de los productos de PCR de agua y lodo residual y con una clona positiva resultante de esta biblioteca, construyendo bibliotecas metagenómicas para cada uno de los amplicones generado con material metagenómico de las muestras ambientales.

2.4.1. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleotidos para el ensamblado de la secuencia codificante del péptido señal de una Endoxilanasas de *Bacillus sp.* (Jeong *et al.*, 1998), el cual se había demostrado es capaz de permitir la secreción funcional de la fosfatasa alcalina de *E. coli* (Choi *et al.*, 2000).

Para el diseño se localizó en el Genbank la secuencia codificante de la Endoxilanasas (No. acceso GenBank: U51675.1) y con el software Serial Cloner Versión. 2.6 (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) se generó la traducción de la secuencia (Anexo 2) (Jeong *et al.*, 1998).

En la secuencia traducida se localizó la región codificante de los 30 aminoácidos correspondientes al péptido señal (Choi *et al.*, 2000). Para generar la secuencia codificante del péptido señal se diseñaron 4 oligonucleótidos: (SGPEndFor1: 5'-GTTTAAAAGAAATTCTTAGTGGGATTAACGGCAGCTTTC-3', SGPEndRev1: 5'-CTAAGAATTTCTTTTTAACTTAAACATATGTC-3', SGPEndFor2: 5'-CAGC



ATGTTTTCTGCAACCGCCTCTGCAGCTGGAATTCTC-3', SGPEndRev2: 5'-GTTGCAGAAAACATGCTGATACTCATGAAAGCTGCCGTTAATCCC-3'), que incluyeron regiones que hibridan entre sí para permitir el ensamblado de la secuencia mediante el uso de la enzima *Pfx* ADN polimerasa. Los oligonucleótidos diseñados en las regiones de hibridación se consideró que tuviesen una temperatura media de hibridación de 40 a 60 °C. Para la clonación en el vector de expresión bacteriano pET302/NT-His de la secuencia a generar se incluyó la colocación en el extremo 5´ la secuencia identificada por la enzima de restricción *NdeI*, y en el extremo 3´ para la enzima *EcoRI*, finalmente en ambos extremos se incluyó la adición de dos bases adicionales para favorecer el incremento de la actividad enzimática de las enzimas de restricción. El tamaño final de la secuencia diseñada a sintetizar fue de 101 pb.

En el diseño de oligonucleótidos para la amplificación de las secuencias codificantes de las proteínas similares a PhoN a partir de ADN metagenómico, se obtuvo la secuencia de la proteína PhoN (Anexo 3) de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, previamente descrita por (Makde *et al.*, 2006). La secuencia de PhoN (No. acceso GenBank: AAM77370.1) se empleó para realizar un análisis en el software en línea protein Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), para localizar secuencias de proteínas similares.

Las secuencias localizadas en el análisis Blast se seleccionaron las que mostraron las mayores identidades y similitudes, descartando aquellas idénticas (100 %) y que no tenían cobertura de la región codificante de la proteína secretada. De cada una de las proteínas seleccionadas se localizó la secuencia codificante y se generó una base de datos (Formato Fasta). Las secuencias codificantes fueron alineadas con el software ClustalX Versión. 2.0.12 (<http://www.clustal.org/clustal2/>). En las secuencias ya alineadas se seleccionó la región codificante para la proteína secretada, es decir, se eliminó las secuencias codificantes para los péptidos señal para su secreción al periplasma, y las secuencias extras al codón de paro de las proteínas.



Para las secuencias codificantes de las proteínas maduras (secretadas) ya alineadas se les generó la secuencia consenso mediante el software BioEdit Versión 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). En la secuencia consenso obtenida se seleccionó 30 pb de ambos extremos, la secuencia seleccionada del extremo 3' se convirtió a la secuencia reversa complementaria. Ambas secuencias (los primeros 30 pb de la región 5' y la secuencia reversa complementaria de los últimos 30 pb del extremo 3', incluido el codón de paro) fueron evaluados en el software AutoDimer ver. 1.0 (<http://strbase.nist.gov/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>) al igual que la temperatura media de hibridación, la autohibridación y la hibridación entre sí de las secuencias, considerando una temperatura media de hibridación de entre 53 a 63 °C para definir la longitud de los oligonucleótidos.

En el oligonucleótido diseñado para el extremo 5' de la secuencia codificante se le adicionó la secuencia reconocida por la enzima de restricción *EcoRI* y dos bases extras para favorecer una mayor eficiencia de la actividad de la enzima *EcoRI*. En el diseño de la inclusión de la secuencia del sitio de restricción se consideró la necesidad de mantener en fase con el marco abierto de lectura de la secuencia codificante del péptido señal de la Endoxilanasas, a la cual se le había colocado el sitio de restricción para la misma enzima *EcoRI*. Para el oligonucleótido del extremo 3' de la secuencia codificante se le colocó una base (Citocita) adicional al codón de paro, para restaurar el sitio de restricción de la enzima *BamHI*, rellenado en la secuencia del plásmido de destino (pET302/NT-His).

Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la secuencia codificante de las proteínas similares a PhoN fueron: PHON-For1: 5'-GAGAATTCCAACARTGCAACCCTTTCATTC-3' y PHON-Rev1: 5'-CTCAGTAATTAAGTTYGGGRYGWTC-3'.



2.4.2. Ensamble de secuencia de péptido señal

Para el ensamblado de la secuencia se realizó la síntesis de las cadenas complementarias de los oligonucleótidos SGPEndRev1 y SGPEndFor2, con una mezcla de reacción descrita en la Tabla 5.

Tabla 5. Mezcla de reacción de síntesis de las cadenas complementarias de los oligonucleótidos SGPEndRev1 y SGPEndFor2.

Reactivo	Concentración		Volumen (µl) de premezcla
	Inicial	Final	
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	83.85
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	12.5
Solución enhancer 10X	10X	1X	12.5
Solución de dNTP's	10 mM	6.1 mM	1.25
Solución de MgSO ₄	50 mM	1 mM	2.5
Oligonucleótido SGPEndRev1	100 µM	0.8 µM	2
Oligonucleótido SGPEndFor2	100 µM	0.8 µM	2
Hexameros aleatorios	50 µM	0.4 µM	7.4
Enzima Pfx ADN polimerasa	2.5 U/µl	0.02 U/µl	1
Volumen final			125

Con un perfil de temperatura (94 °C por 5 min y 68 °C por 15 min, por un único ciclo) para activar la ADN polimerasa y la síntesis de las secuencias programado en un termociclador Mastercycler Nexus (Eppendorf). El volumen total (125 µl) de reacción de síntesis de las cadenas complementarias fue purificado con columnas (GeneJet PCR purification Kit, Thermo scientific, Cat. No.: #K0701).

Las secuencias obtenidas fueron empleadas junto con los oligonucleótidos SGPEndRev2 y SGPEndFor1 en una mezcla de un volumen de 125 µl (Tabla 6), la cual fue sometida al mismo perfil de temperaturas arriba descrito para el ensamblado de la secuencia de 101 pb codificante del péptido señal.



Tabla 6. Mezcla de reacción de síntesis de las cadenas complementarias de los oligonucleótidos SGPEndRev2 y SGPEndFor1.

Reactivo	Concentración		Volumen (µl) de premezcla
	Inicial	Final	
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	83.85
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	12.5
Solución enhancer 10X	10X	1X	12.5
Solución de dNTP's	10 mM	6.1 mM	1.25
Solución de MgSO ₄	50 mM	1 mM	2.5
Oligonucleótido SGPEndRev2	100 µM	0.8 µM	2
Oligonucleótido SGPEndFor1	100 µM	0.8 µM	2
Reacción de síntesis	-----	-----	7.4
Enzima Pfx ADN polimerasa	2.5 U/µl	0.08 U/µl	1
Volumen final			125

El producto de síntesis mediante PCR fue colectado, purificado (GeneJet PCR purification Kit, Thermo scientific, Cat. No.: #K0701) y sometido a una digestión doble con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI*, para lo cual se incubó a 37 °C por 2 h. Las reacciones resultantes de la digestión fueron cargados en un gel de agarosa - TAE al 1% teñido con Bromuro de etidio para su resolución y purificación de la secuencia a clonar.

2.4.3. Amplificación de secuencia de fosfatasa PhoN a partir de muestras ambientales

Se realizó un PCR de las secuencias codificantes de fosfatasa similares a PhoN a partir de ADN total de las muestras ambientales usando el termociclador marca Mastercycler Nexus Eppendorf, para generar una curva de temperatura de alineamiento cuya reacción de amplificación esta especificada en la Tabla 7 y el perfil de temperaturas en la Tabla 8. Luego de cada reacción de amplificación los productos se resolvieron en un gel de agarosa- TAE al 1.2 % teñido Bromuro de etidio.



Tabla 7. Mezcla de reacción de amplificación de *PhoN* para curva de temperatura de alineamiento.

Reactivo	Concentración		Volumen (µl) de premezcla
	Inicial	Final	
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	83.25
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	12.5
Solución enhancer 10X	10X	1X	12.5
Solución de dNTP's	10 mM	6.1 mM	1.25
Solución de MgSO4	50 mM	1 mM	2.5
Oligonucleótido PHON-For1	100 µM	0.8 µM	1
Oligonucleótido PHON-Rev1	100 µM	0.8 µM	1
Enzima <i>Pfx</i> ADN polimerasa	2.5 U/µl	0.08 U/µl	1
Muestra de ADN total	___ µg/ µl	___ µg/ µl	10
Volumen final			125

Tabla 8. Curva de temperatura de alineamiento para amplificación de *PhoN*.

No:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TM (°C)	49.0	49.3	50.1	51.4	53.1	54.7	56.3	57.9	59.6	60.9	61.7	62
Tubo:	LD1		LD2		LD3		LD4			LD5		
Tubo:	AS1		AS2		AS3		AS4			AS5		
Tubo:	AE1		AE2		AE3		AE4			AE5		

Nota: LD, Lodo deshidratado; AS, Agua de salida de Lagunas de maduración; AE, Agua de Canales de derivación.

De acuerdo a la curva de temperatura de alineamiento se visualizó bandas a temperatura similar o inferior a 50 °C, por lo que los productos de PCR correspondientes a 49.0, 49.3 y 50.1 °C se colocaron en un sólo tubo Eppendorf de 2 ml y fueron resueltos en un gel de agarosa- TAE al 1.2 % teñido Bromuro de etidio del cual se extrajo una sección del mismo en donde se localizaban amplicones con un tamaño entre 600 a 800 pb para su purificación mediante columna (GeneJET Gel Purification Kit, Thermo scientific, Cat. No.: K0691) y estos fueron reamplificados de acuerdo a la Tabla 9 y Tabla 10.



Tabla 9. Mezcla de reacción de amplificación de *PhoN* a 50 °C.

Reactivo	Concentración		Volumen (µl) de premezcla
	Inicial	Final	
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	66.54
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	28.14
Solución enhancer 10X	10X	1X	28.14
Solución de dNTP's	10 mM	6.1 mM	2.82
Solución de MgSO ₄	50 mM	1 mM	5.64
Oligonucleótido PHON-For1	100 µM	0.8 µM	2.25
Oligonucleótido PHON-Rev1	100 µM	0.8 µM	2.25
Enzima <i>Pfx</i> ADN polimerasa	2.5 U/µl	0.08 U/µl	2.25
Muestra de ADN total	___ µg/ µl	___ µg/ µl	12
Volumen final			150

Tabla 10. Perfil de temperaturas de amplificación de *PhoN* a 50 °C.

	Número de ciclos: 40					
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final	Alineamiento
Tiempo (min ' , s ")	5'	25 "	25 "	35 "	5 "	∞
Temperatura (°C)	94	94	50	68	68	4

Posteriormente, los productos de PCR previamente purificados con columna (GeneJet PCR purification Kit, Thermo scientific, Cat. No.: #K0701) fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* cuya mezcla de reactivos es realizada según la Tabla 11, colocada en incubación a 37 °C por 2 h, posterior a ello fueron purificados a partir del área perteneciente a 701 pb (entre 600 a 800 pb) del gel de agarosa - TAE al 1% teñido con Bromuro de etido mediante el kit GeneJET Gel Purification (Thermo scientific, Cat. No.: K0691).



Tabla 11. Digestión de productos de PCR de secuencias de fosfatasa similares a PhoN con EcoRI.

Volumen (µl)	Reactivos
2	Buffer EcoRI 10X
16	ADN P. PCR
2	EcoRI 10 U/µl. (Thermo scientific. Cat. No.: ER0271)
20	Volumen total

2.4.4. Preparación del vector de clonación pET302/NT-His para la clonación de los amplicones de PhoN

El plásmido pET302/NT-His (Invitrogen, Cat. no.: K630203), fue digerido con la enzima *Bam*HI (Tabla 12) y purificado con el kit GeneJET PCR Purification (Cat. No.: K071, Thermo scientific).

Tabla 12. Digestión de pET302/NT-His con BamHI.

Volumen (µl)	Reactivos
1	Buffer BamHI 10X
8	ADN Vector
1	BamHI 10 U/µl. (Thermo scientific. Cat. No.: ER0051)
10	Volumen total

Seguidamente, los extremos del vector digerido con *Bam*HI fueron reparados/rellenados con *Pfx* ADN polimerasa y/o con reactivos para la reparación de terminales del inserto de ADN (End-Repair Enzyme Mix, 10X End-Repair Buffer, 2.5 mM dNTP Mix, 10 mM ATP) que son parte del kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production (Tabla 13).



Tabla 13. Reparación de extremos de pET302/NT-His.

kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production				Pfx ADN polimerasa			
Volumen (µl)		Reactivos		Volumen (µl)		Reactivos	
2.5	Agua grado biología molecular			62.25	Agua grado biología molecular		
30	ADN vector digerido			12.5	Buffer de amplificación 10X		
5	10X End-Repair Buffer			12.5	Solución enhancer 10X		
5	2.5 mM dNTP Mix			1.25	Solución de dNTP		
5	10 mM ATP			2.5	Solución de MgSO ₄		
2.5	End-Repair Enzyme Mix			1	Enzima Pfx ADN polimerasa		
50	Volumen total			92	Volumen total		

Cuando se empleó el kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production, la reacción fue incubada por 45 min a 23 °C; para el caso de cuando se usó la enzima Pfx ADN polimerasa, la enzima fue activada por 5 min a 95 °C y el rellenado se realizó por 15 min a 68 °C. Una vez modificados los extremos del vector con uno u otro método, se procedió a la purificación de las reacciones con columna (GeneJet PCR purification Kit, Thermo scientific, Cat. No.: #K0701). El plásmido ya purificado fue sometido a digestión mediante la mezcla dada en la Tabla 14 con la enzima EcoRI por 2 h a 37 °C.

Tabla 14. Digestión de pET302/NT-His con EcoRI.

Volumen (µl)	Reactivos
4	Agua grado biología molecular
4	Buffer EcoRI 10X
30	ADN P-PCR
2	EcoRI. 10 U/µl. (Thermo scientific. Cat. No.:ER0271)
40	Volumen total



Finalmente, con los plásmidos resultantes de las dos reparaciones ya digeridos con la enzima *EcoRI* se realizó una electroforesis en gel de agarosa -TAE al 1% teñido con Bromuro de etidio, a partir del cual se purificó el área correspondiente a 6 kpb mediante el kit GeneJET Gel Purification (Thermo scientific, Cat. No.: K0691).

2.4.5. Construcción de biblioteca metagenómica a partir de mezcla de amplicones

2.4.5.1. Clonación de la mezcla de productos de PCR de la secuencia de PhoN en el vector pET302/NT-His

Los productos de PCR amplificados con PhoN a partir de muestras ambientales se mezclaron en igual volúmenes completando un volumen total de 150 μ l, éste se dividió en partes iguales en dos tubos Eppendorf de 2 ml, cada una de las mezclas fue precipitada de acuerdo a la Tabla 1 mostrada en el apartado 2.3.2 con la única diferencia que luego del paso 2, se incubó a - 20 °C por 20 min. Los resultantes de la precipitación contenidos en dos tubos Eppendorf de 2 ml fueron ligados a pET302/NT-His con los extremos reparados con cada uno de los métodos descritos, en una mezcla de reactivos detallados en la Tabla 15. Las reacciones de ligación se incubaron durante toda la noche a 4 °C.

Tabla 15. Mezcla de reactivos para la ligación.

Volumen (μ l)	Reactivos
1	10X Fast-Link Ligation Buffer
1	10 mM de ATP
2	pET302/NT-His vector (Extremo <i>Bam</i> HI reparado con los dos métodos y digerido con <i>Eco</i> RI)
7	ADN P. PCR PhoN (Extremo romo y otro extremo digerido con <i>Eco</i> RI)
1	Fast-Link DNA Ligase 2 U/ μ l
12	Volumen total



2.4.5.2. Transformación de *E. coli* TOP10F' por choque térmico

Las reacciones de ligación correspondientes a cada método de reparación de los extremos del vector fueron mezcladas con 200 μ l de cultivo de cepa *E. coli* TOP10F' (competentes) preparadas para su transformación por choque térmico, siguiendo los siguientes pasos:

1. A dos tubos con 200 μ l de la cepa *E. coli* TOP10F' se les adicionó el volumen total de las respectivas reacciones de ligación y fueron incubados en hielo por 30 min.
2. Finalizado los 30 min, se sumergieron en baño María a 42 °C por 1 min e inmediatamente volvieron al hielo por 2 min adicionales.
3. Se les adicionó 800 μ l de medio S.O.C (0.5 % de Extracto de levadura, 2 % de Triptona, 10 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de Glucosa) previamente calentado a 37 °C por 30 min, y se incubaron los tubos a 37 °C por 1 h (cada 15 min se realizaron inversiones para mezclar).
4. Una vez recuperadas las bacterias transformadas, se sembraron 200 μ l en placas de LB-agar (0.5 % de Extracto de levadura, 1 % de Triptona, 1 % de NaCl y 1.5 % de Agar microbiológico) suplementado con 100 mg/ml de Ampicilina, las placas fueron etiquetadas por separado de acuerdo al método de reparación de los extremos del vector de clonación como CK (Reparación por kit) y CP (Reparación por enzima *Pfx* ADN polimerasa). Finalmente las placas fueron incubadas a 37 °C por toda la noche.
5. Al día siguiente se visualizaron colonias y de cada placa se seleccionó 4 colonias las cuales se inocularon con la ayuda de un palillo de dientes en 5 ml de LB-caldo (0.5 % de Extracto de levadura, 1 % de Triptona y 1 % de NaCl) con 100 mg/ml de Ampicilina y se crecieron a 37 °C durante toda la noche. Una vez crecidos los cultivos, estos fueron centrifugados a 1200 x *g* por 10 min a temperatura ambiente, para colectar la pastilla bacteriana y de la cual se extrajo el plásmido usando el kit Gene JET Plasmid Purification (Thermo scientific, Cat. No.: K0503) siguiendo las instrucciones del fabricante.



La clonación de los productos de PCR en el vector fue confirmada mediante la realización de un mapa de restricción de los plásmidos obtenidos con la enzima de restricción *EcoRV*, cuya mezcla de reacción es detallada en la Tabla 16.

Tabla 16. Mezcla de reactivos para mapa de restricción con *EcoRV*.

Volumen (µl)	Reactivos
2	Agua grado biología molecular
1	Buffer R 10X.
6	ADN Plásmido recombinante
1	<i>EcoRV</i> . 10 U/µl. Thermo scientific. Cat. No.:ER0301
10	Volumen total

Junto a las muestras de los plásmidos extraídos se colocó una muestra de uno de ellos sin enzima de restricción (Control no digerido) y una muestra del plásmido original (Control negativo). Las reacciones de digestión fueron resueltas mediante electroforesis en gel de agarosa - TAE al 1% teñido con Bromuro de etidio.

2.4.5.3. Clonación de la secuencia sintetizada del péptido señal al vector recombinante pET2-PhoN

Los plásmidos recombinantes pET2-PhoN (en los que se clonó una de las secuencias de los productos de PCR) (apartado 2.4.5.1), pertenecientes a dos clonas: CK4 y CP2, al igual que el producto del ensamblado del péptido señal (apartado 2.4.2), fueron digeridos con *EcoRI* y *NdeI* (Tabla 17).

Tabla 17. Digestión de pET2-PhoN y del péptido señal.

Plásmido recombinante		Producto de ensamblado de péptido señal	
Volumen (µl)	Reactivos	Volumen en (µl)	Reactivos
2	Buffer O	2	Buffer O
16	ADN pET2-PhoN (CK4, CP2)	16	ADN Péptido Señal SgP



Plásmido recombinante		Producto de ensamblado de péptido señal	
Volumen (µl)	Reactivos	Volumen en (µl)	Reactivos
1	<i>EcoRI</i> . 10 U/µl. (Thermo scientific. Cat. No.:ER0271)	1	Enzima <i>EcoRI</i> . 10 U/µl. Thermo scientific. Cat. No.:ER0271
1	<i>NdeI</i> . 10 U/µl. (Thermo scientific Cat. No.:ER0581)	1	Enzima <i>NdeI</i> . 10 U/µl. Thermo scientific. Cat. No.: ER0581
20	Volumen total	20	Volumen total

Ambas mezclas de digestión fueron incubadas a 37 °C por 6 h y posteriormente resueltas en un gel de agarosa - TAE al 1% teñido con Bromuro de etidio, desde el cual se purificó el material genético de interés (plásmido recombinante: 2 kpb; péptido señal: 100 pb), ambos segmentos de ADN fueron purificados y mezclados usando el kit GeneJET Gel Purification (Thermo scientific, Cat. No.: K0691), ambas purificaciones fueron reunidas en un solo tubo Eppendorf de 2 ml y precipitadas según lo descrito en la Tabla 1, con la diferencia de que luego del paso 2, se incubó a – 20 °C por 20 min, llevado a cabo esto, se realizó la reacción de ligación (Tabla 18).

Tabla 18. Mezcla de reactivos para la ligación de pET2-PhoN y péptido señal.

Volumen (µl)	Reactivos
1	10X Fast-Link Ligation Buffer
1	10 mM ATP
7	pET2-PhoN y SgP
1	Fast-Link DNA Ligase
10	Volumen total

Las reacciones de ligación fueron incubadas a 4 °C por toda la noche y mezcladas con 200 µl de cultivo de la cepa *E. coli* TOP10F' (competentes), para ser transformadas según lo detallado en la sección 2.4.5.2.

Dos colonias de las transformantes de cada placa fueron inoculadas en 5 ml de LB-caldo con 100 µg/ml de Ampicilina e incubadas a 37 °C por toda la noche, al



día siguiente se centrifugó cada cultivo a 12,000 x g por 10 min a temperatura ambiente y de la pastilla resultante se extrajo el plásmido con el kit Gene JET Plasmid Purification (Thermo scientific, Cat. No.: K0503) siguiendo las instrucciones del fabricante. La recombinación de los productos de síntesis de la secuencia codificante del péptido señal y los vectores de las clonas del pET2-PhoN fue confirmada al realizar un mapa de restricción con las enzimas de restricción *EcoRV* y *XbaI* de la siguiente forma (Tabla 19).

Tabla 19. Digestión de pET2 SgP-PhoN con *EcoRV* y *XbaI*.

Volumen (µl)	Reactivos
1.5	Buffer Tango 10X
7.5	pET2 SgP-PhoN
0.5	<i>XbaI</i> . 10 U/µl. (Thermo scientific. Cat. No.: ER0681)
0.5	<i>EcoRV</i> . 10 U/µl. (Thermo scientific. Cat. No.:ER0301)
10	Volumen total

Las mezclas a digerir se incubaron a 37 °C por 2 h, una vez finalizada la digestión se realizó una electroforesis en gel de agarosa - TAE al 1.2% teñido con Bromuro de etidio para resolver los segmentos generados, esperando visualizar un fragmento de 896 pb para considerar positiva la clonación de la secuencia sintetizada.

2.4.5.4. Transformación de *E. coli* BL21 Star (DE3) y tamizaje de biblioteca metagenómica

Con los plásmidos pET2 SgP-PhoN extraídos, descritos en la sección anterior se transformó *E. coli* BL21 Star (DE3) (competentes) según el procedimiento del apartado 2.4.5.2, con la diferencia que en el último paso correspondiente al plaqueo, se realizó en LB-agar suplementando con 100 mg/ml de Ampicilina, 5 mM de Lactosa, 1 mg/ml de Difosfato de fenoltaleína (Sigma-Aldrich. Cat. No.: P9875) y 50 µg/ml de Verde de metilo (Sigma-Aldrich. Cat. No.: M8884).



2.4.6. Construcción de biblioteca metagenómica por producto de PCR

Una de las clonas denominadas CK4.1 con actividad enzimática de fosfatasa obtenida en la sección anterior (2.4.5.4) fue cultivada en 5 ml de LB-caldo con 100 µg/ml de Ampicilina, a partir del cual se extrajo los plásmidos recombinantes mediante el kit Gene JET Plasmid Purification (Thermo scientific, Cat. No.: K0503), posterior a ello estos plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción *Bam*HI (Tabla 20) a 37 °C por 12 h.

Tabla 20. Digestión de *pET2 SgP-PhoN* con *Bam*HI.

Volumen (µl)	Reactivos
4	Buffer <i>Bam</i> HI 10X
33	ADN <i>pET2 SgP-PhoN</i>
3	<i>Bam</i> HI. 10 U/µl. (Thermo scientific. Cat. No.: ER0051)
40	Volumen total

Posterior a ello, se reparó/rellenó los terminales del inserto del vector con *Pfx* ADN polimerasa como se detalla en la Tabla 13 en el apartado 2.4.4 y posteriormente se digirió con la enzima *Eco*RI (Tabla 21) a 37 °C por 6 h.

Tabla 21. Digestión de *pET2 SgP-PhoN* con *Eco*RI.

Volumen (µl)	Reactivos
2.5	Buffer <i>Eco</i> RI 10X
21	ADN <i>pET2 SgP-PhoN</i>
1.5	<i>Eco</i> RI. 10 U/µl. (Thermo scientific. Cat. No.: ER0271)
25	Volumen total

Paralelamente a lo antes descrito, los productos de PCR purificados a partir del gel de cada una de las muestras ambientales, obtenidos en la sección 2.4.3, fueron digeridos con la enzima *Eco*RI de acuerdo a la Tabla 22. La mezcla de digestión fue incubada a 37 °C por 12 h.

**Tabla 22.** Digestión de productos de PCR con *EcoRI*.

Volumen (μ l)	Reactivos
2	Buffer <i>EcoRI</i> 10X
16.5	ADN P. PCR
1.5	<i>EcoRI</i> . 10 U/ μ l. (Thermo scientific. Cat. No.: ER0271)
20	Volumen total

Finalmente, las digestiones del plásmido y productos de PCR fueron purificados de un gel de agarosa -TAE al 0.8% teñido con Bromuro de etidio correspondiente al área de 6 kpb para el plásmido y desde un gel de agarosa - TAE al 1.4% teñido con Bromuro de etidio para los productos de PCR digeridos, esto mediante el kit Gene JET Plasmid Purification (Thermo scientific, Cat. No.: K0503). Posterior a ello, se precipitaron de acuerdo a la Tabla 1, con la diferencia que posterior a la adición de Etanol absoluto se incubó a -20°C por 30 min.

Posteriormente, se procedió a realizar las reacciones de ligación según la Tabla 23, las cuales fueron incubadas a 4°C por 12 h. Finalizado esto, se transformó a la cepa de *E. coli* BL21 Start (DE₃) siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.4.5.2, el medio de plaqueo fue LB-agar suplementado con 100 mg/ml de Ampicilina, 5 mM de Lactosa, 1 mg/ml de Difosfato de fenoltaleína (Sigma-Aldrich, Cat. No.: P9875) y 50 μ g/ml de Verde de metilo (Sigma-Aldrich, Cat. No.: M8884). Las placas fueron incubadas a 37°C por 12 h.

Tabla 23. Mezcla de reactivos para la ligación de cada uno de los productos de PCR de *PhoN* y el vector *pET2 SgP-PhoN*.

Volumen (μ l)	Reactivos
1	10X Fast-Link Ligation Buffer
1	10 mM ATP
7	ADN (<i>pET2-SgP-PhoN</i> , P. PCR)
1	Fast-Link DNA Ligase
10	Volumen total



2.4.7. Selección de biblioteca metagenómica

De acuerdo a la tinción verde (indicadora de actividad fosfatasa) mostrada por las colonias, se seleccionaron de cada una de las bibliotecas de agua o lodo residual para su posterior caracterización y conservación en un biobanco.

3. Resultados

3.1. ADN total

Se logró extraer el ADN metagenómico de las muestras de agua y lodo residual, el material genético se observó fragmentado correspondiendo mayoritariamente a 20 kpb (Figura 2). Se observa que el ADN de las muestras de lodo deshidratado (LD) y lodo hidratado (LH) presentaron degradación parcial, debido a que estos fueron extraídos y mantenidos a 4 °C durante 8 meses previos, a lo que fue la extracción de ADN del agua de salida de las Lagunas de maduración (AS). Sin embargo, el ADN proveniente del agua de los Canales de derivación (AE) en este mismo periodo de tiempo y a las mismas condiciones de almacenamiento se mantuvo estable.

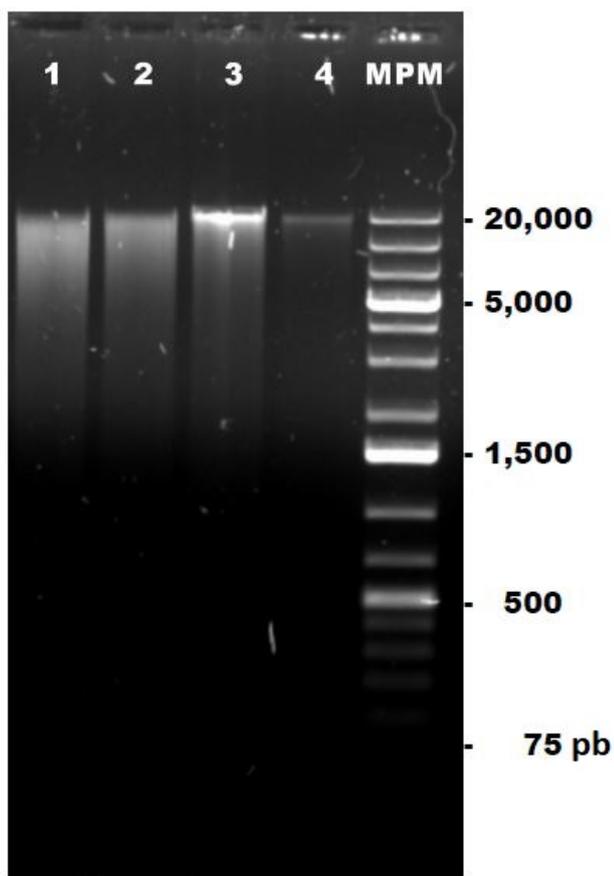


Figura 2. ADN total. Carril: 1, LD; 2, LH; 3, AE; 4, AS; MPM, Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder. (Thermo scientific. Cat. No.: SM1331).



Por otra parte, los valores de las concentraciones de ADN de cada muestra ambiental fueron estimados por fluorimetría, los cuales son presentados en la Tabla 24.

Tabla 24. Concentración de ADN por fluorimetría.

Muestra	Valores promedio de concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
LD	0.027
LH	0.022
AE	0.036
AS	0.004

LD, Lodo deshidratado; LH, Lodo hidratado; AE, Agua de Canales de derivación; AS, Agua de salida de Lagunas de maduración.

3.2. Identificación de actividad enzimática de fosfatasa en la biblioteca metagenómica generada a partir de ADN total

La actividad enzimática de fosfatasa no pudo ser identificada en esta biblioteca ya que ésta no logró ser construida. Se dedujo que el proceso de empaqueo posiblemente resultó ineficaz, debido a que el extracto de empaque MaxPlax Lambda presentó funcionalidad nula al ensayar el empaqueo con ADN de control positivo del kit.

3.3. Identificación de actividad enzimática de fosfatasa en la biblioteca metagenómica generada a partir de productos de PCR que codifican para PhoN

Se identificó actividad enzimática fosfatasa en muestras de agua y lodo residual. Esta experimentación se basó en la preparación del vector de clonación pET302/NT-His donde la reparación de sus extremos fue realizada con reactivos del kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production y/o Pfx ADN polimerasa, los plásmidos producto de las dos reparaciones fueron usados para generar bibliotecas metagenómicas a partir de la mezcla de amplicones de secuencias similares a PhoN de las muestras ambientales (sección 2.4.5), de esta se obtuvieron 8 clonas, 4 correspondientes a la reparación de los extremos del

vector con el Kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production denominadas desde CK1 - CK4 y 4 con el uso de la enzima *Pfx* ADN polimerasa identificadas como CP1 – CP4 , la recombinación de PhoN y pET302/NT-His, es decir los vectores pET2-PhoN de cada clona fue evaluada a través de un mapa de restricción con *EcoRV* (Figura 3).

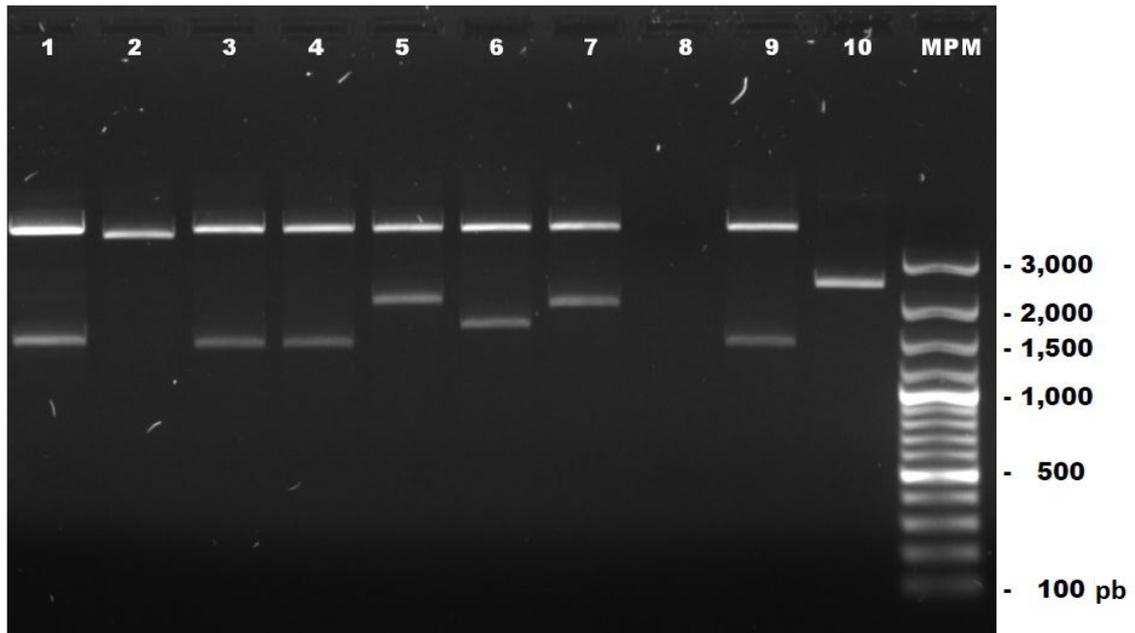


Figura 3. Mapa de restricción de pET2-PhoN con *EcoRV*. Carril: 1, pET302/NT-His; 2, CK1; 3, CK2; 4, CK3; 5, CK4; 6, CP1; 7, CP2; 8, CP3; 9, CP4; 10, pET2-PhoN (sin digestión); MPM, Marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder. (Thermo scientific. Cat. No.: SM0321).

Como resultado de aquellas bibliotecas se obtuvo dos clonas que esperaban ser obtenidas: CK4 y CP2 en base a las cuales se ligó el producto del ensamblado del péptido señal (SgP) y transformó *E. coli* TOP10F' (Ver sección 2.4.5.2), las clonas resultantes de este procedimiento: CK4.1, CK4.2, CP2.1 y CP2.2, se analizaron mediante un mapa de restricción con una doble digestión con las enzimas *EcoRV* y *XbaI* (Figura 4).

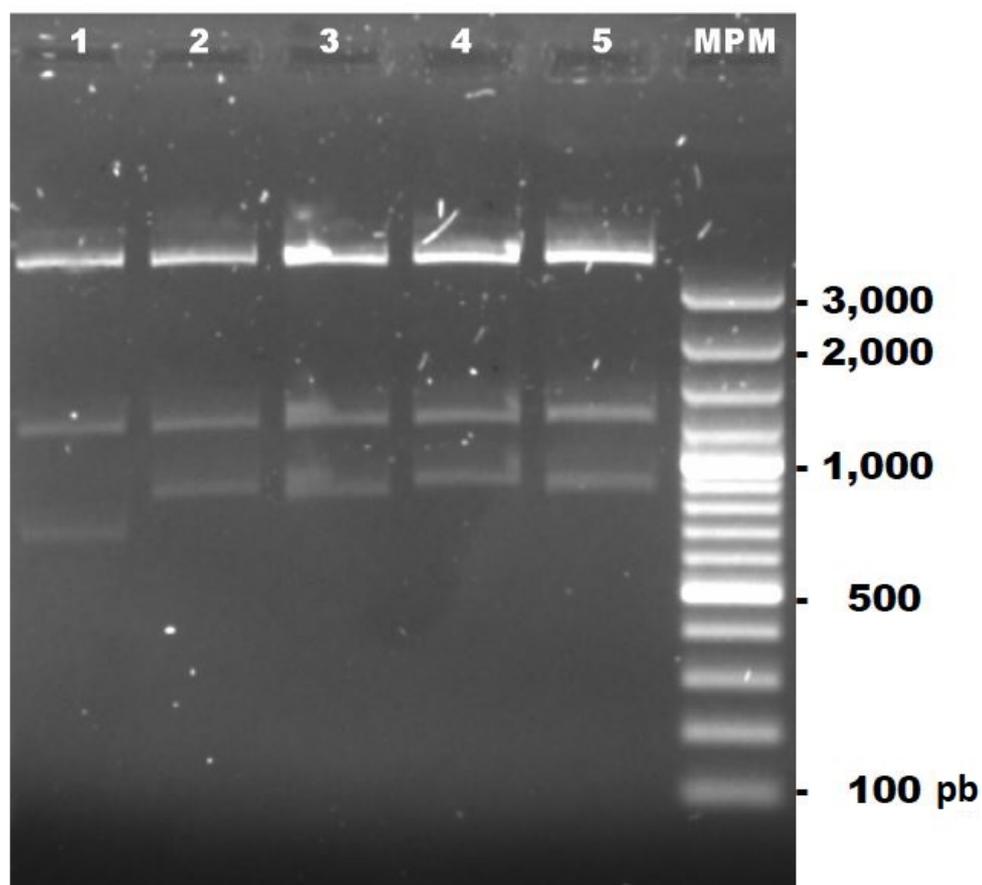


Figura 4. Mapa de restricción de pET2SgP-PhoN con EcoRV y XbaI. Carril: 1, pET2-PhoN; 2, CK4.1; 3, CK4.2; 4, CP2.1; 5, CP2.2; MPM, Marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder. (Thermo scientific. Cat. No.: SM0321).

De acuerdo al mapa de restricción las clonas evaluadas presentaron el patrón de segmentos esperados. Los plásmidos de las clonas CK4.1 y CP2.1 se transformaron en la cepa de *E. coli* BL21 Star (DE₃) y se sembraron en LB-agar suplementado con Ampicilina, Lactosa, Fenoltaleína y Verde de metilo para lograr expresar la funcionalidad de la enzima fosfatasa de cada una de las clonas, de las transformantes se observó que en las derivadas de la clona denominada CK4.1 se expresó la actividad fosfatasa.

A partir de la clona funcional CK4.1 se crearon 4 bibliotecas metagenómicas diferentes, que corresponden a los 4 productos de PCR de las secuencias codificantes de enzimas similares a PhoN, correspondientemente a las muestras



de lodo deshidratado, lodo hidratado, agua de Canales de derivación y agua de salida de Lagunas de maduración, en cada biblioteca se diferencié y cuantificó el número de clonas positivas (clonas que crecen como colonias con tinción verde) (Tabla 25) de las negativas (colonias sin tinción) (Figura 5).

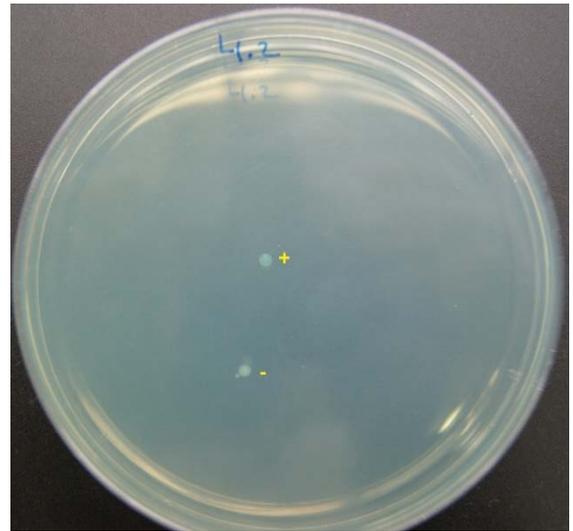
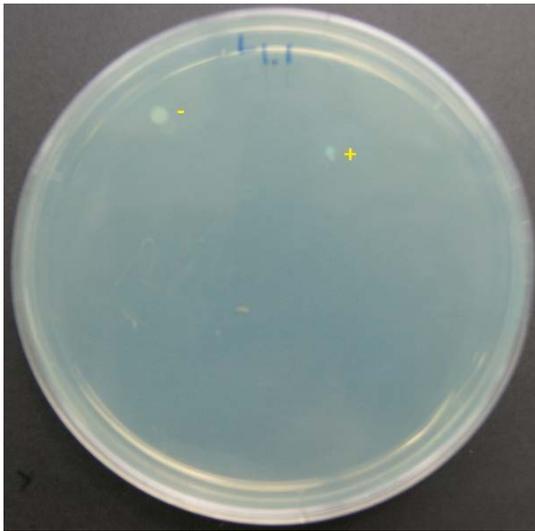
Como resultado final, se visualizó el 100 % de clonas con actividad enzimática fosfatasa generada a partir del material genético extraído desde la muestra del agua de salida de las Lagunas de maduración de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba (PTAR), y que fue empleado para la amplificación de las secuencias codificantes de proteínas semejantes a PhoN, seguida de las muestras de lodo hidratado (62.5 % de las clonas) y finalmente en igual proporción (50 % de las clonas) el agua de Canales de derivación correspondiente al afluente de la PTAR y el lodo deshidratado obtenido de los Filtros de banda de la Estación de deshidratación de lodos.

Tabla 25. Cuantificación de clonas en bibliotecas metagenómicas.

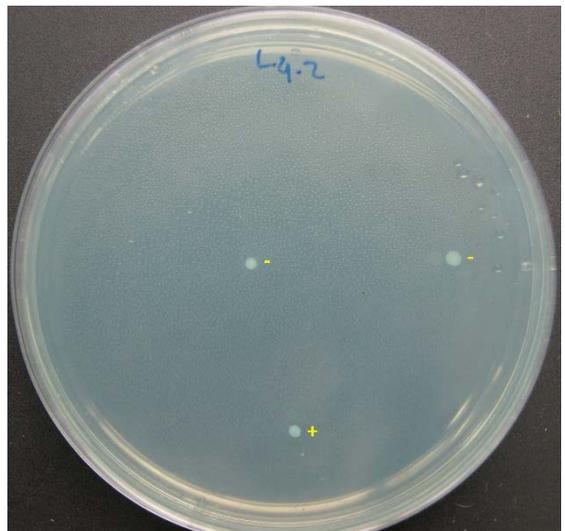
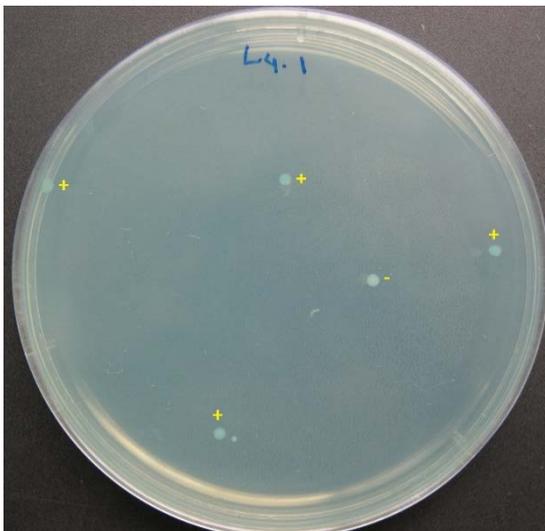
Muestra ambiental correspondiente a biblioteca metagenómica	Número total de clonas	Clonas con actividad fosfatasa	
		Número	Porcentaje (%)
LD	4	2	50.0
LH	8	5	62.5
AE	4	2	50.0
AS	5	5	100.0

LD, Lodo deshidratado; LH, Lodo hidratado; AE, Agua de Canales de derivación; AS, Agua de salida de Lagunas de maduración.

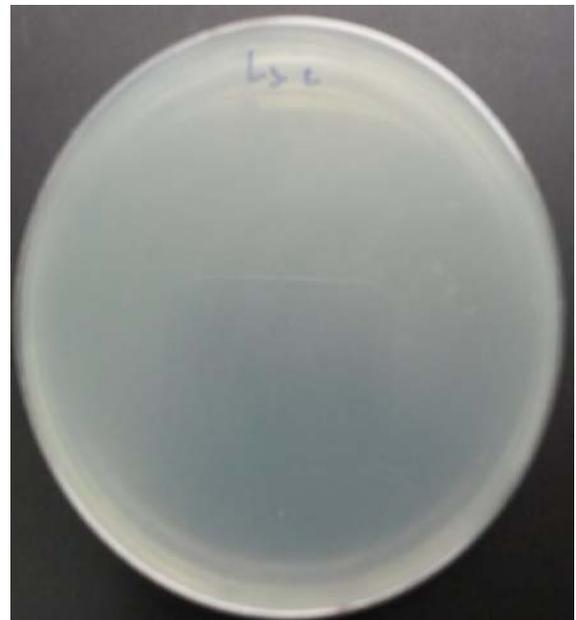
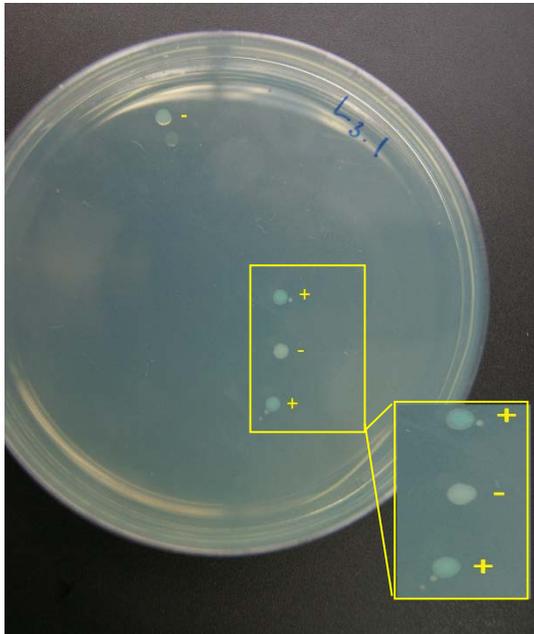
a). Lodo deshidratado



b). Lodo hidratado



c). Agua de Canales de derivación



d). Agua de salida de Lagunas de maduración

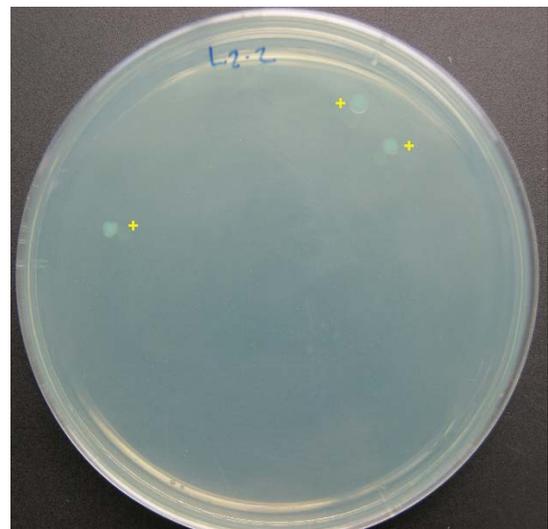
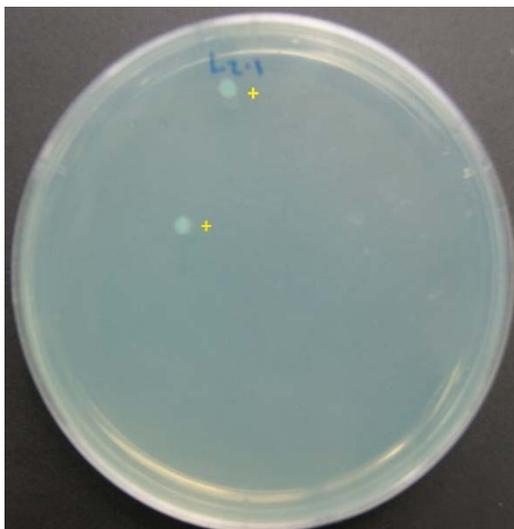


Figura 5. Clonas positivas (+) y negativas (-) por biblioteca metagenómica.



4. Discusión

Las plantas de tratamiento de aguas residuales constituyen fuentes importantes de enzimas con funciones desconocidas, que aún no han sido ampliamente exploradas. En este sentido, la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba, ubicada en la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay, al igual que otras plantas de tratamiento en Ecuador no registran ningún tipo estudio sobre actividades enzimáticas que pueden encontrarse, ni su aplicabilidad a nivel biotecnológico. En esta investigación se utilizó herramientas de biología molecular y metagenómica funcional, para identificar actividad enzimática de fosfatasas, la cual puede tener una aplicabilidad posterior en el campo biominero, por ello, en base al ADN metagenómico total extraído a partir de las muestras de agua y lodo residual se generó bibliotecas metagenómicas, sin embargo el ADN presentó degradación, lo cual se explica por la temperatura de almacenado de 4 °C (temperatura a la que se tuvo acceso para el almacenamiento de ADN), aunque en el protocolo del kit PowerSoil DNA Isolation y en estudios de optimización de extracción de ADN a partir de lodos en digestión anaerobia y suelos de cultivos de arroz recomiendan una temperatura de almacenamiento inferior a -20 °C (Dong *et al.*, 2013; Islam *et al.*, 2012).

Por tanto, se planteó la construcción de dos clases de bibliotecas metagenómicas, una generada a partir de ADN metagenómico y otra, en base a productos de PCR de secuencias codificantes de proteínas similares a PhoN de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium.

La biblioteca metagenómica generada a partir de ADN metagenómico total no logró ser construida, por lo que no existe resultados respecto a esta. Esto se puede explicar debido a que su construcción se basa en la utilización del kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.3, requiriendo para la reparación de los extremos de los insertos de ADN, ligación y empaquetado estrictamente reactivos del kit.

En la construcción de la biblioteca originada a partir de amplicones, la reparación de los extremos generados por la enzima *Bam*HI de los vectores pET302/NT-



His, pET2 SgP-PhoN se usó 10X End-Repair Buffer, 2.5 mM dNTP Mix, 10 mM ATP y End-Repair Enzyme Mix (apartado 2.4.4), y de manera similar, los reactivos para el ligado (10X Fast-Link Ligation Buffer, 10 mM ATP, Fast-Link DNA Ligase) fueron utilizados en las reacciones de ligación del apartado 2.4.5, estos reactivos son parte del kit CopyControl™ HTP Fosmid Library Production, los cuales fueron funcionales en los apartados mencionados, cuyos resultados fueron positivos y serán discutidos más adelante.

Entonces, de acuerdo a lo anterior se deduce que el proceso de empaqueo pudo ser ineficaz, por lo cual se realizó un experimento para probar la funcionalidad del extracto de empaqueo MaxPlax Lambda. Al realizar el empaqueo con el ADN de control positivo incluido en el kit, usando la cepa EPI300-T1^R, la funcionalidad resultó nula, lo cual puede ser el resultado de haber sobrepasado el tiempo de vida útil, que no es mayor a 1 año en condiciones de almacenamiento a temperatura de ultracongelación (-70 °C).

Debido a lo anterior, se intentó localizar otras cepas bacterianas para crear extractos de empaqueo de ADN de fago Lambda de forma *in vitro*. En este sentido, Hohn, en 1979 describió a dos cepas lisogénicas y complementarias de *E. coli* que son: BHB2690 y BHB2688, de las cuales se derivaron los extractos de empaqueo tradicionales, sin embargo, el extracto MaxPlax Lambda utiliza una nueva cepa de empaqueo NM759 reportada por Gunther et al., (1993) que reemplaza a la BHB2690 (DiLella & Woo, 1987; Sambrook *et al.*, 1989 en Epicentre, 2010). La cepa NM759 junto con la BHB2688 fueron localizadas en un laboratorio de la Universidad de Yale, EE.UU., se intentó contactar a las personas quienes poseen las cepas, sin embargo no se obtuvo respuesta, por lo cual no se pudo tener acceso a este material.

Otros estudios detallan cepas de *E. coli* que pueden ser usadas para generar extractos de empaqueo, así, la cepa *E. coli* C1a patentada por Frackman *et al.* (1996) fue descrita para generar un extracto de empaqueo estable a temperatura ambiente, pero en búsquedas exhaustivas no se la ha podido encontrar



registrada en ningún banco de microorganismos a nivel mundial. De igual forma Rosenberg *et al.*, 1985, expresan en sus estudios que el empacado con la cepa *E. coli* SMR10 es consistente y de alta eficiencia al tratarse de ligaciones con insertos de ADN sin modificar. La cepa SMR10 fue cotizada pero no se pudo adquirir debido a que su costo elevado.

Por otra parte, a pesar de lo anteriormente descrito, si se logró detectar actividad enzimática fosfatasa a través del análisis histoquímico de las bibliotecas metagenómicas, generadas en base a amplicones de secuencias codificantes de proteínas similares a PhoN. Los resultados mostraron que con el material genético obtenido del afluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba (PTAR), al igual que del lodo deshidratado se generaron bibliotecas en las que se identificaron el 50 % de clonas con actividad fosfatasa, el efluente y el lodo hidratado presentaron el 100 % y el 62.5 %, respectivamente. No obstante, no se puede inferir que las muestras ambientales en estudio tengan únicamente actividad fosfatasas ácidas similares a PhoN, ya que para asegurar aquello es necesario secuenciar estas clonas. Además, el agua y lodo residual de la PTAR presenta valores promedio de pH de 7.34 y 6.49 correspondientemente (ETAPA EP, 2011; Durazno & Diaz, 2009), por lo que da lugar a suponer que pueden existir tanto fosfatasas ácidas como alcalinas en estos medios (Cordero & Campoverde, 2013).

De acuerdo a Xie *et al.*, (2010) en su estudio sobre la actividad enzimática de fosfatasa alcalina en lodos aerobios activados menciona que los iones metálicos tienen un efecto sobre la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, así la mayoría de iones metálicos incluyendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} estimulan levemente la actividad de la fosfatasa alcalina, aunque otros iones metálicos como Zn^{2+} , Cu^{2+} y Ag^+ inhiben la actividad de esta enzima. En este aspecto, las concentraciones promedios de $\text{Cu} = 200.5 \text{ mg/kg}$ y $\text{Zn} = 987.75 \text{ mg/kg}$ son muy superiores a $\text{Ni} = 28 \text{ mg/kg}$ en los lodos provenientes de las lagunas aereadas de la PTAR (Durazno & Diaz, 2009 en Cordero & Campoverde, 2013), lo mismo sucede en el agua residual, siendo el promedio de las concentraciones medias



ponderadas de Cu = 19.23 $\mu\text{g/l}$, Zn = 105.9 $\mu\text{g/l}$ y Ni = 17.77 $\mu\text{g/l}$ (ETAPA EP, 2011 en Cordero & Campoverde, 2013), lo que daría lugar a pensar que no se podría identificar actividad enzimática en el agua y lodo residual de la PTAR, sin embargo, si se logró encontrar y amplificar secuencias codificantes de proteínas similares a PhoN, dando como resultado la obtención de clonas con actividad enzimática de fosfatasas.

El haber logrado identificar actividad enzimática de fosfatasas en muestras de agua residual, es apoyado por Fischer *et al.*, 2013 en su estudio sobre la variabilidad de perfiles enzimáticos entre y dentro de las plantas de tratamiento que reportaron actividad de fosfatasa alcalina en un 19.2 % en el afluente y el 7.2 % en el efluente.

Por otra parte, la visualización de clonas posterior a la transformación de *E. coli* BL21 Star (DE₃) confirman que la secuencia señal de Endoxilanasas de *Bacillus* sp., usada como modelo para la secreción de fosfatasa alcalina en diferentes cepas de *E. coli*, también fue útil para la secreción de fosfatasas ácidas similares a PhoN.

Respecto al medio LB-agar para el análisis histoquímico de las clonas, éste logró ser funcional, manteniendo sus componentes en las siguientes concentraciones: Ampicilina (100 mg/ml) para la selección de las transformantes, Lactosa (5 mM) para la inducción de la expresión de las secuencias clonadas y el difosfato de fenoltaleína (1 mg/ml) con el verde de metilo (50 $\mu\text{g/ml}$) para evidenciar la actividad enzimática. Sin embargo, se observó una mayor tinción verde al colocar las placas en refrigeración por lo menos durante 12 h posteriores a su periodo de crecimiento (incubación a 37 °C por 12 h).



5. Conclusiones

En el agua y lodo de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba de la ciudad de Cuenca, se encontraron secuencias de material genético que codifican para proteínas que muestran actividad enzimática fosfatasa, existiendo una diferencia porcentual y fenotípica de las clonas con actividad enzimática obtenidas desde las diferentes muestras ambientales, siendo más frecuente la generación de clonas con actividad en las muestras colectadas en el agua de salida de las Lagunas de maduración. Sin embargo, no se puede asumir que la presencia de la activada de fosfatasa corresponde a una enzima idéntica a PhoN, ya que para sustentar esta aseveración es necesario realizar la secuenciación de los segmentos de ADN clonados.

Por otra parte, las enzimas fosfatasas al lograr ser expresadas e identificadas en el medio indicador confirma que el péptido señal de Endoxilanasas de *Bacillus* sp., es funcional para las enzimas fosfatasas similares a PhoN.



6. Perspectivas y/o recomendaciones

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a nuestro entendimiento sobre la aplicación de técnicas de biología molecular en la identificación de proteínas con actividad enzimática, iniciando el desarrollo de aplicaciones industriales, en este caso de enzimas fosfatasa en prácticas biomineras.

Considerando lo anterior, se recomienda de forma complementaria a este estudio:

1. Realizar ensayos de inoculación de las clonas positivas en el medio indicador (LB-agar suplementado con Ampicilina, Lactosa, Difosfato de fenoltaleína y Verde de metilo) preparado con diferentes intervalos de pH para evaluar la actividad enzimática en ambientes extremos de acidez o alcalinidad.
2. Evaluar la diversidad de las secuencias codificantes clonadas con actividad enzimática de fosfatasa a través de ensayo tipo PCR–RFLP con el uso de enzimas de restricción como *A_luI* o similares.
3. Secuenciar los segmentos de ADN clonados con que codifican enzimas con actividad fosfatasa, para afirmar que la actividad enzimática de las clonas positivas corresponden a proteínas similares a PhoN.

Con esto, en futuras investigaciones se podría evaluar la expresión y funcionalidad de la enzima fosfatasa en biomasa contaminada con metales pesados.

Por otro lado, este estudio favorece la realización de trabajos bioprospectivos en plantas de tratamiento de aguas residuales a nivel enzimático, ya que los resultados aquí descritos son una muestra de la factibilidad de encontrar enzimas de interés, que probablemente en otros sitios no son factibles identificar.



7. Referencias

- Adriano, D. C. (2001). Trace elements in terrestrial environments. *Trace elements in terrestrial environments*. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-21510-5>
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), 180. <http://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
- Cabrera, R. (2014). Análisis taxonómico y funcional del microbioma humano mediante aproximaciones clásicas moleculares y metagenómicas. Universidad de Valencia.
- Carroll, D. (2001). Recombinant DNA. In S. Brenner & J. H. Miller (Eds.), *Encyclopedia of Genetics* (pp. 1637–1639). <http://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1079>
- Cavicchioli, R., Charlton, T., Ertan, H., Omar, S. M., Siddiqui, K. S., & Williams, T. J. (2011). Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial Biotechnology*, 4(4), 449–460. <http://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00258.x>
- Choi, J. H., Jeong, K. J., & Kim, S. C. (2000). Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus* sp. endoxylanase signal sequence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 640–645.
- Choi, J. H., & Lee, S. Y. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 625–635. <http://doi.org/10.1007/s00253-004-1559-9>
- Cordero, M. F. E., & Campoverde, M. A. (2013). Evaluación del desempeño de los espesadores a gravedad de la planta de aguas residuales de Ucubamba. Universidad de Cuenca. Retrieved from http://www.puce.edu.ec/sitios/documentos_DGA/9_20_2002_2008-02_10077_1700603317_S_1.pdf



- Dong, B., Yi, J., Dai, L., & Dai, X. (2013). Evaluation of several DNA extraction methods for obtaining total community DNA from anaerobic digestion sludge. *Procedia Environmental Sciences*, 18, 856–863. <http://doi.org/10.1016/j.proenv.2013.04.115>
- Epicentre. (2010). CopyControl™ Fosmid Library Production Kit with pCC1FOS™ Vector CopyControl™ HTP Fosmid Library Production Kit with pCC2FOS™ Vector, 1–28. <http://doi.org/CCFOSS110>
- Fischer, K., Wolff, B., & Emmerling, C. (2013). Biore source technology inter and intra plant variability of enzyme profiles including various phosphoesterases and sulfatase of six wastewater treatment plants. *Bioresource Technology*, 137, 209–219. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.128>
- Frackman, S. G., Franciskovich, P. P., Jolly, J. F., Luhm, R. A., & Riedl, W. A. (1996). *In vitro* phage lambda DNA packaging system. Estados Unidos.
- Ilustre Consejo Cantonal de Cuenca. (2015). Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial del Cantón Cuenca. Cuenca.
- Islam, M. R., Sultana, T., Joe, M. M., Cho, J. C., & Sa, T. (2012). Comparisons of direct extraction methods of microbial DNA from different paddy soils. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 337–342. <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.001>
- Jeong, K. J., Lee, P. C., Park, I. Y., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1998). Molecular cloning and characterization of an endoxylanase gene of *Bacillus sp.* in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 229 (1997), 599–605.
- Karam, J., & Nicell, J. A. (1997). Review potential applications of enzymes in waste treatment. *J. Chemical Technology and Biotechnology*, 69 (1997), 141–153. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199706\)69](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199706)69)
- Lorenz, P., & Eck, J. (2005). Metagenomics and industrial applications. *Nature Reviews. Microbiology*, 3(6), 510–516. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1161>
- Low, K. O., Mahadi, N. M., & Illias, R. M. (2013). Optimization of signal peptide for recombinant protein secretion in bacterial hosts. *Applied Microbiology*



- Biotechnology*, 97, 3811–3826. <http://doi.org/10.1007/s00253-013-4831-z>
- Macaskie, L. E., Wates, J. M., & Dean, A. C. (1987). Cadmium accumulation by a *Citrobacter sp.* immobilized on gel and solid supports: Applicability to the treatment of liquid wastes containing heavy metal cations. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(1), 66–73. <http://doi.org/10.1002/bit.260300110>
- Makde, R. D., Dikshit, K., & Kumar, V. (2006). Protein engineering of class-A non-specific acid phosphatase (PhoN) of *Salmonella typhimurium*: Modulation of the pH-activity profile, 23, 247–251. <http://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.06.004>
- Malachowska-Jutysz, A., & Niesler, M. (2015). The effect of Calcium peroxide on the phenol oxidase and acid phosphatase activity and removal of fluoranthene from soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 226(11). <http://doi.org/10.1007/s11270-015-2632-y>
- Martin, M., Barbeyron, T., Gurvan, M., Daniel, P., & Miceline, V. (2013). Functional screening of a metagenomic library from algal biofilms. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, (February), 6.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216. <http://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Rajkumar, M., Vara Prasad, M. N., Freitas, H., & Ae, N. (2009). Biotechnological applications of serpentine soil bacteria for phytoremediation of trace metals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(2), 120–130. <http://doi.org/10.1080/07388550902913772>
- Rao, M. ., Scelza, R., Scotti, R., & Gianfreda, L. (2010). Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 333–353. <http://doi.org/10.4067/S0718-95162010000100008>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: Principles and biotechnological applications. *Essays In Biochemistry*, 59(0), 1–41. <http://doi.org/10.1042/bse0590001>



- Rodríguez, M. (2013). Identificación y caracterización de enzimas hidrolíticas aptas para la producción de biocombustibles utilizando herramientas de metagenómica funcional. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
- Rosenberg, S. M., Stahl, M. M., Kobayashi, I., & Stahl, F. W. (1985). Improved *in vitro* packaging of coliphage lambda DNA: a one-strain system free from endogenous phage, 38, 165–175.
- Sallaku, F., Shallari, S., Kristo, I., & Sulçe, S. (2001). Concentration and distribution of Copper, Zinc and Cadmium in contaminated soils near the metallurgical plant of elbasan in Albania. *Options Méditerranéennes, Série A*, 50, 425–432.
- Salvador, J., & Lara, M. (2015). Aproximación metagenómica para la identificación de enzimas lipolíticas en suelo de bosque alto andino del parque nacional natural los nevados. Ponteficia Universidad Javeriana.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Metagenomics for studying unculturable microorganisms: Cutting the Gordian knot. *Genome Biology*, 6(8), 229. <http://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-229>
- Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo – Senplades. (2015). Agenda Zonal Zona 6 - Austro. (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo – Senplades. Quito.
- Simon, C., & Daniel, R. (2009). Achievements and new knowledge unraveled by metagenomic approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 265–276. <http://doi.org/10.1007/s00253-009-2233-z>
- Singh, J., Behal, A., Singla, N., Joshi, A., Birbian, N., Singh, S., Batra, N. (2009). Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnology Journal*, 4(4), 480–494. <http://doi.org/10.1002/biot.200800201>
- Tchounwou, P., Yedjou, C., Patlolla, A., & Sutton, D. (2012). Heavy metals toxicity and the environment. *National Institute of Health*, 101, 133–164.



<http://doi.org/10.1007/978-3-7643-8338-1>

- Uchiyama, T., & Miyazaki, K. (2009). Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(6), 616–622. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.09.010>
- Vakhlu, J., Sudan, A. K., & Johri, B. N. (2008). Metagenomics: Future of microbial gene mining. *Indian Journal of Microbiology*, 48(2), 202–215. <http://doi.org/10.1007/s12088-008-0033-2>
- Vester, J. K., Glaring, M. A., & Stougaard, P. (2015). Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles*, 19(1), 17–29. <http://doi.org/10.1007/s00792-014-0704-3>
- Vidali, M. (2011). Bioremediation - An overview. *Journal of Industrial Pollution Control*, 27(2), 161–168. <http://doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Walker, G. M., & Dundee, A. (2009). Defining statement. *Cell*, 478–491.
- Xie, C., Lu, R., Huang, Y., Wang, Q., & Xu, X. (2010). Effects of ions and phosphates on alkaline phosphatase activity in aerobic activated sludge system. *Bioresource Technology*, 101(10), 3394–3399. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.047>
- Zhao, K., Fu, W., Ye, Z., & Zhang, C. (2015). Contamination and spatial variation of heavy metals in the soil-rice system in Nanxun County, Southeastern China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(2), 1577–1594. <http://doi.org/10.3390/ijerph120201577>

8. Anexos

Anexo 1

Colecta de agua y lodo residual en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Ucubamba





Anexo 2

Protocolo para la extracción de ADN con el kit PowerSoil DNA Isolation

PowerSoil DNA Isolation Kit

Catálogo No. 12888-100

ATENCIÓN:

Tipo de riesgo

Equipo de protección personal: USO OBLIGATORIO



- Protección corporal con mandil.
- Usar guantes de nitrilo.
- Lavarse las manos antes y una vez concluido el trabajo.
- Seguir los procedimientos de bioseguridad descritos en el Manual de Bioseguridad.
- En caso de emergencia seguir los procedimientos descritos en el Manual de Emergencias.



Reactivos etiquetados como inflamables (Solución C5 – contiene etanol) deberán permanecer fuera de llamas o chispas.

A.- COMPONENTES DEL KIT

Componente	Cantidad
PowerBead Tubes	100
Solución C1	6.6 ml
Solución C2	28 ml
Solución C3	22 ml
Solución C4	144 ml
Solución C5	2 x 30 ml
Solución C6	12 ml
PowerSoil Spin Filters (units in 2 ml tubes)	100
PowerSoil 2 ml Collection Tubes	400

B.- EQUIPOS REQUERIDOS

- Microcentrifuga (10000 x g)
- Pipetas (50 µl – 500 µl)
- Vortex-Genie 2 Vortex (MOBIO Catalog# 13111-V o 13111-V-220)

C.- ALMACENAMIENTO DEL KIT

Los reactivos del kit y componentes deberían almacenarse a temperatura ambiente (15 – 30 °C).



D.- PROCEDIMIENTO

Paso No.	Descripción
1	Etiquetar los tubos Eppendorf de 2 ml proporcionados por el kit en su tapa y pared correspondiendo a la respectiva muestra a tratar.
2	Pesar 0.5 g de suelo y colocarla en el Tubo PowerBead.
3	Mezclar perfectamente en vórtex por 10 s.
4	Chequear si la solución C1 provista por el Kit está precipitada, si lo está calentarlo a 60 °C hasta disolverlo en parrilla de calentamiento.
5	Pipetear 60 µl de solución C1 y añadir la solución C1 al Tubo PowerBead que posee la muestra.
6	Colocar en el Tubo PowerBead en el TissuLyzer a máxima velocidad por 10 min.
7	Centrifugar a 10000 x g a 22 °C por 30 s. Tiene que formarse un sobrenadante, sino es así, centrifugar a 15 000 x g por 1 min.
8	Pipetear y transferir el sobrenadante (lo esperado es entre 400 – 500 µl) a un tubo Eppendorf de 2 ml limpio.
9	Añadir 250 µl de Solución C2 a tubo con el sobrenadante.
10	Vortear por 5 s y refrigerar a 4 °C por 5 min.
11	Centrifugar a 10000 x g a 22 °C por 1 min.
12	Pipetear y transferir 600 µl de sobrenadante a un tubo Eppendorf de 2 ml limpio.
13	Añadir 200 µl de Solución C3 a tubo con el sobrenadante.
14	Vortear por 5 s y refrigerar a 4 °C por 5 min.
15	Centrifugar a 10000 x g a 22 °C por 1 min.
16	Pipetear y transferir 750 µl de sobrenadante a un tubo Eppendorf de 2 ml limpio.
17	Añadir 1200 µl de Solución C4 a tubo con el sobrenadante.
18	Vortear por 5 s.
19	Cargar 675 µl en columna de Tubo Spin Filter.
20	Centrifugar a 10000 x g a 22 °C por 1 min.
21	Descartar la fracción no retenida para ello es necesario retirar la columna.
22	Cargar 675 µl de sobrenadante en columna de Tubo Spin Filter.
23	Centrifugar a 10000 x g a 22 °C por 1 min.
24	Descartar la fracción no retenida para ello es necesario retirar la columna.
25	Cargar el sobrenadante restante en columna de Tubo Spin Filter.
26	Centrifugar a 10000 x g a 22 °C por 1 min.
27	Colocar la columna con la fracción retenida en un tubo Eppendorf.
28	Pipetear y añadir 500 µl de solución C5.
29	Centrifugar a 10000 x g a 22 °C por 30 s.
30	Descartar la fracción no retenida.



- 31 Centrifugar a 10000 x g a 22 °C por 1 min.
- 32 Sacar columna y colocarla en un tubo limpio para evitar contaminación.
- 33 Pipetear y añadir 100 µl de solución C6 en el centro de la columna.
- 34 Centrifugar a 10000 x g a 22 °C por 30 s.
- 35 Desechar la columna.
- 36 Almacenar en refrigeración el ADN dispuesto en el tubo en un rango de – 20 °C a –80 °C.

E.- REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

BIO, L. M. (2013). PowerSoil © DNA Isolation Kit, (14900), 1–16.

Anexo 3***Manual para medición de concentración de ADN con Fluorómetro Qubit 3.0*****PROTOCOLO PARA MEDIR LA CONCENTRACIÓN DE ADN MEDIANTE FLUOROMETRÍA****Qubit dsDNA BR Assay Kits****100 pg/ μ L a 1000 ng/ μ L****ATENCIÓN:****Tipo de riesgo****Equipo de protección personal:
USO OBLIGATORIO**

- Protección corporal con mandil.
- Usar guantes de nitrilo.
- Lavarse las manos antes y una vez concluido el trabajo.
- Seguir los procedimientos de bioseguridad descritos en el Manual de Bioseguridad.
- En caso de emergencia seguir los procedimientos descritos en el Manual de Emergencias.

A.- SOLUCIONES Y/O REACTIVOS DEL KIT

N°	Solución / Reactivo	Q32851 (100 ensayos)	Concentración	Condición de almacenado	Estabilidad
1	Qubit dsDNA Reagent (Component A)	250 μ l	Concentrado 200X en DMSO (Dimetilsulfóxido)	<ul style="list-style-type: none">• Temperatura ambiente.• Desecado• Protegido de la luz.	Cuando se almacena como se indica, los kits son estables por 6 meses.
2	Qubit dsDNA HS Buffer (Component B)	50 mL	No aplicable	Temperatura ambiente	
3	Qubit dsDNA HS Standard # 1 (Component C)	1 mL	0 ng/ μ l en TE buffer.		
4	Qubit dsDNA BR Standard # 2 (Component D)	1 mL	100 ng/ μ l en TE buffer.	<4°C	

B.- PARÁMETROS CRÍTICOS DEL ENSAYO

Temperatura de ensayo	El ensayo Qubit® dsDNA BR ofrece un rendimiento óptimo cuando todas las soluciones están a temperatura ambiente (22-28°C). Los ensayos Qubit® están diseñados para ser realizados a temperatura ambiente, ya
-----------------------	--



	<p>que las fluctuaciones de temperatura pueden influir en la precisión del ensayo. Para minimizar las fluctuaciones de temperatura, almacene el Reactivo Qubit® dsDNA BR y el Tampón a temperatura ambiente e inserte todos los tubos de ensayo en el Fluorómetro Qubit® sólo durante el tiempo que el instrumento necesite para medir la fluorescencia; El Fluorómetro Qubit® puede elevar la temperatura de la solución de ensayo significativamente, incluso durante un período de unos pocos minutos. No sostenga los tubos de ensayo en su mano antes de leer porque esto calienta la solución y resulta en una lectura baja.</p>
Tiempo de incubación	<p>Para permitir que el ensayo Qubit® alcance una fluorescencia óptima, incubar los tubos para los ensayos de ADN y ARN durante 2 minutos después de mezclar la muestra o estándar con la solución de trabajo. Después de este periodo de incubación, la señal de fluorescencia es estable durante 3 horas a temperatura ambiente.</p>
Fotoblanqueo de los reactivos Qubit®	<p>Los reactivos Qubit® exhiben alta fotoestabilidad en el Fluorómetro Qubit®, mostrando una caída de <0,3% en la fluorescencia después de 9 lecturas y <2,5% de caída en la fluorescencia después de 40 lecturas. Sin embargo, si el tubo de ensayo permanece en el Fluorómetro Qubit® para lecturas múltiples, se observará una reducción temporal en la fluorescencia a medida que la solución aumente de temperatura (Figura 2, página 7). Tenga en cuenta que la temperatura dentro del fluorómetro Qubit® puede alcanzar hasta 3 ° C por encima de la temperatura ambiente después de 1 hora. Por esta razón, si desea realizar múltiples lecturas de un solo tubo, retire el tubo del instrumento y deje que se equilibre a temperatura ambiente durante 30 segundos antes de tomar otra lectura.</p>
Calibración del Fluorómetro Qubit®.	<p>Para cada ensayo, tiene la opción de ejecutar una nueva calibración o utilizar los valores de la calibración anterior. Cuando utilice el instrumento por primera vez, realice una nueva calibración cada vez. A medida que se familiarice con los ensayos, el instrumento, la precisión de pipeteado y las importantes fluctuaciones de temperatura dentro de su laboratorio, puede decidir que tan adecuado está utilizando los datos de calibración almacenados desde la última vez que el instrumento fue calibrado. Además, recuerde que la señal de fluorescencia en los tubos que contienen soluciones estándares y muestras es estable durante no más de 3 horas. Consulte la Figura 3 para ver un ejemplo de la curva de calibración utilizada para generar los resultados de la cuantificación.</p>
Manipulación y eliminación	<p>No se dispone actualmente de datos que aborden la mutagenicidad o la toxicidad del Reactivo Qubit® dsDNA BR (Componente A). Se sabe que este reactivo se une al ácido nucleico y se proporciona como una solución en DMSO. Tratar el Reactivo Qubit® dsDNA BR con las mismas precauciones de seguridad que todos los demás mutágenos potenciales y disponer del colorante de acuerdo con las regulaciones locales.</p>

C.- MATERIALES REQUERIDOS PERO NO INCLUIDOS EN EL KIT

Container plástico (desechable) para mezclar la Qubit working solution.

Tubos de ensayo Qubit o Tubos Axygen PCR-05-C.

D.- COMPONENTES EXTERIORES DEL INSTRUMENTO (Qubit 3.0)

Vista frontal de Qubit 3.0

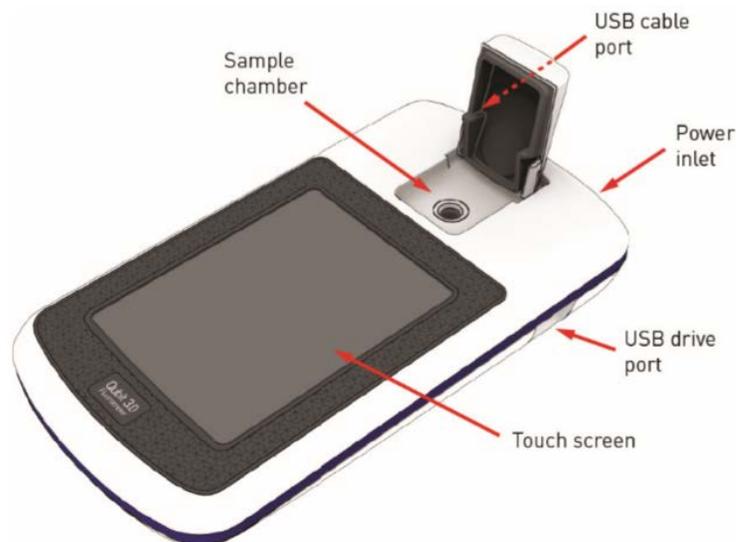
Power Intel conecta el Fluorómetro Qubit® 3.0 a una fuente de corriente eléctrica utilizando el cable de alimentación suministrado y el enchufe adecuado.

Touch screen ubicada en la parte frontal del instrumento es la interfaz de usuario que contiene los botones para todas las funciones necesarias y muestra los datos de los ensayos.

Sample chamber es usada para insertar el tubo de ensayo que contiene la muestra en el fluorómetro para su análisis.

USB drive port permite transferir y guardar datos en su computadora para fines de registro e impresión. La unidad USB suministrada con el instrumento o cualquier otra unidad USB similar se puede insertar en el puerto de la unidad USB para la transferencia de datos

USB cable port ubicado en la parte posterior, le permite transferir sus datos directamente a su computadora utilizando el cable USB suministrado con el instrumento o cualquier otro cable USB similar.



E.- PROCESO

Paso No:	Descripción:
1	Preparar tubos 0.5 mL para las soluciones estándares y las muestras. El ensayo Qubit® dsDNA BR requiere 2 estándares. Nota: Utilizar sólo tubos de PCR de 0.5 mL de pared delgada y transparentes. Los tubos aceptables incluyen tubos de ensayo Qubit® (nº Cat. Q32856) o tubos Axygen® PCR-05-C (nº de referencia 10011-830).
2	Etiquetar las tapas de los tubos (No las paredes de los tubos porque podría interferir con el proceso). La calibración del Qubit® Fluorometer requiere que los estándares sean insertados en el instrumento en el orden correcto.



- Preparar la Qubit working solution al diluir a Qubit dsDNA HS Reagent 1:200 en Qubit dsDNA HS Buffer. Usar un tubo plástico limpio cada vez que usted prepare la Qubit working solution. No mezclar la working solution en un recipiente de vidrio.
- 3 **Nota:** El volumen final en cada tubo debe ser 200 μ l. Cada tubo estándar requiere 190 μ l de Qubit working solution y cada tubo con muestra requiere entre 180 – 199 μ l. Prepare suficiente Qubit working solution.
- Preparar suficiente Qubit working solution para todos los estándares y muestras. Por ejemplo: Para 8 muestras, preparar suficiente Qubit working solution para las muestras y 2 estándares, ~ 200 μ l por tubo en 10 tubos produce 2 ml de Qubit working solution (10 μ l de reactivo Qubit® más 1990 μ l de tampón Qubit®).
- 4 Añadir 190 μ l de Qubit working solution a cada uno de los tubos para los estándares.
- Añadir 10 μ l de cada Qubit standard al apropiado tubo, entonces vortee por 2-3 segundos. Sea cuidadoso con no crear burbujas.
- 5 **Nota:** Sea cuidadoso al pipetear para asegurar que exactamente 10 μ l de cada Qubit standard es añadido a 190 μ l de Qubit working solution.
- Añadir Qubit working solution a los tubos individuales de ensayo así que el volumen final en cada tubo después de añadir la muestra es 200 μ l.
- 6 **Nota:** Su muestra de ADN puede variar desde 1 – 20 μ l. Añadir un volumen correspondiente de Qubit working solution a cada tubo de ensayo: variando desde 180 – 199 μ l.
- 7 Añadir cada muestra a los tubos que contienen el correcto volumen de Qubit working solution, entonces mezcle por vorteo entre 2 – 3 segundos. El volumen final en cada tubo debería ser 200 μ l.
- 8 Incubar todos los tubos a temperatura ambiente por 2 min, proceder a leer los estándares y las muestras.

LECTURA DE ESTÁNDARES Y MUESTRAS

- En la pantalla de inicio del Fluorómetro Qubit® 3.0, pulsar **ADN**, luego seleccionar **dsDNA Broad Range** como el tipo de ensayo. Aparecerá la pantalla "Leer estándares". Presionar **Leer Estándares** para continuar.
- 9 **Nota:** Si ya ha realizado una calibración para el ensayo seleccionado, el instrumento le pedirá que elija entre leer nuevos estándares y ejecutar muestras utilizando la calibración anterior. Si desea utilizar la calibración anterior, vaya al paso 12. De lo contrario, continúe con el paso 10.
- 10 Insertar el tubo que contiene el **Estándar # 1** en la cámara de muestras, cerrar la tapa, luego presionar **Leer estándar**. Cuando termine la lectura (~ 3 segundos), quitar el Estándar # 1.
- Insertar el tubo que contiene el **Estándar # 2** en la cámara de muestras, cerrar la tapa y luego pulsar **Leer estándar**. Cuando termine la lectura, quitar el Estándar # 2.
- 11 El instrumento muestra los resultados en la pantalla de Lectura estándar. Para obtener información sobre la interpretación de los resultados de la calibración, consulte la Guía del usuario del fluorómetro Qubit® 3.0.



12 Presionar **Ejecutar muestras**.

En la pantalla de ensayo, seleccionar el volumen de muestra y las unidades:

13 a. Pulsar los botones + o - de la rueda para seleccionar el volumen de muestra añadido al tubo de ensayo (de 1-20 μ l).

b. En el menú desplegable, seleccionar las unidades para la concentración de muestra de salida.

Introducir un tubo de muestra en la cámara de muestras, cierre la tapa y luego pulse **Lectura del tubo**. Cuando termine la lectura (~ 3 segundos), retirar el tubo de muestra.

14 El instrumento muestra los resultados en la pantalla de ensayo. El valor superior (en fuente grande) es la concentración de la muestra original. El valor inferior es la concentración de dilución. Para obtener información sobre la interpretación de los resultados de la muestra, consulte la Guía del usuario del fluorómetro Qubit® 3.0.

15 Repetir el paso 14 hasta que se hayan leído todas las muestras.

F. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Thermo Fisher Scientific. (2015). LifeTech: Qubit dsDNA BR Assay Kit. Manual, 1–10.



Anexo 4

Diseño del péptido señal de la Endoxilanaso en pET302NT-His

>AAD10834.1 endo-1,4-beta-xylanhydrolase [Bacillus sp.]

1 MFKFKKKFLVGLTAAAFMSLSMFSATASAAGTDYWNQWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWVAPNGNGYLTLYGWT
101 RAPLIEYVVDVSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDNFTTQYWSVRQSKRPTGSNAAITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVLATE
201 GYKSSGSSNVTVW

>U51675.1 Bacillus sp. endo-1,4-beta-xylanhydrolase (xynA) gene, complete cds

1 CCCGGGTTTTTCTTATTCCGCTTCTCCGACAACGGTAAAGTTTTTCTGCTTTGGATTGCAATACGGCCCCGAACAGCATTGACGCTGTATGCAGAT
101 ATTCTTTGGCAAAAAGTTTTTCAAATAAACTTTCTCAGAGTTCAACTGAAATCACTCAGTTCTGCAAAATAAGGCTATGGCGGTACAAGACCA
201 CTCATCATACAGTTTTTTGGGCTTTGTAATTAATTAACAATTGTTCTTAATATTTCACTGATGTATTTCATGCTATTATATTGAAAGGACGATCAAAGCG
301 TTGAGGTTTGTAAATATTACGAGTGTCTGCCTCATGTCAAAGTCAGAAAAATAGTATAGGAGGTAACATATGTTTAAAGTTAAAAAGAAATCTTAGT
401 GGGATTAAACGGCAGCTTTTCATGAGTATCAGCATGTTTTCTGCAACCGCCTCTGCAGCTGGCACAGATTACTGGCAAAAATTGGACTGACGGGGCGGAACA
501 GTAAACGCAGTCAATGGCTCTGGCGGAATTACAGTGTTAATGGTCTAATACCGGAATTTTCGTTGTTGGTAAAGGCTGGACTACAGGCTCGCCATTTA
601 GAACAATAAACTATAATGCCGGTGTTTGGGCGCCGAATGGTAATGGATATTGACTTTATATGGCTGGACGAGAGCACCTCTCATCGAATATTATGTGGT
701 GGATTCATGGGGTACTTACAGACCTACCGAACGTATAAAGGTACTGTAAAGAGTGATGGAGGTACATATGACATATATAACAACGACAGCTTATAATGCA
801 CCTTCCATTGATGGCGATAACACTACTTTTACGCAGTACTGGAGTGTCCGCCAGTCAAGAGACCGACAGGAACGACGCTGCAATCACTTTCAGCAATC
901 ATGTTAAACGCATGGAAGAGCCATGGAATGAAATCTGGGCGAGTAAATGGGCTTATCAAGTCTTAGCAACAGAAGGATATAAAGCAGCGGAAGTTCTAATGT
1001 AACTGTGTGGTAAACAGCTCATCTTTAATGAGGGGACGCTAACGGGCTTTGATCGTTCCTTGAGAAAATTTATAATGATTGTGAAGAGGCGAAGCGTTTG
1101 GCATTACCGGAGCAGGATATTCTCCATCAGTTTTTTAGCGGGTATTAATAAGAGTTCGCTCTTTTTTGGTAAACCGCTTACAACAGACACCTTCA
1201 CATAAGCCTTAAGCAAAAATAAAATAATCCCGGTTACCACCTCCTTTAGTTTCGGAGGATTTCTTCATTAAACAGATCGCAATGGCGCATCCAGGCTTGT
1301 CTGAAAATAGAGCAAAAACCGTGATTTCTCATTTCCATTGTAACCATTTCCGTTACCCTTAGCGGCATGAACCCATCTCTTTTTAACAAAAAGAGATG
1401 ATTCATTACATATAAAGGACTTGTCTGCAAGTTCATTCTCCATTGCGGCTGTAGCCTTCCGAACTCTCATCGAGCGGCGCTGAATATTTTTCGCGA
1501 CCGGACAGTCCGGGTTTCGGATTGTCGTGAACGGAAAAGCCTTTCCTTATTCTGCACCGCCCTGTAAACCTCTAAGAGGGTGATCTCCGACGGATCTTTT
1601 TTCAGACTGGCTCCCGAAC

NdeI(*) PvuII(*) PstI(*)
CATATGTTTAAAGTTAAAAAGAAATCTTAGTGGGATTAACGGCAGCTTTTCATGAGTATCAGCATGTTTTCTGCAACCGCCTCTGCAGCTGGCACAGATT <
100 H M F K F K K K F L V G L T A A F M S I S M F S A T A S A A G T D Y
10 20 30 40 50 60 70 80 90
ACTGGCAAAAATTGGACTGACGGGGCGGAACAGTAAACGCAGTCAATGGCTCTGGCGGAATTACAGTGTTAATTTGGTCTAATACCGGAATTTTCGTTGT <
200 W Q N W T D G G G T V N A V N G S G G N Y S V N W S N T G N F V V
110 120 130 140 150 160 170 180 190
TGGTAAAGGCTGGACTACAGGCTCGCCATTTAGAACATAAACTATAATGCCGGTGTGGGCGCCGAATGGTAATGGATATTGACTTTTATATGGCTGG <
300 G K G W T T G S P F R T I N Y N A G V W A P N G N G Y L T L Y G W
210 220 230 240 250 260 270 280 290
ACGAGAGCACCTCTCATCGAATATTATGTGGTGGATTTCATGGGGTACTTTACAGACCTACCGGAACGTATAAAGTACTGTAAAGAGTATGGAGGTACAT <
400 T R A P L I E Y Y V V D S W G T Y R P T G T Y K G T V K S D G G T Y
310 320 330 340 350 360 370 380 390
ATGACATATATAACAACGACAGCTTATAATGCACCTTCCATTGATGGCGATAACACTACTTTTTACGCAGTACTGGAGTGTCCGCCAGTCAAGAGACCGAC <
500 D I Y T T T R Y N A P S I D G D N T T F T Q Y W S V R Q S K R P T
410 420 430 440 450 460 470 480 490
AGGAAGCAACGCTGCAATCACTTTTCAGCAATCATGTTAACGCATGGAAGAGCCATGGAATGAATCTGGGCGTAATTTGGGCTTATCAAGTCTTAGCAACA <
600 G S N A A I T F S N H V N A W K S H G M N L G S N W A Y Q V L A T
510 520 530 540 550 560 570 580 590
GAAGGATATAAAGCAGCGGAAGTTCTAATGTAAGTGTGGTAA < 645
E G Y K S S G S S N V T V W *
610 620 630 640

Signal peptide sequence:

NdeI(*) PvuII(*) PstI(*) EcoRI(*)
GACATATGTTTAAAGTTAAAAAGAAATCTTAGTGGGATTAACGGCAGCTTTTCATGAGTATCAGCATGTTTTCTGCAACCGCCTCTGCAGCTGGAAATCTC <
101 M F K F K K K F L V G L T A A F M S I S M F S A T A S A A G I L
CTGTATACAAAATCAAATTTTCTTAAAGAAATCACCCATAATTGCCGTGCAAAAGTACTCATAGTCGTACAAAAGACGTTGGCGGAGACGTCGACCTTAAGAG
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100



Anexo 5

Diseño de oligonucleótidos de secuencias codificantes de proteínas similares a PhoN

>AF521595.1 Salmonella typhimurium class A nonspecific acid phosphatase PhoN gene, complete cds

```
GCAGCGTCCTGCTTTTTTACCTGTATGTTGAATAACCATTTCAATAAATCATTATAGAATCACATCTGTT
TATTATTGCCTGATCCGGGGTGAGTCTTTATGAAAAGTCGTTATTTACTATTTTTTCTACCACTGATCGT
AGCTAAATATACATCAGCAGCAACAATGCAACCCTTTCAATTCTCCTGAAGAATCAGTGAACAGTCAGTTC
TACTTACCACCACCGCCAGGTAATGATGATCCGGCTTTCCGCTATGATAAGGAGGCTTATTTTAAGGGCT
ATGCGATAAAGGGTTCACGATGGAAACAAGCTGCTGAGGATGCAGATATAAGCGTGGAATAATATAGC
CAGAATATTCTCGCCAGTAGTGGGTGCTAAAATTAATCCCAAAGATACGCCAGAAACCTGGAATATGTTA
CAGAATCTTCTGAAAATGGGCGGCTACTACGCTACTGCTTCGGCAAAAAAATATTATATGCGTACTCGTC
CCTTTGTCTTATTTAATCATTCTACCTGCCGTCCTGAAGATGAGAATACTTTGCGAAAAGATGGCTCTTA
CCCTTCCGGGCATACTGCTTATAGTACACTTCTGGCATTAGTATTATCCCAGGCCAGACCGGAACGCGCG
CAGGAGCTCGCCAGACGAGGATGGGAGTTCGGGCAAAGCAGAGTGATATGCGGTGCTCACTGGCAAAGCG
ATGTTGATGCTGGCCGTTATGTGGGAGCAGTAGAGTTTGCAAGGCTGCAAACAATCCCGGCTTTTCAGAA
GTCACTGGCAAAAGTCCGTGAGGAGCTGAACGACAAAAATAATTTATTGAGTAAAGAAGAACGCCCGGAA
CTTAATTACTGAAGGTGAAAGTCTTCCCGCAAACCTGGCCACA
```

>AF522938.1 Salmonella typhimurium class A nonspecific acid phosphatase PhoN precursor (phoN) gene, complete cds

```
GCAGCGTCCTGCTTTTTTACCTGTATGTTGAATAACCATTTCAATAAATCATTATAGAATCACATCTGTT
TATTATTGCCTGATCCGGGGTGAGTCTTTATGAAAAGTCGTTATTTACTATTTTTTCTACCACTGATCGT
AGCTAAATATACATCAGCAGCAACAATGCAACCCTTTCAATTCTCCTGAAGAATCAGTGAACAGTCAGTTC
TACTTACCACCACCGCCAGGTAATGATGATCCGGCTTTCCGCTATGATAAGGAGGCTTATTTTAAGGGCT
ATGCGATAAAGGGTTCACGATGGAAACAAGCTGCTGAGGATGCAGATATAAGCGTGGAATAATATAGC
CAGAATATTCTCGCCAGTAGTGGGTGCTAAAATTAGTCCCAAAGATACGCCAGAAACCTGGAATATGTTA
CAGAATCTTCTGAAAGTGGGCGGCTACTACGCTACTGCTTCGGCAAAAAAATATTATATGCGTACTCGTC
CCTTTGTCTTATTTAATCATTCTACCTGCCGTCCTGAAGATGAGAATACTTTGCGAAAAGATGGCTCTTA
CCCTTCCGGGCATACTGCTTATAGTACACTTCTGGCATTAGTATTATCCCAGGCCAGACCGGAACGCGCG
CAGGAGCTCGCCAGACGAGGATGGGAGTTCGGGCAAAGCAGAGTGATATGCGGAGCTCACTGGCAAAGCG
ATGTTGATGCTGGCCGTTATGTGGGAGCAGTAGAGTTTGCAAGGCTGCAAACAATCCCGGCTTTTCAGAA
GTCACTGGCAAAAGTCCGTGAGGAGCTGAACGACAAAAATAATTTATTGAGTAAAGAAGAACGCCCGGAA
CTTAATTACTGAAGGTGAAAGTCTTCCCGCAAACCTGGCCACA
```



>CP019183.1:4398014-4398706 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Mbandaka str. ATCC 51958, complete genome

GCAACAGTGCAACCCTTTCATTCTCCTGAAGAATCAGTGAACAGTCAGTTCTACTTACCACCACCGCCAG
GTAATGATGATCCGGCTTTCGGCTATGATAAAGAGGCTTATTTTAAGGGCTATGCGATAAAGGGTTCCCC
ACGATGGAAACAAGCTGCTGAGGATGCAGATGTAAGCGTGGAAAATATAGCCAGAATATTCTCGCCAGTA
GTGGGTGCTAAAATTAATCCCAAAGATACGCCTGAAACCTGGAATATGTTACAGAATCTTCTGAAAATGG
GCGGCTACTACGCTACTGCTTCGGCAAAAAAATATTATATGCGTACTCGCCCCCTTGTCTTATTTAATCA
TTCCACCTGCCGTCTTGAAGATGAGAATACTTTGCGAAAAGATGGCTCTTACCCTTCCGGGCATACTGCT
TATGGTACACTTCTGGCATTAGTATTATCCCAGGCCAGACCGGAACGCGCGCAGGAGCTCGCCAGACGAG
GATGGGAGTTCGGGCAAAGCAGAGTGATATGCGGTGCTCACTGGCAAAGCGATGTTGATGCTGGCCGTTA
TGTGGGAGCAGTAGAGTTTGCAAGGCTGCAAACAATCCCGGCGTTTCAGAAGTCACTGGCAAAGTCCGT
GAGGAGCTGAACGACAAAAATAATTTATTGAGTAAAGAAGATCACCCAAACTTAATTACTGA

>AE017220.1:4499817-4500509 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis str. SC-B67, complete genome

TCAGTAATTAAGTTTGGGATGATCTTCTTTACTCAATAAATTATTTTTGTTCGTTTCAGCTCCTCACGGACT
TTTGCCAGTGACTTCTGAAAAGCCGGGATTGTTTGCAGTCTTGCAAACCTCTACTGCTCCACATAACGGC
CAGCATCAACATCGCTTTGCCAGTGAGCACCGCATATCACTCTGCTTTGCCCGAACTCCCATCCTCGTCT
GGCGAGCTCCTGCGCGCGTTCCGGTCTGGCCTCGGATAATACTAATGCCAGAAGTGTACCATAAGCAGTA
TGCCCGGAAGGGTAAGAGCCATCTTTTCGCAAAGTATTCTCATCTTCAGGACGGCAGGTAGAATGATTAA
ATAAGACAAAGGGACGAGTACGCATATAATATTTTTTTGCCGAAGCAGTCGCGTAGTAGCCGCCATTGT
CAGAAGATTCTTTAACATATTCAGGTTTCTGGCGTATCTTTGGGGTTAATTTTAGCACCCACTACTGGC
GAGAATATTCTGGCTATATTTTCCACGCTTACATCTGCATCCTCAGCAGCTTGTTTCCATCGTGGGGAAC
CCTTTATCGCATAGCCCTTAAAATAAGCCTCCTTATCATAGAGGAAAGCCGGATCATCATTACCTGGCGG
TGGTGGTAAGTAGAACTGACTGTTCACTGATTCTTCAGGAGAATGAAAGGGTTGCACTGTTGC

>CP007325.2:4420410-4421100 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis str. EC20111515 genome

TCAGTAATTAAGTTCCGGGTGATCTTCTTTACTCAATAAATTATTTTTGTTCGTTTCAGCTCCTCACGGACT
TTTGCCAGTGACTTCTGAAATGCCGGGATTGTTTGCAGTCTTGCAAACCTCTACTGCTCCACATAACGAC
CAGCATCAACATCGCTTTGCCAGTGAGCACCGCATATCACTCTGCTTTGCCCGAACTCCCATCCTCGTCT
GGCGAGCTCCTGCGCGCGTTCCGGTCTGGCCTCGGATAATACTAATGCCAGAAGTGTACCATAAGCAGTA
TGCCCGGAAGGGTAAGAGCCATCTTTTCGCAAAGTATTCTCATCTTCAGGACGGCAGGTGGAATGATTAA
ATAAGACAAAGGGACGAGTACGCATATAATATTTTTTTGCCGAAGCAGTAGCGTAGTAGCCGCCATTGT



CAGAAGATTCTGTAACATATTCCAGGTTTCTGGCGTATCTTTGGGATTAATTTTAGCACCCACTACTGGC
GAGAATATTCTGGCTATATTTCCACGCTTACATCTGCATCCTCAGCAGCTTGTTTCCATCGCGGGGAAC
TCTTTATCGCATAGCCCTTAAAATAAGCCTCCTTATCATAGCGGAAAGCCGGATCATCATTACCTGGCGG
TGGTGGTAAGTAGAACTGACTGTTCACTGATTCTTCAGGAGAATGAAAGGGTTGCACTGTT



Anexo 6

Generación de *E. coli* TOP10F' y BL21 Start (DE3) competentes con Calcio y transformación por choque térmico

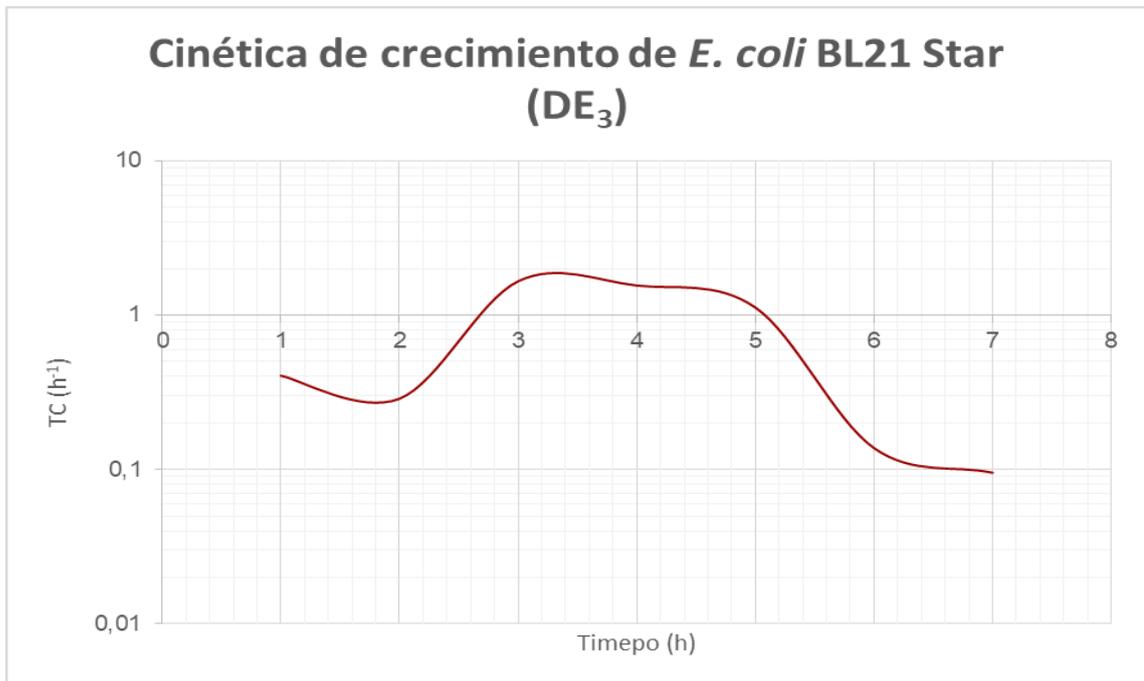
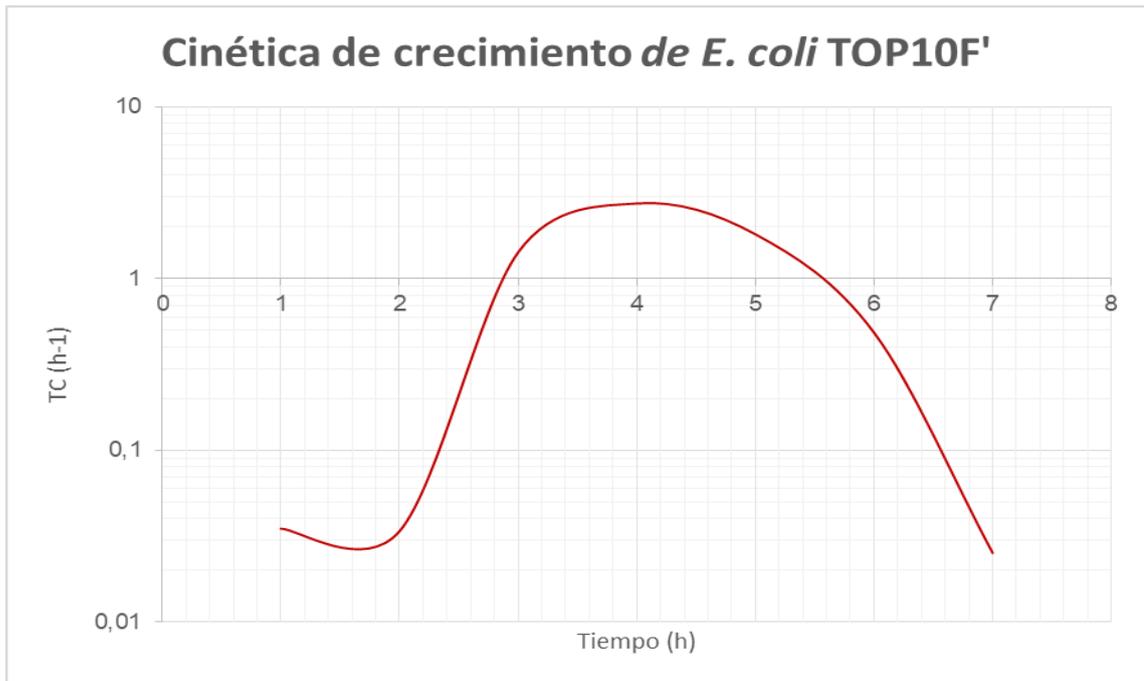
Cinética de crecimiento de *E. coli* TOP10F' y *E. coli* BL21 Start (DE₃)

Se realizó dos curvas de crecimiento con las cepas TOP10F' y BL21 Start (DE₃), previo al proceso de conversión en competentes, se determinó la tasa máxima de crecimiento de cada cepa siguiendo el protocolo descrito a continuación:

1. Se inoculó la cepa de interés en 50 ml de LB-caldo un día previo a realizar la curva de crecimiento e incubó por toda la noche a 37 °C y en agitación constante a 200 r.p.m.
2. Se inoculó 1000 µl de cultivo de Paso 1 en 100 ml de LB-caldo.
3. De este último se tomó 500 µl y se realizó las diluciones: 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵. A partir de la sexta hora, las diluciones fueron: 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶.
4. Se incubó LB-caldo (Ver paso 2) a 37 °C y en agitación a 350 rpm por períodos de 1 h.
5. Se vertió 10 µl de cada dilución en cuadrantes por duplicado en LB-agar.
6. Se repitió paso 3, 4 y 5 cada hora por 8 h.
7. Finalizado el proceso, se incubó las placas LB-agar a 37 °C por toda la noche.
8. Al día siguiente, se contó el número de colonias en la dilución con colonias contables, se realizó un promedio y graficó en Excel la curva de crecimiento, aplicando la Ecuación 1, las curvas correspondientes a cada cepa pueden ser visualizada en las siguientes gráficas.

$$TC = \frac{\ln\left(\frac{C_i}{C_{i+1}}\right)}{(T_i - T_{i+1})} \quad (1)$$

Donde,
TC: Tasa de crecimiento
C: Número de colonias promedio
T: Tiempo (h)



De acuerdo a la cinética de crecimiento, la cepa TOP10F' tuvo su máxima tasa de crecimiento a las 3 h y media, y BL21 Star (DE3) a las 3 h.



Preparación de *E. coli* TOP10F' y *E. coli* BL21 (DE₃) Start con Calcio

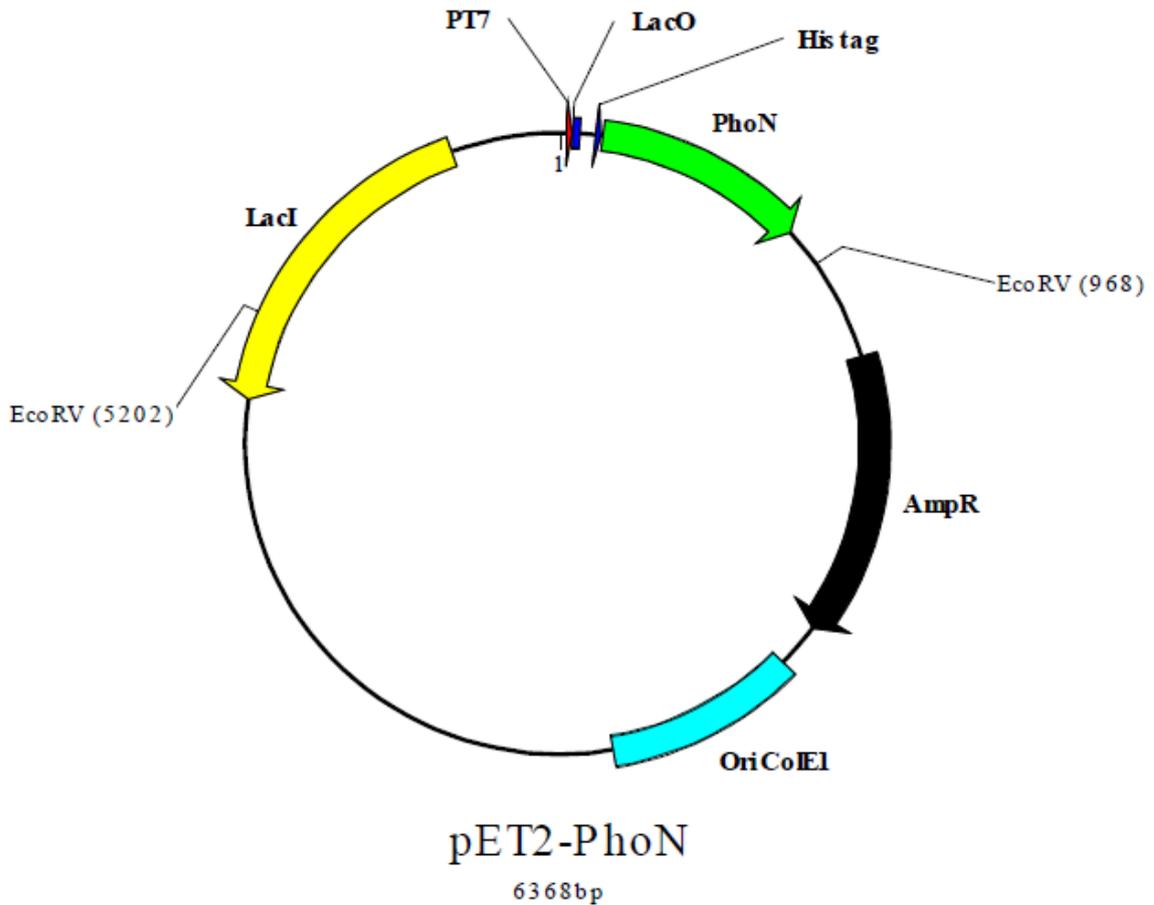
Para generar bacterias competentes se utilizó soluciones de CaCl₂ a 100 mM y CaCl₂ con Glicerina a 100 mM, el proceso a seguir para cada cepa es realizado según como se describe a continuación:

1. Un día previo a la generación de bacterias competentes se inoculó la cepa en estudio en 50 ml de LB-caldo e incubó por toda la noche a 37 °C y en agitación constante a 200 r.p.m.
2. Al día siguiente, se inoculó 1000 µl de cultivo de Paso 1 en 100 ml de LB-caldo e incubó por 3 h y media en caso de TOP10F' y 3 h en caso de BL21 Star (DE₃).
3. Previo a cumplirse el tiempo de incubación se colocó una cubeta con agua a - 70 °C.
4. Culminado el tiempo de incubación, se sumergió el cultivo obtenido en el paso 2 en la cubeta con agua congelada y se los colocó en refrigeración por 30 min.
5. Se centrifugó 3.8 ml del cultivo refrigerado en tubos Eppendorf de 2 ml a 4500 x g por 10 min formando un pellet.
6. Se realizó dos lavados con 1 ml CaCl₂ 100 mM mediante centrifugación a 4500 rfc a 4 °C y retirando el sobrenadante.
7. Al pellet formado en el paso 6, se agregó 1 ml de CaCl₂ con Glicerina a 100 mM y se distribuyó en 10 tubos Eppendorf de 2 ml previamente congelados.

Anexo 7

Vector pET2-PhoN

Sitio de corte de la enzima *EcoRV* en vector pET2-PhoN empleada en la elaboración del mapa de restricción.



Anexo 8

Vector pET2 Sgp-PhoN

Sitio de corte de la enzima EcoRV y XbaI en vector pET2 Sgp-PhoN empleadas en el mapa de restricción.

