



## Póster

# Construcción de una metagenoteca a partir de muestras de una depuradora de aguas de hospital para la obtención de funciones de interés ambiental y biomédico.

Marta Barrientos Moreno, Carlos Medina Morillas y Amando Flores Díaz.

Área: Microbiología, Departamento: Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica, Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide.

*Palabras clave:* metagenoteca; depuradora hospital; resistencia antibióticos

## RESUMEN

**Motivación:** La demanda de medicamentos, especialmente de los antibióticos, ha ido en aumento en los últimos tiempos. A pesar de que muchos de ellos son biodegradables, a menudo se encuentran como contaminantes de las aguas residuales tratadas, lo cual supone un riesgo ecológico y sanitario ya que es posible la aparición de microorganismos resistentes limitando su efectividad. De aquí surge la necesidad de analizar qué microorganismos pueden ser resistentes, y en concreto qué genes les confieren dicha resistencia, para lo cual se propone construir una metagenoteca a partir de aguas residuales de una depuradora de hospital. En ella la concentración de antibióticos es mayor y existen antibióticos tanto de uso frecuente como exclusivos de hospitales.

**Métodos:** Para la construcción de la metagenoteca se siguió el protocolo estándar, "CopyControl™ Fosmid Library Production Kit protocol (Epicentre)", con algunas modificaciones [1]. En primer lugar se realizó la extracción del ADN de las muestras de la depuradora, para lo cual se realizaron diversas pruebas utilizando kits comerciales de extracción así como otros métodos descritos [2,3]. Tras la extracción se comprobó que el ADN purificado no se degradara, se seleccionó el tamaño adecuado, determinado por la capacidad de empaquetar del fago lambda ( $\approx 40\text{kb}$ ), y se repararon los extremos para su clonación. Por otra parte, el fósido que se empleó para la construcción de la metagenoteca, se digirió con PmlI y desfosforiló con SAP. Para que la metagenoteca sea representativa, han de conseguirse concentraciones muy altas tanto del vector como del inserto. Finalmente, el ADN ligado se empaquetó en extractos del fago lambda que se emplean para infectar células EPI300-T1R. Estas bacterias transformadas con el vector, constituyen la metagenoteca.

**Resultados:** Se han buscado bacterias resistentes a diferentes concentraciones de los antibióticos colistina y ceftriaxona. A las concentraciones probadas por el momento, sólo se ha encontrado resistencia a ceftriaxona. Actualmente se sigue trabajando para construir una nueva metagenoteca y mejorar todo el proceso.

**Conclusiones:** Se han obtenido bacterias resistentes a ceftriaxona en la primera metagenoteca construida, a pesar del bajo número de clones de esta. Esto pone de manifiesto la robustez del sistema para detectar actividades génicas incluso teniendo una baja representación en la metagenoteca de los organismos con dicha actividad presentes en el medio.

## 1. BIBLIOGRAFIA

1. Terrón-González, L., Medina, C., Limón-Mortés, M.C. and Santero, E. (2013) Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potencial of metagenomic libraries. *Scientific Reports.*, **3**:1107, doi:10.1038/srep01107.
2. Zhou, J., Bruns, M.A. and Tiedje, J.M. (1996) DNA Recovery from Soils of Diverse Composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **62** (2), 316-322
3. Sharma, P.K., Capalash, N. and Kaur, J. (2007) An improved method for single step purification of metagenomic DNA. *Mol Biotechnol*, **36** (1), 61-63. doi: 10.102.