

UNIVERSIDAD DEL VALLE



**IDENTIFICACIÓN DE GENES PUTATIVOS DE LACASAS DEL
METAGENOMA DE SUELO DE BOSQUE ALTO ANDINO - PARQUE
NACIONAL NATURAL “LOS NEVADOS”- COLOMBIA**

Ivon Andrea Bolaños Martinez

Estudiante de Maestría en Ciencias – Biología

Patricia E. Vélez Varela M.Sc. Ph.D.

Directora

Universidad del Cauca

Pedro A. Moreno Ph.D

Co-director

Universidad del Valle

Programa de Maestría en Ciencias – Biología

Facultad de Ciencias Naturales y Exactas

Universidad del Valle

Abril de 2017

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por amarme tanto y permitirme terminar este sueño, por concederme encontrar personas estupendas en este camino, amigos que me brindaron su apoyo, amor y compañía.

A mi familia, mi mamá, mi manita Vane, mi chiquis hermosa una lucecita en mi camino mi sobri Lia, a mi manita Luzisabel y Amanda, a mi pimis Marisol a Dany y mi tio lindo Jaime, a Dani y Angelita, por su incondicionalidad, por su apoyo en los momentos difíciles, por su amor, por su confianza en mí, por su paciencia.

A mi paito y mi mamita por que son dos grandes razones en mi vida para seguir adelante y ser mis motivaciones constantes; por que siempre están allí para mí con su amor infinito.

A mis directores la Doctora Patricia E. Velez y el Doctor Pedro A. Moreno por su orientación, por darme la posibilidad de aprender de ellos, por permitirme trabajar con ellos y brindarme su apoyo de manera incondicional y su amistad.

A Maritsa Cruz, Adrian Rodriguez, Gilmar Delgado, Aymara Martinez, Yenifer Tovar, Carlos Fernando Castañeda, Alejandro Benachi, Nilza Velasco, Gloria Avila, Clarita Giraldo y Sandra Rivas a mis amigos Joa, Nancy, Carlitos por brindarme su amistad y estar conmigo en cada etapa del desarrollo de este trabajo.

Al posgrado de Ciencias-Biologia por brindarme la posibilidad de realizar la Maestría.

De igual forma, a los estudiante de Doctorado Maritsa Cruz y Adrian Rodriguez, y a la Doctora Aymara Martinez por sus comentarios y asesoria incondicional, que permitieron fortalecer este trabajo.

Al grupo de Investigación y al Semillero de Investigación de Biología Molecular Ambiental y Cáncer -BIMAC, al Departamento de Biología (profesores y laboratoristas) de la Universidad del Cauca, al grupo de Bioinformática de Univalle por su amistad, por sus enseñanzas, por su tiempo, aportes y sus consejos

Agradezco a los Investigadores del Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos, que hicieron parte con su apoyo y asesorías académicas de este trabajo, en especial al PhD. Salvador Montaña.

A los Doctores y Maestros Salvador Montaña de la Universidad Javeriana, la Doctora Esperanza y David de la Universidad Nacional, a Cesar Osorio y Katherine de Corpogen, a Oriana de la Universidad Industrial de Santander al doctor Telles de la Universidad de Quilmes-Argentina, al Doctor Santero, Guada y Laura de la Universidad Pablo de Olivide-Sevilla España por enseñarme técnicas para el desarrollo de mi proyecto, por sus valiosos aportes para el desarrollo del trabajo.

De manera especial también agradezco y a mis compañeros de Posgrado del Semaforo UNIVALLE Carito, Anita, Dianis, Rochi y mis amigos Dieguis y Luchi y a mi Adri de Unicauca. Gracias por su amistad, por la dedicación, apoyo y paciencia y por impulsarme cada día a seguir adelante.

Finalmente, agradecer a todos los que de una u otra forma hicieron parte de este proceso.

RESUMEN

A pesar de la amplia biodiversidad colombiana en todos sus aspectos, la bioprospección a partir de comunidades microbianas presentes en los diferentes ecosistemas del país es incipiente y una de las más importantes razones es debida al desconocimiento de las potencialidades de los metagenomas provenientes del suelo. La Metagenómica nos permite el estudio de comunidades enteras de microorganismos sin necesidad de aislarlas previamente, determinando su estructura y su potencial función biotecnológica. Este es el caso de las lacasas, enzimas oxidoreductasas que catalizan la oxidación de varios compuestos aromáticos y fenólicos, característica que les confiere algunas aplicaciones en biorremediación, decoloración y deslignificación, entre otras. El objetivo del actual estudio se enfocó en la identificación de genes putativos de lacasas a partir de librerías Metagenómicas de suelo de Bosque Alto Andino. Por medio de un tamizaje bioinformático preliminar se obtuvieron predicciones con dominios conservados característicos de las lacasas, que fueron evaluadas a nivel molecular. Se realizó la réplica y evaluación de la biblioteca de fósmidos del metagenoma de Bosque Alto Andino, logrando la identificación del gen de lacasa CueO procedente de la bacteria *Escherichia coli* con un porcentaje de identidad que va de 87-100% mediante el uso de cebadores degenerados diseñados en este estudio y de los cebadores reportados por (Ausec et al., 2011). El tamizaje de bibliotecas realizado en la actual investigación permite la identificación de enzimas de alto potencial industrial, constituyendo una excelente herramienta para considerar el ecosistema de páramo como un gran reservorio para la Bioprospección.

Palabras claves: Metagenómica, Bioprospección, Industria, Biorremediación, Lacasas.

ABSTRACT

Despite the wide Colombian biodiversity in all its aspects, bioprospecting from microbial communities present in different ecosystems of the country is emerging and one of the most important reasons is due to ignorance of the potential of metagenomics from the soil. Metagenomics allows us to study entire communities of microorganisms without first having to isolate and determine their structure and function biotechnological potential by identifying genes of enzymes with broad applications in industry. This is the case laccases, oxidoreductases enzymes that catalyze the oxidation of various aromatic and phenolic compounds, which confers characteristic some applications in bioremediation, bleaching and delignification, among others. The aim of the current study focused on the identification of putative genes of laccases obtained from metagenomic libraries High Andean Forest (HAF) soil. Through a preliminary screening bioinformatic predictions with conserved characteristic of laccases that were evaluated at the molecular level domains they were obtained. Replication and evaluation of the library fosmids the metagenome of Bosque Alto Andino was made, making identification laccase gene CueO from the bacteria *Escherichia coli* with an identity percentage ranging from 87 to 100% by using degenerate primers designed in this study and the primers reported by (Ausec et al., 2011). Screening libraries made in current research allows the identification of enzymes high industrial potential, constituting an excellent tool to consider the paramo ecosystem as a large reservoir for bioprospecting.

Keywords: Metagenomics, Bioprospecting, Industry, Bioremediation, Lacases.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Microorganismos del suelo	4
2.2 La Metagenómica	5
2.3 Bioprospección	8
2.4 Tamizajes de librerías Metagenómicas	10
2.4.1 Tamizaje basado en secuencias	10
2.4.2 Tamizaje funcional.....	11
2.5 Enzimas lacasas (ec 1.10.3.2, oxidoreductasas).....	12
2.5.1 Distribución.....	12
2.5.2 Estructura	13
2.5.3 Identificación de lacasas	14
2.5.4 Funciones.....	14
2.5.5 Aplicación	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Sitio de muestreo.....	17
4.2 Análisis bioinformático preliminar	18
4.3 Preparación de bibliotecas Metagenómicas	20
4.3.1 Evaluación de la viabilidad de la Biblioteca	21
4.3.2 Réplica de las bibliotecas Metagenómicas.....	21
4.4 Tamizaje basado en secuencias	22

4.4.1 Pool de clones	23
4.4.2 Extracción de ADN fosmídico	23
4.4.3 Extracción de ADN genómico de controles	25
4.5 Amplificación de genes de lacasas.....	25
4.5.1 Diseño de cebadores degenerados.....	26
4.5.2 Condiciones para la PCR	28
4.5.4 Análisis de secuencias	30
4.6 Pruebas preliminares en sustratos específicos.....	32
4.6.1 Siembra directa en placa con sustrato	33
4.6.1.1. Preparación de medios suplementados	33
4.6.1 Preparación del extracto crudo de enzimas extracelulares e intracelulares para pruebas colorimétricas de actividad.....	35
4.6.2 Pruebas con enzimas extracelulares e intracelulares.	35
5. RESULTADOS	37
5.1 Análisis bioinformático preliminar	37
5.2 Preparación de bibliotecas Metagenómicas	39
5.3 Tamizaje basado en secuencias	39
5.3.1 Extracción de ADN fosmídico.....	40
5.3.2 Extracción ADN genómico (ADNg) controles	41
5.4 Amplificación de los genes de Lacasas.....	42
5.5 Productos de PCR	43
5.5.1 PCR Controles	43
5.5.2. PCR ADN Controles y biblioteca de ADNf.....	47
5.6 Análisis de secuencias	50
5.6.1 Análisis por Homología de Secuencia LAC405BAA	50
5.6.2 Análisis por Homología secuencia LAC137BAA	53

5.6.3 Alineamiento.....	56
5.7 Pruebas preliminares en sustratos	58
5.7.1 Prueba colorimétrica.....	58
5.7.2 Prueba en medio sólido.....	58
6. DISCUSIÓN	61
7. CONCLUSIONES.....	66
8. PERSPECTIVAS.....	67
9. LITERATURA CITADA.....	68
10. ANEXOS	81
Anexo 1. Prueba de viabilidad de las colonias	81
Anexo 2. Protocolo Réplica de bibliotecas.....	83
Anexo 3. Protocolo Extracción de ADN fosmídico con FosmidMAX DNA Purification Kit Epicentre a partir de una colonia	84
Anexo 4. Protocolo electroforesis	86
Anexo 5. Extracciones de ADN genómico controles positivos Isolate II genomic DNA kit BIOLINE bacterias gram + (Modificado del protocolo del kit).....	87
Anexo 6. Extracciones de ADN genómico controles positivos método convencional bacterias gram – (Modificado del protocolo de (Wen-ping y Tsong- teh 1993)	88
Anexo 7. Cebadores generados a partir de regiones conservadas de lacasas	
Anexo 8. Permiso ambiental denominado contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados con fines de investigación y prospección biológica N° 15 del 29 de abril de 2008- permiso de investigación científica en diversidad biológica expedida por parques UAESPNN no. DTNO-N-20/2007.	86

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudios metagenómicos de búsqueda de lacasas bacterianas a partir de muestras de suelo y agua.....	6
Tabla 2. Enzimas de interés bioprospectivo procedentes de bacterias y de análisis metagenómicos.....	8
Tabla 3. Lacasas de origen bacteriano	13
Tabla 4. Números de acceso de secuencias de lacasas de bacterias.....	27
Tabla 5. Cantidades de reactivos para cada volumen total de las reacciones de PCR	29
Tabla 6. Cebadores generados a partir de regiones conservadas de lacasas ..	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dominios característicos de lacasas. Se aprecian tres dominios característicos de las lacasas de los cuales el 1 y el 3 son regiones ricas en histidina que corresponden al centro de cobre III (1) y IV (3).	37
Figura 2. Representación gráfica los resultados con la aplicación WebLogo. En los recuadros se aprecian dos dominios ricos en histidinas de unión a cobre, característica principal de las lacasas.....	38
Figura 3. Réplica de bibliotecas	39
Figura 4. Diagrama de trabajo de la búsqueda de genes de lacasas por tamizaje basado en secuencias	40
Figura 5. ADNf aislado a partir de una colonia. Carril 1: ADNfMix1, 2: ADNfMix2, 3: ADNfMix3, 4: ADNfMix4.....	40
Figura 6. ADNf extracción a partir de pool de clones Carril 1: ADNfMix1, 2: ADNfMix2,.....	41
Figura 7. Extracción ADNg 1) Marcador, 2) <i>E. coli.</i> , 3) <i>B. subtilis</i> , 4) <i>Enterobacter sp.</i>	41
Figura 8. Amplificaciones controles PCR.....	44
Figura 9. <i>Enterobacter sp.</i> cebador A5 gradiente de temperatura	45

Figura 10. Amplificación de <i>E.coli</i> con cebador A5 gradiente de temperatura..	46
Figura 11. Amplificación <i>Enterobacter sp.</i> cebadores A7 con gradiente de temperatura.....	46
Figura 12. Amplificaciones cebador A5. Marcador de peso molecular 1Kb Bioline Carril 1) LAC136BAA, 2) LAC137BAA, 3) <i>E.coli</i> EPI 300, 4) <i>Enterobacter sp.</i> A, 5) Control - 6) <i>Enterobacter sp.</i> B.....	47
Figura 13. PCR de la amplificación del cebador A5: 1) LAC136BAA 55ng/ul, 2) LAC137BAA, 3) LAC138BAA, 4) <i>E. coli</i> EPI300f, 5) <i>E. coli</i> EPI 300I, 6) Control-, 7) ADNf pool 1, 8) ADNf pool 2, 9) ADNf <i>E. coli</i> EPI300f.....	48
Figura 14. Amplificaciones cebadores Ausec et al., (2011): Carril 1- 6 ADNf biblioteca, Carril 7 control-, Carril 8 <i>Enterobacter sp.</i> [110ng/ul], Carril 9 <i>E. coli</i>	49
Figura 15. ADN fosmídico y Amplificaciones de los cebadores de Ausec et al., (2011): LAC405BAA 55ng/ul, 2) LAC406BAA 103ng/ul, 3) BAI3 35ng/ul, 4) <i>E. coli</i> EPI300f 12ng/ul, 5) <i>E. coli</i> EPI300 genómico 50ng/ul, 6) control-.....	50
Figura 16. Homología con la cepa K-12 de <i>E.coli</i> y con una lacasa multicobre de la misma cepa.....	51
Figura 17. Resultados BLASTX	52
Figura 18. Dominios CuRO2 y CuRO3 de LAC405BAA	52
Figura 19. Relación filogenética con dominios asociados a lacasas.....	53
Figura 20. Homología de LAC137BAA con la cepa K-12 de <i>E.coli</i>	54
Figura 21. Resultados BLASTX	54
Figura 22. Dominio conservado CuRO2 de LAC137BAA	55
Figura 23. Identidad de LAC137BAA con una oxidasa multicobre de <i>E.coli</i>	55
Figura 24. Alineamiento de las secuencias LAC405BAA y LAC137BAA con secuencias de lacasas bacterianas	56
Figura 25. Relaciones filogenéticas entre las secuencias LAC405BAA y LAC137BAA y secuencias de lacasas bacterianas según método de “Neighbor Joining”	57
Figura 26. Relaciones filogenéticas entre las secuencias LAC405BAA y LAC137BAA y secuencias de lacasas de <i>E. coli</i> según método de “Neighbor Joining”	57

Figura 27. Análisis colorimétrico con ABTS de los extractos del pool de clones de la biblioteca.	58
Figura 28. Colonias con actividad lacasa de los controles sustrato ABTS.....	59
Figura 29. Colonias con actividad lacasa del pool de la biblioteca.	59
Figura 30. Colonias con actividad lacasa por el método de goteo. a) Guaiacol (GUA), b) Sirindilgazine (SGZ).....	60

TABLA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Metodología general.....	17
Diagrama 2. Análisis Bioinformático.....	18
Diagrama 3. Preparacion de bibliotecas.....	20
Diagrama 4. Tamizaje basado en secuencias.....	22
Diagrama 5. Amplificación de genes.....	26
Diagrama 6. Análisis de secuencias	31
Diagrama 7. Pruebas con sustratos.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2 ϕ -Azino-bis (3-ethylBenzthiazoline-6-sulphonic acid
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNf	Ácido desoxirribonucleico fosmídico
Ara	Arabinosa
BAA	Bosque Alto Andino
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Cm	Cloramfenicol
CueO	Enzima Lacasa
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
GeBiX	Centro de Excelencia en Genómica y bioinformática
GUA	Guaiacol
Kb	Kilopares de bases
LB	Medio Luria Bertani
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de lectura)
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
pH	Potencial de hidrogeno
Rpm	Revolución por minuto
SGZ	Syringaldazine
TAE	Solución tampon Tris, Acetato y EDTA
UFC	Unidades formadoras de colonia

HIPÓTESIS

¿Es posible identificar genes putativos de lacasas en las muestras de suelo del metagenoma de Bosque Alto Andino?

Ho: No existen genes putativos de lacasas en las muestras de suelo del metagenoma de Bosque Alto Andino (BAA).

H1: Existen genes putativos de lacasas en las muestras de suelo del metagenoma de Bosque Alto Andino (BAA).

1. INTRODUCCIÓN

Colombia cuenta con diferentes ambientes y nichos únicos microbiológicos, que presentan características excepcionales que presentan un alto potencial para la búsqueda de enzimas de interés industrial. Búsqueda que aún no se ha realizado en su totalidad. Este es el caso de uno de los ecosistemas de páramo como el Bosque Alto Andino (BAA) del Parque Nacional Natural “Los Nevados”, que presentan condiciones ambientales extremas y que pueden contener un interesante potencial biotecnológico. Unida a la Biotecnología, la biodiversidad nos permite la obtención de materiales y servicios óptimos mediante la aplicación de estrategias Metagenómicas (Rondon et al., 2000).

Un metagenoma se define como el ADN de una muestra ambiental (Hernández-León et al., 2010) proveniente de organismos no cultivables. La Metagenómica por su parte permite acceder y aprovechar adecuadamente la diversidad de especies de microorganismos a partir de muestras ambientales (nichos particulares) independientes de su cultivo (Handelsman, 2004, Rondon et al., 2000, Riesenfeld et al., 2004). El auge de los estudios metagenómicos en el mundo ha revelado una gran cantidad de información acerca de la potencialidad funcional de las comunidades microbianas presentes en agua, suelo, minas, tracto gastrointestinal humano, entre otros (Rondon et al., 2000, Lee et al., 2004, Tyson et al., 2004, Gill et al., 2006). La aplicación de las aproximaciones Metagenómicas nos permite la identificación de genes o microorganismos que puedan contribuir al desarrollo de productos con potencial económico. Estas aproximaciones involucrarían una serie de análisis de datos obtenidos de abordajes bioinformáticos, moleculares y bioquímicos (Handelsman, 2004).

Una de las familias de enzimas de oxidasas multicobre que despierta el interés para bioprospección son las lacasas (EC 1.10.3.2, benzenodiol: oxígeno oxidoreductasas), enzimas con amplia distribución en plantas, insectos, hongos y bacterias (Hoegger et al., 2004, Sharma et al., 2007). Las lacasas han sido

reportadas en múltiples aplicaciones industriales como en la degradación de lignina, en el blanqueamiento de textiles, detoxificación de efluentes, entre otras (Breen and Singleton, 1999), pues tienen la capacidad de oxidar una gran cantidad de compuestos fenólicos y no fenólicos en presencia de O₂ (Thurston, 1994). Estas enzimas presentan gran utilidad en el campo alimenticio, farmacéutico, cosmético y en procesos de biorremediación (Arias et al., 2003, Murugesan, 2003, Wesenberg et al., 2003, Couto and Herrera, 2006)

En Metagenómica la búsqueda de enzimas puede ser realizada mediante diferentes abordajes que involucran tamizajes de diferentes tipos. En este proyecto se evaluó el tamizaje basado en secuencias que es uno de los abordajes más efectivos para identificar enzimas (Ausec et al., 2011, Fang et al., 2011, Ferrer et al., 2005, Suenaga et al., 2007).

El potencial económico de la biodiversidad está ligado directamente con la valoración y el aprovechamiento sostenible de la misma. Colombia a pesar de presentar alta diversidad en microorganismos posee pocos estudios en bioprospección; es por ello que la implementación de plataformas de investigación en la obtención de materiales y servicios óptimos mediante la aplicación de estrategias de búsqueda de genes u organismos que puedan llegar al desarrollo de productos con potencial económico es de gran importancia para el desarrollo científico y económico del país, las lacasas de origen bacteriano presentan características únicas, (Fang et al., 2011) las cuales poseen un potencial alto de bioprospección.

Por lo tanto, este proyecto contempla la identificación de genes putativos de lacasas en el metagenoma de suelo de bosque alto andino, ecosistema rico en biodiversidad microbiana con condiciones ambientales extremas de radiación, temperatura, pH, entre otros, que lo convierten en un foco atractivo de investigación de actividades enzimáticas potenciales que pueden ser utilizadas en la industria.

El Centro de Excelencia – GeBiX, una de las pocas iniciativas desarrolladas en Metagenómica en Colombia y la única orientada a la búsqueda de lacasas en metagenomas del país hace parte de uno de los Centros de Excelencia propuesto en el año 2007 con el propósito de la “Conformación de una plataforma en Metagenómica y Bioinformática para la caracterización y el aprovechamiento de recursos genéticos de Ambientes Extremos”, que busca conocer y potencializar la biodiversidad microbiana tanto a nivel de ambiente como en utilidad de enzimas del metagenoma de los páramos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Microorganismos del suelo

Se estima un total de células procariotas sobre la tierra de $4-6 \times 10^{30}$ (Cowan et al., 2005), representando una diversidad microbiana de 3000 y 11000 genomas por gramo de suelo (Torsvik and Øvreås, 2002). El suelo es uno de los ecosistemas más ricos en microorganismos pero se conoce muy poco de toda la microbiota que habita en él pues solo del 0.1-10% de estos microorganismos son cultivables (Rondon et al., 1999) y se estima que entre el 80 y 90% de éstos aún no han sido identificados (Atlas, 1984).

Actualmente, se han desarrollado Ciencias Ómicas multidisciplinares como la Metagenómica que permite conocer y estudiar en más detalle el material genético (ADN) de estos microorganismos a pesar de ser desconocidos. Con este tipo de estrategias, se ha logrado descubrir nuevas moléculas con aplicaciones biotecnológicas y entender las interacciones microbiológicas existentes en ambientes extremos (Hernández-León et al., 2010).

Los microorganismos son uno de los grupos de seres vivos más diversos existentes en la Tierra que se encuentran bajo todas las condiciones ambientales, incluyendo las llamadas “extremas”, que son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas y para las nuevas potenciales aplicaciones biotecnológicas para diferentes campos, entre los que se encuentra el campo de la salud (Olembo and Hawksworth, 1991). Los microorganismos tienen grandes capacidades funcionales llevando a cabo reacciones de oxidación y reducción vitales para todos los procesos que se dan en la Tierra (Atlas, 1984). Por lo anterior, se debe establecer la importancia de los microorganismos para así poder establecer estrategias de conservación de los hábitats que los albergan (Olalde and Aguilera, 1998).

2.2 La Metagenómica

El surgimiento de las Ciencias Ómicas (Metagenómica, Genómica, Proteómica, Metabolómica, Nutrigenómica, entre otras) ha contribuido al desarrollo de la Biotecnología y la bioprospección. La Metagenómica, por su parte es una estrategia que permite acceder y aprovechar la diversidad de especies de microorganismos no cultivables mediante el estudio de sus ácidos nucleicos (Daniel, 2005, Handelsman, 2004). Los microorganismos, a pesar de que representan un recurso natural muy amplio, son un campo de estudio poco conocido (Flórez, 2001). El suelo representa una de las más altas fuentes de diversidad de microorganismos en el planeta (Daniel, 2004, Daniel, 2005, Rondon et al., 1999) y la Metagenómica nos permite hacer un completo análisis de las comunidades microbianas que conforman un ecosistema (Demanèche et al., 2009) para descubrir los roles de las bacterias no cultivables en un nicho (Schloss and Handelsman, 2003). Tyson et al., (2004) secuenciaron el primer metagenoma completo, el cual fue publicado un poco antes del gran estudio de Metagenómica del Mar de los Sargazos realizado por Venter et al., (2004) proporcionando así información muy valiosa sobre la diversidad de microorganismos provenientes de muestras ambientales.

La biodiversidad es una fuente de recursos que permite la obtención de materiales y servicios óptimos mediante la aplicación de estrategias biotecnológicas con potencialidad para la bioprospección contribuyendo así al uso sostenible de la biodiversidad (Lee and Lee, 2013). Esto se realiza mediante el empleo de diversos procesos dirigidos a la búsqueda de genes o de organismos con los que se puede lograr el desarrollo de productos con aplicación económica potencial (Bull, 2004), como es el caso de la identificación de enzimas (Jiménez et al., 2012b, Cottrell et al., 1999, Feng et al., 2007, Lee et al., 2007, Ruijsenaars and Hartmans, 2004, Ausec et al., 2011, Ausec et al., 2012, Fang et al., 2011, Fang et al., 2012, Moghadam et al.,

2016, Vavourakis et al., 2016) y/o productos de gran interés industrial, tales como antibióticos (Brady et al., 2002), genes de resistencia a antibióticos (Diaz-Torres et al., 2006, Rizzo et al., 2013, Mullany, 2014, Scanlon et al., 2014), entre otros.

Algunos de los estudios más destacados en búsqueda de lacasas de origen bacteriano de metagenomas de muestras suelo y agua se listan en la siguiente tabla.

Tabla 1. Estudios metagenómicos de búsqueda de lacasas bacterianas a partir de muestras de suelo y agua.

Muestras de agua	
Estudio	Referencia
Metagenomic Insights into the Uncultured Diversity and Physiology of Microbes in Four Hypersaline Soda Lake Brines.	(Vavourakis et al., 2016)
A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability	(Fang et al., 2012)
A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization	(Fang et al., 2011)
Muestras de suelo	
Laccase activity is proportional to the abundance of bacterial laccase-like genes in soil from subtropical arable land	(Feng et al., 2015)
Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in	(Ausec et al., 2011)

drained peat soils

Characterization of denitrification gene (Demanèche et al., 2009)

clusters of soil bacteria via a metagenomic approach.

The soil metagenome--a rich resource for the discovery of novel natural products (Daniel, 2005)

The metagenomics of soil (Daniel, 2004)

En Colombia, el Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos – GeBiX se ha enfocado en estudiar la diversidad microbiana y en hacer bioprospección en diversos ecosistemas en páramos, en especial en el Parque Nacional Natural los Nevados (Zambrano 2010, 2012). En el marco de este proyecto se han publicado interesantes resultados tanto en eventos internacionales (Bolaños et al., 2013) como en revistas científicas; en estas publicaciones se reportó que: a) se obtuvieron datos de secuencias Metagenómicas que proporcionan información sobre las posibles funciones y estructura de comunidades microbianas de ecosistemas de alta montaña donde se identificaron algunos grupos de genes potencialmente implicados en el ciclo del nitrógeno y del azufre (Bohorquez et al., 2012, Jiménez et al., 2012a), b) se desarrolló la búsqueda de nuevas enzimas lipolíticas con potencial bioprospectivo en las comunidades microbianas del suelo de Bosque Alto Andino (Jiménez et al., 2012b), c) se hizo la comparación de diferentes métodos de asignación taxonómica y funcional de secuencias para evaluar la diversidad microbiana en un ecosistema de suelo en busca de enzimas de interés biotecnológico (Montana et al., 2012), d) Se han realizado trabajos bioinformáticos que revelaron que las secuencias no codificantes tienen información pertinente que podría ser considerada para un análisis metagenómico completo con el fin de analizar su organización, los protocolos de clasificación, y su relación con el medio ambiente (Tobar-Tosse et al., 2013).

Todo lo anterior demuestra la importancia de este trabajo científico el cual sirve para fomentar iniciativas encaminadas al desarrollo biotecnológico del país por medio de la búsqueda de genes con potencial industrial.

2.3 Bioprospección

La Bioprospección consiste en la búsqueda de genes u organismos que puedan llevar al desarrollo de productos con potencial económico en las diferentes industrias como la farmacéutica, agro, alimentos, cosmética, entre otras (Castree, 2003, Laird and ten Kate, 2002, Moran et al., 2001). Es considerada un área muy interesante porque permite desarrollo económico y tecnológico involucrando diferentes disciplinas como la Biología Molecular, Biotecnología, Microbiología, Bioinformática. Los microorganismos ambientales provenientes de muestras de aguas y suelos constituyen una reserva inagotable (Dionisi et al., 2012) de diversidad genética. Para poder aprovechar adecuadamente la diversidad microbiana se hace necesario el surgimiento de enfoques novedosos para la búsqueda de nuevas moléculas y actividades de interés biotecnológico que permitan la aparición de áreas de investigación como la Metagenómica (Torres and Velho, 2009). Actualmente son muchos los esfuerzos para impulsar el desarrollo de la Bioprospección en Colombia promoviendo el trabajo colaborativo entre grupos de investigación de diferentes países (Torres and Velho, 2009). La Metagenómica es considerada como una herramienta muy útil para la bioprospección de enzimas derivadas de muestras ambientales (Vester et al., 2015a). En la Tabla 2 se observan algunas enzimas de interés bioprospectivo de origen bacteriano reportadas en estudios metagenómicos.

Tabla 2. Enzimas de interés bioprospectivo procedentes de bacterias y de análisis metagenómicos

Enzimas	Referencia
Enzimas con resistencia a Níquel	(Mirete et al., 2007)
Enzimas con resistencia a Ácidos	(Guazzaroni et al., 2013)
Enzimas con Resistencia a Arsenico	(Morgante et al., 2015)

Biosíntesis de celulosa	(Berlemont et al., 2009,
Celulasas	Maruthamuthu et al., 2016, Bhat et al., 2013, Martin et al., 2014, Feng et al., 2007)
Proteasas	(Ferrer et al., 2005, Lee et al., 2007)
Esterasas	(Heath et al., 2009, Hu et al., 2012, Fu et al., 2013, Jeon et al., 2009, Yu et al., 2011, Leis et al., 2015, Rhee et al., 2005, Tchigvintsev et al., 2015, Seo et al., 2014, Kim et al., 2006)
Lipasas	(Tirawongsaroj et al., 2008, Kur and Turkiewicz, 2009, Lee et al., 2004)
b-Galactosidasa, a-amilasa y fosfatasa	(Vester et al., 2014)
ADN polimerasas	(Simon et al., 2009)
Amilasas	(Wang et al., 2011, Sharma et al., 2010, Vester et al., 2014, Vester et al., 2015a)
b-Galactosidasas	(Wang et al., 2010, Vester et al., 2015b, Wierzbicka-Woś et al., 2013)
Protease, amylase , glutaminase, urease, agarase, pectinase, lipase and invertase	(Saravanan et al., 2015)
Dehydrogenases,	(Spickermann et al., 2014)
Xylanase	(Lee et al., 2007)
Chitinase	(Kim et al., 2014, Cottrell et

	al., 1999)
Phthalate Esters	(Jiao et al., 2013)
Hydrolase	
Laccase	(Ruijssenaars and Hartmans, 2004, Ausec et al., 2011, Ausec et al., 2012, Fang et al., 2012, Moghadam et al., 2016, Vavourakis et al., 2016)

2.4 Tamizajes de librerías Metagenómicas

El tamizaje de las librerías Metagenómicas consiste en la identificación de clones ya sea por la exposición a sustratos específicos o por la construcción cebadores para la búsqueda de un gen de interés. En general, la identificación de actividades enzimáticas de ADN de muestras ambientales (suelo-agua) se consigue mediante la construcción de librerías Metagenómicas y tamizaje funcional y/o basado en secuencias en paralelo (Ferrer et al., 2005, Suenaga et al., 2007, Wang et al., 2011, Uchiyama and Miyazaki, 2009, Uchiyama et al., 2005, Mori et al., 2008, Waschowitz et al., 2009). Actualmente se han desarrollado un gran número de estrategias que permiten acceder a ese potencial biocatalítico existente en los metagenomas (Lee and Lee, 2013). Estas estrategias se basan en la integración de diferentes áreas tales como la Microbiología, la Bioinformática, la Biología Molecular y la Ecología (Ausec et al., 2011, Xing et al., 2012), como veremos a continuación en el tamizaje basado en secuencias y funcional

2.4.1 Tamizaje basado en secuencias

Una de las estrategias abordadas para la búsqueda de enzimas a partir de muestras Metagenómicas es el tamizaje basado en secuencias. Este involucra

el diseño de cebadores partiendo del conocimiento de una secuencia conservada, amplificando la secuencia de interés por PCR o hibridación (Tyson et al., 2004, Uchiyama and Miyazaki, 2009). Este tamizaje va unido al tamizaje bioinformático que implica el análisis de metagenomas almacenados en diferentes bases de datos, mediante la predicción de genes y la identificación de su potencial a partir de anotación por homología y/o búsqueda de patrones funcionales o estructurales, todo esto mediante el desarrollo o aplicación de herramientas bioinformáticas. Existen varios estudios en los cuales a partir de muestras Metagenómicas y mediante el uso de cebadores específicos se han identificado genes de lacasas (Fang et al., 2011, Fang et al., 2012, Ausec et al., 2012).

También se han reportado estudios de búsqueda de enzimas lacasas a partir de muestras ambientales como suelo y agua (provenientes de metagenomas) aplicando tamizaje basado en secuencia para la búsqueda de genes (Ferrer et al., 2010, Ausec et al., 2011, Ausec et al., 2012, Fang et al., 2011, Fang et al., 2012).

2.4.2 Tamizaje funcional

El tamizaje funcional nos permite identificar clones que expresan una función enzimática con potencial aplicación en el campo industrial plaqueando los clones sobre un sustrato específico y una posterior secuenciación del clon positivo (las colonias cambian de color o se forma un halo alrededor de la colonia) y análisis bioquímico (Schloss and Handelsman, 2003). Una de las ventajas más sustanciales de este método es la posibilidad de encontrar genes nuevos ya que no se requiere conocer con anterioridad la secuencia (Knietsch et al., 2003, Daniel, 2004, Allen et al., 2009, Suenaga et al., 2007, Moghadam et al., 2016, Ferrer et al., 2010).

El tamizaje funcional más utilizado es el directo, el cual consiste en plaquear en un medio específico el cultivo bacteriano (biblioteca) y observar los cambios en las coloraciones de las colonias o formación de halo lo cual indica que el clon es positivo para la actividad enzimática buscada. Sin embargo, este método

dificulta la observación de actividades enzimáticas intracelulares, por ello para hallar este tipo de actividad se hace necesario lisar las células y utilizar sobrenadantes midiendo la oxidación de los sustratos por espectrofotometría (Revollo Escudero et al., 2012). Otra desventaja de este método es que del total de clones evaluados solo el 0,01% son positivos para la actividad buscada (Streit and Schmitz, 2004).

2.5 Enzimas lacasas (ec 1.10.3.2, oxidoreductasas)

Estas son enzimas que requieren O_2 para oxidar una gran cantidad de compuestos fenólicos, aminas aromáticas y compuestos no fenólicos (Bourbonnais and Paice, 1990). Las lacasas son oxidoreductasas multicobre, los cuatro átomos de cobre presentes en la estructura de las lacasas les permiten realizar la transferencia de electrones al O_2 ya que varían el estado de oxidación entre Cu^I y Cu^{II} . Los productos orgánicos de esta reacción son radicales altamente reactivos (Couto and Herrera, 2006).

2.5.1 Distribución

En el año 1986 fue descrito el primer ADN complementario de lacasas del hongo *Neurospora crassa* (Germann and Lerch, 1986). A la fecha existen publicadas varias secuencias de origen eucariota y procariota. Las lacasas están ampliamente distribuidas en eucariotas (Plantas, Hongos, Insectos) (Mayer and Staples, 2002, Martins et al., 2002) y procariotas (Archaea y Bacteria) como se observa en la Tabla 3. Los suelos presentan alta diversidad de lacasas bacterianas (Luo et al., 2015, Feng et al., 2015).

Tabla 3. Lacasas de origen bacteriano

Bacteria	Referencia
<i>Bacillus halodurans</i>	(Ruijsenaars and Hartmans, 2004)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	(Martins et al., 2002)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	(Machczynski et al., 2004)
<i>Streptomyces griseus</i>	(Endo et al., 2003)
<i>Nitrosomonas europaea</i>	(Lawton et al., 2009)
<i>Marinomonas mediterránea</i>	(Sanchez-Amat et al., 2001)
<i>Pseudomonas</i>	(Brouwers et al., 1999, Solano et al., 2001)
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	(Forootanfar et al., 2016)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	(Chan et al., 2015)
<i>Psychrobacter</i> sp.	(Morgante et al., 2015)
<i>Escherichia coli</i>	(Roberts et al., 2002, Huffman et al., 2002)

2.5.2 Estructura

Las lacasas hacen parte de las oxidasas multicobre, presentando un único centro de cobre de tipo 1 (un átomo de cobre), tipo 2 (un átomo de cobre) y tipo 3 (dos átomos de cobre), los cuales constituyen el sitio activo de la enzima. Los alineamientos de secuencias muestran motivos altamente conservados en los sitios de unión a cobre.

- Tipo 1 o T1: es el encargado de la oxidación del sustrato y se caracteriza por presentar 2 residuos de histidina y uno de cisteína (HCH) (Reiss et al., 2013).
- Tipo 2 o T2: se asocia con el T3 formando un centro de cobre trinuclear considerado como un híbrido T2/T3 (McGuirl and Dooley, 1999); el cual se encarga de reducir el oxígeno molecular en agua (Alcalde et al., 2002, Arias et al., 2003). Este sitio posee 2 ligandos de histidina (HXH) (Reiss et al., 2013).

- Tipo 3 o T3: presenta dos átomos de cobre asociados y un carácter diamagnético por el acoplamiento antiferromagnético, mediado por un hidroxilo que actúa como puente (Claus, 2004). Este sitio se caracteriza por poseer 6 ligandos de histidina organizando en 4 subsecuencias (HXHG, HXH, HXXHXH y HCHXXXHXXXM/L/F) (Reiss et al., 2013).

Las secuencias del gen completo presentan de 1000 a 1650 pb, algunos dominios presentan hasta 600pb (Dominio II) y 1000pb (Dominio III) (Ausec et al., 2011) y un patrón en la codificación para una cadena polipeptídica de entre 520-550 aminoácidos para el gen completo (Thurston, 1994) y un tamaño molecular de 60 a 100 kDa. Las lacasas pueden tener 2 ó 3 dominios conservados de unión a cobre (Thurston, 1994, Claus, 2003, Kumar et al., 2003, Nakamura et al., 2003), estas enzimas presentan en su estructura secundaria hojas beta, hélices alfa y loops (Solomon and Lowery, 1993).

2.5.3 Identificación de lacasas

La actividad enzimática de lacasas de hongos y bacterias ha sido identificada por medio de la oxidación de sustratos como el ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylBenzthiazoline-6-sulphonic acid), Guaicol y Syringaldizine (Ferrer *et al.* 2010). Estos sustratos han permitido la determinación bioquímica (cambios de color del sustrato debido a la actividad oxidativa) de enzimas tales como: CotA de *Bacillus subtilis* (Martin et al., 2014), CueO y PcoA de *Escherichia coli* (Roberts et al., 2002, Huffman et al., 2002), EpoA from *Streptomyces griseus* (Endo et al., 2003), CopA de *Pseudomonas* species (Brouwers et al., 1999, Solano et al., 2001), CumA y BCO de *Nitrosomonas europaea* (Lawton et al., 2009), entre otras.

2.5.4 Funciones

Algunas funciones que cumplen estas enzimas en las células son: a) oxidación de nucleósidos, b) resistencia al Cu²⁺, c) pigmentación de esporas, d) morfogénesis, e) destrucción de especies tóxicas de oxígeno y otros

compuestos, f) esporulación, g) oxidación de fenoles y hidrocarburos policíclicos aromáticos (Zeng et al., 2016), (h) resistencia a UV y H₂O₂ y, i) transporte de electrones (Sharma et al., 2007), (i) biodegradación de pesticidas organofosforados (Clorfirifos) (Liu et al., 2016).

2.5.5 Aplicación

Las lacasas están involucradas en varios procesos de gran utilidad en el campo alimenticio, farmacéutico, cosmético, textil y procesos de biorremediación; tal es el caso de su aplicación en la deslignificación, bioblanqueamiento de pulpa de papel (Couto and Herrera, 2006), tratamiento de aguas residuales y destoxificación de afluentes industriales (Berrio et al., 2007, Muthukumarasamy and Murugan, 2014, Guan et al., 2015), blanqueamiento de textiles (Abadulla et al., 2000, Forootanfar et al., 2016), son catalizadores importantes en la fabricación de medicamentos anti cáncer, son importantes herramientas en diagnósticos médicos (Muthukumarasamy and Murugan, 2014), biorremediación de fuentes de agua (Alcalde et al., 2002) y síntesis de polímeros (Hüttermann et al., 2001) producción de bioetanol (Fang et al., 2015).

La mayor cantidad de estudios de estas enzimas se han desarrollado en hongos. (Palmieri et al., 1997, Wesenberg et al., 2003). Pocas lacasas han sido caracterizadas a partir de bacterias, por esto hay poco conocimiento de la actividad de lacasas de origen bacteriano en el campo biotecnológico (Arias et al., 2003, Koschorreck et al., 2009). Sin embargo, se está ampliando su estudio (Alexandre and Zhulin, 2000, Sharma et al., 2007, Ausec et al., 2011, Ausec et al., 2012, Fang et al., 2012, Maruthamuthu et al., 2016, Nayaranan *et al.* 2016; Guan *et al.* 2015; Zeng *et al.* 2016) en busca de conocer la potencialidad que estas enzimas de origen bacteriano podrían llegar a tener.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar genes putativos de lacasas a partir de librerías Metagenómicas de suelo de Bosque Alto Andino (BAA).

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar regiones conservadas de genes de lacasas para la búsqueda de genes putativos a partir de bibliotecas Metagenómicas de suelo de Bosque Alto Andino (BAA).
2. Aplicar técnicas moleculares para verificar la existencia de genes de lacasas a partir de bibliotecas Metagenómicas de suelo de Bosque Alto Andino (BAA).
3. Realizar ensayos preliminares de actividad de lacasas sobre sustratos específicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la búsqueda de genes putativos para lacasas mediante la aplicación de tamizaje basado en secuencias.

A continuación se muestra un esquema general de la metodología aplicada en el estudio (Diagrama 1).



Diagrama 1. Metodología general

La preparación de las soluciones stock mencionadas más adelante se realizaron con base en los protocolos de Sambrook and Russell (2001); todos los protocolos se realizaron bajo las normas generales de bioseguridad.

4.1 Sitio de muestreo

Las muestras de suelo provienen del metagenoma BAA del Bosque Alto Andino en el Parque Nacional Natural los Nevados ubicado en la Cordillera Central en la Región Andina de Colombia, entre los departamentos de Caldas, Risaralda, Quindío y Tolima. Las muestras del suelo fueron colectadas en agosto 20 de

2008 por investigadores del Centro de Excelencia en Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos-GeBiX. Este metagenoma es una mezcla que comprende cinco muestras de suelo tomadas en las coordenadas 4°58'6.7"75°22'41.7" (un cuadrante), a una altura promedio de 3590 msnm.

Se tomaron cinco muestras en puntos diferentes, separados aproximadamente por veinticinco metros y a una profundidad de 10-15 cm. Las muestras fueron transportadas en refrigeración a las instalaciones de la Corporación Corpogen, en donde se almacenaron a -80°C, hasta su procesamiento y análisis.

Permiso ambiental denominado contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados con fines de investigación y prospección biológica N° 15 del 29 de abril de 2008- permiso de investigación científica en diversidad biológica expedida por parques UAESPNN no. DTNO-N-20/2007 Anexo

4.2 Análisis bioinformático preliminar

En el siguiente diagrama se observa la metodología general del método empleado.

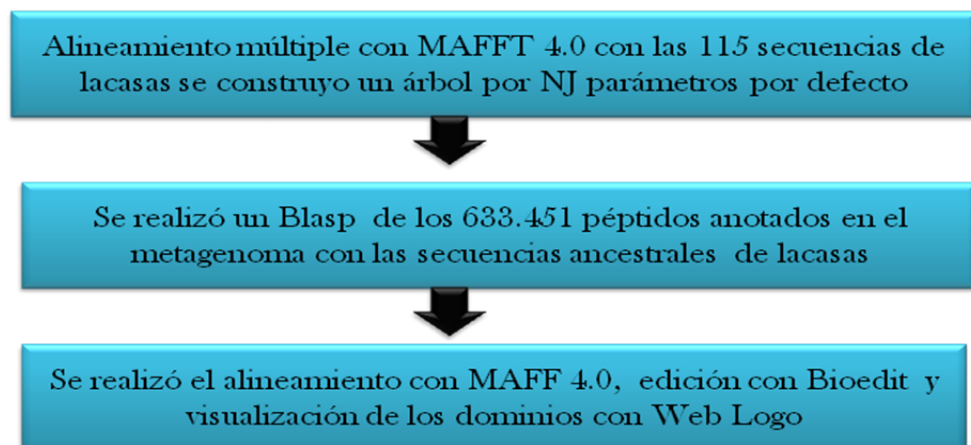


Diagrama 2. Análisis bioinformático

Se realizó un análisis bioinformático preliminar para verificar la existencia de las lacasas en el metagenoma de BAA, para el análisis de las secuencias se usó un secuenciador ABI-3730XL (Applied Biosystems), las secuencias fueron

publicadas en el servidor MG-RAST con el ID 4447277.3 y en la base de datos del GenBank con los numero de acceso JN127794–JN128117, (Montana et al., 2012).

El protocolo llevado a cabo fue producto de la modificación de los protocolos de Kennedy et al., (2008), Ausec et al., (2011) y Tobar-Tosse et al., (2013), Fang et al., (2011).

Datos utilizados:

Para realizar la anotación enzimática preliminar para lacasas presentes en el metagenoma de BAA se usaron las predicciones de 633.451 péptidos almacenadas en el servidor GeBiX, la predicción de los péptidos se realizó con Metagenemark.

Se realizó una búsqueda de lacasas en la base de datos NCBI Protein-Laccase- bacterial- sequence legth (400-500), se descargaron 115 secuencias con las cuales se realizó un alineamiento múltiple con el programa MAFFT 4.0 (Kato and Toh, 2008). Posterior al alineamiento se construyó un árbol por el método Neighbor joining parámetros por defecto. Teniendo en cuenta los resultados del árbol, se tomaron dos secuencias de referencia de lacasas “ancestros” (gi. 164414806 y gi. 164414806); con base en estas dos secuencias, se realizó un Blastp con las predicciones de los 633.451 péptidos del metagenoma BAA. Las secuencias resultado del Blastp se alinearon en el programa Mafft 4.0 y se realizó la edición manual en el programa Bioedit. La visualización de los dominios se realizó con la aplicación WebLogo y Bioedit.

4.3 Preparación de bibliotecas Metagenómicas

Las bibliotecas fueron preparadas bajo los parámetros mostrados en el diagrama 3.

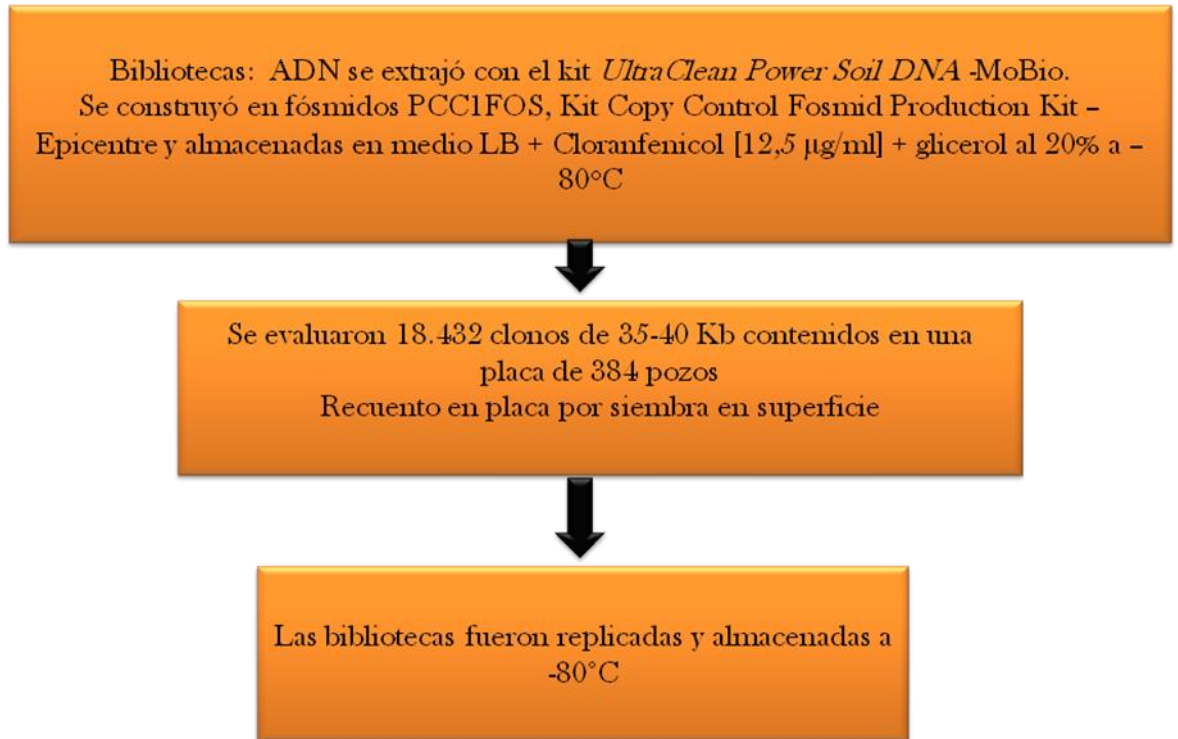


Diagrama 3. Preparación de bibliotecas

Las bibliotecas de fósmidos que se evaluaron corresponden a las réplicas de las construidas por el Centro en Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos-GeBiX en el 2009 - Laboratorio GeBiX Universidad Javeriana.

La biblioteca evaluada está constituida por 1 microplaca de 384 pozos, en cada pozo se encuentran aproximadamente 48 clones; en total se evaluaron aproximadamente 18.432 clones de 35-40 kb. Las bibliotecas se realizaron a partir de muestras compuestas de suelo de BAA a las cuales se les extrajo el ADN mediante el kit *UltraClean Power Soil DNA de Laboratorios* MoBio. La librería fue construida en el vector fósrido PCC1FOS, Kit Copy Control Fosmid Production Kit – Epicentre y almacenadas en medio LB + Cloranfenicol [12,5 µg/ml] + glicerol al 20% a -80°C protocolo descrito por Jiménez et al., (2012a).

4.3.1 Evaluación de la viabilidad de la Biblioteca

Esta se llevó a cabo en el laboratorio de Genómica y Biología Molecular de la Universidad del Cauca. Para la realización de la réplica de las bibliotecas se procedió primero a probar la viabilidad de las bibliotecas de BAA de diciembre de 2009 construida y almacenada en GeBiX-Universidad Javeriana. Se probó la viabilidad de las bibliotecas, para garantizar la completa evaluación del metagenoma.

Se utilizó la técnica de recuento en placa por siembra en superficie. Se sembró (con palillos estériles) en medio Luria-Bertani (LB) sólido suplementado con cloranfenicol [12,5 µg/ml] y arabinosa al 20%, los clones de cada uno de los pozos de la biblioteca. Se mantuvo en incubación por 24 horas a 37°C. Los clones de los 384 pozos se repicaron en 15 ml de medio LB líquido suplementado con cloranfenicol [12,5 µg/ml] (Cm) y arabinosa (Ara) al 20%, se incubó por 16 horas a 150rpm y 37°C. Se realizaron diluciones seriadas en solución salina hasta llegar a la dilución 10^{-6} de la cual se inoculó 0.1 ml de la dilución, esparciendo el inóculo con ayuda de una espátula de Drigalsky hasta su absorción total por parte del medio LB sólido+Cm+Ara, se incubó por 48 horas a 37°C. Posteriormente se calculó el UFC. También se realizó siembra directa por estria plaqueando uno a uno el contenido de los pozos (Anexo 1).

4.3.2 Réplica de las bibliotecas Metagenómicas

Una vez probada la viabilidad de las bibliotecas se realizaron dos copias de la biblioteca en microplacas estériles de 384 pozos y en placas de 96 pozos. Para la copia en placa de 384 se colocó en cada pozo 40ul de medio de crecimiento (LB líquido estándar + cloranfenicol 12.5 ug/ml), luego se repicó con palillos estériles los clones de cada pozo de la biblioteca original. Se incubó overnight a 37°C a 200rpm (Shaker incubadora); después del crecimiento, se adicionaron 20 ul de medio para almacenar (LB líquido estándar + cloranfenicol 12.5 ug/ml + glicerol estéril al 40% para una obtener una concentración final de 20% de glicerol) (Sambrook and Russell 2001). Las microplacas fueron selladas con papel film metalizado y almacenadas a -80°C hasta la realización del tamizaje (Protocolo comunicación personal Investigadores GeBiX) también se realizó

una copia en cajas de 96 pozos distribuyendo el contenido de los 384 pozos en 4 cajas de 96 pozos debidamente rotuladas, esta biblioteca fue almacenada a -80°C para posteriores estudios (Anexo 2).

4.4 Tamizaje basado en secuencias

Para la búsqueda de los genes de lacasas se aplicaron dos abordajes paralelamente; el tamizaje basado en secuencias (Diagrama 4) y el tamizaje funcional.

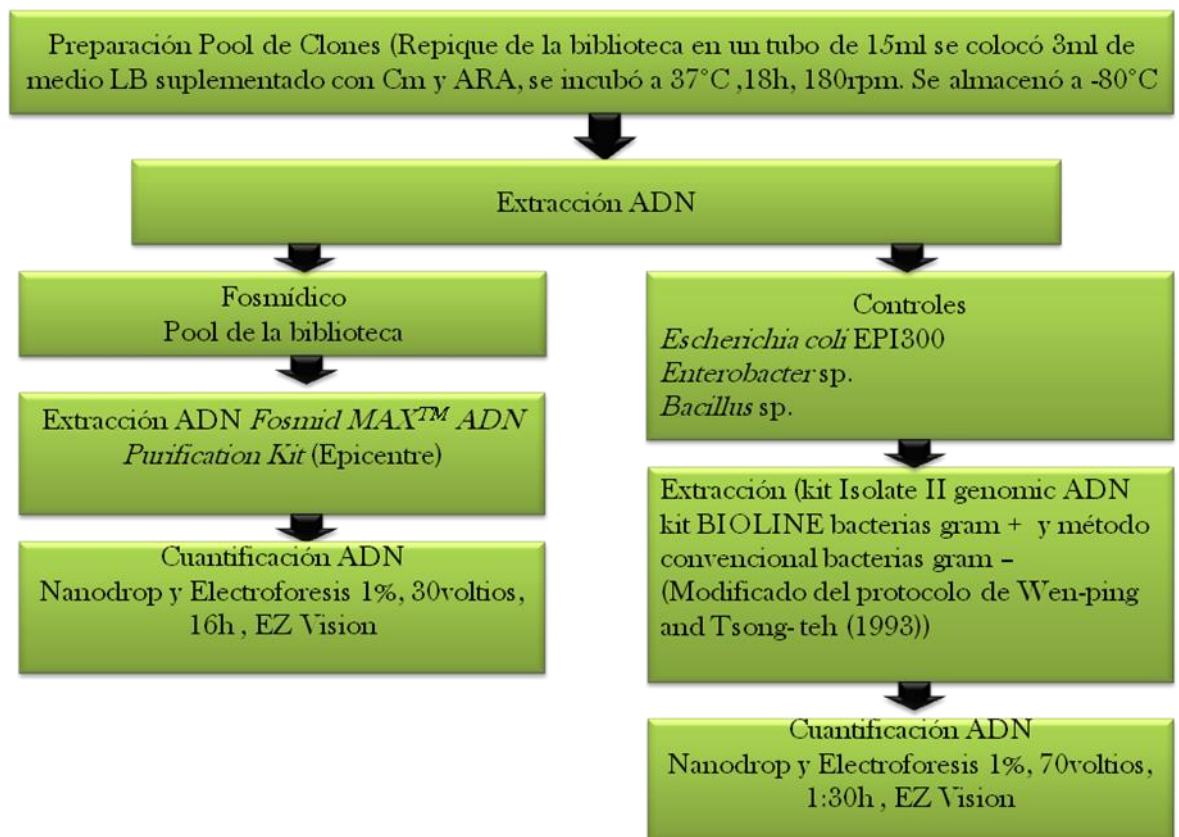


Diagrama 4. Tamizaje basado en secuencia

La estrategia del tamizaje basado en secuencias se fundamenta en la búsqueda de genes a partir de la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores diseñados a partir de regiones conservadas del gen de interés (Kim et al., 2006); en este caso se usaron

motivos conservados de lacasas en los sitios de unión a cobre (Ausec et al., 2011, Fang et al., 2011, Iqbal et al., 2012).

Se construyó un pool de clones metagenómicos a partir de la biblioteca replicada de BAA y a esta se le extrajo el ADN fósmidico según el protocolo modificado del *Fosmid MAXTM ADN Purification Kit* (Epicentre); este ADN se utilizó como template para la PCR usando cebadores diseñados específicamente para lacasas (cebadores degenerados con base en motivos conservados).

4.4.1 Pool de clones

Se realizó un precultivo inoculando con palillos estériles los clones almacenados en las microplacas de 384 pozos en 15ml de medio líquido Luria-Bertani (LB) suplementado con cloranfenicol 12.5 µg/ml y arabinosa 20%. Posteriormente, se incubó a 37°C por 18 horas en constante agitación a 180 rpm, una vez transcurrido este tiempo se midió el DO el cual estaba en 600=0.6 lo que garantiza que se pueda extraer una buena cantidad de ADN (Suarez, 2010).

Luego, se inoculó 500ul del precultivo en 4.5 ml de medio LB suplementado con cloranfenicol (12.5 ug/ml) y solución de inducción arabinosa 20%. Esta reacción fue llevada a cabo en tubos de 15ml, y se agitó a 200rpm por 5 horas a 37°C.

Transcurrido el tiempo, 1.5 ml del cultivo se transfirió a tubos eppendorf de 2ml, y se almacenó con glicerol para evitar el rompimiento de las células a -80°C para tener disponible cultivo para realizar las extracciones.

4.4.2 Extracción de ADN fósmidico

Para la extracción del ADN fósmidico se siguió el protocolo de *Fosmid MAXTM ADN Purification Kit* (Epicentre) alternativa B, con algunas modificaciones

propuestas por Suarez (2010) y algunas modificaciones que surgieron durante la estandarización, las cuales se presentan en el protocolo (Anexo 3).

Para obtener células frescas para la extracción se procedió a realizar un precultivo sembrando (se pica con una punta de pipeta estéril sobre el tubo que contiene el pool de clones almacenado en glicerol) en un tubo falcón de 15 ml para permitir una mejor aireación, 2ml de LB líquido suplementado con Ara y Cm para evaluar los pooles y LB solo para evaluar los controles. Luego se incubaron los tubos a 37°C por 24h con agitación constante a 180rpm.

Una vez obtenida la densidad óptica adecuada (DO: 600=3) de células se procedió a sembrar 100ul del precultivo en 2ml de medio LB líquido suplementado con Cm y Ara para los pooles y LB solo para los controles, se incubó a 37°C 18h a 180rpm, esto para garantizar la evaluación del ADN de la mayor cantidad de clones.

También se realizó aislamiento a partir de una colonia, para lo cual se sembró con un asa redonda un pique desde el tubo del pool de clones en forma de estria en una placa de medio LB sólido suplementado con Cm+Ara, se incubó por 24 horas a 37°C. Una vez observado el crecimiento, se tomó una colonia y se la inoculó en 2ml de medio LB líquido suplementado con Cm y Ara, se lo incubó a 37°C por 18h en agitación constante a 180rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO: 600= 3) y a partir de este cultivo se realizó la extracción. Para la evaluación total de los clones del metagenoma se realizó también la extracción a partir de 100 ul de precultivo del pool de clones (Anexo 2).

El ADN fosmídico obtenido se verificó mediante cuantificación en Nanodrop 2000 y electroforesis en gel de agarosa 1% se corrió a 30 voltios por 16h (Anexo 4), el ADN fosmídico obtenido se utilizó como template para la amplificación de los genes de lacasas.

4.4.3 Extracción de ADN genómico de controles

Se utilizaron como controles la cepa de *Echerichia coli* EPI300 en la que fue construida la biblioteca y cepas de *Enterobacter sp.* y *Bacillus subtilis* y *Bacillus sp.*

Las cepas se encontraban almacenadas en el cepario de la Universidad del Cauca a -80°C por tanto se procedió a realizar la prueba de viabilidad (Anexo 2). Las células que crecieron en la prueba de viabilidad se inocularon en 2ml de LB líquido y se incubaron a 37°C 18h con agitación constante a 180rpm para la posterior extracción.

La extracción se realizó mediante kit Isolate II genomic ADN kit BIOLINE bacterias gram + (Modificado del protocolo del kit) (Anexo 5) y por el método convencional bacterias gram – (Modificado del protocolo de Wen-ping and Tsong- teh (1993) (Anexo 6). La verificación del ADN obtenido se realizó en Nanodrop 2000 y electroforesis en gel de agarosa 1% que se corrió a 70 voltios por 1h y media (Anexo 4).

4.5 Amplificación de genes de lacasas

Para la amplificación de los genes de lacasas se realizó una búsqueda bibliográfica de los cebadores más usados para la identificación de estos genes, donde se encontró que los más reportados eran los cebadores degenerados pues proporcionan mayor posibilidad de encontrar genes nuevos. También se diseñaron algunos cebadores degenerados con base en secuencias conservadas y cebadores específicos y se presenta el diagrama general de la amplificación (Diagrama 5).

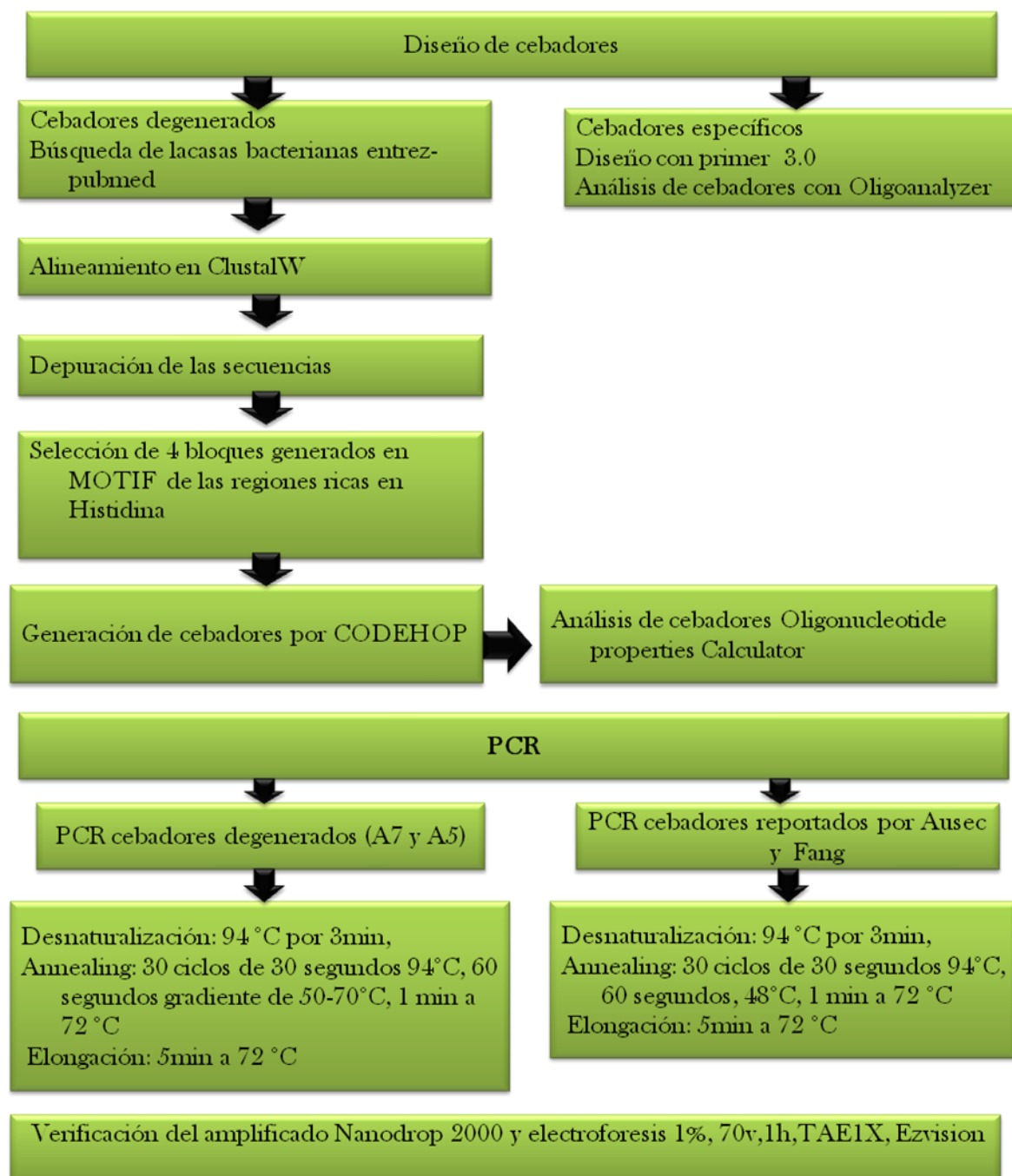


Diagrama 5. Amplificación de genes

4.5.1 Diseño de cebadores degenerados

Se realizó una búsqueda en Entrez-PubMed para proteínas de lacasas bacterianas. Dichas secuencias fueron alineadas (ClustalW) y se empezó a realizar la depuración, siguiendo los criterios: a) eliminar las secuencias que se encontraban repetidas (mismo organismo), b) eliminar secuencias putativas, c)

eliminar secuencias muy dispares y d) eliminar secuencias con gaps en las regiones de interés.

Se utilizaron 4 bloques generados en MOTIF los cuales presentaron regiones ricas en histidina (**HWHG, WFHPHXH, HPFHXHG, HCHLLEHE**). Con los bloques se elaboraron los cebadores degenerados utilizando la herramienta CODEHOP (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html> 02-11-2015) (Rose et al., 2003), con un nivel máximo de degeneración de 128.

Los números de acceso de algunas de las secuencias utilizadas para el diseño de cebadores fueron obtenidos de bases de datos como GenBank y PDB según (Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 4. Números de acceso de secuencias de lacasas de bacterias

Bacteria	Nº. Acceso NCBI	Referencia
<i>Bacillus halodurans</i>	AY228142	(Ruijssenaars and Hartmans, 2004)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	NP_388511	(Martins et al., 2002)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAB45586	(Machczynski et al., 2004)
<i>Streptomyces griseus</i>	BAB64332	(Endo et al., 2003)
<i>Nitrosomonas europea</i>	3G5W	(Lawton et al., 2009)
<i>Marinomonas mediterránea</i>	AF184209	(Sanchez-Amat et al., 2001)

Dichos cebadores fueron analizados utilizando la herramienta Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.unc.edu/~cail/bioutil/oligo/>-10-11-2015) para conocer parámetros físicos, termodinámicos, TM y formación de hairpin. Las secuencias de cebadores escogidas se analizaron con BLAST.

Con las herramientas Primer3 V 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> 12-12-2015) y Oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer> 13-12-2015), se

diseñaron algunos cebadores específicos basados en las secuencias del análisis bioinformático preliminar que mostraron secuencias conservadas de lacasas (8 secuencias) (cebadores diseñados en la Universidad de Pablo de Oliviade-Sevilla España).

También se utilizaron los cebadores degenerados reportados en los estudios de búsqueda de lacasas de Ausec et al., (2011), Fang et al., (2011, 2012).

CU1A F → ACMWCBGTYCAY TGGCAYGG

CU4R → TGC TCV AGB AKR TGG CAGTG

CU1F → ACMWCKGTTCAYTGGCACGG

CU4R → TGNTCNAGNAWGTGRCARTG

4.5.2 Condiciones para la PCR

- a. Para los cebadores reportados en artículos se manejaron las mismas condiciones reportadas por los autores en el caso de los cebadores de Ausec et al., 2011: Desnaturalización a 94 °C por 3min, (30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 48 °C (T_m), 1 min a 72 °C (Annealing) y se finaliza con 5min a 72 °C (Elongación) la reacción se llevó a cabo en un termociclador ESCO.
- b. Para los cebadores que fueron diseñados se realizó una PCR en gradiente de temperaturas (de 50 a 70°C en el T_m) para observar en cual se observaba mejor amplificación; manteniéndose las mismas condiciones de desnaturalización, *annealing* y elongación.

Las reacciones de PCR se realizaron de manera convencional y con Mango Mix. **Convencional:** Volumen total 25ul: agua ultrapura 18,3ul, dNTPs [10Mm] 0,5ul, cebador Cu4R y Cu1AF [10mM] 0.5ul de cada uno, MgCl₂ [25mM] 1.5ul, Buffer 10x 2.5ul, Taq 1U/ul 0.2ul, ADN [50ng/ul]

1ul. Se probaron diferentes cantidades de primer, A: 0,5 B: 1ul, C: 1,5ul y D: 2ul. Gel 1%, 70v, 1 hora, TAE1X, Ez vision. **PCR Mango mix:** Volumen total 25ul: agua ultrapura 8,5ul, cebadores Cu4R y Cu1AF [10mM] 1,5ul de cada uno, 12,5 ul de Mango Mix, ADN [50ng/ul] 1ul. Gel 1%, 70v, 1 hora, TAE1X, Ez vision.

- b. Se prepararon reacciones de volúmenes totales de 12,5, 25 y 50-ul de la reacción para estandarizar y enviar las muestras a secuenciar. En la Tabla 5 se presentan las cantidades utilizadas de cada reactivo para los volúmenes totales.

Tabla 5. Cantidades de reactivos para cada volumen total de las reacciones de PCR

Reactivos/Vol.total	12,5ul	25ul	50ul
Mango Mix	6,25	12,5ul	25ul
Agua Ultrapura	4,25ul	8,5ul	17ul
Cebador F	0.75ul	1,5ul	3ul
Cebador R	0,75ul	1,5ul	3ul
ADN -50ng/ul	0,5ul	1ul	2ul

Se realizaron 3 réplicas de la reacción de PCR por cada conjunto de cebadores evaluado con cada tipo de ADN (Revollo Escudero et al., 2012, Ausec et al., 2011). Los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa 1%.

4.5.3 Verificación del amplificado

Condiciones de electroforesis en gel de agarosa para verificar el tamaño de los fragmentos:

- a. El gel de agarosa se preparo al 1%; los geles son preparados con TAE 1X (Tris-Base, ácido acético glacial, 0,5M EDTA, pH 8). La electroforesis

se corrió por 1:20 minutos a 70v, 1 ul de EzVision, 4 ul de muestra, 3 ul de marcador molecular (Sambrook & Russell 2001) (Anexo 4).

- b. Se determinó por electroforesis de agarosa el tamaño de los fragmentos; los de tamaños entre 600 y 1100pb se consideraron como posibles genes de lacasas (positivos). Se eligió este tamaño porque podría corresponder a la longitud de los genes de las lacasas de 2 ó 3 dominios (Fang et al., 2011, 2012, Ausec et al., 2012).
- c. Los productos de la amplificación que dieron positivos se enviaron a secuenciar; se realizó nuevamente la PCR con volumen de 50ul como reacción final, debido a que se debía enviar 40ul para la secuenciación. Los productos de PCR positivos se enviaron a MacroGen USA solicitando purificación de las muestras y una secuenciación estándar (Reverse y forward).

4.5.3 Análisis de secuencias

A continuación se presenta el diagrama general de la metodología del análisis de secuencias (Diagrama 6).

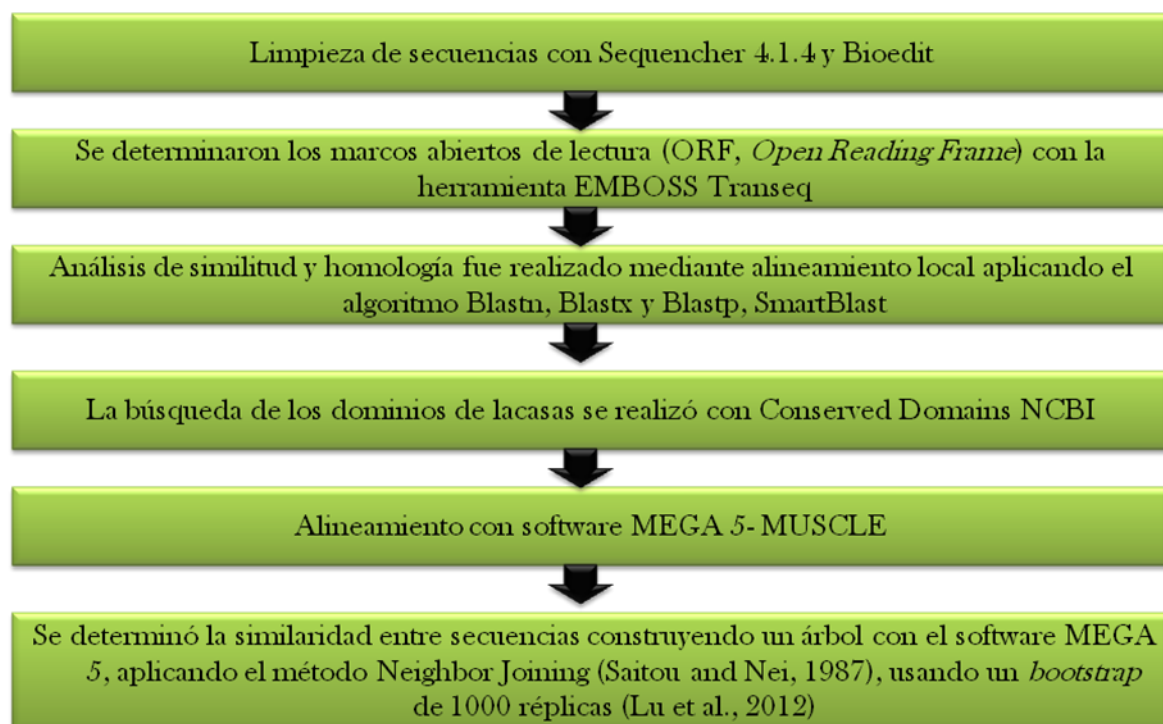


Diagrama 6. Análisis de secuencias

Las secuencias resultado de la secuenciación se limpiaron con la ayuda de los programas Sequencher 4.1.4 y Bioedit.

La verificación genómica de las secuencias para encontrar la función enzimática de las lacasa se realizó determinando los marcos abiertos de lectura (ORF, *Open Reading Frame*) con la herramienta EMBOSS Transeq (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/-06-03-2016) y el análisis de similitud y homología fue realizado mediante alineamiento local aplicando el algoritmo Blastn, Blastx y Blastp, SmartBlast (Altschul et al., 1990) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 03-03-2016) con parametros por defecto; la búsqueda para identificar dentro de las secuencias posibles dominios de lacasa se realizó con Conserved Domains NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi> -04-03-2016), en las bases de datos de NCBI no redundantes, Pfam, Uniprot y Swiss Prot entre otras (Finn et al., 2009).

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de lacasas encontradas en la biblioteca y algunas reportadas en las bases de datos de lacasas reportadas por; (Ausec et al., 2011, Fang et al., 2011, Lu et al., 2012, Fernandes et al., 2014). Para el alineamiento se utilizó el software MEGA 5 (Tamura et al., 2011), usando MUSCLE. Para determinar la similaridad entre secuencias se construyó un cladograma con el software MEGA 5, aplicando el método Neighbor Joining (Saitou and Nei, 1987), usando un *bootstrap* de 1000 réplicas (Lu et al., 2012), como grupo externo se usó una secuencia de lacasa de la planta *Arabidopsis thaliana* (NC 003076.8). También se construyó un cladograma con secuencias de *E.coli* de diferentes cepas.

4.6 Pruebas preliminares en sustratos específicos

En el diagrama 7 se observa la metodología general.

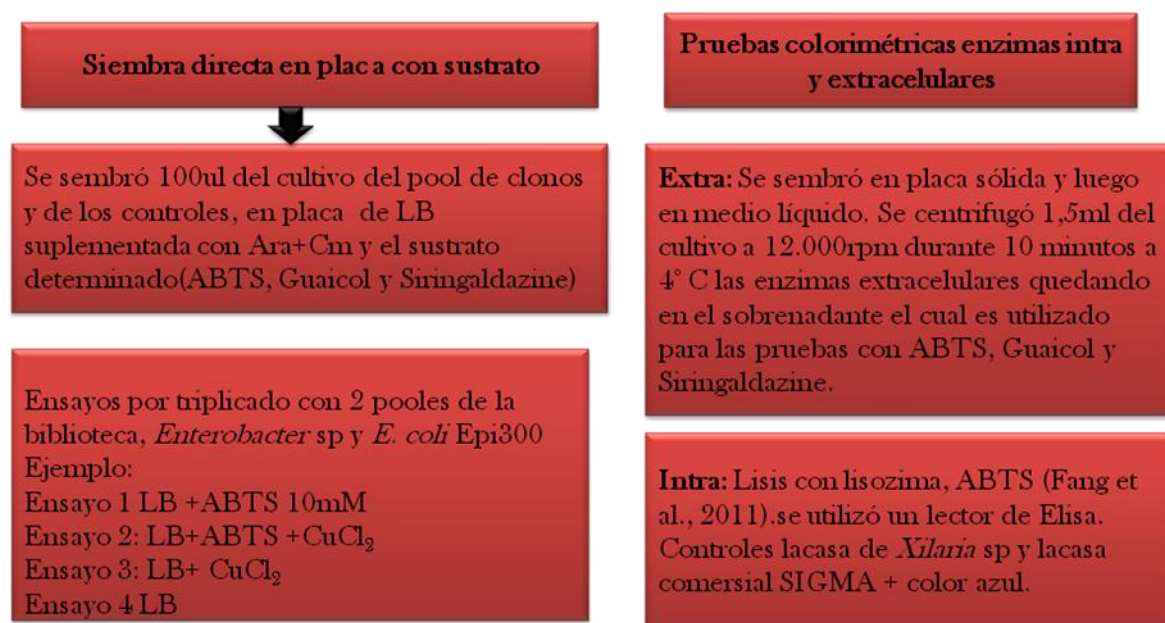


Diagrama 7. Pruebas con sustratos

Se realizó una prueba preliminar de actividad de lacasa, por siembra directa en placa y por pruebas colorimétricas (Revollo Escudero et al., 2012). Se evaluó la actividad de lacasas intra y extracelulares, preparando sobrenadantes y lisados de células.

4.6.1 Siembra directa en placa con sustrato

Se sembró 100ul del cultivo del pool de clones y de los controles, en placa suplementada con Ara+Cm y el sustrato determinado. Los sustratos evaluados fueron ABTS, Guaicol y Siringaldazine.

4.6.1.1. Preparación de medios suplementados

Medio LB+2,2 α -Azino-bis (3-ethylBenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS): (ABTS; 420 = 38,000 M⁻¹ cm⁻¹) (Sigma–Aldrich): se utilizó el protocolo modificado de la Universidad Pablo de Oliviade (Sevilla-España) a partir del protocolo reportado por (Francis and Tebo, 2001) en su estudio. La detección de la actividad se determinó por la aparición de coloración ámbar o café en las colonias.

Se preparó 500ml de medio LB sólido añadiendo antes de autoclavar ABTS 1mM.

A 500ml de LB-Agar se le agregó 274mg de ABTS, se calentó en la plancha hasta la completa dilución y se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Después de autoclavar se dejó enfriar un poco y se suplementó el medio con Cm (500ul), Ara (500ul) y cloruro de cobre CuCl₂ (250ul), los controles no se les adicionó Cm y Ara.

Se realizaron 4 ensayos cada uno con tres réplicas evaluando dos pools de clones de las bibliotecas, la cepa de *Enterobacter sp.* y la cepa de *E. coli* EPI 300:

Ensayo 1 LB +ABTS 10mM

Ensayo 2: LB+ABTS +CuCl₂

Ensayo 3: LB+ CuCl₂

Ensayo 4 LB

Medio LB + GUAICOL (GUA): (GUA; 470 = 26,600 M⁻¹ cm⁻¹) (Sigma–Aldrich): se utilizó el protocolo modificado de la Universidad Pablo de Oliviade

(Sevilla-España) a partir de los protocolos de (Kiiskinen et al., 2004). La detección de la actividad se determinó por la aparición de coloración ámbar o café en las colonias.

Se preparó 500ml de medio LB sólido añadiendo después de autoclavar GUA al 0,01%.

Se autoclavó 500ml de LB-Agar, luego se dejó enfriar y se suplementó el medio con Cm (500ul), Ara (5000ul) y cloruro de cobre CuCl_2 (250ul) y GUA (50ul) a los controles no se les adicionó Cm y Ara.

Se realizaron 4 ensayos cada uno con tres réplicas evaluando dos pooles de clones de las bibliotecas, la cepa de *Enterobacter sp.* y la cepa de *E. coli* EPI 300:

Ensayo 1 LB +GUA10mM

Ensayo 2: LB +GUA+ CuCl_2

Ensayo 3: LB+ CuCl_2

Ensayo 4 LB

Los ensayos con Siringaldazine se hicieron por goteo. Se prepararon los sustratos y luego se goteó cada colonia (crecidas previamente por 24h a 37 °C) esperando el cambio de color (Ferrer et al., 2010).

Syringaldazine (SGZ): ($\text{SGZ}; 530 = 64,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Sigma– Aldrich): SGZ, 0.56 mM solución stock: se pesaron 10,0 mg de SGZ, se adicionó etanol al 96% se almacenó y se dejó disolver por 3 horas. La solución se almacenó en el refrigerador, en una botella oscura. **Detección:** formación de un halo de color púrpura producto de la oxidación del SGZ.

4.6.1 Preparación del extracto crudo de enzimas extracelulares e intracelulares para pruebas colorimétricas de actividad.

Las lacasas pueden ser periplasmáticas, intra o extracelulares, por ello se realizaron diferentes pruebas como las que se mencionan a continuación.

4.6.2 Pruebas con enzimas extracelulares e intracelulares.

Para evaluar las lacasas extracelulares se realizó el crecimiento normal del pool de clones en placa sólida y luego en medio líquido. Se centrifugó 1,5 ml del cultivo a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4° C las enzimas extracelulares quedando en el sobrenadante el cual es utilizado para las pruebas con ABTS, Guaicol y Siringaldazine.

Para la lisis celular se utilizó tratamiento con lisozima. Se evaluaron las células mediante siembra en medio LB sólido, se incubaron por 24 h a 37°C se inoculó una colonia en 3 ml de LB líquido suplementado con Cm y Ara. El lavado se realizó a partir del cultivo de 3 ml, se tomó 1,5 ml de cultivo y se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Tras el “lavado”, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 1 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM; NaCl 150 mM, pH 7.6). Luego se le añadió 20 µl de la solución de lisozima (10 mg/ml en tampón A), se incubó a 37 °C durante 30 minutos, obteniendo así el extracto crudo de enzimas intracelulares.

Para esta prueba colorimétrica se utilizó como control positivo para la oxidación del sustrato extracto crudo del hongo *Xylaria* sp. provisto por el laboratorio GeBiX-Universidad Nacional-Bogotá y una solución de enzima lacasa comercial de *Tremates vesicolor* marca SIGMA (12,7U/mg=U/ml).

La enzima fue transportada desde la UIS-Bucaramanga en hielo seco. Se pesó 1 mg de la enzima y se disolvió en 1 ml de acetato de sodio quedando a 12,7U (Revollo Escudero et al., 2012). La solución enzimática se almacenó en un tubo eppendorf forrado con papel aluminio, se recomienda preparar antes de realizar la prueba.

Los ensayos se realizaron con el sustrato ABTS, este sustrato es muy utilizado para identificación de lacasas (Fang et al., 2011).

Como sustrato se utilizó **2,2'-Azino-bis (3-ethylBenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)**: (ABTS; $420 = 38,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Sigma–Aldrich): las soluciones de trabajo se prepararon con buffer acetato de sodio a 10 mM (pH 4.5) y se almacenaron a 4°C. Para la detección se debe observar una coloración azul verdosa producto de la reacción. Se prepararon 10 ml de ABTS a una concentración de 10mM. Se pesó 0,0548 g de ABTS y se disolvió en 10ml de buffer acetato de sodio 10 mM ph 4.5.

Se utilizó un lector de ELISA para determinar la actividad, las lecturas se realizaron a 420 nm y las mediciones se realizaron en placas de 96 pozos bajo las siguientes condiciones según protocolo de Revollo y et al., (2012). El experimento se realizó por triplicado.

100ul ABTS 10mM

85ul Buffer acetato de sodio 0,2M

15ul de muestra a evaluar (pool de clones de la biblioteca, *E.coli*, *Enterobacter* sp, Enzima comercial).

El blanco del equipo consistió en una mezcla de Buffer acetato de sodio 0,2M y ABTS 10mM.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis bioinformático preliminar

Se realizó un tamizaje bioinformático preliminar para verificar la existencia de este tipo de enzimas en el Metagenoma.

A partir de los 633.451 péptidos predichos se reportaron 77 predicciones con identidades diversas para la relación de los candidatos putativos de lacasas a partir de los alineamientos. De las 77 predicciones 8, presentan dominios conservados (**HPMHLHG**, **WKDTVLV** y **HCH**) ricos en histidina (Figura 2) lo cual es característico de las lacasas; estos dominios fueron reportados por Fang et al., (2011) (Figura 1).



Figura 1. Dominios característicos de lacasas. Se aprecian tres dominios característicos de las lacasas de los cuales el 1 y el 3 son regiones ricas en histidina que corresponden al centro de cobre III (1) y IV (3).

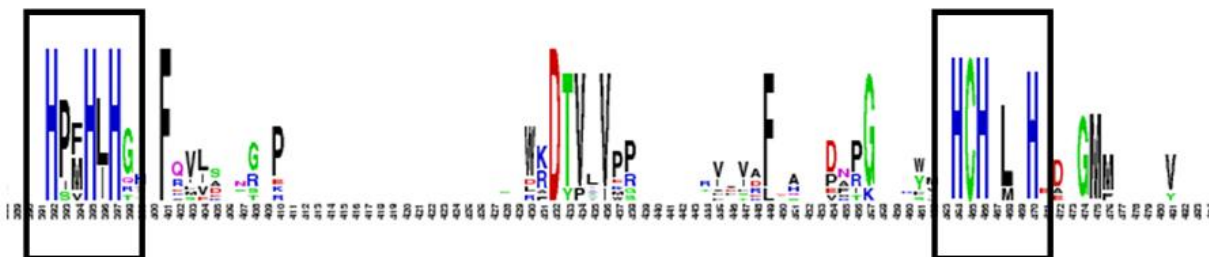


Figura 2. Representación gráfica los resultados con la aplicación WebLogo. En los recuadros se aprecian dos dominios ricos en histidinas de unión a cobre, característica principal de las lacasas.

Las secuencias del metagenoma BAA que presentaron los dominios relacionados para lacasas son las que se listan a continuación. .

HAF|189111|195898

HAF|316891|323709

HAF|117541|121015

HAF|334363|341979

HAF|295495|301537

HAF|278712|284347

HAF|456596|469551

HAF|396074|406467

De las 633. 451 secuencias se reportan 77 con relación a candidatos putativos de lacasas

Frecuencia= $77/633.451 = 1,04 \times 10^{-4}$

De los 77, 8 presentan los dominios conservados de lacasas.

Frecuencia= $8/77 = 0,10$

Por los valores reportados se observa que las lacasas presentan valores muy bajos de frecuencia en el metagenoma.

5.2 Preparación de bibliotecas Metagenómicas

Se realizó la prueba de viabilidad de la biblioteca verificando la supervivencia de las células para proceder a realizar las réplicas. Todos los pozos evaluados presentaron buen crecimiento de células, por tanto se realizaron dos réplicas de la biblioteca una en placa de 384 y otra se distribuyó en cuatro microplacas de 96 pozos como se muestra en la Figura 3.

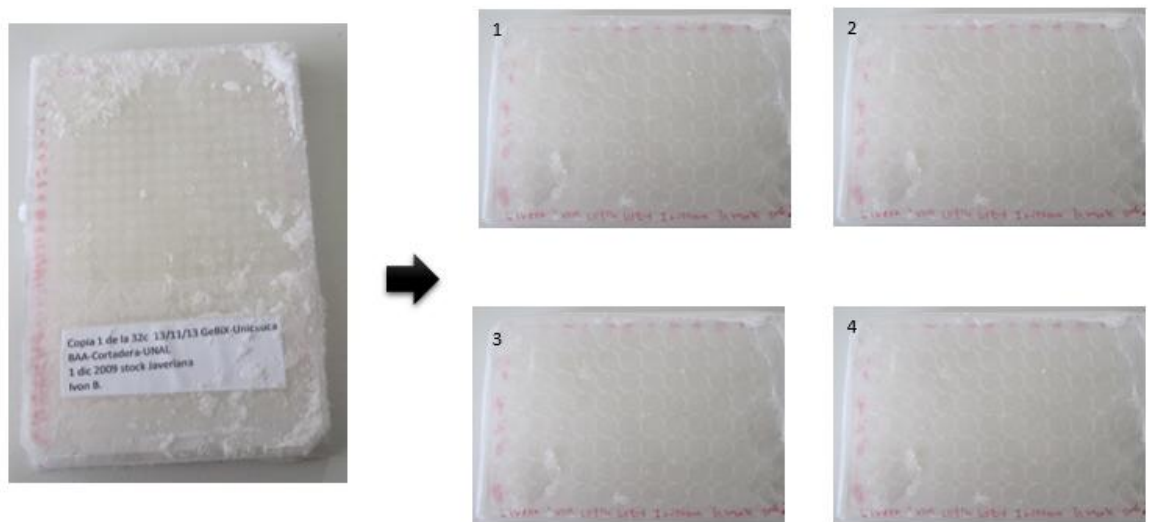


Figura 3. Réplica de bibliotecas

Se realizó la réplica en placas de 96 pozos debido a que en la caja de 384 los pozos que quedaban más al exterior se observó que se evaporaba el medio por tener menos contenido, por lo que podrían desaparecer los clones.

5.3 Tamizaje basado en secuencias

La biblioteca evaluada y replicada contenía un pool de 18.432 clones. Para obtener los genes de lacasas se aplicó el abordaje de tamizaje basado en secuencias conservadas de sitios de unión a cobre bajo el siguiente diagrama de trabajo (Figura 4).



Figura 4. Diagrama de trabajo de la búsqueda de genes de lacasas por tamizaje basado en secuencias

5.3.1 Extracción de ADN fosmídico

En Figura 5 se observa la extracción de ADN de alto peso molecular que corresponde a ADN fosmídico (ADNf) de la extracción realizada a partir de una colonia.

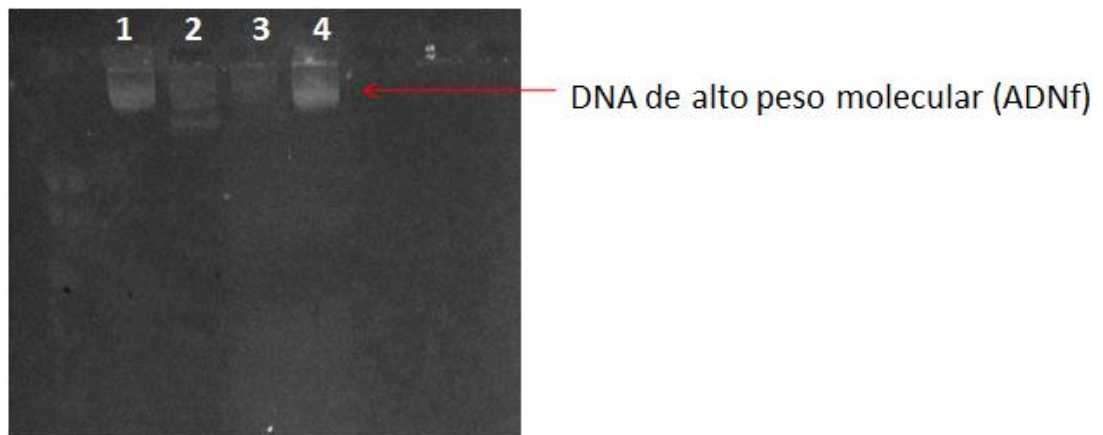


Figura 5. ADNf aislado a partir de una colonia. Carril 1: ADNfMix1, 2: ADNfMix2, 3: ADNfMix3, 4: ADNfMix4

Las extracciones realizadas a partir de una colonia mostraron concentraciones de ADN fosmídico que van de 200 a 600 ng/ul.

Las extracciones a partir del pool de clones mostraron concentraciones de 100 y 200 ng/ul (Figura 6).

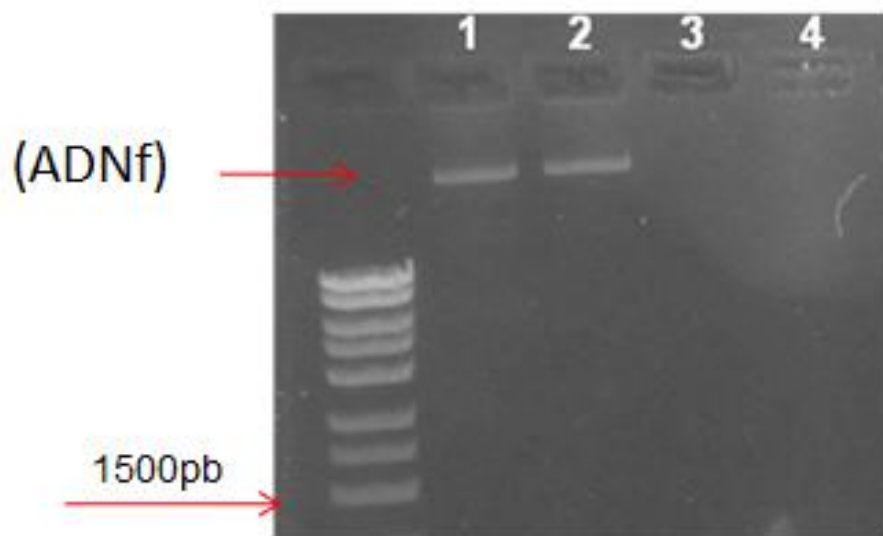


Figura 6. ADNf extracción a partir de pool de clones Carril 1: ADNfMix1, 2: ADNfMix2,

5.3.2 Extracción ADN genómico (ADNg) controles

Se realizó la extracción de ADNg de *E. coli* EPI300, *Bacillus subtilis*, y *Enterobacter sp.* se obtuvieron concentraciones desde 100 a 800ng/ul. A continuación se muestra un gel con la correspondiente extracción.



Figura 7. Extracción ADNg 1) Marcador, 2) *E. coli*., 3) *B. subtilis*, 4) *Enterobacter sp.*

5.4 Amplificación de los genes de Lacasas

Se realizaron las amplificaciones tomando como template los ADN fosmídico y genómico producto de las extracciones. Se utilizaron los cebadores Cu1F y Cu4R, los cebadores A5 y A7, los cebadores reportados por Fang et al., (2011) y los cebadores específicos diseñados en la Universidad Pablo de Olivade pero estos dos últimos no amplificaron.

5.4.1 PCR cebadores diseñados en este estudio

Se obtuvieron un total de 224 secuencias. Dichas secuencias fueron alineadas y después de la depuración en total quedaron 90 secuencias para la elaboración de los bloques. Se utilizarón 4 bloques con regiones ricas en histidina (Tabla 6) (Anexo 5).

Tabla 6. Cebadores generados a partir de regiones conservadas de lacasas

Initiales (FORWARD)	Complementos (REVERSE)
Región que contiene WFHPHXH N° secuencias analizadas: 52	
A A T C W F H P	A5
oligo:5'-	
CCGCCGCCACCTGntggwwhcayc-3'	
degen=96 temp=60.5	
oligo:5'-	
GCCGCCACCTGCTGgwwhcayccnc-	A7
3' degen=96 temp=63.9	
A A T C W F H P H	
Región que contiene HPFHXHG N° secuencias analizadas: 54	
A5	P F H I H G T Q F
	ggnaargtryaGGTGCCGTGGGTCAAG
	oligo:5'-
	GAAGTGGGTGCCGTGGayrtgraangg-
	3' degen=32 temp=61.8
	H I H G T Q F R I
	gtryangtrccGTGGGTCAAGGCCT
A7	oligo:5'-
	TCCGGAAGTGGGTGccrtgnayrtg-3'
	degen=32 temp=61.7

De los cebadores degenerados creados en el programa se seleccionaron 2 pares los cuales al realizar un ensayo de PCR in silico fueron los que presentaban mejor anillamiento con genes de lacasas.

A5F→CCGCCGCCACCTGntggwwhcayc

A5R→GAACTGGGTGCCGTGGayrtgraangg

A7F→GCCGCCACCTGCTGgwwhcayccnc

A7R → TCCGGAACTGGGTGccrtgnayrtg

Cebadores escogidos de otros estudios:

Fang et al., (2011)

CU1A F → ACMWCBGTYCAY TGGCAYGG

CU4R → TGC TCV AGB AKR TGG CAGTG

Ausec et al., (2011)

CU1F → ACMWCKGTTCAYTGGCACGG

CU4R → TGNTCNAGNAWGTGRCARTG

5.5 Productos de PCR

Se mantuvieron las condiciones de PCR reportadas por Ausec et al., (2011) para los cebadores Cu1F y Cu4R y se modificó por medio de un proceso de estandarización en el Laboratorio de Genómica y Biología Molecular GeBiX- Unicauca la temperatura TM para los cebadores A5 y A7, generados en este estudio. El mix de la PCR se realizó de manera convencional y con Mango Mix. La temperatura de TM para los cebadores generados en el estudio fue de 52,3°C.

5.5.1 PCR Controles

Se realizó la PCR con los cebadores Cu1F y Cu4R y con el mix de PCR convencional y con Mango Mix y se estandarizó la cantidad de cebador adecuada para la amplificación.

Estandarización de cantidad de primer, nomenclatura de las muestras cargadas en el gel:

1: *Enterobacter sp.*, 2: *Bacillus sp.* C1, 3: *Echerichia coli* EPI 300

A: 0,5ul, B: 1ul, C: 1,5ul y D: 2ul

Estos cebadores permitieron amplificar fragmentos de 1300pb y de 800pb para las muestras de *Enterobacter sp.* y fragmentos de 1300pb y 1000pb para *Echerichia coli* EPI 300, longitudes que corresponden a las longitudes de los genes de lacasas (Figura 8).

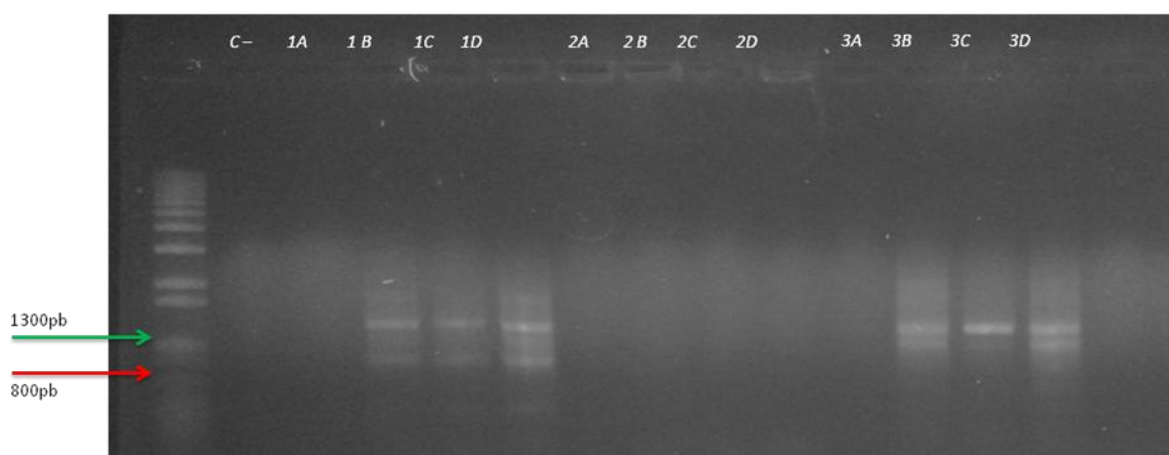


Figura 8. Amplificaciones controles PCR.

Como se observa en el gel, las muestras de *Enterobacter sp.* (1) y *E. coli* EPI300 (3) amplificaron mostrando bandas más fuertes con las cantidades de cebadores B: 1ul, C: 1,5ul y D: 2ul. En la tabla 5 se observa la cantidad de cebador adecuada para cada volumen total de reacción. Se determinó como control negativo para la PCR *Bacillus sp.* y como controles positivos *Enterobacter sp.* y *E. coli* Epi 300.

Las PCRs de los cebadores A5 y A7 se realizaron en gradiente de temperatura de 50°C a 70°C determinando así un TM de 52,3°C para la amplificación de genes de lacasas con los pool de clones de los cebadores A5 y un TM de 55°C para A7 (Figura 11). *Enterobacter* y *E.coli* EPI300 mostraron amplificación de

fragmentos de 1000pb, tamaño que corresponde a la presencia de lacasas (Figuras 9, 10 y 11).

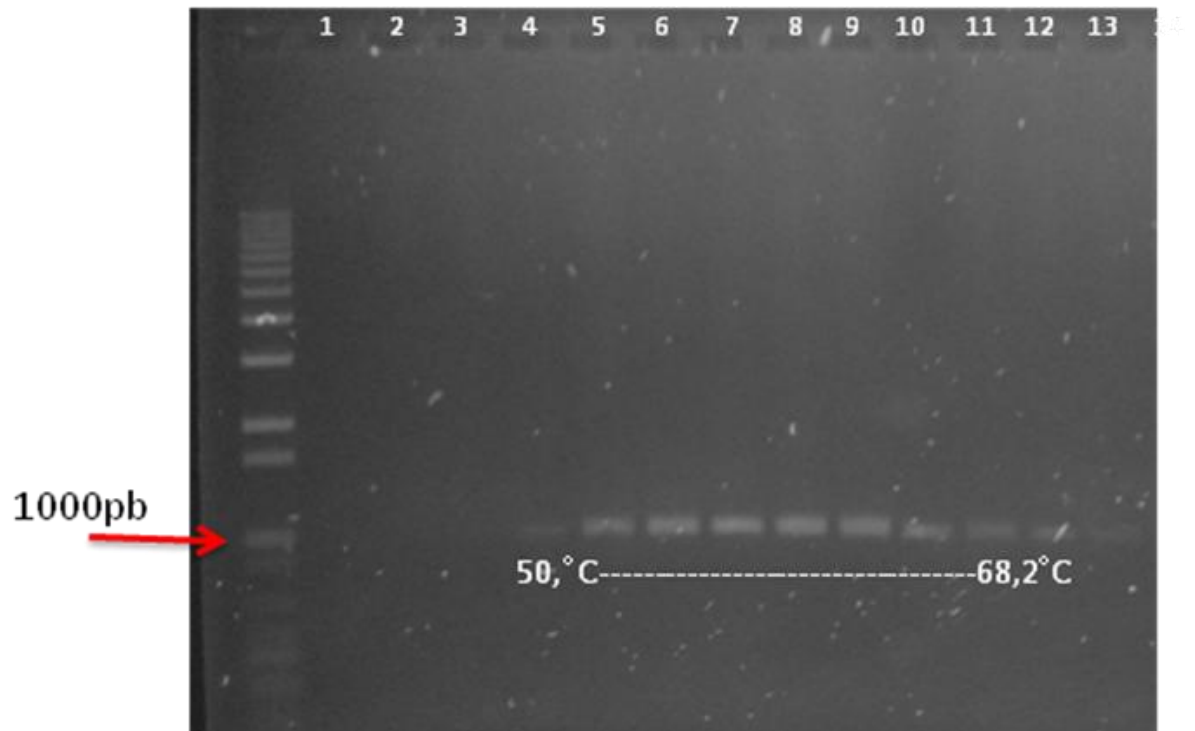


Figura 9. *Enterobacter sp.cebador A5* gradiente de temperatura

Como se observa en la figura 9 para la bacteria *Enterobacter sp* las bandas están bien definidas desde 50 a 68,2°C, pero se considero la temperatura 52,3°C como la temperatura en la que la banda esta mejor definida con el cebador A5.

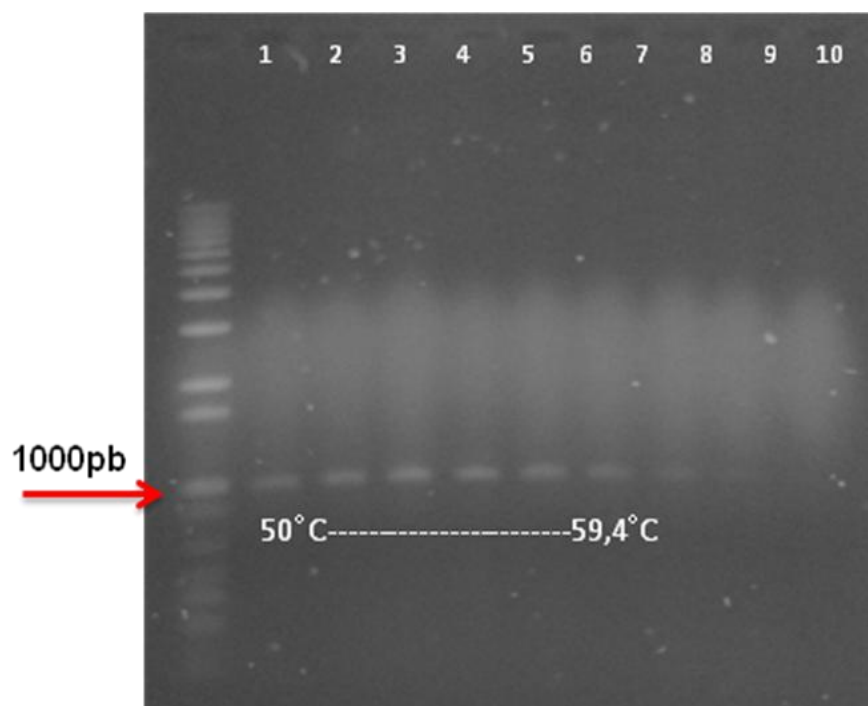


Figura 10. Amplificación de *E.coli* EPI300 con cebador A5 gradiente de temperatura

En la figura 10 se observa que para *E. coli* EPI300 la banda mejor definida se determina bajo la temperatura 52,3°C , con el cebador A5.

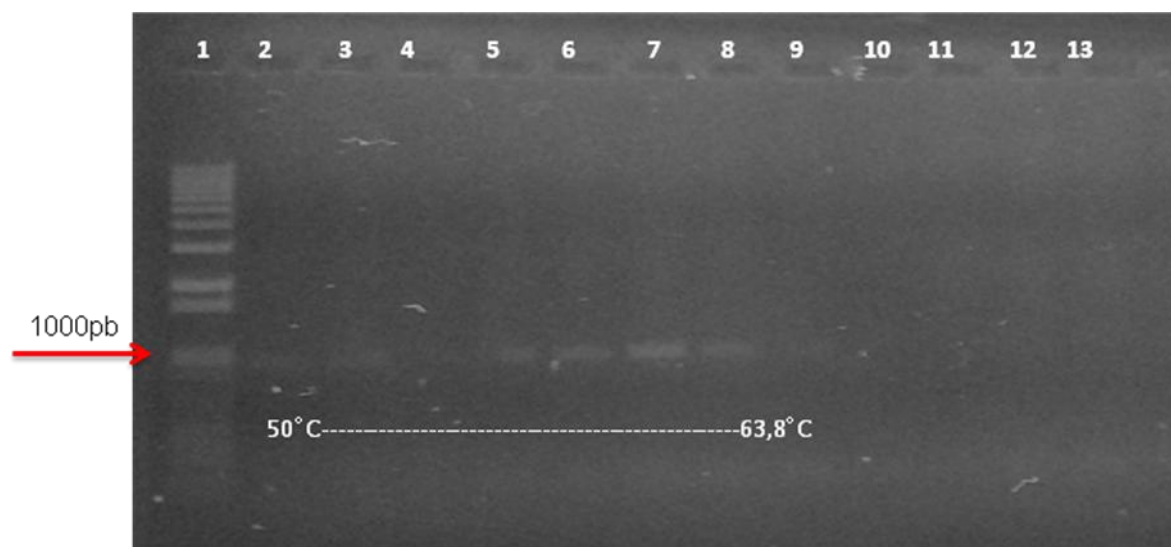


Figura 11. Amplificación *Enterobacter* sp. cebadores A7 con gradiente de temperatura

Para la bacteria *Enterobacter sp.* con el cebador A7 la banda mejor definida se encuentra bajo una temperatura de 55°C como se observa en la figura 11.

5.5.2. PCR ADN Controles y biblioteca de ADNf

Utilizando los cebadores A5 se lograron obtener amplicones de 1000pb para LAC136BAA, LAC137BAA y *E. coli* EPI300 y fragmentos de 1100pb para *Enterobacter sp.* (Figura 12), estos fragmentos fueron considerados como posibles genes de lacasas.

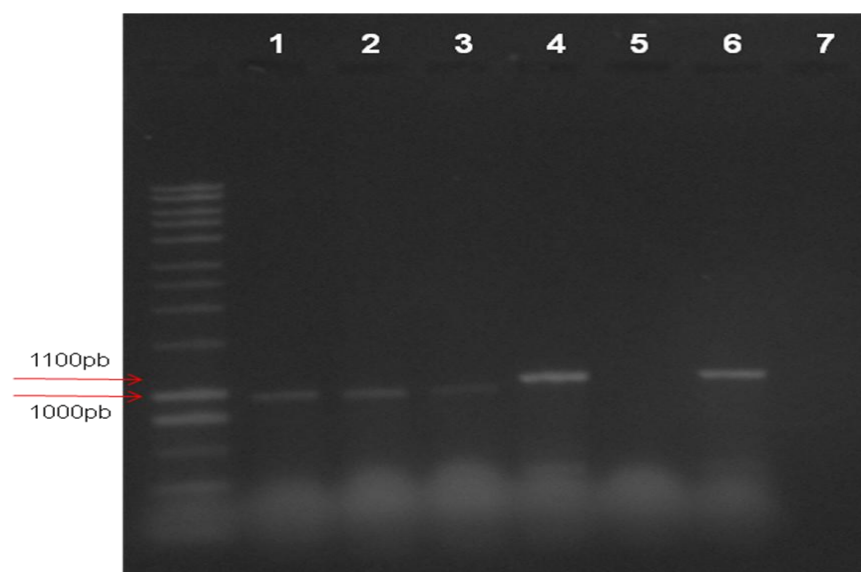


Figura 12. Amplificaciones cebador A5. Marcador de peso molecular 1Kb Bioline Carril 1) LAC136BAA, 2) LAC137BAA, 3) *E.coli* EPI 300, 4) *Enterobacter sp. A*, 5) Control - 6) *Enterobacter sp. B*.

Para descartar cualquier tipo de contaminación provisto por la cepa hospedera *E. coli* EPI300 en la que fue construida la biblioteca, se realizaron extracciones de ADN fosmídico de esta cepa utilizando el kit *FosmidMAX™ ADN Purification Kit* (Epicentre) (Anexo2). Al cuantificar el ADN de estas extracciones no alcanzaron valores mayores a 12 ng/ul. Por lo tanto se determinó que los amplicones efectivamente correspondían al ADNf de los insertos de la biblioteca del metagenoma BAA.

Se realizó amplificación utilizando como template ADNf de tres pools de la biblioteca y de *E. coli* EPI300 ADNf y *E. coli* EPI300 (ADN genómico) con cebadores A5 y con las condiciones de amplificación mostradas anteriormente. En el gel se observa en el carril 1-3, los pool de la biblioteca que muestran la amplificación de fragmentos de 1000pb. El template de ADN fosmídico de *E.coli* EPI300 no amplificó para lacasa; esto demuestra también que el ADN que amplifica para lacasa es exclusivamente el que está en los insertos de los clones de la biblioteca.

En la Figura 13 se observan amplicones de 1000pb de LAC136BAA 55ng/ul (pool1) LAC137BAA 103ng/ul (pool2), 3) LAC138BAA 35ng/ul (Pool3), ADNg *E. coli* EPI 300 50ng/ul, los cuales son considerados como posibles lacasas por su tamaño.

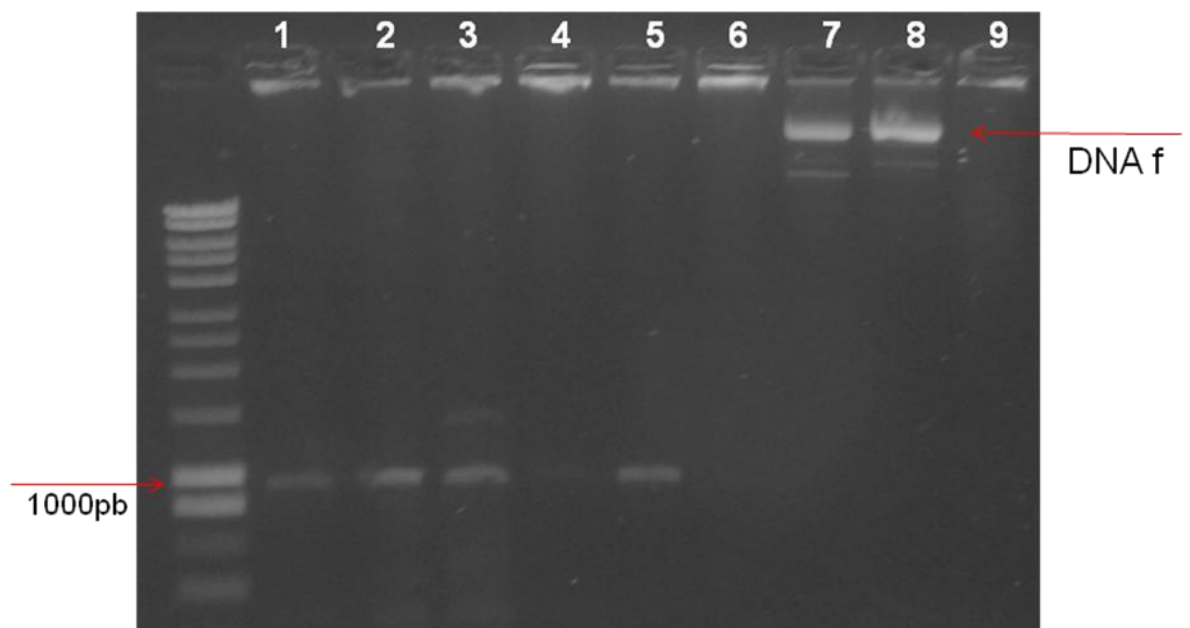


Figura 13. PCR de la amplificación del cebador A5: 1) LAC136BAA 55ng/ul, 2) LAC137BAA, 3) LAC138BAA, 4) *E. coli* EPI300f, 5) *E. coli* EPI 300I, 6) Control-, 7) ADNf pool 1, 8) ADNf pool 2, 9) ADNf *E. coli* EPI300f.

Se realizó la PCR para los cebadores reportados por Fang et al., (2011) y Ausec et al., (2011) siguiendo las condiciones que manejaron en sus estudios.

La amplificación con Fang et al., (2011) y con los cebadores específicos diseñados no permitieron obtener amplificaciones.

Los cebadores de Ausec et al., (2011) generaron amplicones de 1300pb los cuales son considerados como posibles lacasas pues corresponden a los tamaños de las mismas (Figura 14 y 15).

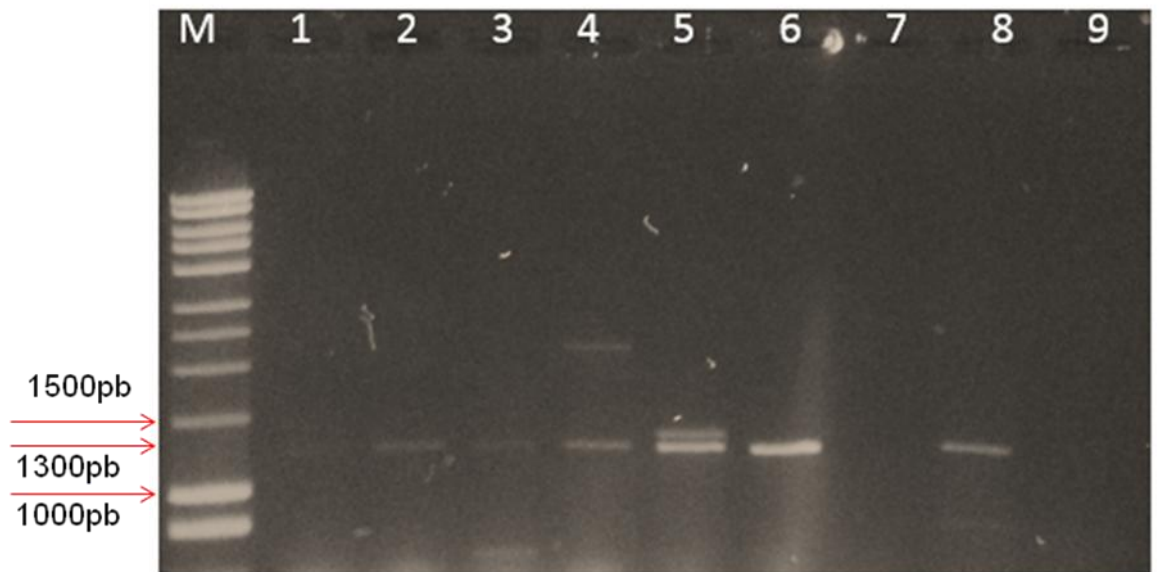


Figura 14. Amplificaciones cebadores Ausec et al., (2011): Carril 1- 6 ADNf biblioteca, Carril 7 control-, Carril 8 *Enterobacter sp.* [110ng/ul], Carril 9 *E. coli*

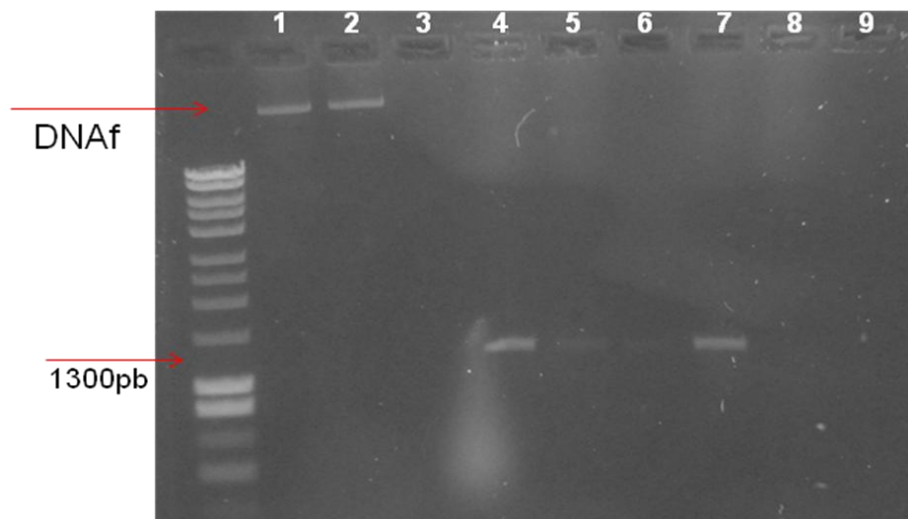


Figura 15. ADN fosmídico y Amplificaciones de los cebadores de Ausec et al., (2011): 1) LAC405BAA 55ng/ul ADNf, 2) LAC406BAA 103ng/ulADNf, 3) BAI3 35ng/ul, 4) LAC405BAA, 5) LAC406BAA, 6) *E. coli* EPI300f 12ng/ul, 7) *E. coli* EPI300 genómico 50ng/ul, 8) control-

5.6 Análisis de secuencias

Se identificaron los marcos abiertos de lectura (ORF), y se analizaron las secuencias LAC405BAA (cebadores de Ausec et al., (2011) y LAC137BAA (cebadores generados en este estudio) con los algoritmos BLASTN, BLASTX y SMARTBLAST.

La secuenciación de los amplicones dió como resultado un fragmento de ADN de 1042pb para la secuencia LAC405BAA y un fragmento de 880pb para la secuencia LAC137BAA. La búsqueda de marcos abiertos de lectura mediante el programa EMBOSS transeq llevó a la identificación de una región de 352 aminoácidos para LAC405BAA y 283 para LAC137BAA, lo cual concuerda con las características de tamaño determinadas para las lacasas.

5.6.1 Análisis por Homología de Secuencia LAC405BAA

En primer lugar se comparó la secuencia, con la base de datos de NCBI por medio del algoritmo BLASTN revelando un 100% de identidad de la secuencia

con el genoma de *E.coli* de diferentes cepas y en particular la cepa K-12 de *E. coli* Lac- la cual esta asociada a una lacasa multicobre como se observa en la Figura 16. Además el resultado del alineamiento múltiple y relación filogenética de lacasas de diferentes cepas de *E. coli* lo confirman (Figura 26).

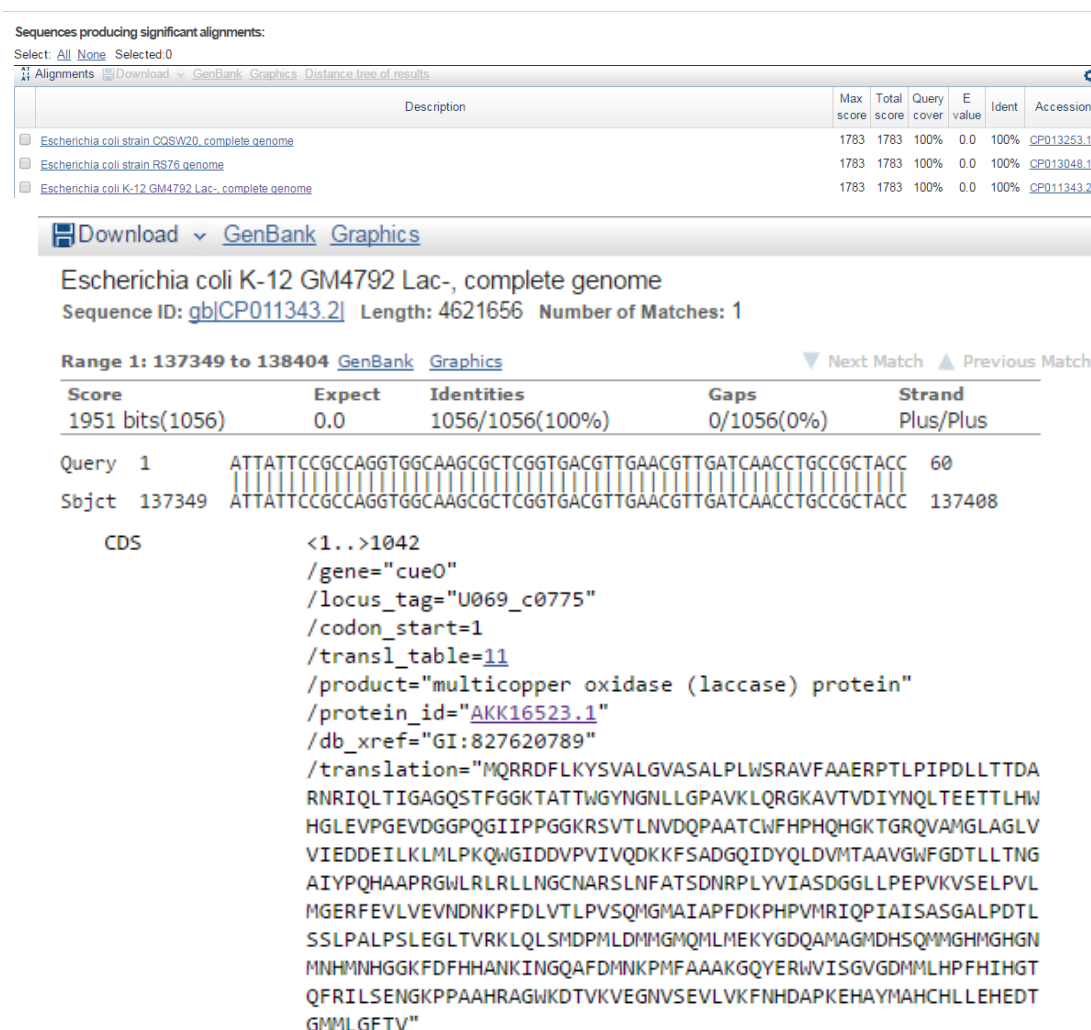


Figura 16. Homología con la cepa K-12 de *E.coli* y con una lacasa multicobre de la misma cepa.

El BLASTX asoció la secuencia a la lacasa de la superfamilia cupredoxin revelando identidades de 100 y 99% de Oxidasas de unión a cobre, multicobre y oxidasas azules de unión a cobre de *E. coli* (Figura 17).



Figura 17. Resultados BLASTX

Al realizar el análisis de los dominios conservados en la plataforma de la NCBI (Conserved domain) se logró identificar el dominio CuRO_2 FtsP y CuRO_3 FtsP (Figura 18). Estos dominios con el segundo y tercer dominio cupredoxin de las Oxidasas multicobre CueO de *E.coli* (Figura 18).

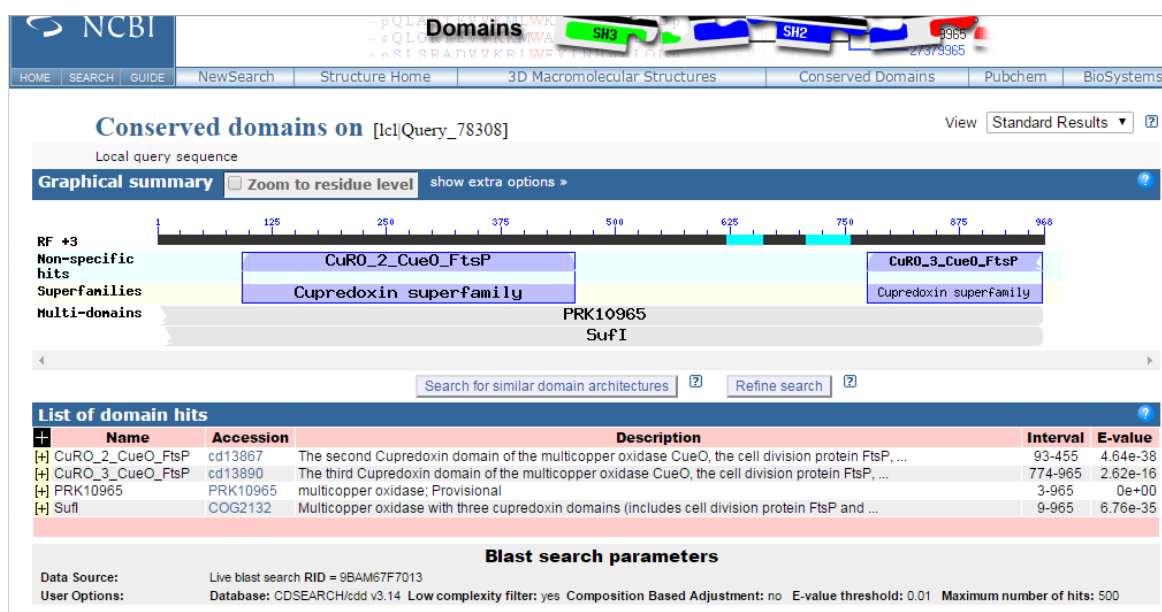
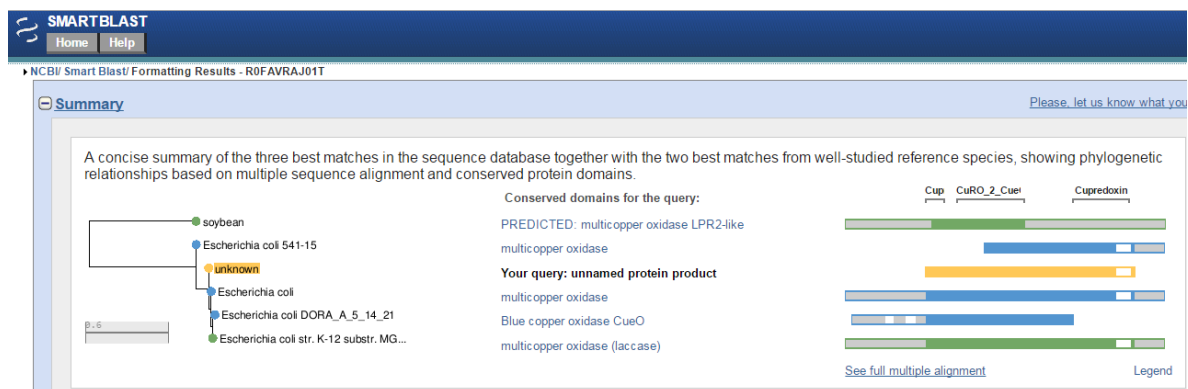


Figura 18. Dominios CuRO2 y CuRO3 de LAC405BAA

SMARTBLAST confirmó las relaciones filogenéticas de la secuencia LAC405BAA con *E. coli* y la relación con el dominio CuRO2 (Figura 19).



blue copper oxidase CueO [Escherichia coli]

Sequence ID: [refWIP_021546720.1](#) Length: 516 Number of Matches: 1

Range 1: 118 to 469 [GenPept](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
726 bits(1875)	0.0()	Compositional matrix adjust.	352/352(100%)	352/352(100%)	0/352(0%)	
Query 1	IIPPGGKRSVTLNVDQPAATCFHPHQHGKTGRQVAMGLAGLVVIEDDEILKMLPKQWG		60			
	IIPPGGKRSVTLNVDQPAATCFHPHQHGKTGRQVAMGLAGLVVIEDDEILKMLPKQWG					
Sbjct 118	IIPPGGKRSVTLNVDQPAATCFHPHQHGKTGRQVAMGLAGLVVIEDDEILKMLPKQWG		177			

Figura 19. Relación filogenética con dominios asociados a lacasas

5.6.2 Análisis por Homología secuencia LAC137BAA

Al realizar el BLASTN, la secuencia reveló una identidad de 98% con la cepa K-12 de *E. coli* como se observa en la figura 20. El cladograma que revela la relación filogenética de lacasas de diferentes cepas de *E. coli* también lo confirma (Figura 26).

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Nucleotide Sequence (880 letters)

RID [PZTTHWMT015](#) (Expires on 06-27 22:31 pm)

Query ID [Ic|Query_77575](#)

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 880

Database Name nr

Description Nucleotide collection (nt)

Program BLASTN 2.4.0+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

Escherichia coli K-12 GM4792 Lac- complete genome	1304	1304	86%	0.0	98%	CP011343.2
Escherichia coli K-12 GM4792 Lac+ complete genome	1304	1304	86%	0.0	98%	CP011342.2
Escherichia coli strain K-12 substrain MG1655 TMP32XR2 complete genome	1304	1304	86%	0.0	98%	CP012870.1
Escherichia coli strain K-12 substrain MG1655 TMP32XR1 complete genome	1304	1304	86%	0.0	98%	CP012869.1

Escherichia coli K-12 GM4792 Lac-, complete genome				
Sequence ID: gb CP011343.2 Length: 4621656 Number of Matches: 1				
Range 1: 137570 to 138328 GenBank Graphics Next Match Previous Match				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1304 bits(706)	0.0	742/760(98%)	2/760(0%)	Plus/Plus
Query 102	CGCCACGGGTCA-ATTGATTATCAACTGGGTGCGACGACCGCCCCGTGGCTGCTTTG	160		
Sbjct 137570	CGCCGACGGG-CAGATTGATTATCAACTGGATGTGATGACCGCCGCCGTGGCTGCTTTG	137628		
Query 161	GCTATCCGTTGCTGACCAACAGCGAATCTACCCGACACGCTGCCCGCGTGTTGGC	220		
Sbjct 137629	GCGATACGTTGCTGACCAACGGTGCAATCTACCCGCAACAGCTGCCCGCGTGTTGGC	137688		
Query 221	TGCGCCTGCGTTTGCTCAATGGCTGGAATGCCCGTTGCTCAATTTGCCACACAGCGACA	280		
Sbjct 137689	TGCGCCTGCGTTTGCTCAATGGCTGTAATGCCCGTTGCTCAATTTGCCACACAGCGACA	137748		

Figura 20. Homología de LAC137BAA con la cepa K-12 de *E.coli*

El BLASTX permitió asociar la secuencia con una lacasa de superfamilia cupredoxin (oxidasa de unión a cobre) (Figura 21).

Edit and Resubmit
Save Search Strategies
Formatting options
Download

[YouTube](#)
[How to read this page](#)
[Blast report description](#)

137A5F

RID

V3RVPCF7016 (Expires on 08-16 23:27 pm)

Query ID

lcl|Query_131792

Description

137A5F

Molecule type

nucleic acid

Query Length

870

Database Name

nr

Description

All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects

Program

BLASTX 2.5.0+ [Citation](#)

Other reports:

[Search Summary](#)
[Taxonomy reports](#)

Graphic Summary

Show Conserved Domains

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	blue copper oxidase cueO [Shigella flexneri VA-6]	381	381	97%	9e-130	87%	EGK30051.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Shigella sonnei]	381	381	97%	1e-129	87%	CSG32574.1
<input type="checkbox"/>	copper oxidase [Escherichia coli]	381	381	97%	2e-129	87%	WP_063081877.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Shigella sonnei]	380	380	97%	2e-129	87%	CSF12903.1
<input type="checkbox"/>	copper oxidase [Shigella sonnei]	381	381	97%	2e-129	87%	WP_052984570.1
<input type="checkbox"/>	copper oxidase [Shigella sonnei]	380	380	97%	2e-129	87%	WP_052988818.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Escherichia coli]	380	380	97%	3e-129	87%	WP_032213719.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Escherichia coli]	380	380	97%	5e-129	87%	WP_042108412.1
<input type="checkbox"/>	copper oxidase [Shigella sonnei]	380	380	97%	6e-129	87%	WP_052973482.1
<input type="checkbox"/>	copper oxidase [Shigella sonnei]	380	380	97%	6e-129	87%	WP_052986761.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Escherichia coli]	379	379	97%	1e-128	87%	WP_032102029.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Escherichia coli ECA-0157]	380	380	97%	2e-128	87%	EST87390.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Escherichia coli]	381	381	97%	2e-128	87%	WP_024212806.1
<input type="checkbox"/>	Blue copper oxidase CueO precursor [Klebsiella pneumoniae IS22]	380	380	97%	4e-128	87%	CDK71573.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Escherichia coli]	382	382	97%	5e-128	88%	WP_024220082.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Escherichia coli]	382	382	97%	7e-128	87%	WP_040080197.1
<input type="checkbox"/>	multicopper oxidase [Escherichia coli]	382	382	97%	9e-128	87%	WP_001189624.1
<input type="checkbox"/>	copper oxidase [Escherichia coli]	381	381	97%	1e-127	87%	WP_064772099.1
<input type="checkbox"/>	copper oxidase [Escherichia coli]	382	382	97%	1e-127	87%	WP_063078800.1
<input type="checkbox"/>	copper oxidase [Escherichia coli]	378	378	97%	1e-127	87%	WP_064773239.1
<input type="checkbox"/>	Chain A, Multicopper Oxidase Cueo Mutant C500se506q (Data1)	380	380	97%	1e-127	87%	3UAA A

Figura 21. Resultados BLASTX

Al realizar el análisis de los dominios conservados se logró identificar el dominio CuRO_2 FtsP en la secuencia (Figura 22). Este dominio es el segundo dominio cupredoxin de las Oxidasas multicobre CueO (lacasas).

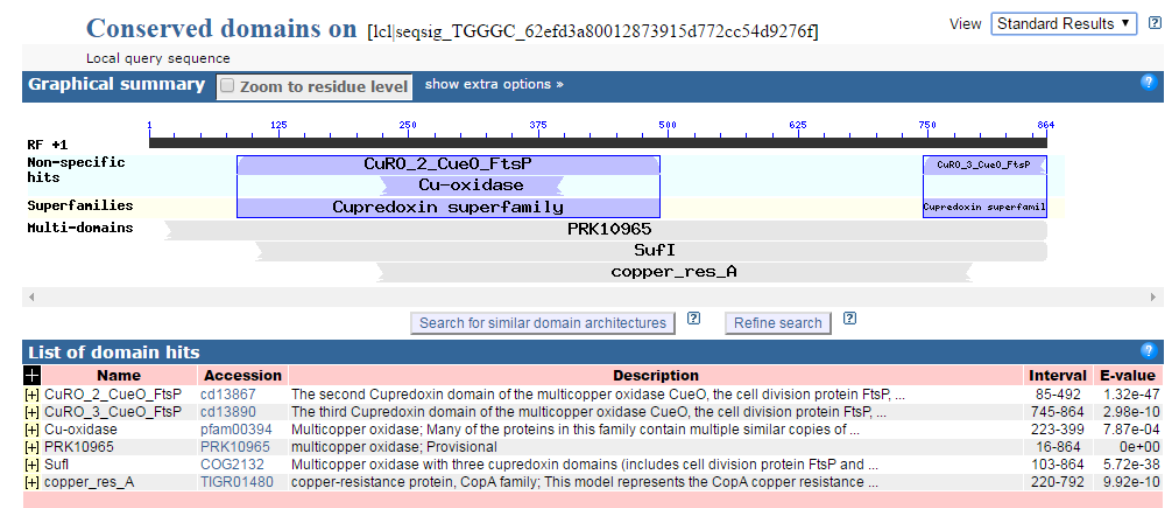
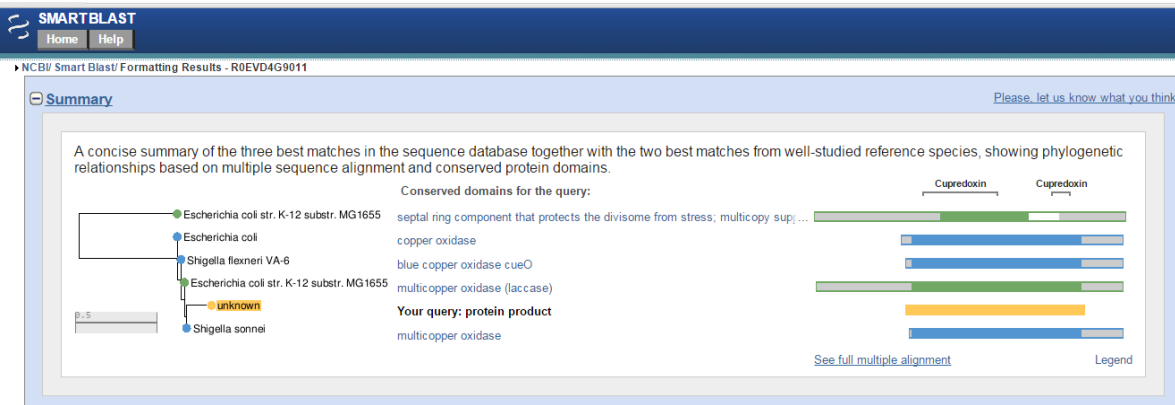


Figura 22. Dominio conservado CuRO2 de LAC137BAA

Con SMARTBLAST se confirmó que la secuencia LAC137BAA está relacionada con *E. coli* K12 con 87% de identidad y su la relación con el dominio cuprerodoxin característico de lacasas (Figura 23).



multicopper oxidase (laccase) [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655]

Sequence ID: [ref|NP_414665.1](#)

Range 1: 163 to 445 [GenPept](#)

Next Match Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
492 bits(1267)	2e-173()	Compositional matrix adjust.	247/283(87%)	254/283(89%)	0/283(0%)	

Query 6 EXDDTLNLVTRARGGRNDVGGIYRLFTPTAHGSDIDYQLGATTAPVACFGYPLLTNSAIYP 65
E D+ L L+ + G +DV I + +A G IDYQL TA V FG LLTN AIYP
Sbjct 163 EDDEILKLMPLKQWGIIDVPVIVQDKKFSADGQIDYQLDVMTAAVGFQDTLLTNGAIYP 222

Query 66 HHAAPRGWLRRLRLNGWNARSINLFATSDNRPLYVVIASDGGLLPEPVKVSELPVLMGERFE 125
HHAAPRGWLRRLRLNGWNARSINLFATSDNRPLYVVIASDGGLLPEPVKVSELPVLMGERFE

Figura 23. Identidad de LAC137BAA con una oxidasa multicobre de *E.coli*

5.6.3 Alineamiento

Las secuencias se analizaron por medio del algoritmo MUSCLE en busca de regiones conservadas (dominios de unión a cobre, regiones ricas en histidina), logrando identificar 2 dominios característicos de lacasas el dominio II (WXHXXH) y el dominio III (HXXHXXH). LAC405BAA corresponde a los amplicones obtenidos con cebadores Cu1F y Cu 4R y LAC137BAA a los aplicados con A5 que fueron los que presentaron bandas más intensas en los geles. LAC405BAA presenta los dominios el dominio II (WXHXXH) y el dominio III (HXXHXXH) y LAC137BAA solo el dominio III (HXXHXXH) (Figura 24).



Figura 24. Alineamiento de las secuencias LAC405BAA y LAC137BAA con secuencias de lacasas bacterianas

En la Figura 25 aparece una representación filogenética en forma de árbol consenso donde se muestran las relaciones entre LAC405BAA y LAC137BAA y una serie de secuencias de lacasas de bacterias. Las secuencias LAC405BAA y LAC137BAA revelaron relación con CueO oxidasa multicobre de *E.coli* y una lacasa (oxidasa multicobre) de *E.coli* str.K-12.

El potencial enzimático del metagenoma es alto, sin embargo para las lacasas en particular es bajo por ello se considera necesario producirla en bioreactores.

La caracterización bioquímica de la enzima encontrada permitirá posteriormente establecer diferencias con las ya reportadas, se espera que presente condiciones especiales por ser procedente de bacterias extremofilas en cuanto a estabilidad.

5.7 Pruebas preliminares en sustratos

5.7.1 Prueba colorimétrica

Se evaluaron los extractos extracelulares e intracelulares midiendo la absorbancia en el lector de ELISA y no hubo cambio en los pozos que contenían los extractos, solo se observó reacción (color azul) en el pozo que tenía la enzima comercial (Figura 27).

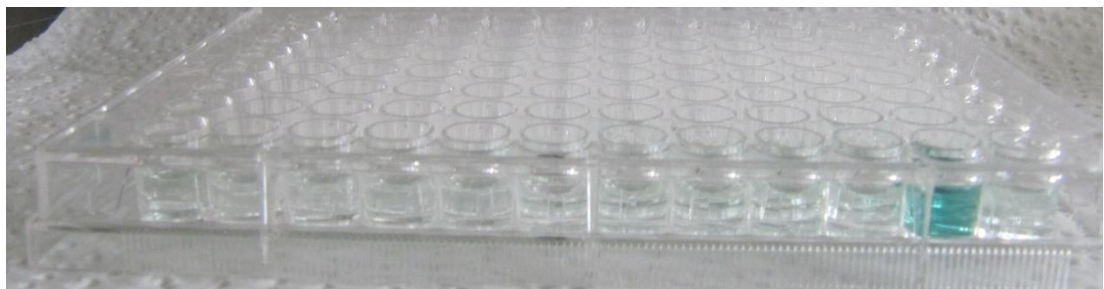


Figura 27. Análisis colorimétrico con ABTS de los extractos del pool de clones de la biblioteca.

5.7.2 Prueba en medio sólido

El sustrato con ABTS permitió identificar actividad de lacasa en las cepas control *E. coli* y *Enterobacter sp.* mostrando colonias oscuras (Figura 28).

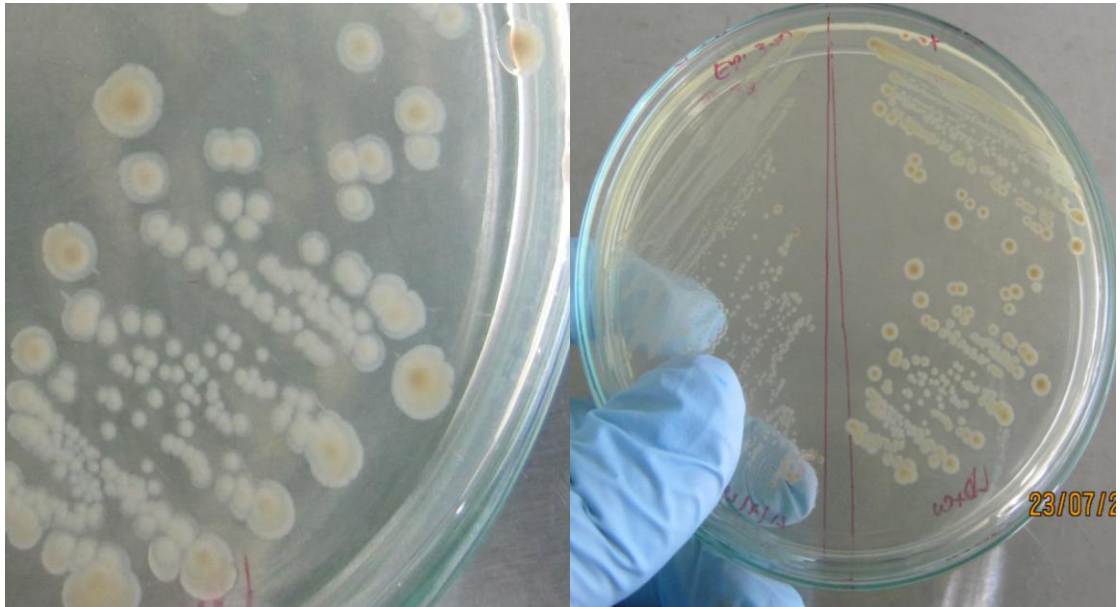


Figura 28. Colonias con actividad lacasa de los controles sustrato ABTS

Las colonias del pool de la biblioteca también mostraron coloración ámbar lo cual indica que presentan actividad lacasa (Figura 29).

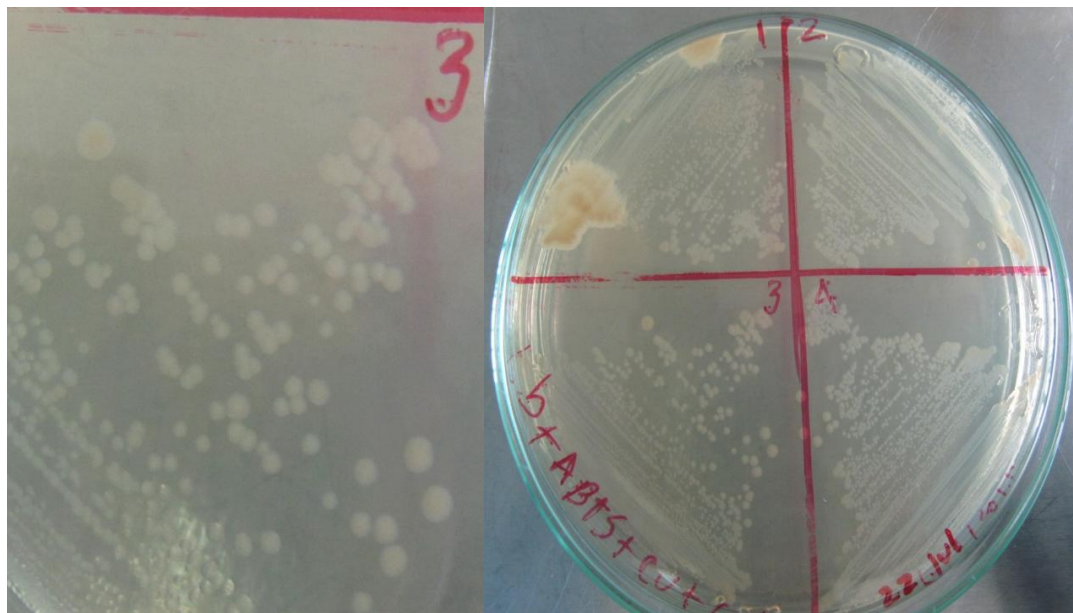


Figura 29. Colonias con actividad lacasa del pool de la biblioteca.

Las colonias goteadas con Guaicacol, Siringaldazine mostraron actividad de lacasa; las colonias tomaron una tonalidad oscura como se observa en la Figura 30, que muestra la reacción de la enzima con el sustrato.

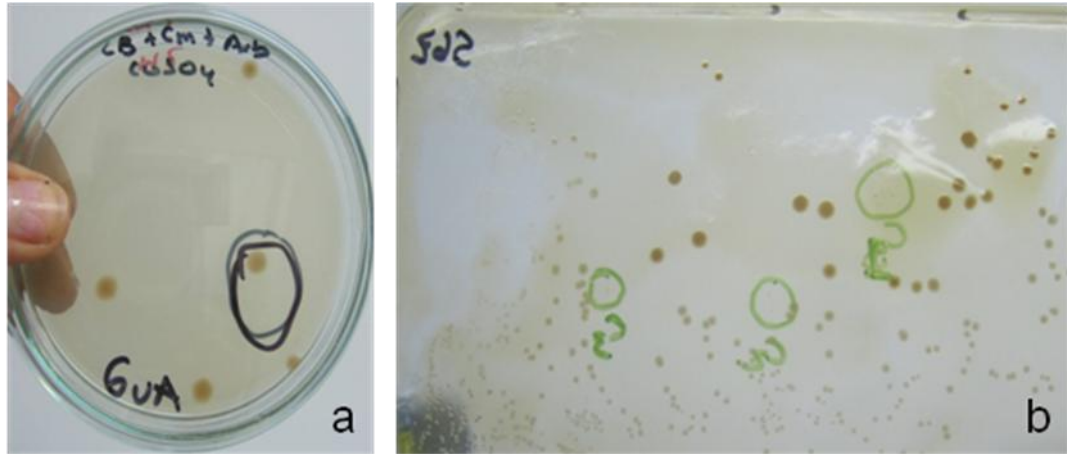


Figura 30. Colonias con actividad lacasa por el método de goteo. a) Guaiacol (GUA), b) Sirindilgazine (SGZ).

6. DISCUSIÓN

Los metagenomas provenientes de suelos son un enorme recurso de variedad de enzimas con altos potenciales de bioprospección en la industria (Lee and Lee, 2013). De aquí el interés científico por la potencialidad de los ecosistemas para el descubrimiento de nuevos biocompuestos derivados de la enorme diversidad que presentan los *hotspots* colombianos.

Las lacasas bacterianas poseen propiedades importantes para la industria pues presentan alta actividad y son mucho más estables a altas temperaturas y pH altos (Sharma et al., 2007). El auge de los estudios de lacasas bacterianas viene desde hace poco tiempo, siendo muy interesantes estas enzimas de origen bacteriano para aplicaciones biotecnológicas pues los abordajes actuales de las Ciencias Ómicas permiten la identificación de nuevas lacasas con alto potencial bioprospectivo, pues estas enzimas tienen un amplio espectro de aplicabilidad como se habló anteriormente.

Los metagenomas son una fuente de diversidad bacteriana y enzimática arrolladora, es por esto que los análisis *in-silico* permiten conocer de una manera rápida y económica la riqueza de los ambientes megadiversos que posee nuestro país permitiendo al investigador tener un punto de partida para posteriores estudios de bioprospección (Lee and Lee, 2013). En esta investigación la aplicación de este abordaje fue utilizado asertivamente, permitiendo avanzar en el estudio de lacasas a nivel molecular.

La realización de un análisis bioinformático preliminar consistió en aprovechar los datos disponibles del metagenoma de BAA, datos valiosos para la realización de estudios bioprospectivos (Vester et al., 2014, Vester et al., 2015a, Vester et al., 2015b, Ferrer et al., 2016).

(Weirick et al., 2014, Couto and Herrera, 2006, Ausec et al., 2012) aplican en sus estudios herramientas bioinformáticas y desarrollos computacionales para la búsqueda de lacasas.

En este estudio se trabajó con bibliotecas construidas en fósmidos debido a que es un vector diseñado para insertos grandes que permite la búsqueda de genes completos (Schmeisser et al., 2007). Algunos investigadores prefieren hacer sus bibliotecas en BAC como es el caso de Fang et al., (2011) o en bibliotecas de plásmidos como Jiménez et al., (2012a). Todo depende de la estructura y tamaño del gen de interés pues algunos están organizados en operones, presentando estructuras más complejas como los genes de las poliquetido sintetasas y otros como las lacasas son genes de aproximadamente 1500pb. La biblioteca evaluada presenta 18.430 clones con insertos de tamaños entre 35 y 40 kb, tamaño que garantizó que este ADNf fuera un excelente candidato para contener alguna de las secuencias de interés.

Son muchos los tamizajes que se pueden aplicar para la búsqueda de enzimas siendo el tamizaje funcional y basado en secuencia los más utilizados. La mayoría de estudios de búsqueda de enzimas a partir de muestras ambientales se han realizado con tamizajes funcionales sin importar el bajo número de clones positivos que se presentan a la hora de realizar los experimentos (es difícil encontrar la función de las enzimas intracelulares). No obstante, estas dos metodologías presentan sus ventajas y desventajas como lo presenta Terrón- Gonzalez et al., (2014) sobre el tamizaje en bibliotecas Metagenómicas.

En este estudio se aplicó el tamizaje basado en secuencia; aunque este método es dependiente de las secuencias reportadas en bases de datos, también permite encontrar enzimas nuevas, pues la variación en un nucleótido puede generar cambios en las propiedades de actividad enzimática. Para el caso de la búsqueda de lacasas por tamizaje basado en secuencias se destacan los estudios de donde reportan dos genes de lacasas (RL5 y Lac 591)

a partir de un metagenoma bovino y el de Fang et al., (2011), los cuales identifican el gen Lac15 de un metagenoma marino. Este método permite el hallazgo de un gran número de genes pero esto no garantiza que estos genes puedan ser expresados con la actividad enzimática (Vester et al., 2015).

Esta alternativa involucra el diseño de cebadores a partir de secuencias conservadas del gen de la enzima de interés. En esta investigación se optó por utilizar cebadores degenerados, los cuales a pesar de presentar algunas desventajas por su nivel de degeneración (pueden amplificar enzimas que no estamos buscando), son considerados muy prácticos si son diseñados con bajos niveles de degeneración Ausec et al., (2011) y Fang et al., (2011) en sus estudios lograron identificar genes de lacasas a partir de muestras ambientales, Fernandes et al., (2014) por su parte utilizaron cebadores degenerados y cebadores específicos para lacasas en su estudio de actinobacterias. A pesar de las ventajas reportadas por Untergasser et al., 2012 para el programa primer 3 los cebadores específicos diseñados en este estudio no permitieron obtener amplicones.

Fang et al., 2011 en su estudio de un metagenoma marino identificó una nueva lacasa Lac15 determinando un tamaño de 1100pb y Ausec et al., (2011) reporta también fragmentos de 600 para la amplificación del dominio II y fragmentos de 1500pb para lacasas con dominio III. En este estudio se obtuvieron amplicones de tamaños de 1000pb y 1300pb.

Para descartar la contaminación del pool de clones de la biblioteca con *E. coli* del ambiente, o que el ADNf que se estaba amplificando no fuera del ADN de los insertos sino de la cepa de *E. coli* EPI300 en la que fue construida la biblioteca. Se realizó una prueba extrayendo ADNf de la biblioteca y de la cepa de *E. coli* EPI300 control con el *Fosmid MAXTM ADN Purification Kit* (Epicentre). Este Kit presenta alta especificidad y calidad del ADNf extraído, mas cuando la biblioteca ha sido construida con *CopyControlTM Fosmid Library Production Kit*

por tanto esto garantiza que el ADNf extraído es procedente de los clones, Uchiyama and Miyazaqui (2010), Sommer et al., (2014), Du et al., (2014) reportan el uso de este kit en sus estudios. Los resultados de este experimento no revelaron bandas para lacasas utilizando el DNAf extraído de la cepa EPI300. Así se confirma que la lacasa reportada en el estudio es proveniente de los clones del metagenoma.

El análisis de secuencias por el algoritmo BLAST asoció las secuencias generadas de la biblioteca de BAA al genoma de *E. coli*, y a lacasas pertenecientes a la misma (CueO), presentando identidades de 98 y 100%. Los cebadores Cu4R y Cu1F y A5 permitieron amplificar regiones que contenían los dominios II y III de lacasas, estos dominios también fueron encontrados por Ausec et al., (2011) con los cebadores Cu4R y Cu1F, los cuales han sido utilizados en otros estudios como el de Fernandes et al., (2014).

Los alineamientos confirman el hallazgo de una lacasa de origen bacterial (*E. coli*) en el metagenoma BAA, pues presenta los dominios II y III de unión a cobre característicos de lacasas, como lo reportan Ausec et al., (2011), y Reiss et al., (2013) en sus estudios.

La aplicación del método NJ mostró una estrecha relación de las secuencias de lacasas obtenidas en este estudio con lacasas de *E. coli* lo cual confirma que las secuencias obtenidas pertenecen a *E. coli*, este método ha sido utilizado por Lu et al., (2012), Didelot (2010), entre otros por su eficiencia y se buenos resultados. Sin embargo también muestran relación con algunas secuencias de lacasas de otros géneros como *Bacillus*, *Klebsiella*, *Streptomyces*, entre otras.

Las dificultades que se presentan al realizar los ensayos de actividad o funcionalidad de lacasas contenidas en los clones son muchas, sin embargo en este estudio se logró probar la actividad en medio sólido de colonias expuestas a sustratos como ABTS, SZG, GUA. Reiss et al., (2013), Ferrer et al., (2010),

en sus estudios, por citar algunos, han aplicado estos sustratos para la identificación de la actividad de lacasas, el ABTS el más utilizado. Las bajas concentraciones de la cantidad de enzima liberada para los ensayos colorimétricos de absorbancia pudieron haber generado los resultados negativos, considerando que el origen periplasmático asociado a la lacasa CueO de *E.coli* y que algunos autores como Revollo y et al., (2012) utilizan bioreactores para obtener una buena cantidad de actinobacterias para evaluar por absorbancia una mejor la actividad de la lacasa.

7. CONCLUSIONES

- Los análisis bioinformáticos permiten evidenciar in silico, la presencia de lacasas putativas, lo cual puede ser evaluado en laboratorio por medio de tamizajes moleculares, permitiendo así el desarrollo de estudios de Bioprospección.
- El tamizaje de bibliotecas realizado en la actual investigación permite la identificación de enzimas de alto potencial bioprospectivo, como las lacasas, permitiendo así encontrar nuevas enzimas dentro de esta familia con propiedades interesantes a nivel industrial que permitan el desarrollo biotecnológico.
- Se debe perfeccionar el diseño de los cebadores de tal manera que permitan amplificar los cuatro dominios de lacasas o el gen completo para que sea funcional.
- Se obtuvieron 8 predicciones con dominios conservados (HPMHLHG y HCH) ricos en histidina característicos de lacasas en el análisis in silico.
- Dos nuevos cebadores degenerados A5 y A7 son reportados para la búsqueda de nuevos genes de lacasas.
- Se identificó una lacasa putativa asociada a la enzima CueO (lacasa de *E. coli*) procedente del metagenoma de suelo BAA.
- El tamizaje basado en secuencias es una excelente herramienta para la búsqueda de lacasas en muestras ambientales, como se evidencia en los resultados alcanzados en la actual investigación, siendo esta la primera iniciativa de búsqueda de lacasas en metagenomas desarrollada en Colombia.
- La aplicación de estrategias Metagenómicas es importante para el conocimiento, aprovechamiento adecuado y la protección de los ecosistemas como el BAA el cual puede ser considerado como un reservorio para la Bioprospección.

8. PERSPECTIVAS

- Continuar con la expresión del gen de lacasas encontrado para determinar la funcionalidad y/o potenciales aplicaciones del mismo.
- Se debe perfeccionar el diseño de los cebadores de tal manera que permitan amplificar los cuatro dominios de lacasas o el gen completo para que sea funcional.
- Realizar puebas de actividad enzimática caracterizando la enzima encontrada.
- Esta investigación sienta las bases para seguir estudiando las lacasas provenientes de metagenomas de nuestro país, permitiendo así encontrar nuevas lacasas con propiedades interesantes a nivel industrial que permitan el desarrollo biotecnológico.
- Continuar con la búsqueda de más y nuevos genes de interés bioprospectivo y/o biorremediador.
- Motivar por medio de este tipo de estudios la protección de ecosistemas *hotspots* en Colombia.

9. LITERATURA CITADA

- ABADULLA, E., TZANOV, T., COSTA, S., ROBRA, K.-H., CAVACO-PAULO, A. & GÜBITZ, G. M. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and environmental microbiology*, 66, 3357-3362.
- ALCALDE, M., BULTER, T. & ARNOLD, F. H. 2002. Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *Journal of biomolecular screening*, 7, 547-553.
- ALEXANDRE, G. & ZHULIN, I. B. 2000. Laccases are widespread in bacteria. *Trends in biotechnology*, 18, 41-42.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215, 403-410.
- ALLEN, H. K., MOE, L. A., RODBUMRER, J., GAARDER, A. & HANDELSMAN, J. 2009. Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alaskan soil. *The ISME journal*, 3, 243-251.
- ARIAS, M. E., ARENAS, M., RODRÍGUEZ, J., SOLIVERI, J., BALL, A. S. & HERNÁNDEZ, M. 2003. Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and environmental microbiology*, 69, 1953-1958.
- ATLAS, R. M. 1984. Diversity of microbial communities. *Advances in microbial ecology*. Springer.
- AUSEC, L., VAN ELSAS, J. D. & MANDIC-MULEC, I. 2011. Two-and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 975-983.
- AUSEC, L., ZAKRZEWSKI, M., GOESMANN, A., SCHLÜTER, A. & MANDIC-MULEC, I. 2012. Correction: bioinformatic analysis reveals high diversity of bacterial genes for laccase-like enzymes. *PloS one*, 7.
- BERLEMONT, R., DELSAUTE, M., PIPERS, D., D'AMICO, S., FELLER, G., GALLEN, M. & POWER, P. 2009. Insights into bacterial cellulose biosynthesis by functional metagenomics on Antarctic soil samples. *The ISME journal*, 3, 1070-1081.
- BERRIO, J., PLOU, F. J., BALLESTEROS, A., MARTÍNEZ, Á. T. & MARTÍNEZ, M. J. 2007. Immobilization of *Pycnoporus coccineus* laccase on Eupergit C: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. *Biocatalysis and Biotransformation*, 25, 130-134.
- BHAT, A., RIYAZ-UL-HASSAN, S., AHMAD, N., SRIVASTAVA, N. & JOHRI, S. 2013. Isolation of cold-active, acidic endocellulase from Ladakh soil by functional metagenomics. *Extremophiles*, 17, 229-239.
- BOHORQUEZ, L. C., DELGADO-SERRANO, L., LÓPEZ, G., OSORIO-FORERO, C., KLEPAC-CERAJ, V., KOLTER, R., JUNCA, H., BAENA, S. & ZAMBRANO, M. M. 2012. In-depth characterization via complementing culture-independent approaches of the microbial community in an acidic hot spring of the Colombian Andes. *Microbial ecology*, 63, 103-115.

- BOLAÑOS I.A., RODRÍGUEZ A.C., CRUZ M., MARTÍNEZ D.F., MORENO P.A., ZAMBRANO M.M, VÉLEZ P.E. 2013. Metagenomics: towards environmental protection and industrial development in Colombia. *Memorias- FEMS- Leipzig*.
- BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. *FEBS letters*, 267, 99-102.
- BRADY, S. F., CHAO, C. J. & CLARDY, J. 2002. New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster. *Journal of the American Chemical Society*, 124, 9968-9969.
- BREEN, A. & SINGLETON, F. L. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopulping. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 252-258.
- BROUWERS, G.-J., DE VRIND, J. P., CORSTJENS, P. L., CORNELIS, P., BAYSSE, C. & DE VRIND-DE JONG, E. W. 1999. cumA, a gene encoding a multicopper oxidase, is involved in Mn²⁺ oxidation in *Pseudomonas putida* GB-1. *Applied and environmental microbiology*, 65, 1762-1768.
- BULL, A. T. 2004. *Microbial diversity and bioprospecting*, ASM press.
- CASTREE, N. 2003. Bioprospecting: from theory to practice (and back again). *Transactions of the Institute of British Geographers*, 28, 35-55.
- CLAUS, H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Archives of Microbiology*, 179, 145-150.
- CLAUS, H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35, 93-96.
- COTTRELL, M. T., MOORE, J. A. & KIRCHMAN, D. L. 1999. Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 65, 2553-2557.
- COUTO, S. R. & HERRERA, J. L. T. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, 24, 500-513.
- COWAN, D., MEYER, Q., STAFFORD, W., MUYANGA, S., CAMERON, R. & WITTEWER, P. 2005. Metagenomic gene discovery: past, present and future. *Trends in biotechnology*, 23, 321-329.
- CHAN, K.-G., CHONG, T.-M., KHER, H. L., HONG, K.-W., GRANDCLÉMENT, C., FAURE, D., YIN, W.-F. & DESSAUX, Y. 2015. Whole-genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* ZBG7B reveals its biotechnological potential. *Genome announcements*, 3, e01442-15.
- DANIEL, R. 2004. The soil metagenome—a rich resource for the discovery of novel natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 199-204.
- DANIEL, R. 2005. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 470-478.
- DEMANÈCHE, S., PHILIPPOT, L., DAVID, M. M., NAVARRO, E., VOGEL, T. M. & SIMONET, P. 2009. Characterization of denitrification gene clusters of soil bacteria via a metagenomic approach. *Applied and environmental microbiology*, 75, 534-537.
- DIAZ-TORRES, M. L., VILLEDIEU, A., HUNT, N., MCNAB, R., SPRATT, D. A., ALLAN, E., MULLANY, P. & WILSON, M. 2006. Determining the antibiotic resistance potential of the indigenous oral microbiota of humans using a metagenomic approach. *FEMS microbiology letters*, 258, 257-262.

- DIDELOT, X. 2010. Sequence-Based Analysis of Bacterial Population Structures, in *Bacterial Population Genetics in Infectious Disease* (eds D. A. Robinson, D. Falush and E. J. Feil), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470600122.ch3
- DIONISI, H. M., LOZADA, M. & OLIVERA, N. L. 2012. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Rev Argent Microbiol*, 44, 49-60.
- DU, J., ET AL. 2014. Identification and Characterization of a Ginsenoside-Transforming β -Glucosidase from *Pseudonocardia* sp. Gsoil 1536 and Its Application for Enhanced Production of Minor Ginsenoside Rg2(S). *PLoS ONE* 9, e96914
- ENDO, K., HAYASHI, Y., HIBI, T., HOSONO, K., BEPPU, T. & UEDA, K. 2003. Enzymological characterization of EpoA, a laccase-like phenol oxidase produced by *Streptomyces griseus*. *Journal of biochemistry*, 133, 671-677.
- FANG, Z.-M., LI, T.-L., CHANG, F., ZHOU, P., FANG, W., HONG, Y.-Z., ZHANG, X.-C., PENG, H. & XIAO, Y.-Z. 2012. A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability. *Bioresource technology*, 111, 36-41.
- FANG, Z., LI, T., WANG, Q., ZHANG, X., PENG, H., FANG, W., HONG, Y., GE, H. & XIAO, Y. 2011. A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. *Applied microbiology and biotechnology*, 89, 1103-1110.
- FANG, Z., LIU, X., CHEN, L., SHEN, Y., ZHANG, X., FANG, W., WANG, X., BAO, X. & XIAO, Y. 2015. Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. *Biotechnology for biofuels*, 8, 1.
- FENG, S., SU, Y., DONG, M., HE, X., KUMARESAN, D., O'DONNELL, A. G., WU, J. & CHEN, X. 2015. Laccase activity is proportional to the abundance of bacterial laccase-like genes in soil from subtropical arable land. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 2039-2045.
- FENG, Y., DUAN, C.-J., PANG, H., MO, X.-C., WU, C.-F., YU, Y., HU, Y.-L., WEI, J., TANG, J.-L. & FENG, J.-X. 2007. Cloning and identification of novel cellulase genes from uncultured microorganisms in rabbit cecum and characterization of the expressed cellulases. *Applied microbiology and biotechnology*, 75, 319-328.
- FERNANDES, T. A. R., DA SILVEIRA, W. B., PASSOS, F. M. L. & ZUCCHI, T. D. 2014. Oligonucleotide primers for specific detection of actinobacterial laccases from superfamilies I and K. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 391-398.

- FERRER, M., BELOQUI, A. & GOLYSHIN, P. N. 2010. Screening metagenomic libraries for laccase activities. *Metagenomics: Methods and Protocols*, 189-202.
- FERRER, M., GOLYSHINA, O. V., CHERNIKOVA, T. N., KHACHANE, A. N., DOS SANTOS, V. A. M., YAKIMOV, M. M., TIMMIS, K. N. & GOLYSHIN, P. N. 2005. Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin. *Chemistry & biology*, 12, 895-904.
- FERRER, M., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M., BARGIELA, R., STREIT, W. R., GOLYSHINA, O. V. & GOLYSHIN, P. N. 2016. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. *Microbial biotechnology*, 9, 22-34.
- FINN, R. D., MISTRY, J., TATE, J., COGILL, P., HEGER, A., POLLINGTON, J. E., GAVIN, O. L., GUNASEKARAN, P., CERIC, G. & FORSLUND, K. 2009. The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, gkp985.
- FLÓREZ, C. 2001. Pautas y Prioridades en la Investigación de la Diversidad Microbiana p. 1-4. *Importancia de la DM en términos de conocimiento, conservación y uso sostenible, recomendando pautas de acción sobre el tema para Colombia, Bogotá-Colombia*.
- FOROOTANFAR, H., REZAEI, S., ZEINVAND-LORESTANI, H., TAHMASBI, H., MOGHARABI, M., AMERI, A. & FARAMARZI, M. A. 2016. Studies on the laccase-mediated decolorization, kinetic, and microtoxicity of some synthetic azo dyes. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 14, 1.
- FRANCIS, C. A. & TEBO, B. M. 2001. cumA Multicopper Oxidase Genes from Diverse Mn (II)-Oxidizing and Non-Mn (II)-Oxidizing *Pseudomonas* Strains. *Applied and environmental microbiology*, 67, 4272-4278.
- FU, J., LEIROS, H.-K. S., DE PASCALE, D., JOHNSON, K. A., BLENCKE, H.-M. & LANDFALD, B. 2013. Functional and structural studies of a novel cold-adapted esterase from an Arctic intertidal metagenomic library. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 3965-3978.
- GERMANN, U. A. & LERCH, K. 1986. Isolation and partial nucleotide sequence of the laccase gene from *Neurospora crassa*: amino acid sequence homology of the protein to human ceruloplasmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 8854-8858.
- GILL, S. R., POP, M., DEBOY, R. T., ECKBURG, P. B., TURNBAUGH, P. J., SAMUEL, B. S., GORDON, J. I., RELMAN, D. A., FRASER-LIGGETT, C. M. & NELSON, K. E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *science*, 312, 1355-1359.
- GUAN, Z.-B., SHUI, Y., SONG, C.-M., ZHANG, N., CAI, Y.-J. & LIAO, X.-R. 2015. Efficient secretory production of CotA-laccase and its application in the decolorization and detoxification of industrial textile wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 9515-9523.
- GUAZZARONI, M. E., MORGANTE, V., MIRETE, S. & GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. 2013. Novel acid resistance genes from the metagenome of the Tinto River, an extremely acidic environment. *Environmental microbiology*, 15, 1088-1102.

- HANDELSMAN, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68, 669-685.
- HEATH, C., HU, X. P., CARY, S. C. & COWAN, D. 2009. Identification of a novel alkaliphilic esterase active at low temperatures by screening a metagenomic library from antarctic desert soil. *Applied and environmental microbiology*, 75, 4657-4659.
- HERNÁNDEZ-LEÓN, R., VELÁZQUEZ-SEPÚLVEDA, I., OROZCO-MOSQUEDA, M. & SANTOYO, G. 2010. Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (Buenos Aires)*, 79, 133-139.
- HOEGGER, P. J., NAVARRO-GONZALEZ, M., KILARU, S., HOFFMANN, M., WESTBROOK, E. D. & KÜES, U. 2004. The laccase gene family in *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). *Current genetics*, 45, 9-18.
- HU, X. P., HEATH, C., TAYLOR, M. P., TUFFIN, M. & COWAN, D. 2012. A novel, extremely alkaliphilic and cold-active esterase from Antarctic desert soil. *Extremophiles*, 16, 79-86.
- HUFFMAN, D. L., HUYETT, J., OUTTEN, F. W., DOAN, P. E., FINNEY, L. A., HOFFMAN, B. M. & O'HALLORAN, T. V. 2002. Spectroscopy of Cu (II)-PcoC and the multicopper oxidase function of PcoA, two essential components of *Escherichia coli* pco copper resistance operon. *Biochemistry*, 41, 10046-10055.
- HÜTTERMANN, A., MAI, C. & KHARAZIPOUR, A. 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied microbiology and biotechnology*, 55, 387-394.
- IQBAL, H. A., FENG, Z. & BRADY, S. F. 2012. Biocatalysts and small molecule products from metagenomic studies. *Current opinion in chemical biology*, 16, 109-116.
- JEON, J. H., KIM, J.-T., KANG, S. G., LEE, J.-H. & KIM, S.-J. 2009. Characterization and its potential application of two esterases derived from the arctic sediment metagenome. *Marine biotechnology*, 11, 307-316.
- JIAO, Y., CHEN, X., WANG, X., LIAO, X., XIAO, L., MIAO, A., WU, J. & YANG, L. 2013. Identification and characterization of a cold-active phthalate esters hydrolase by screening a metagenomic library derived from biofilms of a wastewater treatment plant. *PloS one*, 8, e75977.
- JIMÉNEZ, D. J., ANDREOTE, F. D., CHAVES, D., MONTAÑA, J. S., OSORIO-FORERO, C., JUNCA, H., ZAMBRANO, M. M. & BAENA, S. 2012a. Structural and functional insights from the metagenome of an acidic hot spring microbial planktonic community in the Colombian Andes. *PloS one*, 7, e52069.
- JIMÉNEZ, D. J., MONTANA, J. S., ALVAREZ, D. & BAENA, S. 2012b. A novel cold active esterase derived from Colombian high Andean forest soil metagenome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 361-370.
- KATOH, K. & TOH, H. 2008. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in bioinformatics*, 9, 286-298.

- KIISKINEN, L. L., RÄTTÖ, M. & KRUUS, K. 2004. Screening for novel laccase-producing microbes. *Journal of applied microbiology*, 97, 640-646.
- KIM, D., PARK, H. J., KIM, I.-C. & YIM, J. H. 2014. A new approach for discovering cold-active enzymes in a cell mixture of pure-cultured bacteria. *Biotechnology letters*, 36, 567-573.
- KIM, Y.-J., CHOI, G.-S., KIM, S.-B., YOON, G.-S., KIM, Y.-S. & RYU, Y.-W. 2006. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein expression and purification*, 45, 315-323.
- KNIETSCH, A., WASCHKOWITZ, T., BOWIEN, S., HENNE, A. & DANIEL, R. 2003. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 69, 1408-1416.
- KOSCHORRECK, K., SCHMID, R. D. & URLACHER, V. B. 2009. Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis. *BMC biotechnology*, 9, 1.
- KUMAR, S., PHALE, P. S., DURANI, S. & WANGIKAR, P. P. 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnology and Bioengineering*, 83, 386-394.
- KUR, J. & TURKIEWICZ, M. 2009. Identification and molecular modeling of a novel lipase from an Antarctic soil metagenomic library. *POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW POLISH SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS*, 58, 199-204.
- LAIRD, S. A. & TEN KATE, K. 2002. Biodiversity prospecting: the commercial use of genetic resources and best practice in benefit-sharing. *Biodiversity and traditional knowledge: equitable partnerships in practice*. London: Earthscan.
- LAWTON, T. J., SAYAVEDRA-SOTO, L. A., ARP, D. J. & ROSENZWEIG, A. C. 2009. Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase implications for the evolution of multicopper blue proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 10174-10180.
- LEE, D.-G., JEON, J. H., JANG, M. K., KIM, N. Y., LEE, J. H., LEE, J.-H., KIM, S.-J., KIM, G.-D. & LEE, S.-H. 2007. Screening and characterization of a novel fibrinolytic metalloprotease from a metagenomic library. *Biotechnology letters*, 29, 465-472.
- LEE, M. H. & LEE, S.-W. 2013. Bioprospecting potential of the soil metagenome: novel enzymes and bioactivities. *Genomics & informatics*, 11, 114-120.
- LEE, S.-W., WON, K., LIM, H. K., KIM, J.-C., CHOI, G. J. & CHO, K. Y. 2004. Screening for novel lipolytic enzymes from uncultured soil microorganisms. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, 720-726.
- LEIS, B., ANGELOV, A., MIENTUS, M., LI, H., PHAM, V. T., LAUINGER, B., BONGEN, P., PIETRUSZKA, J., GONÇALVES, L. G. & SANTOS, H. 2015. Identification of novel esterase-active enzymes from hot environments by use of the host bacterium *Thermus thermophilus*. *Frontiers in microbiology*, 6, 275.

- LIU, J., TAN, L., WANG, J., WANG, Z., NI, H. & LI, L. 2016. Complete biodegradation of chlorpyrifos by engineered *Pseudomonas putida* cells expressing surface-immobilized laccases. *Chemosphere*, 157, 200-207.
- LU, L., ZHAO, M., LI, G.-F., LI, J., WANG, T.-N., LI, D.-B. & XU, T.-F. 2012. Decolorization of synthetic dyes by immobilized spore from *Bacillus amyloliquefaciens*. *Catalysis Communications*, 26, 58-62.
- LUO, L., ZHOU, Z.-C. & GU, J.-D. 2015. Distribution, diversity and abundance of bacterial laccase-like genes in different particle size fractions of sediments in a subtropical mangrove ecosystem. *Ecotoxicology*, 24, 1508-1516.
- MACHCZYNSKI, M. C., VIJGENBOOM, E., SAMYN, B. & CANTERS, G. W. 2004. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. *Protein Science*, 13, 2388-2397.
- MARTIN, M., BIVER, S., STEELS, S., BARBEYRON, T., JAM, M., PORTETELLE, D., MICHEL, G. & VANDENBOL, M. 2014. Identification and characterization of a halotolerant, cold-active marine Endo- β -1, 4-Glucanase by using functional metagenomics of seaweed-associated microbiota. *Applied and environmental microbiology*, 80, 4958-4967.
- MARTINS, L. O., SOARES, C. M., PEREIRA, M. M., TEIXEIRA, M., COSTA, T., JONES, G. H. & HENRIQUES, A. O. 2002. Molecular and Biochemical Characterization of a Highly Stable Bacterial Laccase That Occurs as a Structural Component of the *Bacillus subtilis* Endospore Coat. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 18849-18859.
- MARUTHAMUTHU, M., JIMÉNEZ, D. J., STEVENS, P. & VAN ELSAS, J. D. 2016. A multi-substrate approach for functional metagenomics-based screening for (hemi) cellulases in two wheat straw-degrading microbial consortia unveils novel thermoalkaliphilic enzymes. *BMC genomics*, 17, 1.
- MAYER, A. M. & STAPLES, R. C. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60, 551-565.
- MCGUIRL, M. A. & DOOLEY, D. M. 1999. Copper-containing oxidases. *Current opinion in chemical biology*, 3, 138-144.
- MIRETE, S., DE FIGUERAS, C. G. & GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. 2007. Novel nickel resistance genes from the rhizosphere metagenome of plants adapted to acid mine drainage. *Applied and environmental microbiology*, 73, 6001-6011.
- MOGHADAM, M. S., ALBERSMEIER, A., WINKLER, A., CIMMINO, L., RISE, K., HOHMANN-MARRIOTT, M. F., KALINOWSKI, J., RÜCKERT, C., WENTZEL, A. & LALE, R. 2016. Isolation and genome sequencing of four Arctic marine *Psychrobacter* strains exhibiting multicopper oxidase activity. *BMC genomics*, 17, 1.
- MONTANA, J. S., JIMÉNEZ, D. J., HERNÁNDEZ, M., ÁNGEL, T. & BAENA, S. 2012. Taxonomic and functional assignment of cloned sequences from high Andean forest soil metagenome. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101, 205-215.
- MORAN, K., KING, S. R. & CARLSON, T. J. 2001. Biodiversity prospecting: lessons and prospects. *Annual Review of Anthropology*, 505-526.

- MORGANTE, V., MIRETE, S., FIGUERAS, C. G., POSTIGO CACHO, M. & GONZÁLEZ-PASTOR, J. E. 2015. Exploring the diversity of arsenic resistance genes from acid mine drainage microorganisms. *Environmental microbiology*, 17, 1910-1925.
- MORI, T., MIZUTA, S., SUENAGA, H. & MIYAZAKI, K. 2008. Metagenomic screening for bleomycin resistance genes. *Applied and environmental microbiology*, 74, 6803-6805.
- MULLANY, P. 2014. Functional metagenomics for the investigation of antibiotic resistance. *Virulence*, 5, 443-447.
- MURUGESAN, K. 2003. Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Indian journal of experimental biology*, 41, 1239-1248.
- MUTHUKUMARASAMY, N. P. & MURUGAN, S. 2014. Production, purification and application of bacterial laccase: a review. *Biotechnology*, 13, 196.
- NAKAMURA, K., KAWABATA, T., YURA, K. & GO, N. 2003. Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution. *FEBS letters*, 553, 239-244.
- OLALDE, V. & AGUILERA, L. 1998. Microorganismos y biodiversidad. Irapuato, México. *Terra*, 3, 289-292.
- OLEMBO, R. & HAWKSWORTH, D. Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity. Biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture. Proceedings of the First Workshop on the Ecological Foundations of Sustainable Agriculture (WEFSA 1), London, UK, 26-27 July 1990., 1991. CAB International, 7-15.
- PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., SCALONI, A., CAPASSO, A. & SANNIA, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 31301-31307.
- REISS, R., IHSEN, J., RICHTER, M., EICHHORN, E., SCHILLING, B. & THÖNY-MEYER, L. 2013. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. *PloS one*, 8, e65633.
- REVOLLO ESCUDERO, E. L., SERNA DAZA, O. D. & HERNÁNDEZ TORRES, J. 2012. Caracterización de actinobacterias raras, degradadoras de lignocelulosa: Demostración de actividad lacasa en dos aislados de *Tsukamurella* sp y *Cellulosimicrobium* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14, 70-80.
- RHEE, J.-K., AHN, D.-G., KIM, Y.-G. & OH, J.-W. 2005. New thermophilic and thermostable esterase with sequence similarity to the hormone-sensitive lipase family, cloned from a metagenomic library. *Applied and environmental microbiology*, 71, 817-825.
- RIESENFELD, C. S., SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. 2004. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 525-552.
- RIZZO, L., MANAIA, C., MERLIN, C., SCHWARTZ, T., DAGOT, C., PLOY, M., MICHAEL, I. & FATTA-KASSINOS, D. 2013. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the total environment*, 447, 345-360.

- ROBERTS, S. A., WEICHSEL, A., GRASS, G., THAKALI, K., HAZZARD, J. T., TOLLIN, G., RENSING, C. & MONTFORT, W. R. 2002. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 2766-2771.
- RONDON, M. R., AUGUST, P. R., BETTERMANN, A. D., BRADY, S. F., GROSSMAN, T. H., LILES, M. R., LOIACONO, K. A., LYNCH, B. A., MACNEIL, I. A. & MINOR, C. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 66, 2541-2547.
- RONDON, M. R., GOODMAN, R. M. & HANDELSMAN, J. 1999. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends in biotechnology*, 17, 403-409.
- ROSE, T. M., HENIKOFF, J. G. & HENIKOFF, S. 2003. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate hybrid oligonucleotide primer) PCR primer design. *Nucleic acids research*, 31, 3763-3766.
- RUIJSSENAARS, H. & HARTMANS, S. 2004. A cloned *Bacillus halodurans* multicopper oxidase exhibiting alkaline laccase activity. *Applied microbiology and biotechnology*, 65, 177-182.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4, 406-425.
- SAMBROOK J. & RUSSELL D. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory manual 3ed. Chapter 6 Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA y Chapter 7 Extraction, Purification, and Analysis of mRNA from Eukaryotic Cells.
- SANCHEZ-AMAT, A., LUCAS-ELÍO, P., FERNÁNDEZ, E., GARCÍA-BORRÓN, J. C. & SOLANO, F. 2001. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547, 104-116.
- SCANLON, T. C., DOSTAL, S. M. & GRISWOLD, K. E. 2014. A high-throughput screen for antibiotic drug discovery. *Biotechnology and Bioengineering*, 111, 232-243.
- SARAVANAN D., RADHAKRISHNAN M. & BALAGURUNATHAN R. 2015. Bioprospecting of bacteria from less explored ecosystem *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3):852-857
- SCHLOSS, P. D. & HANDELSMAN, J. 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 303-310.
- SCHMEISSER, C., H. STEELE, AND W. R. STREIT. 2007. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 75:955-962.
- SEO, S., LEE, Y.-S., YOON, S.-H., KIM, S.-J., CHO, J. Y., HAHN, B.-S., KOO, B.-S. & LEE, C.-M. 2014. Characterization of a novel cold-active

- esterase isolated from swamp sediment metagenome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 879-886.
- SHARMA, P., GOEL, R. & CAPALASH, N. 2007. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 823-832.
- SHARMA, S., KHAN, F. G. & QAZI, G. N. 2010. Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1821-1828.
- SIMON, C., HERATH, J., ROCKSTROH, S. & DANIEL, R. 2009. Rapid identification of genes encoding DNA polymerases by function-based screening of metagenomic libraries derived from glacial ice. *Applied and environmental microbiology*, 75, 2964-2968.
- SOLANO, F., LUCAS-ELÍO, P., LÓPEZ-SERRANO, D., FERNÁNDEZ, E. & SANCHEZ-AMAT, A. 2001. Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS microbiology letters*, 204, 175-181.
- SOLOMON, E. I. & LOWERY, M. D. 1993. Electronic structure contributions to function in bioinorganic chemistry. *science*, 259, 1575-1581.
- SOMMER, M. O., ET AL. 2014. A functional metagenomic approach for expanding the synthetic biology toolbox for biomass conversion. *Mol Syst Biol* 6, 360
- SPICKERMANN, D., KARA, S., BARACKOV, I., HOLLMANN, F., SCHWANEBERG, U., DUENKELMANN, P. & LEGGEWIE, C. 2014. Alcohol dehydrogenase stabilization by additives under industrially relevant reaction conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 103, 24-28.
- STREIT, W. R. & SCHMITZ, R. A. 2004. Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Current opinion in microbiology*, 7, 492-498.
- SUENAGA, H., OHNUKI, T. & MIYAZAKI, K. 2007. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds. *Environmental microbiology*, 9, 2289-2297.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, 28, 2731-2739.
- TERRÓN-GONZÁLEZ L., GENILLOUD O. AND E. SANTERO. 2014. Metagenomics, methods, applications and perspectives. Chapter 1 Potential and limitations of metagenomic functional analyses. Ed. Camilla Benedetti. 193: 1-43
- TCHIGVINTSEV, A., TRAN, H., POPOVIC, A., KOVACIC, F., BROWN, G., FLICK, R., HAJIGHASEMI, M., EGOROVA, O., SOMODY, J. C. & TCHIGVINTSEV, D. 2015. The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxylesterases from marine metagenomes. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 2165-2178.

- THURSTON, C. F. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 140, 19-26.
- TIRAWONGSAROJ, P., SRIPRANG, R., HARNPICHARNCHAI, P., THONGARAM, T., CHAMPREDA, V., TANAPONGPIPAT, S., POOTANAKIT, K. & EURWILAICHITR, L. 2008. Novel thermophilic and thermostable lipolytic enzymes from a Thailand hot spring metagenomic library. *Journal of Biotechnology*, 133, 42-49.
- TOBAR-TOSSE, F., RODRÍGUEZ, A. C., VÉLEZ, P. E., ZAMBRANO, M. M. & MORENO, P. A. 2013. Exploration of noncoding sequences in metagenomes. *PloS one*, 8, e59488.
- TORRES, O. D. & VELHO, L. 2009. Bioprospecting an international cooperation mechanism for strength the capabilities in Science and Technology in Colombia. *Ciência da Informação*, 38, 96-110.
- TORSVIK, V. & ØVREÅS, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Current opinion in microbiology*, 5, 240-245.
- TYSON, G. W., CHAPMAN, J., HUGENHOLTZ, P., ALLEN, E. E., RAM, R. J., RICHARDSON, P. M., SOLOVYEV, V. V., RUBIN, E. M., ROKHSAR, D. S. & BANFIELD, J. F. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428, 37-43.
- UCHIYAMA, T., ABE, T., IKEMURA, T. & WATANABE, K. 2005. Substrate-induced gene-expression screening of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nature biotechnology*, 23, 88-93.
- UCHIYAMA, T. & MIYAZAKI, K. 2009. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 616-622.
- UCHIYAMA, T. & MIYAZAKI, K. 2010. Product-Induced Gene Expression, a Product-Responsive Reporter Assay Used To Screen Metagenomic Libraries for Enzyme-Encoding Genes. *Journal/Appl. Envir. Microbiol.* 76, 7029-7035
- UNTERGASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, ET AL. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*;40(15):e115. doi:10.1093/nar/gks596.
- VAVOURAKIS, C. D., GHAI, R., RODRIGUEZ-VALERA, F., SOROKIN, D. Y., TRINGE, S. G., HUGENHOLTZ, P. & MUYZER, G. 2016. Metagenomic insights into the uncultured diversity and physiology of microbes in four hypersaline soda lake brines. *Frontiers in microbiology*, 7.
- VESTER, J. K., GLARING, M. A. & STOUGAARD, P. 2014. Discovery of novel enzymes with industrial potential from a cold and alkaline environment by a combination of functional metagenomics and culturing. *Microbial cell factories*, 13, 1.
- VESTER, J. K., GLARING, M. A. & STOUGAARD, P. 2015a. An exceptionally cold-adapted alpha-amylase from a metagenomic library of a cold and

- alkaline environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 717-727.
- VESTER, J. K., GLARING, M. A. & STOUGAARD, P. 2015b. Improved cultivation and metagenomics as new tools for bioprospecting in cold environments. *Extremophiles*, 19, 17-29.
- WANG, H., GONG, Y., XIE, W., XIAO, W., WANG, J., ZHENG, Y., HU, J. & LIU, Z. 2011. Identification and characterization of a novel thermostable gh-57 gene from metagenomic fosmid library of the Juan de Fuca Ridge hydrothermal vent. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164, 1323-1338.
- WANG, K., LI, G., YU, S. Q., ZHANG, C. T. & LIU, Y. H. 2010. A novel metagenome-derived β -galactosidase: gene cloning, overexpression, purification and characterization. *Applied microbiology and biotechnology*, 88, 155-165.
- WASCHKOWITZ, T., ROCKSTROH, S. & DANIEL, R. 2009. Isolation and characterization of metalloproteases with a novel domain structure by construction and screening of metagenomic libraries. *Applied and environmental microbiology*, 75, 2506-2516.
- WEIRICK, T., SAHU, S. S., MAHALINGAM, R. & KAUNDAL, R. 2014. LacSubPred: predicting subtypes of Laccases, an important lignin metabolism-related enzyme class, using in silico approaches. *BMC bioinformatics*, 15, 1.
- WEN-PING C. & TSONG- TEH K. 1993. A simple and rapid method for the preparation gram – negative bacterial genomic DNA. *Nucleic acid research* vol 21 N° 9: 2260.
- WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I. & AGATHOS, S. N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology advances*, 22, 161-187.
- WIERZBICKA-WOŚ, A., BARTASUN, P., CIEŚLIŃSKI, H. & KUR, J. 2013. Cloning and characterization of a novel cold-active glycoside hydrolase family 1 enzyme with β -glucosidase, β -fucosidase and β -galactosidase activities. *BMC biotechnology*, 13, 1.
- XING, M.-N., ZHANG, X.-Z. & HUANG, H. 2012. Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis. *Biotechnology advances*, 30, 920-929.
- YU, E. Y., KWON, M.-A., LEE, M., OH, J. Y., CHOI, J.-E., LEE, J. Y., SONG, B.-K., HAHM, D.-H. & SONG, J. K. 2011. Isolation and characterization of cold-active family VIII esterases from an arctic soil metagenome. *Applied microbiology and biotechnology*, 90, 573-581.
- ZAMBRANO MM, S. BAENA, I. BALZER, D. ALVAREZ, E. TORRES, MI. CHACÓN ET AL. 2010. Third Progress Report and Final Report – PHASE I. Colombian Center for Genomics and Bioinformatics of Extreme Environments - GEBIX: Bogotá
- ZAMBRANO MM, S. BAENA, D. ALVAREZ, O. ACEVEDO, E. TORRES, MI. CHACÓN ET AL. 2012. Gebix - Informe Técnico Final. Año 2011 (Año 1 - Fase II). Centro Gebix: Bogotá.

ZENG, J., ZHU, Q., WU, Y. & LIN, X. 2016. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons using *Bacillus subtilis* CotA with high laccase activity and copper independence. *Chemosphere*, 148, 1-7.

10. ANEXOS

Anexo 1. Prueba de viabilidad de las colonias

Técnica de recuento en placa por siembra en superficie.

Obtención de diluciones seriadas del cultivo. Se siembra (con palillos estériles) en medio LB sólido suplementado con cloranfenicol [12,5 µg/ml], cada uno de los pozos de las bibliotecas, se incuba por 24h a 37°C. Se transfirieren a medio LB líquido con cloranfenicol [12,5 µg/ml] (cm) se incuba a 37°C por 16h con agitación constante a 150rpm.

Marcar los 6 tubos de solución salina con las diluciones 10⁻¹, 10⁻²,.....10⁻⁶

1. Utilizando la pipeta de 1 ml con punta estéril, transferir asépticamente 0.5 ml del cultivo de *E. coli* (Bibliotecas Metagenómicas) a un primer tubo de solución salina estéril de 4.5 ml. (dilución 10⁻¹). Retirar la punta y colocarla en el contenedor.
2. Mezclar la suspensión con un vortex durante unos segundos.
3. Con una nueva punta de pipeta estéril, transferir 0.5 ml al siguiente tubo de dilución (dilución 10⁻²).
4. Retirar la punta y colocarla en el contenedor.
5. Repetir el paso anterior hasta obtener la dilución 10⁻⁶.

Siembra en placa de petri

1. Prender el mechero y agregar 20 ml de medio LB+ agar fundido a una temperatura no mayor de 45° a cada caja. Dejar la tapa medio puesta (para

evitar condensación) e imprimir a la placa movimientos circulares suaves en un sentido y otro (aproximadamente 5 veces cada sentido).

2. Dejar solidificar, cerrar la caja y flamear, invertir la placa de manera que la tapa quede en la base.

3. Una vez que el medio este sólido y firme, se inocula el mismo con 0.1 ml de la dilución a analizar, esparciendo el inóculo con ayuda de una espátula de Drigalsky hasta su absorción total por parte del medio.

4. Se cierra la placa (papel parafilm), se invierte y se incuba durante 48 hs a 35°C.

Las placas sin inóculo pueden ser almacenadas en la nevera a 4°C hasta su uso, las placas se deben guardar invertidas de manera que la tapa quede en la base.

.

Recuento de las colonias

1. Tras la incubación, se observan las colonias bacterianas sobre la superficie del agar. Cada colonia representa a una unidad formadora de colonia (UFC). Usualmente una UFC se corresponde con una célula viable.

2. Seleccionar las placas de la dilución que haya producido un número de colonias comprendido entre 30-300 y contar el número de colonias presentes.

En el ejemplo: 125 colonias

El resultado debe expresarse como UFC/ml para ello se multiplica el promedio del nº de colonias obtenido por el inverso de la dilución final de la muestra.

$$\text{UFC/ml} = 125 \times 10 \times 10^6 = 125 \times 10^7$$

Anexo 2. Protocolo Réplica de bibliotecas

Para la realización de la réplica de las bibliotecas se procederá a repicar las microplacas de la librería de BAA de diciembre de 2009.

Una copia se realizó en placas de 386 pozos y la otra en placas de 96 pozos, en el caso de las de 96, para cubrir los 384 pozos se utilizaron 4 placas de 96 pozos y se numeraron de la 1 a la 4.

1. En cada pozo de la placa estéril de 96 pozos se colocara 400µl de medio de crecimiento (LB líquido estándar + cloranfenicol 12.5 µg/ml). En las de 384 se coloca 40ul.
2. Luego se replica con palillos estériles cada clono (s) de cada pozo de la librería original en cada pozo de la microplaca a la cual se le coloco los 400ul ó 40 ul de medio. Este paso debe ser muy rápido para evitar el descongelamiento completo de la librería original.
3. Se deja overnight a 37°C a 200rpm en el Sheaker Incubadora.
4. Después del crecimiento, se adiciona 200 µl de medio para almacenar (LB líquido estándar + cloranfenicol 12.5 µg/ml + glicerol estéril al 40% para obtener una concentración final de 20% de glicerol), en el caso de la placa de 384 se coloca 20ul a cada pozo completando así el volumen total.
5. Las placas se sellan con papel film metalizado y se almacenan a -80°C hasta la realización del tamizaje correspondiente.

Nota: Para evitar la evaporación del medio en los pozos que quedan en la parte exterior de las placas se recomienda hacer la réplica placas de 96.

Anexo 3. Protocolo Extracción de ADN fosmídico con FosmidMAX DNA Purification Kit Epicentre a partir de una colonia

Se puede partir del crecimiento en 2 ml de LB de una colonia ó del crecimiento de 100ul de una suspensión de células en 2ml de medio LB.

1. Partiendo de un cultivo de 1.5ml.
2. Se mide el OD de 600 de las células cultivadas (Nanodrop 2000) para garantizar una buena cantidad de ADN.
3. Luego se genera el *pellet* de las células centrifugando por 2 minutos a 12000 rpm 4°C.
4. Se adiciona 200µl de la *FosmidMAX Solución 1*, y se resuspende completamente el *pellet*.
5. Se adiciona 600µl de *FosmidMAX Solución 2*, se agita por inversión del tubo 3 veces suavemente, esta reacción de lisis no excede los 5 minutos.
6. Se adiciona 400 µl de *FosmidMAX Solución 3*, se mezcla por inversión del tubo 3 veces suavemente, formándose un precipitado blanco dentro del tubo.
7. Se encuba durante 30 min sobre hielo, posteriormente se centrifuga durante 25 min a 12000rpm a 4°C, se repite este paso una vez más para peletear los residuos que quedan sueltos.

8. Se transfiere el sobrenadante a un tubo de 1.5ml, teniendo cuidado de no tomar el precipitado blanco, se adiciona 0,6 volúmenes de isopropanol al sobrenadante y se mezcla por inversión suave.

1200ul en total, seis volúmenes serian 720ul de isopropanol. (1200*0.6)

9. Se centrifuga a 12.000 rpm por 15min a 4°C, cuidadosamente. Se extrae el isopropanol y se realiza una corta centrifugación para sacar los residuos de isopropanol.

10. Se deja secar el *pellet* al aire por 4 min y se resuspende en 250µl de *Fosmid MAX solución 4* frio, se mezcla por agitación circular del tubo y se incuba esta reacción por 15min sobre hielo, se centrifuga el tubo a máxima velocidad por 20min a 4°C a 12.000rpm, y cuidadosamente se extrae el sobrenadante en otro tubo nuevo, sin romper el *pellet*.

11. Se adiciona 1ml de etanol absoluto y se mezcla por agitación suave, posteriormente se precipita el ADN por centrifugación a máxima velocidad por 30min a 4°C, se retira el etanol sin romper el *pellet* y se realiza una segunda centrifugación de 10min a máxima velocidad para sacar el exceso de etanol.

12. Se deja secar el *pellet* a temperatura ambiente por 4min, y se resuspende en 25µl de *Buffer TE*, se deja 10min a temperatura ambiente para que el *pellet* se suelte.

13. Se adiciona 1µl de *RNasa RiboShredder* diluida (1:4 en buffer TE) al tubo, se mezcla la reacción y se incuba a 37°C durante 30 min.

14. Se cuantifica el ADN (Nanodrop 2000) y se corre una muestra en gel de agarosa al 0,8% 16h a 30voltios, se guarda el ADN restante -20°C.

Anexo 4. Protocolo electroforesis

Para preparar un gel de 30ml 1% de agarosa.

1. Pese 0.30 gr de agarosa.
2. Coloque la agarosa dentro de un erlenmeyer que contenga 30mL de buffer TAE 1X, calentar en el microondas o en el baño de María hasta su completa disolución (90 segundos).
3. Cuando la solución de agarosa haya alcanzado una temperatura soportable por la mano, sirva la solución en la bandeja de corrida vertiendo la solución lentamente por uno de los extremos de la bandeja y retire las burbujas que queden sobre el área de corrida de las muestras con una punta limpia, se vierte en la cámara y se coloca el peine.
4. Deje polimerizar la agarosa por 30min.
5. Para la corrida, llene el tanque de la cámara de electroforesis con buffer TAE 1X hasta cubrir el gel.
6. Conecte los electrodos de la cámara a la fuente de poder, gradúe el voltaje a 70voltios por 1hora y 30 min de corrida (para AND genómico y productos de PCR; para ADNfosmídico correr a 30v por 16 horas en una cámara de 60ml), verifique las bandas en el transiluminador.

La tinción del gel se puede realizar con Ez visión o Sybr Green teniendo en cuenta lo siguiente:

- **Sybr en el gel:** se coloca 3 ul Syber Green cuando la solución de agarosa sale del microondas y llega a temperatura soportable por la mano para un gel de, 30ml de TAE 1X. Para el montaje de las muestras

se debe cargar 2ul buffer de carga para cada muestra, 4ul de marcador molecular 1kb Bio Line (el marcador debe agitarse antes de ser usado) y 3 ul de la muestra a evaluar.

Sybr Green después de correr el gel: Colocar una proporción de 1 en 10 de Syber Green en Buffer de corrida (TAE 1X) en un recipiente de tal manera que el buffer cubra el gel y dejar por 40 min. Revisar en el trasiluminador.

- **Ez vision (Amresco):** la muestra se carga con 1ul de Ez visión. El Ez visión se debe vorterizar por 15 min antes de usar. Para el montaje de las muestras se debe cargar 1 ul de Ez visión por cada muestra, 3 ul de la muestra a evaluar, 4ul de marcador molecular 1kb Bio Line (el marcador debe agitarse antes de ser usado).

Anexo 5. Extracciones de ADN genómico controles positivos Isolate II genomic DNA kit BIOLINE bacterias gram + (Modificado del protocolo del kit).

1. Tomar 1 mL de cultivo bacteriano – medir OD
2. Centrifugar por 5 min a 8000g (9200rpm) y remover sobrenadante
3. Resuspender el Pellet en 180uL en buffer de lisis GL y 25uL de proteinasa K, dar vórtex vigorosamente e incubar a 56°C por 1-3 horas (o toda la noche para completar lisado, ponerlo en shaker o vórtex ocasionalmente). **SI SE AISLA ADN DE BACTERIAS GRAM (+)**, antes de agregar la proteinasa K, preincubar la mezcla a 37°C suplementada con LISIZYMAS o LISOSTAFIN, durante 30 a 60 min. Luego agregar la proteinasa K e incubar a 56°C de 1 a 3 horas.
4. Dar vórtex a la mezcla y adicionar luego 200uL de buffer de lisis G3. Dar vórtex vigorosamente e incubar a 70°C por 10 min (Si se observa partículas insolubles, centrifugar a las máximas revoluciones durante 5 min, recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo)

5. Dar vórtex brevemente y adicionar 210uL de etanol absoluto y dar vórtex vigorosamente
6. Adicionar toda la muestra sobre la columna (spin column) y centrifugar a 11000g (10900rpm) durante 1 min. Descartar sobrenadante y reusar el tubo de colección.
7. Adicionar 500uL de Buffer de lavado GW1, centrifugar a 11000g (10900rpm) por 1min. Descartar el sobrenadante y reusar el tubo de colección directamente
8. Adicionar 600uL de Buffer de lavado GW2 a la columna y centrifugar a 11000g (10900rpm) por 1 min, descartar el sobrenadante y reusar el tubo de colección.
9. Centrifugar a 11000rpm por 1 min, remover los residuos de etanol
10. Colocar la spin column en un tubo de 1.5mL. Adicionar 100uL de Buffer de elución G (70°C) directamente en la muestra de sílica. Incubar a T° ambiente por 1 min
11. Centrifugar a 11000g (10900rpm) por 1 min. El sobrenadante que quede en el tubo es donde se encuentra el ADN, la columna se descarta.
12. Almacenar a -20 o -80°C alicuotado.

Anexo 6. Extracciones de ADN genómico controles positivos método convencional bacterias gram – (Modificado del protocolo de (Wen-ping y Tsong- teh 1993)

1. La cepa de interés se creció en 3ml de LB por 18h over night con agitación constante de 150rpm. Previamente se realizó el crecimiento de la cepa, pues es recomendable trabajar con colonias frescas (Las cepas almacenadas en el congelador de -80 se sembraron en estría en medio sólido a 37°C por 24h).
2. Centrifugar 1,5 ml del cultivo por 3 min a 12.000rpm a temperatura ambiente. Se descarta el sobrenadante.

3. Resuspender el pellet y lisar en 200ul de buffer de lisis, pipetear vigorosamente.

Buffer de lisis: preparación libro de protocolos lab. BIMAC-GEBIX pág. 3

- 40mM tris-acetato ph 7.8
- 20Mm acetato de sodio ph 5.2
- 1mM EDTA ph 8
- SDS 1%

4. Adicionar 66ul de NaCl 5M, mezclar vigorosamente.
5. Centrifugar a 12.000rpm a 4°C por 10 min.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, adicionar 1 volumen de cloroformo, invertir el tubo suavemente al menos 50 veces. La solución se torna lechosa. Centrifugar a 12.000 rpm por 3 min a 4°C.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y pipetear el ADN con etanol absoluto, refrigerar a -20°C por 1 hora (se puede de 30min a 1 hora, se dejó 1 hora para garantizar una mejor precipitación del ADN). Centrifugar por 10 min a 12.000rpm.
8. Resuspender en 50ul de TE 1x (se puede Resuspender en agua grado molecular estéril) almacenarlo a -20°C ó -80°C

Nota: el ARN se puede remover adicionando ARNasa en el paso 3 de lisis por 30 minutos a 37°C.

Si cree conveniente, hacer dos lavados más con etanol al 70% (Paso 7), centrifugando a 12000 rpm por 3 min y descartando el sobrenadante.

Anexo7. Cebadores generados a partir de regiones conservadas de lacasas

Iniciales (FORWARD)	Complementos (REVERSE)
Región que contiene HWHG N° secuencias analizadas: 19	
T V H W H G L	H W H G L E I P G
oligo:5'-CCACCGTGCACTggcayggntt-3' degen=32 temp=62.8	angtraccgtrcCGGACCTCTAGGGGC
I P G E V D G G P	oligo:5'-CGGGGATCTCCAGGCcrtgccartgna-3' degen=16 temp=62.7
oligo:5'-GATCCCCGGCGAGGTngayggnggnc-3' degen=128 temp=60.6	H W H G L E I P G
P G E V D G G P	gtraccgtrccGGACCTCTAGGGGC
oligo:5'-CCCGGCGAGGTGgayggnggnc-3' degen=32 temp=61.5	oligo:5'-CGGGGATCTCCAGGccrtgccartg-3' degen=4 temp=62.7
P G E V D G G P Q	W H G L E I P G E
oligo:5'-CCCGGCGAGGTGGayggnggncnc-3' degen=128 temp=61.5	accgtrccnnaCCTCTAGGGGCCGC
G E V D G G P Q	oligo:5'-CGCCGGGGATCTCCannccrtgcca-3' degen=32 temp=63.0
Región que contiene WFHPHXH N° secuencias analizadas: 52	
A A T C W F H P	W F H P H Q H G
oligo:5'-CCGCCGCCACCTGntggwwhcayc-3' degen=96 temp=60.5	accwwdgtrggGGTGGTCGTGCCG
A A T C W F H P	oligo:5'-GCCGTGCTGGTGGggrtgddwwcca-3' degen=24 temp=63.6
oligo:5'-GCCGCCACCTGCtggwwhcaycc-3' degen=24 temp=63.9	F H P H Q H G K T
	ccwwdgtrggngTGGTCGTGCCGTTCT
	GG oligo:5'-

A A T C W F H P H	GGTCTTGCCGTGCTGGTgnggrtgdw wcc-3' degen=96 temp=64.0
oligo:5'- GCCGCCACCTGCTGgwwhcayccnc- 3' degen=96 temp=63.9	F H P H Q H G K T
A A T C W F H P H	cwwdgtrggngtGGTCGTGCCGTTCTG G oligo:5'- GGTCTTGCCGTGCTGGtgnggrtgdw c-3' degen=96 temp=64.0
oligo:5'- GCCGCCACCTGCTGGwwhcayccnca -3' degen=96 temp=63.9	
Región que contiene HPFH XHG N° secuencias analizadas: 54	
E G D M M L H P	M L H P F H I H G
oligo:5'- GCGAGGGCGACATGatgytncaaycc-3' degen=16 temp=62.5	tacrangtrggGAAGGTGTAGGTGCC oligo:5'- CCGTGGATGTGGAAGggrtgncat-3' degen=16 temp=60.9
G D M M L H P F H	H P F H I H G T Q
oligo:5'- GGCGACATGATGCTGcayccnttyca-3' degen=16 temp=61.7	gtrggnaargtGTAGGTGCCGTGGG oligo:5'- GGGTGCCGTGGATGtgraangrtg-3' degen=16 temp=60.5
D M M L H P F H I	P F H I H G T Q F
oligo:5'- CGACATGATGCTGCACccnttycayrt-3' degen=32 temp=62.4	ggnaargtryaGGTGCCGTGGGTCAAG oligo:5'- GAACTGGGTGCCGTGGayrtgraang-3' degen=32 temp=61.8
M M L H P F H I H	F H I H G T Q F R
oligo:5'- CATGATGCTGCACCCCTtycayrtnc-3' degen=32 temp=60.7	aargtryangtGCCGTGGGTCAAGGC oligo:5'- CGGAACTGGGTGCCGtgnayrtgraa-3' degen=32 temp=64.9
L H P F H I H G	H I H G T Q F R I
oligo:5'- TGCTGCACCCCTTCcayrtncaygg-3' degen=32 temp=61.0	gtryangtrccGTGGGTCAAGGCCT oligo:5'- TCCGGAAGTGGGTGccrtgnayrtg-3'
T Q F R I L S E N G	
oligo:5'- ACCCAGTTCCGGATCCTGwsngarray	

gg-3' degen=128 temp=60.9

degen=32 temp=61.7

A H R A G W K D

Región que contiene HCHLLEHE N° secuencias analizadas: 42

M A H C H L L E H

E H A Y M A H C

taccgngtracGGTGGACGACCTCG

oligo:5'-

oligo:5'-

GGAGCACGCCTACatggcncaytg-3'

GCTCCAGCAGGTGGcartgngccat-3'

degen=8 temp=62.8

degen=8 temp=60.7

H C H L L E H E D

E H E D T G M M L

oligo:5'-

ctygttrctyctGTGGCCGTACTACGAC

CACTGCCACCTGCTGgarcaygarga-3'

oligo:5'-

degen=8 temp=60.6

CAGCATCATGCCGGTGtctytrtgytc-3'

degen=8 temp=62.4

H L L E H E D T

H E D T G M M L G

oligo:5'-

gtrctyctrtgGCCGTACTACGACC

GCCACCTGCTGGAGcaygargayac-3'

oligo:5'-

degen=8 temp=60.7

CCAGCATCATGCCGgtrtctytrtg-3'

degen=8 temp=60.2
