

# **Título: Obtención, replicación y análisis de genes de bacterias no cultivables de la laguna de Cuatro Ciénegas.**

**Autores:** Aixel Carmona, Alicia Hernández, Jennifer Hegewisch, David Montante, Thalía Fierro

**Profesor responsable:** Dr. Enrique Galindo

**Escuela:** Colegio Marymount

**Area:** Ciencias (Proyecto de Ciencias Biológicas de tipo experimental)

## **Antecedentes:**

Los antecedentes al estudio de genomas de mar fueron hechos en su mayoría y de manera reciente por J. Craig Venter (presidente del Instituto de Alternativas Biológicas de energía) y su equipo en el Mar de Sargasso.<sup>1</sup> En el Mar de Sargasso filtraron agua con filtros cada vez más pequeños, para recolectar organismos unicelulares de diferentes tamaños y hasta virus. El ADN genómico fue extraído y secuenciado en los laboratorios (es decir ver el orden de los nucleótidos por los cuáles está formado como por ejemplo: Adenina, Guanina, Citosina Uracilo). Al conocer su material genético, podemos compararlo con el de otros organismos y determinar cómo han mutado a través de los años, adquiriendo nuevas características.<sup>2</sup> Después de su análisis bioinformático (a través de computadoras), ellos descubrieron por lo menos 1800 nuevas especies y más de 1.2 millones de nuevos genes. Algunas bacterias resultaron ser mucho más complejas de lo estimado (por ejemplo con capacidad para capturar la luz).<sup>3</sup>

Este proyecto con enfoque en la Ingeniería Genética (manipular genes), tiene como novedad que no sólo vamos a analizar y secuenciar la información genética, sino que además vamos a hacer crecer bacterias con genes de otras bacterias no cultivables en el laboratorio. Esto es muy útil ya que no se sabe cómo reproducir al 99 % de las bacterias.<sup>1</sup> Vamos a tomar muestras de la Laguna de Cuatro Ciénegas, en dónde las bacterias tienen características del periodo Jurásico, pero no son cultivables.<sup>4</sup> El hacer crecer bacterias *E. coli* (las más comunes y fáciles de cultivar en laboratorio), con otro gen no cultivable de la Laguna de Cuatro Ciénegas, y reproducirlas permitiría estudiarlas, ya que de otra manera no podemos saber que características poseen. Sin la posibilidad de cultivarlas por no saber cómo nutrirlas, no podemos saber qué características poseen, y no podemos indagar acerca de sus secuencias.<sup>5</sup>

## **Objetivo:**

El objetivo de esta investigación es insertar genes de bacterias no cultivables en bacterias *Escherichia Coli* (incapaces de sintetizar triptofano: auxótrofas) esperando que alguno de estos genes no cultivables le de la cualidad de sintetizar triptofano.

Reproducir las bacterias modificadas, purificar el plásmido del nuevo gen modificado, obtener la secuencia nucleotídica del plásmido y analizar el material genético de éstas.

Comparación de la información con bases de datos acerca de bacterias y secuencias parecidas para determinar las características de los genes obtenidos e indagar sobre su árbol filogenético (cómo han mutado otras bacterias en comparación con las de Cuatro Ciénegas a través de los años).<sup>6</sup> Determinar si los genes obtenidos tienen secuencias de organismos marítimos (se cree que la laguna de Cuatro Ciénegas era un mar primitivo).

## **Metodología:**

**Lugar:** Laboratorio del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis en el Instituto de Biotecnología de la

UNAM (IBT) en Cuernavaca.

### **Equipo, materiales y reactivos:**

- Electroporador, centrífuga, cámaras de electroforesis, Vortex (agitador), campana de aire (esterilizador) y fuente de poder.
- Cajas Petri, tubos de ensaye, tubos de Eppendorff, pipetas volumétricas, puntas para micropipetas, etc.
- Medios de cultivo (ej: hidrolizados de levadura), soluciones amortiguadoras, enzimas de restricción (cortan el ADN en lugares específicos), polimerasas (sintetizan el ADN, lo copian), bacterias *E. coli*, mezclas de nucleótidos, antibióticos (opone resistencia para ver si el gen quedó dentro), y geles de agarosa.

### **Metodología de análisis:**

1. Obtención de plásmidos provenientes de bacterias no cultivables, 2. Transformación genética de bacterias *E. coli* (inserto de plásmidos), 3. Crecimiento de cultivos bacterianos, 4. Purificación de ADN de plásmidos, 5. Secuenciación 6. Análisis bioinformático.

### **Desarrollo:**

A través de filtros con poros diminutos separamos a las bacterias de su medio. Con la ayuda de jeringas para insulina y una punta vibratoria conservamos únicamente los plásmidos (ADN pequeño). Con enzimas de restricción *Bam* rompemos los plásmidos en puntos específicos. Seleccionamos los segmentos de plásmido con cierto tamaño y cantidad de información. (A estos segmentos los llamaremos segmentos tipo A). Rompemos por separado plásmidos de bacterias cultivables (*Escherichia coli*) con las mismas enzimas *Bam*. Los extremos de estos segmentos, a demás de ser iguales y compatibles entre ellos, lo serán también con los segmentos A. (A estos segmentos los llamaremos segmentos tipo B). Juntamos segmentos tipo A con segmentos tipo B. Al fusionarse se crean plásmidos mutantes de *E. coli* con características de bacterias no cultivables. (A estos plásmidos los llamaremos C) Introducimos todo esto a un medio con kanamicina. Los segmentos A y B que no se hayan fusionado (uno con otro) no serán capaces de sobrevivir. Con esto conseguimos una diversidad de plásmidos que codifican para características diferentes.

Ponemos bacterias *E. coli* (incapaces de sintetizar triptofano) de tres tubos de ensaye junto con los plásmidos C en el electroporador. A través de un choque eléctrico lograremos que los plásmidos se introduzcan a las bacterias. Éstas empezarán a replicar la información adquirida. Después de la inserción del plásmido a la bacteria, éstas se colocan en un medio de recuperación. Cuando las bacterias están estables, se transfieren a un medio sin triptofano. Sólo aquellas capaces de sintetizarlo sobrevivirán a este medio. Se extraen los plásmidos y se purifican. Se crea un banco de genes. Los genes de los plásmidos modificados serán secuenciados y así será posible su estudio y comparación con la base de datos ya existente. Se llevará a cabo el proceso una sola vez, a menos que se contaminen los resultados o no funcionen los insertos. Para evitar errores se harán crecer bacterias *E. coli* incapaces de sintetizar triptofano en un medio con éste y otros nutrientes (experimento control). Si no crecen es que los nutrientes que les proporcionamos fueron insuficientes.

### **Resultados:**

Los resultados aún se encuentran en proceso, pero esperamos que realizando toda la metodología, menos del 1 % de las bacterias con genes modificados crezcan. Estas bacterias nos van a proveer información acerca de las características que poseía la bacteria no cultivable. Mostraremos con esquemas y explicaciones cómo se ve la secuenciación final y la comparación con otras bacterias. Como resultado extra, esperamos que además de haber demostrado que sí se pueden estudiar las bacterias no cultivables, nuestra investigación nos proporcione los resultados que determinen que los genes no cultivables son de carácter marino.

### **Conclusiones:**

Las conclusiones son preliminares aún, pues los resultados están en proceso, pero hemos de concluir que la Microbiología puede avanzar mucho a partir de estudios como estos, pues permiten el estudio de las bacterias que antes no eran cultivables en el laboratorio. Además, a través de la comparación de genes obtenidos con los de la base de datos, esperamos concluir que las bacterias de Cuatro Ciénegas tienen propiedades ancestrales, incluso marinas. Queremos encontrar también que entre las bacterias de Cuatro Ciénegas y sus equivalentes actuales o más parecidos, ha habido una mutación o cambio. Finalmente, hay que aclarar, que esta investigación no se centra específicamente en Cuatro Ciénegas, podría ser cualquier lugar (sólo que éste posee bacterias muy antiguas). Es decir, el proyecto se centra en analizar genes que no se podían analizar anteriormente debido a que eran incultivables.

### **Bibliografía y fuentes de consulta:**

<sup>1</sup>Kowalsky, Heather, IBEA Announces Sorcerer II Expedition, Global Expedition To Sample World's Oceans And Land To Characterize And Understand Microbial Populations Using Environmental DNA Sequencing, Gordon and Betty Moore Foundation, Marzo 4, 2004. HYPERLINK "<http://www.moore.org/pa-newsitem.aspx?id=498&pa=36>" <http://www.moore.org/pa-newsitem.aspx?id=498&pa=36> La página fue consultada el 11 de febrero del 2007.

<sup>2</sup>Russell, Peter J, iGenetics & Mendelian approach, Benjamin – Cummings Publishing Company, April 4, 2005. pp:123-135 (ISBN: 13-978-0805346664)

<sup>3</sup>Venter, J.Craig, Karin Remington, John F. Heidelberg, Aaron L. Halpern, Doug Rusch, Jonathan A. Eisen, Dongying Wu, Ian Paulsen, Karen E. Nelson, William Nelson, Derrick E. Fouts, Samuel Levy, Anthony H. Knap, Michael W. Lomas, Ken Neelson, Owen White, Jeremy Peterson, Jeff Hoffman, Rachel Parsons, Holly Baden-Tillson, Cynthia Pfannkoch, “Environmental Genome Shotgun Sequencing at the Sargasso Sea,” *Science*, Vol 304, Abril 2, 2004, pp. 66-74.

<sup>4</sup>Vázquez, Sandra, “Por qué no debe desaparecer Cuatro Ciénegas.” *El Faro, luz de la ciencia*, UNAM, Año VI número 70, Enero 11 del 2007, Pg. 13.

<sup>5</sup>Comunicación personal con el Dr. Lorenzo Segovia (IBT-UNAM), lunes 12 de Febrero, 2007.

<sup>6</sup>Pollack, Andrew, A New Kind of Genomics, With an Eye on Ecosystems, The New York Times, October 21, 2003. HYPERLINK "<http://query.nytimes.com/gst/fullpage.html?res=9407EEDB113EF932A15753C1A9659C8B63&sec=health&spon=&pagewanted=print>" <http://query.nytimes.com/gst/fullpage.html?res=9407EEDB113EF932A15753C1A9659C8B63&sec=health&spon=&pagewanted=print>. La página fue consultada el 11 de febrero del 2007.

