

CONSTRUCCIÓN DE UNA LIBRERÍA METAGENÓMICA DE BACTERIAS SIMBIOTES DEL INTESTINO DE INSECTOS MANTIS

Rut Ortega Ávila¹, Gustavo Hernández Guzmán²

RESUMEN

Se presenta un estudio preliminar donde se pretende obtener conocimiento básico para describir a las comunidades bacterianas presentes en el intestino de insectos mantis. Es importante el proyecto pues no se tienen referencias de las comunidades bacterianas de mantis, ni de sus actividades metabólicas. Su estudio nos permitirá establecer comparaciones con otras comunidades ya descritas en insectos modelo (termitas, cucarachas, hormigas) en las cuales ya se conocen los diferentes componentes microbianos, sus actividades metabólicas y su uso biotecnológico.

PALABRAS CLAVE

Clasificación bacteriana, 16S ribosomal, comunidad bacteriana, PCR, mantis

¹ Universidad Autónoma de Tlaxcala. Facultad de Agrobiología. Km 10.5 carretera San Martín Texmelucan S/N. Ixtlacuixtla, Tlaxcala. C.P: 90120.

² Universidad de Guanajuato, DICIVA Departamento de Alimentos. Km 9 Ex-Hacienda El Copal, Irapuato, Gto. C.P. 36500. Tel. (462)-6241889 ext. 1806, 5237; gustavohdz@ugto.mx

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las bacterias que colonizan determinados nichos ecológicos son tan específicas a las condiciones de su medio que su crecimiento en cultivos estandarizados y de laboratorio es sumamente difícil y muchas veces imposible, porque dependen de factores que no se pueden replicar de manera experimental. Es por ello que para su identificación taxonómica la microbiología convencional no puede determinar hasta nivel de especie. La importancia de conocer qué tipo de bacterias coloniza determinado ambiente proporciona información para poder asociar actividades microbianas a ciertas poblaciones.

Dentro de este enfoque la metagenómica es una ciencia que surge como una rama de las ciencias genómicas, la cual se refiere al estudio del metagenoma de un nicho en particular (Riesenfeld, Schloss, & Handelsman, 2004; Schloss & Handelsman, 2004). El metagenoma se puede definir como el total de ADN de una muestra ambiental. Hasta el momento, se han investigado metagenomas de diversos ambientes, incluyendo ecosistemas acuáticos, minas, suelos agrícolas y forestales, entre otros (Rondon, 2000; Tyson, 2004). Lo relevante de estos estudios es que cada uno de ellos ha mostrado diferentes aspectos para estudiar y analizar. En algunos casos, se han descubierto novedosos elementos genéticos que podrían tener aplicación en la industria (Rondon, 2000; Wang, Gerstein, & Snyder, 2009), mientras que en otros, han aportado novedosos aspectos de la ecología microbiana en un ecosistema en particular (Tyson, 2004).

Para contrarrestar la limitante de las bacterias no cultivables se han desarrollado métodos para poder aislar y amplificar el material genético de bacterias no cultivables en diferentes ambientes. Una de las técnicas más usadas desde hace algunas décadas es la amplificación de los genes ribosomales que codifican para la subunidad 16S (ADNr 16S). Este marcador es una poderosa herramienta que ha sido ampliamente usada en clasificaciones filogenéticas, debido a que su secuencia es altamente conservada (Lane, 1985). La amplificación de los ADNr 16S se realiza por medio de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, por sus siglas en inglés, empleando oligonucleótidos o primers específicos. Esto se realiza para amplificar los ADNr 16S de bacterias u otros grupos como arqueobacterias.

El presente estudio tiene como objetivo determinar qué tipo de bacterias colonizan el intestino del insecto mantis, del orden Mantoidea, cuyo papel ecológico es de suma

importancia, ya que por ser individuos altamente voraces controlan ciertas poblaciones de otros hexápodos por lo que su función en la cadena trófica es determinante; además de tener una conducta peculiar tipo canibalismo, razón por la cual su intestino puede contener bacterias con actividades enzimáticas novedosas que permitan la selección de genes y proteínas con posibles aplicaciones biotecnológicas en el control de plagas, en la producción de energías alternativas, en la remediación de ambientes contaminados o en la producción de agentes antimicrobianos. La investigación comienza con el aislamiento de DNA del intestino, posteriormente se realizó la amplificación por PCR de una fracción del gen 16S ribosomal (un gen ampliamente utilizado en taxonomía molecular de bacterias); posteriormente se construyeron dos librerías metagenómicas en un vector comercial. De ambas librerías se secuenciarán 10 clonas y mediante un análisis informático, se espera conocer la identidad de las bacterias más abundantes en las muestras

Métodos y materiales

Disección de insectos mantis.

Se colectaron insectos mantis adultos de los campos contiguos a la División de Ciencias de la Vida de la Universidad de Guanajuato. Se clasificaron utilizando claves específicas y se seleccionaron tres individuos macho y hembra de *Stagmomantis limbata*. Los ejemplares se sacrificaron sin dolor por congelación a -20°C por 10 minutos. Posteriormente se colocó el insecto en una placa de Petri con etanol 70% y utilizando un bisturí se cortaron las patas y se realizó un corte longitudinal para eliminar los bordes del exoesqueleto. De esta forma se separó la cara anterior y se dejaron expuestos los órganos internos. Ayudándose de un microscopio estereoscópico se aisló el tubo digestivo, se separó del resto de tejidos y finalmente se cortó la cabeza y el ano para liberar el intestino completo. Las muestras se procesaron de inmediatamente.

Se realizaron preparaciones en fresco y de Gram para su observación al microscopio óptico. Para ello utilizamos dos muestras (macho y hembra) y se analizaron al menos 5 campos (40X y 100X) para determinar presencia de parásitos y bacterias.

Aislamiento de ADN.

Se colocó el intestino en una placa de Petri estéril, se agregó 1 ml de Buffer de fosfatos (Gomori) pH 7.2 y utilizando unas espátulas de punta redonda, se obtuvo el contenido intestinal por lavado. Esto con el fin de obtener una muestra bacteriana viable y representativa. Para el aislamiento del DNA se realizaron pruebas con diversos protocolos de extracción, con el objetivo de obtener ADN de mejor calidad y pureza. El primero en ser utilizado fue un protocolo manual con una Solución salina, SDS al 20% y Proteinasa

K; el segundo de igual manera manual con Silica y buffer de guanidina como componentes activos. El tercer protocolo utilizado fue de un kit de extracción de ADN (PowerLyzer, Power soil DNA Isolation Kit, MO BIO).

Amplificación del gen ribosomal 16S

La amplificación del ADNr 16S se consigue en un termociclador, gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Como sustrato se utilizó el ADN purificado a partir del lavado del intestino del insecto. Para la técnica de PCR, se utilizó una enzima termoestable de alta fidelidad (DynaZyme II, Fermentas). Con una mezcla de reacción como sigue: H₂O libre de nucleasas, Buffer 10x, dNTPs (10mM), la polimerasa, ADN de muestras problema como molde y los primer correspondientes (27F y 1492R). El protocolo para el termociclador fue el siguiente: 94°C por 3 minutos para la fase de desnaturalización, 45°C por 30 segundos para la fase de hibridación y 72°C por 1:10 minutos para la fase de polimerización; todo esto durante 30 ciclos.

Construcción de librería en un vector comercial

Para la ligación del gen amplificado se utilizó correctamente un protocolo de ligación con el vector de clonación CloneJET PCR Cloning Kit (Fermentas). Posteriormente se siguió un protocolo para la preparación de células competentes químicas de la cepa *E. coli* DH10B. La transformación se realizó utilizando las ligaciones seleccionadas, por el método de choque térmico y se seleccionaron las colonias recombinantes en placas de LB suplementadas con Carbenicilina (100µg/ml) y Estreptomycin (25µg/ml), el primero es un mecanismo selectivo de la cepa de *E. coli* y el segundo del plásmido comercial usado como vector. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se seleccionaron 15 colonias en total que tuvieron crecimiento y morfología homogénea. Éstas a su vez fueron cultivadas en medio LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes durante 24 horas a 37°C en agitación. Se procedió a realizar la purificación del ADN plasmídico con un protocolo de lisis alcalina de Birnboim-Doly (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989), esto con el fin de verificar si nuestra construcción contiene insertos clonados en el vector. Se digirieron las construcciones con la enzima de restricción BglII, la cual corta en los bordes del sitio de clonación y libera el inserto clonado. Se utilizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8% para visualizar la correcta digestión y comprobar si el inserto se encuentra en alguna de las colonias aisladas. Las colonias recombinantes que contienen insertos, se purificaron sus plásmidos para posteriormente secuenciarlos por el método dideoxi de Sanger (Sambrook et al., 1989).

Análisis de secuencias

Se analizó una secuencia proveniente del banco de genes ribosomales preliminar. Se realizaron comparaciones de su secuencia contra bancos de datos públicos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y del Ribosomal Databank Project (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>), utilizando el RDP Classifier Version 2.6 utilizando el 16S rRNA training set 9.

Resultados

Disección de intestino de mantis.

Observamos mucha variación en el tamaño y contenido intestinal de los individuos analizados. En general, el proctodeo (parte final del intestino que incluye el ano) fue la única sección que presentaba contenido intestinal (0.05g aproximadamente), de color café oscuro y consistencia pastosa. Hubo necesidad de combinar el contenido intestinal de al menos tres individuos para el aislamiento de ADN total.

Al microscopio se observaron algunos huevecillos de parásitos (1 a 2 por campo), de los cuales no se realizó una identificación formal. Observamos un componente importante de bacterias (entre 30 a 50 por campo), predominando principalmente bacilos Gram negativos respecto a las positivos (en relación aproximada de 3:1; no se muestran datos).

Aislamiento de ADN total de intestinos de mantis.

En la figura 1, se muestra una electroforesis en gel de agarosa del ADN total obtenido del contenido intestinal de mantis. Se obtuvo un patrón electroforético similar con los tres protocolos utilizados, sin embargo, al comparar los resultados de los métodos utilizados el que permite obtener un DNA de alto peso molecular y sin degradación evidente, fue el de MO BIO (carril 2, figura 1). Con los otros dos protocolos se obtienen ADNs con diversos grados de degradación (carril 3 de la figura 1). No observamos diferencias evidentes (en cantidad o calidad) de las muestras de hembra y macho de mantis.

Para nuestro caso, es importante el partir de un ADN íntegro, sin degradación evidente, en concentración adecuada y de buena calidad, pues permitirá utilizarlo con diferentes metodologías de biología molecular.

Amplificación y producción de la librería de genes.

En un inicio, utilizamos todo el intestino de mantis para obtener el ADN total, pues los artículos en los cuales se describe el análisis del metagenoma de intestinos de cucaracha (Schauer, Thompson, & Brune, 2012) y termita (Sabree et al., 2012), no hacen ninguna especificación de algún tratamiento previo. Obtuvimos muestras de ADN total de muy buena calidad, pero que no permitían amplificación del 16S ribosomal (datos no

mostrados). Se realizaron diferentes modificaciones a la composición de la mezcla de reacción y al protocolo de amplificación, sin ningún resultado positivo.

Posteriormente decidimos aislar ADN total del contenido intestinal, como una estrategia para “enriquecer” en ADN microbiano a la preparación (y disminuir la proporción de ADN de mantis). Esta modificación al protocolo fue suficiente para obtener una amplificación positiva del marcador 16S ribosomal, como se muestra en la figura 2 y procedimos a la amplificación del resto de las muestras de ADN total de mantis.

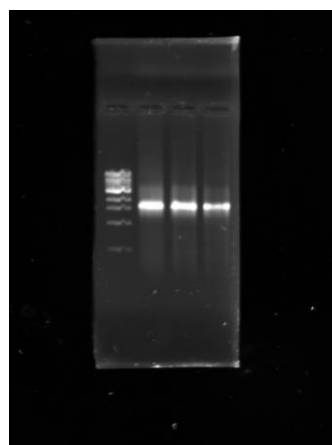
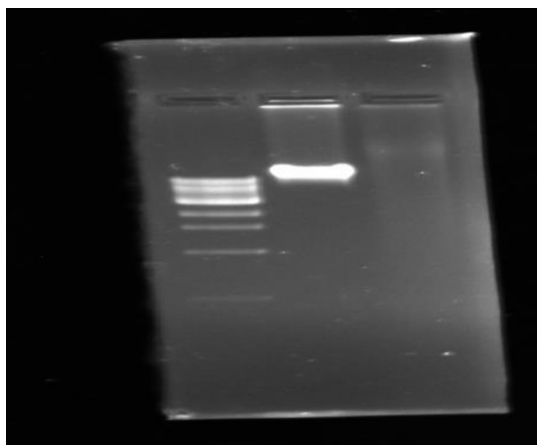


Figura 1. Aislamiento de ADN Total del intestino de Mantis mediante el protocolo de POWER SOIL DNA ISOLATION KIT MOBIO (carril 2) y protocolo de sílica (carril 3). Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (carril 1)

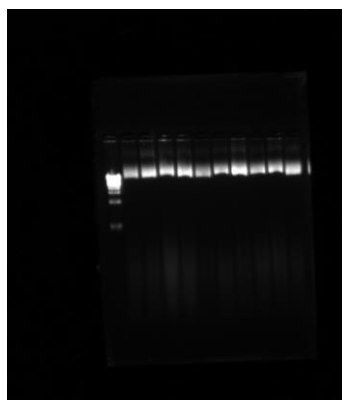


Figura 3. Extracción de ADN plasmidico bacteriano con el protocolo de lisis alcalina Birnboim-Doly

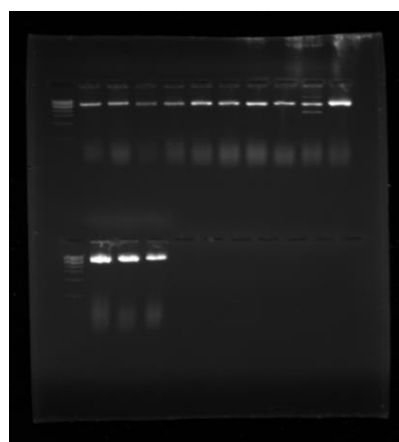


Figura 4. Digestión de plasmidos recombinantes con BglIII. En el carril 10 se observa la presencia de una banda de 1.5Kb correspondiente al 16s ribosomal clonado.

Una vez que obtuvimos todas las amplificaciones de 16S ribosomales de las muestras seleccionadas (mantis hembra y macho), se clonaron en el vector correspondiente. Desafortunadamente nuestro vector no está en su óptimo y obtuvimos muy pocas colonias recombinantes (menos del 10%) y en el momento que se realizó la transformación, solo obtuvimos una construcción con inserto (figuras 3 y 4). Se está preparando un vector para hacer más eficiente la clonación y por lo tanto, la construcción de una librería eficiente de genes.

El análisis de la secuencia de la clona recombinante nos muestra similitud con bacterias del género *Roseateles*. Estas bacterias Gram negativas, aerobias y microaerófilas, pertenecen al grupo de las beta proteobacterias, que se encuentran en diferentes nichos ecológicos, desde los acuáticos, suelo y en simbiosis dentro de los intestinos de insectos y animales. *Roseateles depolymerans* es una de las bacterias mejor caracterizadas y se ha descrito su capacidad para degradar diferentes polímeros y se utiliza como biodegradadora de compuestos vinílicos. En el caso nuestro, no tenemos datos de las capacidades degradadoras de la bacteria que se encuentra en el intestino de mantis.

Con los materiales biológicos obtenidos en el presente trabajo, se pretende hacer un análisis de la diversidad microbiana utilizando dos enfoques: el primero utilizando enzimas de restricción para generar diferentes patrones electroforéticos y el segundo, en el que se utilizará la secuenciación masiva y análisis de las secuencias. Esto nos va a permitir describir a los diferentes grupos bacterianos presentes en el intestino de mantis y estudiar las posibles funciones metabólicas que realizan dentro del intestino del insecto.

Conclusiones

Se estandarizaron las condiciones y protocolos para el aislamiento de ADN de alto peso molecular del intestino de mantis y que es útil para la generación de librerías de genes ribosomales y muy probablemente para librerías metagenómicas.

Se detectó mediante la librería producida a una bacteria que probablemente contiene rutas metabólicas degradadoras de polímeros.

REFERENCIAS

- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. a, Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(20), 6955–9.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*, 38, 525–52. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091216
- Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Goodman, R. M. (2000). Cloning the Soil Metagenome : a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms, 66(6), 2541–2547.
- Sabree, Z. L., Huang, C. Y., Arakawa, G., Tokuda, G., Lo, N., Watanabe, H., & Moran, N. a. (2012). Genome shrinkage and loss of nutrient-providing potential in the obligate symbiont of the primitive termite *Mastotermes darwiniensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(1), 204–10. doi:10.1128/AEM.06540-11
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schauer, C., Thompson, C. L., & Brune, A. (2012). The Bacterial Community in the Gut of the Cockroach *Shelfordella lateralis* Reflects the Close Evolutionary Relatedness of Cockroaches. doi:10.1128/AEM.07788-11
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Status of the Microbial Census, 68(4), 686–691. doi:10.1128/MMBR.68.4.686
- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Banfield, J. F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428(March), 37–43.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Science*.