

Actividades hemolíticas en una biblioteca metagenómica de rizósfera de trigo (*Triticum aestivum* L.)

Rocío Hernández-León¹, Itzi Velázquez-Sepúlveda¹, Gloria Solís-Guzmán², Miguel Martínez-Trujillo², Gustavo Santoyo^{1*}

Laboratorio de recombinación y diversidad genómica. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mich. Ciudad Universitaria, Edif. A'. C.P. 58030

Resumen

En el presente trabajo reportamos la construcción de una biblioteca metagenómica de rizósfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum*). Hasta el momento la biblioteca consta de 1075 clonas. Se determinó que principalmente se han clonado insertos que tienen un tamaño entre 21 y 30 kilobases, con un tamaño promedio de 38 kb. En un análisis funcional se encontraron diversas clonas que presentaron actividades hemolíticas. En particular, una de estas clonas tiene actividad beta hemolítica y 5 clonas más poseen actividad del tipo alfa. Nuestros resultados sugieren que las actividades hemolíticas encontradas en la rizósfera de trigo, pueden ser mecanismos de defensa y ocupación de espacios.

Palabras clave: metagenoma, actividad hemolítica, trigo.

Abstract

It is reported in this work the construction of a metagenomic library of the rhizosphere of wheat. At present, the library consists of 1075 clones. Functional analysis reveals the presence of haemolytic activities. It was also determined that most of the inserts are in the range size between 21 and 30 kilobases with an average size of 38 kb. One clone presents beta haemolytic activity and other 5 clones show alpha haemolysis. Our results suggest that haemolytic activities in the wheat rhizosphere may be part of a defense and colonization mechanism.

Keywords: metagenomics, haemolytic activities, wheat.

Introducción

La rizósfera de plantas es un microambiente donde reside una gran diversidad microbiana (Ahmad *et al.*, 2008). La rizósfera se define como la región del suelo que rodea y se ve influenciada por la raíz (Atlas y Bartha, 1998). Es en este nicho donde se llevan a cabo diversas interacciones abióticas y bióticas. Las interacciones abióticas, como la temperatura, tipo de suelo, el clima, entre otros factores, suelen participar en determinar la estructura poblacional de la comunidad microbiana (Fierer y Jackson, 2005). Sin embargo, los mismos microorganismos han evolucionado diversos mecanismos que pueden ser exitosos en la ocupación de espacios, y así, obtener nutrientes excretados por la raíz de la planta. Por ejemplo, diferentes especies bacterianas (*Pseudomonas*, *Burkholderia*) y de hongos (*Penicillium*, *Aspergillus*) sintetizan y excretan compuestos quelantes de hierro (sideróforos), antibióticos y bacteriocinas (Haas y Keel, 2003; Krishnan *et al.*, 2007; Waller *et al.*, 2002; Validov *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha reportado que bacterias patógenas de humanos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, entre otros) pueden ser parte de la comunidad rizosférica (Rainey, 1999; Paulsen *et al.*, 2005; Valencia Cantero *et al.*, 2005). Incluso, actividades de tipo hemolítico se han reportado en bibliotecas metagenómicas de suelos abiertos (Rondon *et al.*, 2000). De esta manera, se ha propuesto que los microorganismos del suelo son la principal fuente de aislamiento y descubrimiento de diversos metabolitos, así como de otros compuestos químicos relevantes (Handelsman

et al., 1998).

Desafortunadamente el número de microorganismos cultivables provenientes de la rizósfera representa únicamente el 1% (o menos) del total de la comunidad existente. (Torsvik y Goksoyr, 1990). Por tal motivo, la construcción de bibliotecas metagenómicas es una opción importante para tener acceso a todo este material genético que podría codificar para la síntesis de nuevos metabolitos (Handelsman, 2004). En este trabajo, se reporta la construcción y análisis funcional de una biblioteca de ADN metagenómico proveniente de rizósfera de plantas de trigo, así como la presencia de actividades hemolíticas en seis clonas.

Materiales y métodos

Colecta de muestras

Se tomaron las muestras de suelo proveniente de la rizósfera de plantas de trigo (*Triticum aestivum*) de la región de Zamora, Michoacán a una profundidad de 10 cm. Posteriormente se transportaron en bolsas estériles y se mantuvieron en hielo hasta conservarse a 4 °C.

Análisis Físico-Químico del Suelo

Las características físico-químicas del suelo se analizaron en el Laboratorio Nacional de Fertilidad de Suelos y Nutrición Vegetal del INIFAP-Celaya.

*Autor de correspondencia: Dr. Gustavo Santoyo, Profesor Investigador IIQB-UMSNH. Edificio A1 (B5) Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, México. C.P. 58030. Tel. (443) 3265788. Ext. 126. e-mail: gustavo_santoyo@yahoo.com, gsantoyo@umich.mx

Extracción y purificación del ADN Metagenómico

Para aislar el ADN metagenómico de la rizósfera de trigo se emplearon dos métodos: 1) mediante un kit de extracción Power Soil DNA Kit marca MO BIO, siguiendo las instrucciones de la casa comercial y 2) por un protocolo propuesto por Zhou (2005). Se mezclaron las muestras con el buffer de extracción (Tris HCl, fosfato de sodio, NaCl, EDTA, CTAB y PVP) y la proteína K. Se añadió SDS 20% incubando 2 h, se centrifugó y lavó la pastilla dos veces con buffer de extracción y SDS. El sobrenadante se mezcló con cloroformo, isopropanol y acetato de sodio por 1h. Después se centrifugó nuevamente y se lavó con etanol 70% frío, para resuspender en agua desionizada esteril (Figura 1). El ADN extraído se purificó nuevamente mediante una minicolumna Wizard SV Genomic DNA purification System de Promega. Posteriormente se observó la integridad del ADN en un gel de electroforesis al 1% (Figura 2A). Una vez que se comprobó que obtuvimos un ADN lo suficientemente puro, se digirieron aproximadamente 300 nanogramos de ADN con la enzima HindIII durante 4 hr a 37 °C. Se digirió con esta enzima por que el vector de clonación donde se clonó el metagenoma está previamente digerido con HindIII (pIndigoBAC-5). La digestión se observó nuevamente en un gel de electroforesis al 1%. Después, se inactivó la enzima a 65 °C en un Fisher Scientific Dry Bath Incubator por 20 min. Se purificó nuevamente por minicolumna (Wizard SV Genomic DNA purification System, Promega) y se observó en un gel de agarosa al 1% (Figura 2B).

Construcción de la biblioteca

Para llevar a cabo la clonación del ADN metagenómico se emplearon 50 ngr de ADN y 10 ngr del vector pIndigoBAC-5, así como 4U de enzima Ligasa T4 durante 12 horas continuamente a 4 °C. La ligación se transformó por electroporación en células de E. coli TOP10 electrocompetentes en un electroporador 2510 eppendorf. Las células transformadas se plaquearon en medio sólido LB con Cm/ml e incubando de 20 a 24 hrs a 37 °C. Se picaron 1075 clonas en placas de medio LB con 10 microgramos/ml de cloranfenicol más 40 ml de X-gal 60 mg/ml e incubadas durante 24 hrs a 37 °C.

Determinación del tamaño promedio de los insertos clonados

Para determinar el tamaño aproximado y promedio de los insertos clonados se tomaron al azar 26 clonas para aislar el vector por medio de lisis alcalina, posteriormente se digirieron



Figura 1. Comparación de los dos métodos de extracción de ADN metagenómico de suelo rizosférico. (A) Extracción de ADN mediante el protocolo reportado por Zhou *et al.*, 2005. **(B)** Extracción por medio del Power Soil DNA Kit (MO BIO). Ver texto para detalles.

con la enzima HindIII para liberar el inserto. Las digestiones se observaron en un gel de agarosa al 2%.

Determinación de las actividades hemolíticas

La búsqueda de actividades hemolíticas se realizó mediante la resiembra de la biblioteca o clonas en placas de agar sangre de carnero. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 hrs. Las actividades hemolíticas se determinaron mediante la observación de un halo hemolítico alrededor de la colonia o clona resemebrada. Las clonas seleccionadas se volvieron a replicar en agar sangre de carnero para corroborar el fenotipo hemolítico.

Resultados y discusión

Aislamiento, purificación y digestión del metagenoma

La construcción de bibliotecas metagenómicas de diversos ambientes ha mostrado un gran potencial por identificar nuevos o mejores determinantes genéticos que pueden ser usados en diferentes áreas de la biotecnología (Van Elsas, 2008.). Los resultados del análisis físico-químico del suelo muestran que la textura es del tipo franco-arcilloso con un pH neutro de 7.17. El índice de nutrientes en la muestra de suelo presenta altos o muy altos niveles, mientras que el sodio es bajo. Lo anterior es indicativo de buenas condiciones para el cultivo de trigo y el probable desarrollo de microorganismos en la rizósfera de las plantas.

En este trabajo, se aisló el ADN metagenómico de la rizósfera de plantas de trigo mediante dos métodos. En la figura 1 se muestra el grado de pureza del ADN aislado mediante el protocolo de Zhou (2005) y el aislado con el kit de purificación. Los resultados nos muestran que el ADN aislado con el kit muestran una mejor pureza por no observarse un color café, que pueden ser parte de los ácidos húmicos del suelo (Rajendhran y Gunasekaran, 2008). En los experimentos posteriores se trabajó con el ADN purificado con el kit MO BIO. En la figura 2 se observa la digestión del metagenoma con la enzima HindIII en un gel de agarosa. Como se puede observar, la digestión fue parcial y se obtuvo un ADN con fragmentos grandes, probablemente de más de 10 kb, lo

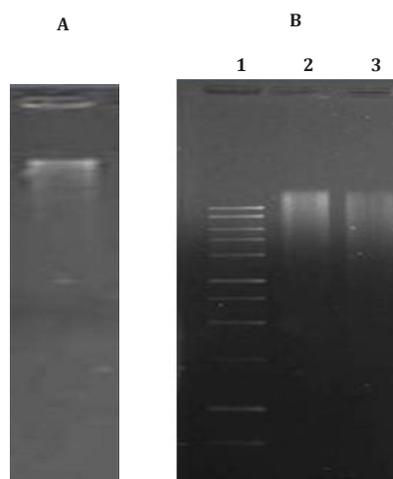


Figura 2. (A) Observación del ADN metagenómico en gel de agarosa al 1%. **(B)** Purificación de ADN metagenómico de rizósfera de planta de trigo. Carril 1, Marcador de peso molecular. Carriles 2 y 3, ADN metagenómico digerido con HindIII (5 y 10 unidades de la enzima, respectivamente). Ver texto para detalles.

cual se recomienda para la construcción de bibliotecas basadas en BACs (Handelsman, 2005).

Construcción de la biblioteca metagenómica

La clonación de grandes fragmentos de ADN en vectores de expresión, tales como los BACs, presentan diversas ventajas; por ejemplo, en una biblioteca con un número razonable de clonas se pueden encontrar vías operones o genes que participan en vías metabólicas completas (Daniel, 2005). Hasta el momento, hemos construido una biblioteca de 1075 clonas. Algunos datos preliminares nos muestran que el tamaño promedio de los insertos en 27 clonas analizadas es de 38 kilobases. Lo anterior nos sugiere que aproximadamente 40.85 megabases de ADN pudieran corresponder al total de ADN metagenómico de rizósfera de trigo clonado en la biblioteca (datos no mostrados). El tamaño de la biblioteca entonces hasta el momento corresponde a tener clonado el genoma de la bacteria *Escherichia coli* K12 8.8 veces, ya que su genoma tiene una tamaño de 4.6 megabases (Blattner *et al.*, 1997).

Promedio aproximado de los insertos clonados

Para determinar el tamaño promedio de los insertos clonados se tomaron al azar 26 clonas para aislar el vector y se digirieron con HindIII para liberar el inserto. La figura 3 muestra el resumen de resultados. Se puede observar que la mayoría de los insertos tiene un tamaño de entre 21 y 30 kb aproximadamente. Sin embargo es de resaltar que se obtuvo fragmentos de gran tamaño, iguales o mayores a 80 kb. En promedio, estos resultados nos sugieren que se obtuvo una biblioteca de insertos grande, con un promedio de 38 kb. Es de resaltar que se determinó únicamente un aproximado del tamaño de los insertos y podría variar por

el hecho de observar fragmentos grandes de ADN en geles de agarosa. Los tamaños exactos se están analizando por otro tipo de técnicas como electroforesis de campo pulsado para conocer con mayor exactitud el tamaño de los insertos.

Rondon y colaboradores (2000) contruyeron una biblioteca metagenómica de un suelo de Wisconsin, E.U., empleando el vector pBeloBAC11, obtuvieron poco más de 3000 clonas e insertos con un tamaño promedio de inserto de 27 Kb. Cabe destacar que el vector empleado en nuestro trabajo es un derivado de este vector, el pIndigoBAC-5. En otro trabajo MacNeil, *et al.*, en el 2001 reportan una biblioteca de suelo construida también con un cromosoma artificial bacteriano con promedio de inserto de 37 Kb. En ambos trabajos se encontraron actividades interesantes, entre algunas de ellas clonas con actividades antimicrobianas. En nuestro trabajo tenemos un tamaño promedio de inserto similar comparado con otros trabajos.

Búsqueda de actividades hemolíticas

Existen diferentes tipos de actividades hemolíticas, la alfa-hemólisis, beta-hemólisis y gamma-hemólisis (Koneman, 2003). La primera se caracteriza por la lisis parcial de los eritrocitos que rodean una colonia, lo que produce un cambio de color gris-verdoso o amarronado del medio de cultivo. La segunda se refiere a la lisis completa de los glóbulos rojos que rodean una colonia, que produce la eliminación total de la sangre del medio de cultivo, y la tercera se da por la ausencia de hemólisis. Fue interesante encontrar que dos de las clonas presentaron una actividad beta hemolítica, mientras que otras cuatro mostraron una hemólisis del tipo alfa (Figura 4). Sin embargo, al repetir el experimento se encontró que una de las clonas que al parecer tenía hemólisis del tipo beta, mostró únicamente una hemólisis parcial por lo

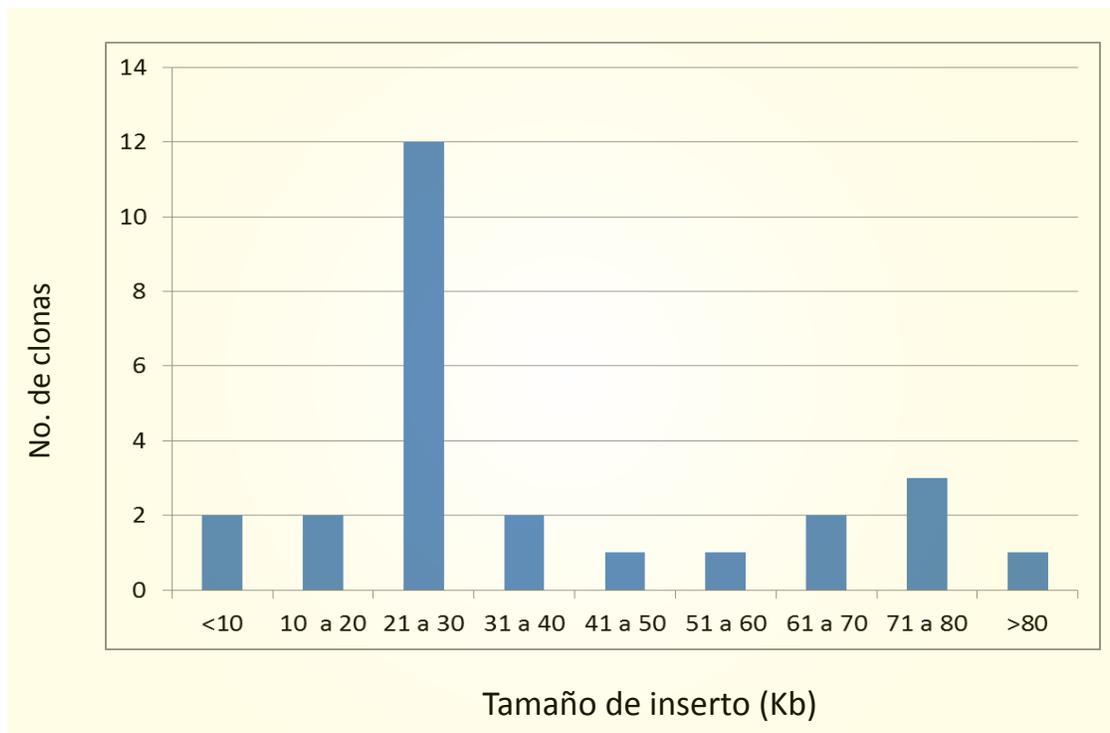


Figura 3. (A) Clonas detectadas en la biblioteca con actividad alfa y beta hemolítica (B) Corroboración del fenotipo alfa-hemolítico de una clona. Ver texto para detalles.

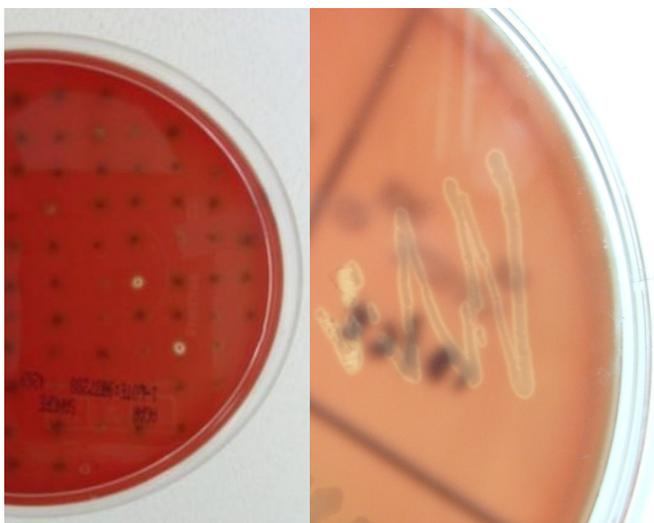


Figura 4. Tamaño promedio de los insertos clonados en la biblioteca metagenómica de rizósfera de trigo.

que se determinó ser del tipo alfa. En conclusión, se encontraron 1 clona con actividad beta-hemolítica y cinco con hemólisis alfa.

Las actividades hemolíticas son comúnmente reportadas en bacterias patógenas de humanos (Boerlin *et al.*, 1998). Sin embargo, también se han reportado este tipo de actividades en bibliotecas metagenómicas de suelo abierto (Rondon, *et al.*, 2000). En este trabajo, encontramos dichas actividades en la rizósfera de plantas de trigo en un campo agrícola. Tales actividades, hasta donde sabemos, no se han estudiado con detalle sobre su papel exacto en este microambiente, aunque dichas actividades se ha asociado a la síntesis de otros compuestos como antibióticos o sideróforos. Tal es el caso de algunas bacterias del género *Aeromonas*, las cuales son patógenas de humanos, y que pueden sintetizar hemolisinas y sideróforos (Santos *et al.*, 1999). Las primeras forman parte del mecanismo que causa la lisis de eritrocitos, mientras que los sideróforos son compuestos quelantes del hierro (Fernandez, 2010). Los sideróforos son compuestos sintetizados por bacterias rizosféricas y se les ha atribuido la capacidad de suprimir y/o inhibir el crecimiento de diversos fitopatógenos de plantas (Valencia-Cantero *et al.*, 2005; Santoyo *et al.*, 2010). Por lo tanto, la síntesis de compuestos como los sideróforos, así como las actividades hemolíticas pueden formar parte de un mecanismo de defensa y ataque por ocupar espacios en un microambiente tan competitivo como lo es la rizósfera.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo de la CIC-UMSNH (2009-2010) por el financiamiento de este proyecto, así como a los revisores por sus sugerencias.

Referencias

Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. 2008. Screening of free-living rizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163: 173-181.

Atlas R, Bartha R. 1998. *Microbial Ecology, fundamentals and Applications*. Fourth Ed. B/Cummings Editors.

Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M,

Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. 1997. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277: 1453-1462

Boerlin PS, Chen JK, Colbourne R, Johnson S, De Grandis, Gyles C. 1998. Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in shiga toxin-producing *E. coli*. *Infection and Immunity*, 66: 2553-2561.

Fernandez P, de Carvalho CCR. 2010. Production of Metabolites as Bacterial Responses to the Marine Environmental. *Marine Drugs*, 8: 705-727.

Fierer N, Jackson RB. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 626-631.

Gillespie DE, Brady SF, Bettermann AD, Cianciotto NP, Liles MR, Rondon MR, Clardy J, Goodman RM, Handelsman J. 2002. Isolation of Antibiotics Turbomicin A and B from a Metagenomic Library of Soil Microbial DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4301-4306.

Handelsman J. 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 669-685.

Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5: 245-249.

Haas D, Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp and relevance for biological control of plant disease. *Annual review of phytopathology*, 41:117-153.

Koneman EW. 2003. *Analisis Microbiológico*. 5° edición, pp. 591.

Krishnan HB, Beom Ryong K, Ammulu HK, Kil Yong K, Young CK. 2007. *Rhizobium etli* USDA9032 engineered to produce a phenazine antibiotic inhibits the growth of fungal pathogens but is impaired in symbiotic performance. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 327-330.

MacNeil IA, Tiong CL, Minor C, August PR, Grossman TH, Loiacono KA, Lynch BA, Phillips T, Narula S, Sundaramoorthi R, Tyler A, Aldredge T, Long H, Gilman M, Holt D, Osburne MS. 2001. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3: 301-308.

Paulsen IT, Press CM, Ravel J, Kobayashi DY, Myers GSA, Mavrodi DV, DeBoy RT, Seshadri R, Ren Q, Madupu R, Dodson RJ, Durkin AS, Brinkac LM, Daugherty SC, Sullivan SA, Rosovitz MJ, Gwinn ML, Zhou L, Schneider DJ, Cartinhour SW, Nelson WC, Weidman J, Watkins K, Tran K, Khouri H, Pierson EA, Pierson LS, Thomashow LS, Joyce EL. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology*, 23: 873-878.

Rainey PB. 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rizhosphere. *Environmental Microbiology*, 1: 243-257.

Rajendhran J, Gunasekaran P. 2008. Strategies for accessing soil metagenome for desired applications. *Biotechnology Advances*, 26: 576-590.

Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C, Tiong CL, Gilman M, Osburne MS, Clardy J, Handelsman J, Goodman RM. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing

- the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2541-2547.
- Santos JA, González CJ, Otero A, García-López ML.** 1999. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5612-5614.
- Santoyo G, Valencia-Cantero E, Orozco-Mosqueda MC, Peña-Cabriales JJ, Fariás-Rodríguez R.** 2010. Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana*, 28: 53-60.
- Torsvik VJ, Goksoyr FLD.** 1990. High Diversity in DNA of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 782-787.
- Valencia-Cantero E, Villegas-Moreno J, Sánchez-Yañez JM, Peña-Cabriales JJ, Fariás-Rodríguez R.** 2004. Inhibición de *Fusarium oxysporum* por cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 incapaces de producir sideróforos. *Terra Latinoamericana*, 23: 81-88.
- Validov S, Mavrodi O, de la Fuente L, Boronin A, Weller D, Thomashow L, Mavrodi D.** 2005. Antagonistic activity among 2,4-diacetylphloroglucinol producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 242: 249-256.
- Van Elsas JD, Costa R, Jansson J, Sjöling S, Bailey M, Nalin R, Vogel TM, van Overbeek L.** 2008. The metagenomics of disease-suppressive soils - experiences from the METACONTROL project. *Trends Biotechnology*, 26: 591-601.
- Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BB, Thomashow LS.** 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual review of phytopathology*, 40: 309-348.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM.** 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 316-322.