



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**BÚSQUEDA DE GENES PROCARIÓTICOS
RELACIONADOS CON LA BIOSÍNTESIS DE
EXOPOLISACÁRIDOS EN EL AGUA DE UN POZO
DEL ESTADO DE YUCATÁN**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS EN MANEJO DE
RECURSOS NATURALES TROPICALES**

Por:

**Licenciada en Química Industrial
Alejandra Susana Cabañas Sandoval**

Asesores:

**Dr. Rafael Antonio Rojas Herrera
Dr. Francisco Eduardo Rodríguez Valera**

Mérida, Yuc., México, septiembre de 2015



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**BÚSQUEDA DE GENES PROCARIÓTICOS
RELACIONADOS CON LA BIOSÍNTESIS DE
EXOPOLISACÁRIDOS EN EL AGUA DE UN POZO
DEL ESTADO DE YUCATÁN**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS EN MANEJO DE
RECURSOS NATURALES TROPICALES**

Por:

**Licenciada en Química Industrial
Alejandra Susana Cabañas Sandoval**

Asesores:

**Dr. Rafael Antonio Rojas Herrera
Dr. Francisco Eduardo Rodríguez Valera**

Mérida, Yuc., México, septiembre de 2015



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES

**POSGRADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
MANEJO DE RECURSOS NATURALES TROPICALES**

ALUMNA: Q. I. ALEJANDRA SUSANA CABAÑAS SANDOVAL

SÍNODO DEL EXAMEN DE TESIS DE GRADO

**DR. ALEJANDRO ZEPEDA PEDREGUERA
FIQ-UADY**

**DRA. ALMA CORONA CRUZ
FIQ-UADY**

**DRA. KARLA ACOSTA VIANA
CIR-UADY**

**DRA. MIRIAM FERRER ORTEGA
CCBA-UADY**

**DRA. LAURA CONDE FERRAEZ
CIR-UADY**

MÉRIDA, YUCATÁN, SEPTIEMBRE DE 2015

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

Q.I. Alejandra Susana Cabañas Sandoval

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo que lleva por título “Búsqueda de genes procarióticos relacionados con la biosíntesis de exopolisacáridos en el agua de un pozo del estado de Yucatán” se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la asesoría y dirección del Dr. Rafael Antonio Rojas Herrera y del Dr. Francisco Eduardo Rodríguez Valera, y fue financiado por el proyecto “Aprovechamiento sustentable del acuífero de Yucatán mediante tecnología metagenómica para la búsqueda de productos biotecnológicos con potencial de alto impacto económico” (FOMIX-Yucatán Proyecto 165026).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado durante el desarrollo de este trabajo a través de la beca 482062.

Al comité tutorial: Dra. Alma Corona Cruz y Dr. Alejandro Zepeda Pedreguera, por sus valiosas aportaciones a lo largo de la realización del trabajo.

Al comité sinodal: Dra. Karla Acosta Viana, Dra. Miriam Ferrer Ortega y Dra. Laura Conde Ferraez, por sus valiosos comentarios al trabajo.

A la M. en C. Araceli González Burgos y la QFB. Karla Guadalupe Ku Durán por la capacitación brindada durante la reproducción y conservación de la biblioteca de metagenómica y los ensayos de producción de exopolisacáridos.

Al Dr. César De los Santos Briones y el M. en C. Max Apolinar Hernández por la capacitación brindada durante la extracción de ácidos nucleicos.

Resumen

Los exopolisacáridos (EPS) bacterianos son aplicados en diversas áreas de la industria por sus diversas propiedades reológicas y fisicoquímicas. Sin embargo, el conocimiento que se tiene sobre estos compuestos se ha limitado a bacterias cultivables. Por este motivo, se propone conocer los genes que se involucran en su biosíntesis, estudiando a la comunidad microbiana del acuífero de Yucatán por medio de técnicas metagenómicas. La comunidad microbiana del acuífero de Yucatán, ha sido muy poco estudiada y está sufriendo constantes modificaciones a causa de las actividades antropogénicas. En este trabajo, tras un análisis basado en secuencias y el análisis funcional de una biblioteca metagenómica, se identificaron géneros bacterianos con la capacidad de producir EPS y secuencias con alta similitud de genes que codifican proteínas involucradas en la síntesis de polisacáridos. Con el análisis funcional se seleccionaron 12 clonas de las 9025 evaluadas con las técnicas de siembra en placa con agar Rojo Congo y tinción con Cristal Violeta. Tras analizar los insertos secuenciados no se encontró similitud con genes reportados que estén involucrados en la biosíntesis de exopolisacáridos, pero la clona CEps6 obtuvo un 90% de identidad con el género *Delftia*. Dos clonas demostraron la capacidad de incrementar la viscosidad del medio de cultivo y después de un mes de incubación produjeron 26.2 mg de EPS por la clona CEps4 y 43.3 mg de EPS por la clona CEps8.

Palabras clave: exopolisacáridos, biblioteca metagenómica, análisis funcional

Summary

The bacterial exopolysaccharides (EPS) are applied in diverse fields of industry because of its rheological and physicochemical properties. However, the knowledge we have about these compounds has been limited to culturable bacteria. For this reason, we proposed to know the genes involved in their biosynthesis through the study of the microbial community from Yucatan aquifer by metagenomic techniques. Microbial community of Yucatan aquifer, it has been unstudied and it is been facing harm due to anthropogenic activities. In this work, after a sequence based analysis and functional analysis of a metagenomic library, we identified several EPS-producing bacterial genera and sequences with high similarity to genes encoding proteins involved in polysaccharide synthesis. With the functional analysis were selected 12 of the 9025 clones evaluated by planting techniques in Congo red agar and staining with Crystal Violet. After analyzing the sequenced inserts no similarity has been found to genes reported to be involved in the biosynthesis of exopolysaccharides that we found, but the cloned CEps6 obtained a 90% identity to the *Delftia* genus. Two clones showed the ability to increase the viscosity of the culture medium and after one month of incubation and each clone produced 26.2 mg of EPS (CEps4) and 43.3 mg of EPS (CEps8).

Keywords: exopolysaccharides, metagenomic library, functional analysis

Contenido

I.	INTRODUCCIÓN	9
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
II.1	El acuífero de Yucatán	11
II.2	Estudios metagenómicos	12
II.3	Exopolisacáridos bacterianos	15
II.4	Genes involucrados en la biosíntesis de EPS	18
II.5	Factores que favorecen la producción de EPS.....	19
II.6	Importancia del estudio de EPS.....	20
II.7	Técnicas para el reconocimiento de EPS.....	21
III.	OBJETIVOS	23
III.1	Objetivo General	23
III.2	Objetivos específicos.....	23
IV.	Referencias	24
V.	ARTÍCULO CIENTÍFICO	35

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de construcción de bibliotecas metagenómicas.....	14
Figura 2. Organización genética del clúster de genes <i>eps</i>	18
Figura 3. Aplicaciones de exopolisacáridos.	21
Figura 4. Distribución de la comunidad bacteriana presente en la muestra de agua.	41
Figura 5. Descripción morfológica de las cepas en agar con rojo Congo	44
Figura 6. Tinción con cristal violeta de películas adheridas a borosilicato	45
Figura 7. Fenotipo de biopelículas formadas en pozos de polipropileno.	45
Figura 8. Cambio en la viscosidad del medio de cultivo durante el período de incubación.	47
Figura 9. Gramos de EPS producidos por las clonas CEps 4, CEps 8 y EPI300 despues de un mes de incubación.	48

Índice de cuadros

Cuadro 1. Vectores empleados en la construcción de bibliotecas genómicas.....	14
Cuadro 2. Exopolisacáridos caracterizados de origen bacteriano	17
Cuadro 3. Datos de la pirosecuenciación de la muestra de agua pzM.....	40
Cuadro 4. Proteínas involucradas en la biosíntesis de exopolisacáridos encontrados en la muestra pzM tras la comparación funcional del Mg-Rast.	42
Cuadro 5. Resultados del análisis de tinción de polisacáridos con RC y CV.....	43
Cuadro 6. Resultados de la secuenciación del fósmino de la clona CEps6.....	46

I. INTRODUCCIÓN

El acuífero de la península de Yucatán es un sistema de ríos subterráneos que se caracteriza por su alta concentración de caliza y se divide en dos zonas predominantes: una superficial de agua dulce y otra profunda de agua salobre (Bauer *et al.*, 2011; Rojas-Herrera *et al.*, 2011). Las características kársticas del suelo de la región permiten la intercomunicación de los cuerpos de agua existentes en la zona, esto influye decisivamente en el funcionamiento del ecosistema y proporciona un ambiente distintivo donde se han desarrollado formas de vida únicas (Medina-González, 2009), aumentando la probabilidad de encontrar nuevas especies microbianas con el potencial genético para producir compuestos novedosos.

El empleo de técnicas metagenómicas hace posible el estudio de los microorganismos no cultivables, de quienes se han obtenido enzimas con propiedades características. Así que, mediante la extracción, manipulación y análisis del ADN metagenómico es posible aprovechar el potencial biotecnológico inmerso en las comunidades microbianas y conocer más sobre su papel ecológico en diferentes ambientes (Hernández-León *et al.*, 2010).

Aunque el estudio y entendimiento de la diversidad microbiana en los ecosistemas de agua subterránea aún se encuentran en una etapa temprana, se ha demostrado la presencia de microorganismos como bacterias, arqueas, protozoarios y algunas levaduras y hongos en estos ambientes (Griebler y Lueders, 2009). Las aguas subterráneas se caracterizan por la poca disponibilidad de carbono orgánico y otros nutrientes esenciales, la falta de luz y las bajas temperaturas que inducen a los microorganismos residentes a formar floculantes en suspensión, películas superficiales o tapetes en las interfaces sólido-líquido o aire-líquido (Jenkinson y Lappin-Scott, 2001). Así, la capacidad de una bacteria para sintetizar adhesinas exopoliméricas puede ser crítica para su supervivencia por la abundancia de nutrientes presentes en las superficies inanimadas, biopelículas o superficies con materia orgánica adsorbida (Bartlett, Wright y Silverman, 1988).

Estos exopolímeros son una matriz compleja compuesta por proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos (Flemming y Wingender, 2001). Además de las funciones biológicas, los polisacáridos son responsables de interacciones adhesivas y cohesivas (Haag, 2006), propiedades que frecuentemente son aprovechadas en las industrias: alimentaria,

farmacéutica, petrolera, textil, entre otras (Melo, Zaia, y Celligoi, 2012; París, 2009; Welman y Maddox, 2003). Los polisacáridos son el principal componente de biopelículas y tapetes microbianos, mismos que están presentes en diversos ecosistemas acuáticos, incluidas zonas del acuífero yucateco (Schmitter-Soto *et al.*, 2002). Sin embargo, la contaminación de los cuerpos de agua, como resultado del proceso de urbanización (Graniel, Morris y Carrillo-Rivera, 1997), está modificando a la comunidad microbiana de dichos ecosistemas, siendo su estudio un objetivo de importancia.

El presente trabajo se enfocó en encontrar genes relacionados con la biosíntesis de polisacáridos extracelulares presentes en el acuífero de Yucatán, mediante el análisis molecular de una muestra de agua de pozo, el escrutinio funcional de una biblioteca de fósidos construida a partir de la muestra de agua y ensayos de producción de exopolisacáridos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

II.1 El acuífero de Yucatán

El acuífero de la Península de Yucatán es uno de los sistemas kársticos más extensos del planeta con un área de 165 000 Km², comprende los estados de Yucatán, Campeche, Quintana Roo, parte de Tabasco y el norte de Guatemala y Belice (Bauer-Gottwein *et al.*, 2011). El acuífero de la Península de Yucatán alberga muchos recursos subterráneos que mantienen una alta diversidad de ecosistemas dependientes del agua subterránea que se caracteriza por contener una fase de agua dulce, una extensa intrusión salina proveniente del mar y una delgada interfase de mezcla (Lefticariu, *et al.*, 2006). La zona noroeste del acuífero de la península de Yucatán, comprendida por el anillo de cenotes, contiene un nivel moderado de cloruros y altos niveles de conductividad eléctrica, relación de absorción de sodio (RAS) y sulfatos (Delgado *et al.*, 2010). Las propiedades físicas de esta agua son resultado de los rasgos geográficos de la región y de la historia geológica que influyen en el funcionamiento de estos ecosistemas. Además, al tratarse de un sistema subterráneo, está generalmente desprovisto de luz y carbón orgánico de fácil acceso, que proporcionan un ambiente peculiar donde se han desarrollado formas de vida únicas como algunos peces, crustáceos, algas, entre otros; además, existe una alta probabilidad de encontrar nuevas especies microbianas y con ello material genético para la producción de sustancias novedosas, sin embargo, por su característica kárstica es altamente susceptible a la contaminación (Griebler y Lueders, 2009; Medina-González, 2009).

Los estudios relacionados con el acuífero de Yucatán están enfocados a su historia, hidrogeología, geoquímica, calidad del agua y flora y macrofauna presentes (Delgado *et al.*, 2010; van Hengstum *et al.*, 2010; Perry *et al.*, 2009; Lefticariu *et al.*, 2006; Iliffe, 1993). En 1936, Wilson inicia los estudios para caracterizar a la microfauna presente en el acuífero. Sin embargo, Suárez-Morales y Rivera-Arriaga en 1998 listan a 89 nuevas especies entre copépodos, ostrácodos, anfípodos, isópodos y misidáceos, concluyendo que la riqueza faunística aún no ha sido suficientemente explorada. Otros esfuerzos de caracterización son los dirigidos a determinar el grado de contaminación bacteriológica en aguas subterráneas de la región, como el estudio de Pacheco, Cabrera y Marín (2000) donde se encontraron altas concentraciones de los géneros *Escherichia*, *Enterobacter* y *Serratia*. Más tarde, la Rosa-

García *et al.*, (2007) hicieron exploraciones en cenotes de la península de Yucatán y reportaron 46 cepas aisladas con actividad antimicrobiana pertenecientes a los géneros: *Aeromonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Shewanella* y *Stenotrophomonas*, más otras 13 cepas no identificadas. Continuando con la investigación, Gamboa-Angulo *et al.*, (2012) aislaron 19 cepas de hongos con actividad antimicrobiana, entre los que destacan los géneros *Acremonium*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Beltrania*, *Fusarium* y 12 no identificados. Estos dos trabajos, son los primeros en sugerir que la microbiota de este hábitat puede ser un recurso microbiológico prometedor y del que aún es necesario un conocimiento más profundo. En el 2014, Moore, realizó el primer análisis metagenómico de la comunidad nativa en agua y en sedimentos del acuífero de Yucatán; en el estudio se observó una alta diversidad microbiana presente y se identificó 79 *phyla* diferentes, siendo los mayoritarios: Proteobacterias, Bacteriodetes, Actinobacteria y Chloroflexi.

II.2 Estudios metagenómicos

Se estima que más del 99% de las bacterias presentes en un ecosistema no pueden ser cultivados por métodos tradicionales (Amann, Ludwig, y Schleifer, 1995) y por tal motivo se recurre a trabajar con técnicas metagenómicas. El término metagenómica deriva del concepto estadístico del meta-análisis (proceso de combinar estadísticamente los análisis por separado) y la genómica (análisis completo del material genético de un organismo) (Rondon *et al.*, 2000). Los estudios metagenómicos implican la manipulación y análisis del conjunto de genomas pertenecientes a una comunidad microbiana (metagenoma) que permiten el estudio de una gran variedad de genes funcionales (Thomas, Gilbert, y Meyer, 2012; Uribe Vélez, 2009). Este campo ha tenido un gran impulso por la necesidad de identificar nuevas enzimas y biomoléculas con aplicación biotecnológica y tiene como objetivo, analizar y entender la diversidad de microorganismos cultivables y no cultivables en diferentes nichos ecológicos, siendo los más estudiados el suelo y el agua (Uribe Vélez, 2009; Grasso, 2006).

Para el desarrollo de los estudios metagenómicos es primordial obtener una muestra de ADN metagenómico (ADNmg) de buena calidad y representativa de la microbiota (Thomas Gilbert, y Meyer, 2012). El análisis puede proseguir a través de la comparación de secuencias o la evaluación de funciones. Los análisis basados en secuencias se apoyan de las técnicas

moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE), microarreglos, entre otros. Las técnicas de secuenciación de última generación, son más accesibles y de mayor potencia, convirtiéndolas en las herramientas más empleadas en estos trabajos, pues permiten la secuenciación del genoma para inspección de genes conservados con la posterior búsqueda de otros genes de interés o puede recurrirse a una secuenciación masiva del metagenoma en busca de ancestros filogenéticos para la reconstrucción de genomas (Sebat, Colwell y Crawford, 2003; Stokes *et al.*, 2001). Con la finalidad de facilitar el análisis de estas secuencias existen servidores, como el MG-Rast, que proporciona información cuantitativa de las poblaciones microbianas obtenidas en la secuenciación, dicho servidor cuenta con el apoyo de otras bases de datos, como el instituto europeo de bioinformática (EMBL-Bank), el centro de información biológica de Japón (DDBJ), el centro nacional de información biotecnológica (GenBank), Swiss-Prot, etcétera (Meyer *et al.*, 2008). Aun cuando estos recursos son gratuitos, la principal desventaja de los estudios metagenómicos con comparación de secuencias es que limita la investigación a la búsqueda de secuencias semejantes previamente reportadas en dichas bases de datos.

Por otra parte, los análisis funcionales incrementan la probabilidad de obtener enzimas y otros metabolitos con propiedades novedosas y de provecho industrial. Para esto, es indispensable la construcción y escrutinio de bibliotecas metagenómicas (Figura 1). Éstas se construyen a partir del ADNmg fragmentado con enzimas de restricción y ligado a vectores, estos últimos son secuencias de ADN conocidas y que expresan la información codificada en el ADNmg fragmentado. Existen distintos tipos de vectores (Cuadro 1), los primeros en emplearse fueron los plásmidos que aceptan pequeños insertos de ADN, mientras que los cósmidos y fósidos aceptan insertos de ADN de mayor tamaño, pero solo pueden mantener un número de copias bajo por cada célula hospedera. Seguidamente, el ADN recombinante (secuencia de nucleótidos derivada de la unión del vector y el fragmento de ADNmg) se introduce en una célula huésped para su clonación, siendo *Escherichia coli* la más empleada (Lodish *et al.*, 2005; Streit y Schmitz, 2004; Luque y Herráez, 2001). En ocasiones, pese a su versatilidad genética, *E. coli* no cuenta con los mecanismos para sintetizar cierto tipo de sustancias, así que comienzan a emplearse otro tipo de hospederos como *Streptomyces* spp., *Agrobacterium*

tumefaciens, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomona putida* y *Ralstonia metallidurans* (Brown, 2008; Klug, Cummings y Spencer, 2006; Steele y Streit, 2005; Courtois *et al.*, 2003).

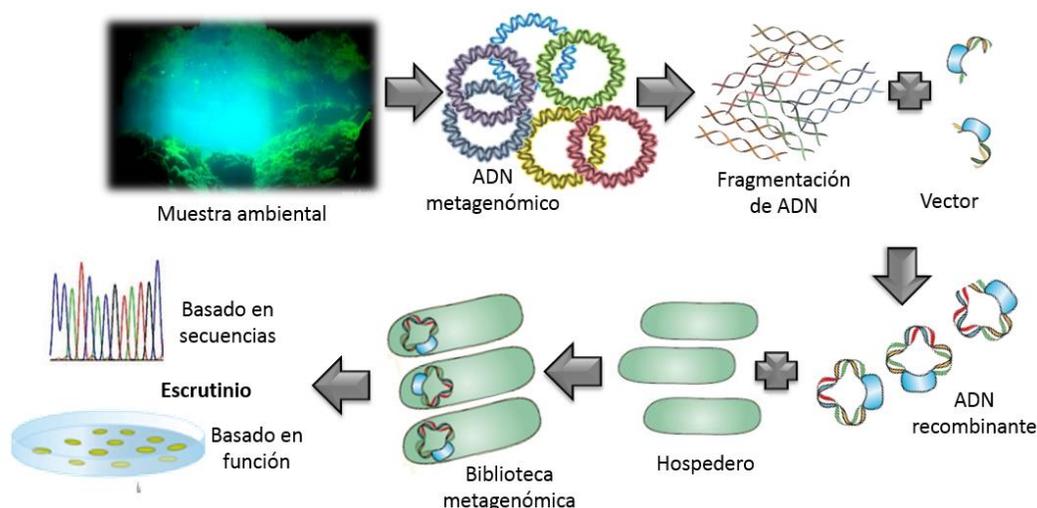


Figura 1. Diagrama de construcción de bibliotecas metagenómicas.

Cuadro 1. Vectores empleados en la construcción de bibliotecas genómicas.

Tipo de vector	Tamaño del inserto que admite
Plásmidos normales	0-10 kb
Bacteriófagos, por inserción (fago λ)	0-10 kb
Bacteriófagos, por sustitución (fago λ)	9-23 kb
Cósmidos	30-44 kb
Fósmidos	30-44 kb
Bacteriófago P1	70-100 kb
PACs (cromosoma artificial de P1)	130-150 kb
BACs (cromosoma artificial de bacteria)	Hasta 300 kb
YACs (cromosoma artificial de levadura)	0.2-1 Mb
Mega-YAC	1-1.4 Mb

Fuentes: Brown, 2008; Streit y Schmitz, 2004; Luque y Herráez, 2001.

Desde 1995 el número de genes y publicaciones de hidrolasas, obtenidas tras el análisis funcional de bibliotecas metagenómicas, ha superado la identificación de otras enzimas (Taupp *et al.*, 2011). Entre las enzimas con menor presencia se encuentran las transferasas, que catalizan la transferencia de un grupo de una molécula a otra y se clasifican según el grupo transferido. A este grupo pertenecen las glicosiltransferasas, enzimas que se

caracterizan por transferir restos glicosilo entre donador y aceptor para formar enlaces glicosídicos, fundamentales en la biosíntesis de polisacáridos (Lombard *et al.*, 2014).

II.3 Exopolisacáridos bacterianos

Los polisacáridos son polímeros de alto peso molecular que se componen de residuos de azúcares y se encuentran presentes en plantas, algas, hongos y bacterias. Estos compuestos se clasifican según las unidades de sacáridos que los conforman en: homopolisacáridos (HoPS), compuestos por un sólo tipo de monómero y; heteropolisacáridos (HePS), compuesto por dos o más monómeros diferentes. En las bacterias, de acuerdo a su localización morfológica, los polisacáridos se clasifican en tres grupos: (1) polisacáridos intracelulares, localizados en el citoplasma y proveen a la célula de fuentes de carbono y energía; (2) polisacáridos estructurales, presentes en la pared celular y; (3) polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos (EPS), excretados de la célula en forma de cápsula o limo (Donot *et al.*, 2012; Wilkinson, 1958).

Los microorganismos procariotes, como las arqueas y algunas bacterias, que se han adaptado a condiciones extremas, producen exopolisacáridos con la finalidad de mantener la integridad de la célula ante situaciones de estrés biótico (competencias contra otros organismos) y abiótico (temperatura, pH, intensidad de luz, salinidad) (Donot *et al.*, 2012; González Burgos, 2011; Poli, Anzelmo y Nicolaus, 2010). Algunos EPS son sintetizados a lo largo del crecimiento bacteriano, mientras que otros solamente se producen al final de la etapa logarítmica o durante la fase estacionaria. El desequilibrio nutrimental, temperatura de incubación por debajo de las óptimas y alta aeración favorecen la síntesis de estos compuestos y la de otro tipo de polímeros, complicando en ocasiones la distinción entre ellos durante su extracción (Sutherland, 2001). La presencia de EPS asociados a bacterias puede identificarse por la formación de colonias mucosas en medio sólido y el aumento de viscosidad o la formación de un gel en el caso de medio líquido. Los EPS capsulares se encuentran unidos a la superficie celular mediante interacciones no covalentes. Por otra parte, el limo no se une a la célula, pero al adherirse a una superficie y compactarse con diversos microorganismos recibe el nombre de biopelícula, brindándole a la comunidad microbiana residente las condiciones adecuadas para su crecimiento y canales de comunicación (Rendueles *et al.*, 2011; Mata Gómez, 2006; Wilkinson, 1958).

La complejidad estructural de estos polímeros se debe a la formación y ruptura de enlaces glicosídicos dirigida por glicosiltransferasas, glicosidasas, glicanfosforilasa, acetil Co-A, fosfoenolpiruvata y polisacárido liasa (Donot, *et al.*, 2012; Lairson *et al.*, 2008). Las bacterias son capaces de producir HoPS y HePS (Cuadro 2), sintetizándose a partir de sacarosa por glicansacararas extracelulares y por glicosiltransferasas intracelulares a partir de precursores glicosídicos, respectivamente (Donot *et al.*, 2012; Freitas, Alves, y Reis, 2009; Gänzle, y Schwab, 2009). Sin embargo, los mecanismos para la formación de los enlaces glicosídicos, por parte de las glicosiltransferasas, aún no es descrita completamente (Lairson *et al.*, 2008).

La síntesis de HoPS puede darse dentro o fuera de la célula, en ambos casos está relacionada a una transferasa que se aloja en el periplasma de las células Gram negativas o que se excreta al medio en el caso de las bacterias Gram positivas. Un ejemplo de esto último es la biosíntesis de dextrano por la bacteria Gram (+) *Leuconostoc* sp., donde una dextransacarasa es la única enzima extracelular participante (Donot *et al.*, 2012; Petit, 2005; Wilches Flórez, 2005; Anton Botella, 1989).

Por otra parte, los estudios para comprender la síntesis de HePS se enfoca a bacterias Gram negativas. Para iniciar la síntesis de estos polisacáridos se requiere de un lípido aceptor y se puede seguir alguna de las siguientes vías: 1) en los sistemas de secreción dependientes-Wzx/Wzy, las unidades del polímero son ensamblados en un aceptor undecaprenil fosfato por varias glicosiltransferasas incrustadas o asociadas a la membrana interna, estos precursores son transportados a través de la membrana interna por una flipasa (Wzx) hasta ser polimerizado por la polimerasa periplasmática (Wzy); 2) en los sistemas dependientes del transportador ABC, la cadena completa de polisacárido se ensambla en un aceptor de lípidos y el transportador ABC pasa al polímero a través de la membrana interna. En ambos casos, se requieren proteínas presentes en la membrana externa (exportadoras y polisacárido-copolimerasas) para movilizar el exopolisacárido a través del periplasma y posterior expulsión (Whitney y Howell, 2013).

Cuadro 2. Exopolisacáridos caracterizados de origen bacteriano: **Glu:** glucosa, **Fruc:** fructosa, **AGluc:** ácido glucorónico, **AMan:** ácido manurónico, **Ace:** acetato, **AcGlu:** Acetilglucosamina, **Ram:** Ramnosa, **Glic:** glicerato, **Man:** Manosa, **Pir:** Piruvato, **AGal:** ácido galacturónico, **Gal:** galactosa, **Suc:** Succinato, **Hbt:** hidroxibutirato, **Fuc:** Fucosa)

EPS	Monómero que compone EPS	Microorganismo productor	Gram	Referencia
HOMOPOLISACÁRIDOS				
Celulosa	Glu	<i>Acetobacter xylinum</i> <i>Gluconacetobacter hansenii</i>	- -	Brown Jr, Willison y Richardson, 1976
Dextrano	Glu	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>Cremoris</i>	+	Lawford <i>et al.</i> , 1979
Curdan	Glu	<i>Agrobacterium</i> sp./ <i>Alcaligenes faecalis</i>	-	Stasinopoulos <i>et al.</i> , 1999
Levano	Fruc	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Zymomonas mobilis</i>	+ -	Ananthalakshmy, y Gunasekaran, 1999; Shih <i>et al.</i> , 2005
HETEROPOLISACÁRIDOS				
Alginato	AGluc, AMan, Ace	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Azotobacter vinelandii</i>	- -	Aarons <i>et al.</i> , 1997; Núñez <i>et al.</i> , 2013
Ácido hialurónico	AcGlu, AGluc	Group A <i>Streptococci</i>	+	Cole <i>et al.</i> , 2012
Gelano	Glu, Ram, Ace, Glic, AGluc	<i>Sphingomonas</i>	-	Sá-Correia <i>et al.</i> , 2002
Xantan	Glu, Man, Ace, Pir, AGal	<i>Xanthomonas campestris</i>	-	Lu <i>et al.</i> , 2007
Succionoglicano	Glu, Gal, Ace, Pir, Suc, Hbt	<i>Rhizobium meliloti</i> <i>Sinorhizobium meliloti</i>	- -	Simsek, Wood, y Reuhs, 2013; Reuber y Walker, 1993
GalactoPol	Gal, Man, Glu, Ram, Ace, Suc, Pir	<i>Pseudomonas oleovorans</i> NRRL B-14682	-	Freitas <i>et al.</i> , 2009
FucoPol	Fuc, Gal, Glu, Suc, Ace, Pir	<i>Enterobacter</i> strain A47	-	Freitas <i>et al.</i> , 2011

II.4 Genes involucrados en la biosíntesis de EPS

Los genes involucrados en la producción de EPS generalmente se localizan en el cromosoma bacteriano (Whitfield y Valvano, 1993), aunque también se reporta la presencia de algunos genes codificados en plásmidos, tal es el caso descrito por Wilches Flórez (2005), donde demuestra que el gen responsable de la producción de polímeros extracelulares producidos por bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentra localizado a nivel plasmídico. Así, los genes involucrados en la biosíntesis de EPS se clasifican en dos grupos: 1) conformado por los genes constitutivos, son parte del metabolismo central del carbono, sintetizan los azúcares nucleotídicos (UDP-glucosa, UDP-glucoronato, GDP-manosa, entre otros) y son regulados independientemente de la síntesis de EPS y; 2) el responsable del ensamble, transporte y polimerización de los EPS y se encuentran agrupados en operones, que varían según la especie productora (Madhuri y Prabhakar, 2014; Gänzle y Schwab, 2009).

Los estudios sobre la biosíntesis de EPS, desde un enfoque genético, generalmente se centran en microorganismos específicos, como el caso de la bacteria ácido láctica (BAL), *Lactococcus lactis* NIZO B40, cuyo clúster de genes involucrados se arregla en *epsRXABCDEFGHIJKL* (Figura 2), donde *epsABI* regulan la polimerización, *epsDEFGH* codifican las glicosiltransferasas y *epsABK* se encargan del transporte del polímero (van Kranenburg *et al.*, 1997). Entre cepas de BAL es frecuente encontrar genes con un alto nivel de similitud, sin embargo en otras cepas diferentes a las BAL se encuentran similitudes, como el gen *rfc* de *E. coli* que tiene un 21% de similitud con el gen *epsI*; o el caso de gen *RfbP* (*H. influenzae*) semejante en un 43% con *epsD* (van Kranenburg *et al.*, 1999).

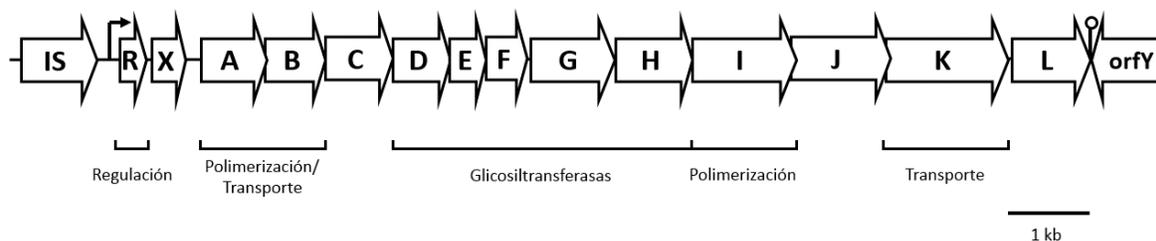


Figura 2. Organización genética del clúster de genes *eps*.

El polisacárido xantán, producido por la bacteria Gram negativa *Xanthomonas campestris*, ha sido ampliamente estudiado debido a su valor comercial. El clúster de genes para *Xantomona*

consiste en 12 genes designados como *gum*BCDEFGHIJKLM, siendo los genes *gum*DHIKM los que codifican las glucosiltransferasas, *gum* B es el gen promotor y en concomitancia con *gum*C llevan a cabo la translocación del EPS a través de la membrana bacteriana (Katzen *et al.*, 1996; Vojnov *et al.*, 1998).

También, se han caracterizado 24 genes en la producción de alginato por *P. aeruginosa*, de los cuales el clúster conformado de 12 genes (*algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ*, *algF* y *alga*) se codifican en un solo operón y por separado en gen *algC*. Barlett *et al.* (1988) predijo, con la bacteria marina *Pseudomonas atlántica*, que el gen de la glucosiltransferasa es el *algG*. Mientras que en *Azotobacter vinelandii*, también característico por producir alginatos, sus genes se organizan en 3 operones (Donot *et al.*, 2012; Gorin y Spencer, 1966).

II.5 Factores que favorecen la producción de EPS

A diferencia del estado libre, donde la producción de EPS es de vital importancia, las cepas puras estudiadas en el laboratorio con medios de crecimiento artificiales pueden no excretar estructuras poliméricas o incluso perder su habilidad para producirlas, sin que esto impacte en el crecimiento o viabilidad de las células (Wingender, Neu y Flemming, 1999).

Existen numerosos estudios enfocados a determinar las condiciones de cultivo para favorecer la producción de EPS en distintas especies microbianas (Donot *et al.*, 2012). Los factores físicos de mayor importancia son la temperatura de incubación (28-37 °C), velocidad de agitación, tensión de oxígeno, tiempo de incubación y pH, que por lo general es ligeramente ácido (4-6.5), pero en ocasiones se emplean rangos de 7-7.5 (Donot, *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Degeest, 2002). También los factores químicos son determinantes, como las fuentes de carbono y nitrógeno, la relación carbono/nitrógeno y la presencia o ausencia de otros compuestos como vitaminas y sales, para estos últimos es generalmente empleado el cloruro de sodio (Ye, Peng y Li, 2011; Ye, Ye y Li, 2011; Degeest, 2002; Rachid *et al.*, 2000). Como principales fuentes de carbono y energía se emplean la glucosa y la sacarosa (Haag, 2006), aunque también se recurre a otras fuentes como: la fructosa, etanol, xilosa y almidón (Donot *et al.*, 2012).

II.6 Importancia del estudio de EPS

La variedad estructural de los EPS, le confiere diversas propiedades físicas y químicas, permitiendo su aplicación en numerosas situaciones y convirtiéndolos en productos cada vez más cotizados, dejando de lado a polímeros provenientes de otras fuentes como las plantas, algas y hongos. Además de sus aplicaciones en la industria alimentaria y textil, estos compuestos pueden emplearse en la remediación de suelos contaminados con metales pesados como el cobre, el plomo y el cobalto, para lo que se han empleado cepas de *Halomonas maura*, *Alteromonas hispánica* y *Pseudomonas aeruginosa* (Cruz Vega, 2008).

Los exopolisacáridos como el alginato, xantán, gelano, pululano, curdano, celulosa, hialuronano, levano, succinoglicano y dextrano son ampliamente empleados en la industria, como ilustra la Figura 3 (Donot *et al.*, 2012; Mata Gómez, 2006). Aun cuando existe una gran cantidad de estudios relacionados en la síntesis, producción, extracción y aplicaciones de los exopolisacáridos, en la actualidad se continúa con la búsqueda de compuestos con aplicaciones novedosas, ejemplo de ello es el polisacárido producido por *Pseudomonas oleovorans*, al que (Freitas *et al.*, 2009) denominaron GalactoPol cuyas propiedades viscoelásticas semejantes a la goma guar, carácter polielectrolito, propiedades floculantes, emulsionantes y con capacidad de formar biopelículas, lo convierten en una alternativa con aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica cosmética, textil, del papel y del petróleo.

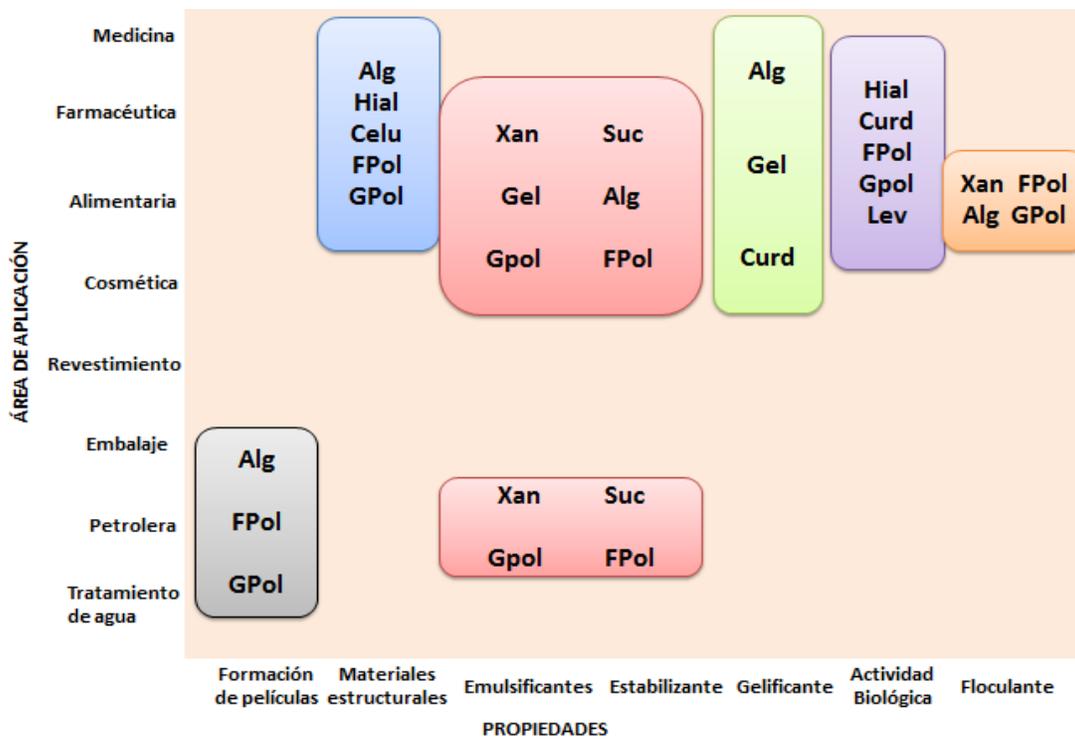


Figura 3. Aplicaciones de exopolisacáridos. Diagrama representando la relación de las propiedades más relevantes de polisacáridos bacterianos y sus áreas de aplicación. Abreviaciones: Alg: alginato, Curd: curdano, FPol: FucoPol, Gel: gelano, GPol: GalactoPol, Hial: hialurano, Lev: levano, Suc: succinoglicano, Xan: xantano. Modificado de Freitas, Alves y Reis, 2011.

II.7 Técnicas para el reconocimiento de EPS

Generalmente, antes de la caracterización genética de cepas productoras de EPS, se recurre a la detección fenotípica. En medio sólido, una colonia mucosa tiene una apariencia brillante y babosa; por otra parte, las colonias viscosas forman largos filamentos al ser tocados con un asa; las cápsulas bacterianas pueden encontrarse en bacterias viscosas y no viscosas. Sin embargo, estas técnicas son susceptibles a las modificaciones fenotípicas que pueden presentarse tras varias resiembras (Ruas-Madiedo, y De Los Reyes-Gavilán, 2005). También, pueden adicionarse colorantes al medio de cultivo, como el rojo ruteño y el rojo Congo que forman complejos con los polisacáridos excretados por las células y las tiñen de color rosa y rojo, respectivamente; por otra parte, el blanco calcofluor permite identificar las cepas productoras de EPS al hacer fluorescer las colonias bajo luz UV (Neu y Lawrence, 2014; Ruas-Madiedo y De Los Reyes-Gavilán, 2005; Berkhoff y Vinal, 1986). Cuando se desea encontrar EPS con una actividad concreta, se emplean técnicas específicas como: 1) tinción con cristal violeta, que tiñe a las adhesinas fijadas en un soporte; 2) evaluación del poder de

aglutinación, que compara la absorbancia inicial y final de una suspensión de EPS; 3) interacción con otros cultivos, para medir el efecto de inhibición (crecimiento o producción de metabolitos) que tenga el EPS sobre otros microorganismos (Rendueles *et al.*, 2011; Rollefson *et al.*, 2011; Yegorenkova *et al.*, 2011).

En contexto, con la ayuda de la metagenómica se puede ampliar el conocimiento de la comunidad microbiana nativa de ambientes característicos como el acuífero de Yucatán. Además, enfocar la investigación a la búsqueda a genes involucrados en la biosíntesis de exopolisacáridos, puede traducirse en productos biotecnológicos de alto valor económico, por su importancia industrial.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo General

Identificar genes relacionados con la producción de exopolisacáridos de la comunidad bacteriana procedente del agua de un pozo profundo de Mérida, Yucatán.

III.2 Objetivos específicos

1. Identificar el potencial de producción de exopolisacáridos de la comunidad bacteriana en el agua de un pozo profundo de Mérida, Yucatán.
2. Evaluar la producción de exopolisacáridos de las clonas productoras.

IV. Referencias

- Aarons, S. J., Sutherland, I. W., Chakrabarty, A. M., & Gallagher, M. P. (1997). A novel gene, *algK*, from the alginate biosynthetic cluster of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 143(2), 641-652.
- Amann, R. I., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), 143-169.
- Ananthalakshmy, V. K., & Gunasekaran, P. (1999). Overproduction of levan in *Zymomonas mobilis* by using cloned *sacB* gene. *Enzyme and microbial technology*, 25(1), 109-115.
- Anton Botella, J. (1989). *Exopolisacáridos de Haloferax mediterranei*. (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante.
- Bartlett, D. H., Wright, M. E., & Silverman, M. (1988). Variable expression of extracellular polysaccharide in the marine bacterium *Pseudomonas atlantica* is controlled by genome rearrangement. *PNAS Biological Sciences: Genetics*, 85(11), 3923-3927.
- Bauer-Gottwein, P., Gondwe, B. R. N., Charvet, G., Marín, L. E., Rebolledo-Vieyra, M., & Merediz-Alonso, G. (2011). Review: The Yucatán Peninsula karst aquifer, Mexico. *Hydrogeology Journal*, 19(3), 507-524. 10.1007/s10040-010-0699-5
- Berkhoff, H. A., & Vinal, A. C. (1986). Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry. *Avian diseases*, 117-121.
- Brown, R. M., Jr., Willison, J. H. M., & Richardson, C. L. (1976). Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. *PNAS U.S.A.* 73(12):4565-4569.
- Brown, T. A. (2008). *Genomas*. (3^a ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Cole, J. N., Aziz, R. K., Kuipers, K., Timmer, A. M., Nizet, V., & van Sorge, N. M. (2012). A conserved UDP-glucose dehydrogenase encoded outside the *hasABC* operon contributes to capsule biogenesis in group A *Streptococcus*. *Journal of bacteriology*, 194(22), 6154-6161.

- Courtois, S., Cappellano, C. M., Ball, M., Francou, F. X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S. J., Hopke, J., Osburne, M. S., August, P. R., Nalin, R., Guérineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., & Pernodet, J. L. (2003). Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 49-55.
- Cruz Vega, D. G. (2008). *Remoción de metales por microorganismos productores de polisacáridos*. (Tesis de maestría). Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada-Querétaro. Instituto Politécnico Nacional.
- Cummings, M. R., Klug, W. S., Spencer, C. A. (2006). *Conceptos de genética*. (8ª ed.). Pearson Educación
- Delgado, C., Pacheco, J., Cabrera, A., Batllori, E., Orellana, R., & Bautista, F. (2010). Quality of groundwater for irrigation in tropical karst environment: the case of Yucatan, Mexico. *Agricultural Water Management*, 97(10), 1423-1433.
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951-962.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science & Technology*, (43), 1-8.
- Freitas, F., Alves, V. D., & Reis, M. A. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in biotechnology*, 29(8), 388-398.
- Freitas, F., Alves, V. D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira, R., & Reis, M. A. M. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource technology*, 100(2), 859-865.

- Gamboa-Angulo, M., De la Rosa-García, S. C., Heredia-Abarca, G., & Medina-Baizabal, I. (2012). Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatan peninsula, Mexico. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 2305-2312.
- Gänzle, M., & Schwab, C. (2009). Ecology of Exopolysaccharide Formation by Lactic Acid Bacteria: Sucrose Utilization, Stress Tolerance, and Biofilm Formation. En M. Ullrich (Eds.), *Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends* (pp. 263-278). Gran Bretaña: ChemBioChem.
- Gondwe, B. R., Merediz-Alonso, G., & Bauer-Gottwein, P. (2011). The influence of conceptual model uncertainty on management decisions for a groundwater-dependent ecosystem in karst. *Journal of Hydrology*, 400(1), 24-40.
- González Burgos, A. (2011). *Caracterización genómica y funcional de consorcios microbianos procedentes de una laguna costera*. (Tesis de maestría). Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Gorin, P. A. J., & Spencer, J. F. T. (1966). Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canadian journal of chemistry*, 44(9), 993-998.
- Graniel, C. E., Morris, L. B., & Carrillo-Rivera, J. J. (1999). Effects of urbanization on groundwater resources of Merida, Yucatan, Mexico. *Environmental Geology*, 37(4), 303-312.
- Grasso, D. (2006). Metagenómica: un viaje a las estrellas. *Revista argentina de microbiología*, 38(4), 189-189.
- Griebler, C. y Lueders, T. (2009). Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 54, 649–677, 10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x
- Haag, A. P. (2006). Mechanical Properties of Bacterial Exopolymeric Adhesives and their Commercial Development. En A. M. Smith, y J. A. Callow (Eds.), *Biological Adhesives* (pp. 1-16). Alemania: Springer Berlin Heidelberg.

- Henne, A., Schmitz, R. A., Bömeke, M., Gottschalk, G., & Daniel, R. (2000). Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 66(7), 3113-3116.
- Hernández-León, R., Velázquez-Sepúlveda, I., Orozco-Mosqueda, M. C., & Santoyo, G. (2010). Metagenómica de suelos: grandes desafíos y nuevas oportunidades biotecnológicas. *Phyton (Buenos Aires)*, 79(2), 133-139.
- Iiffe, T. M. (1993). Fauna troglobia acuática de la Península de Yucatán. En S. I. Salazar-Vallejo, y N. E. González (Eds.), *Biodiversidad Marina y Costera de México*. Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México, pp. 673-686.
- Jenkinson, H. F., & Lappin-Scott H. M. (2001). Biofilms adhere to stay. *Trends in Microbiology*, 9(1), 9-10, 10.1016/S 0966-842X(00)01891-6
- Katzen, F., Becker, A., Zorreguieta, A., Pühler, A., & Ielpi, L. (1996). Promoter analysis of the *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide. *Journal of bacteriology*, 178(14), 4313-4318.
- la Rosa-García, D., Muñoz-García, A. A., Barahona-Pérez, L. F., & Gamboa-Angulo, M. M. (2007). Antimicrobial properties of moderately halotolerant bacteria from cenotes of the Yucatan peninsula. *Letters in applied microbiology*, 45(3), 289-294, 10.1111/j.1472-765X.2007.02185x
- Lairson, L. L., Henrissat, B., Davies, G. J., & Withers, S. G. (2008). Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Biochemistry*, 77(1), 521.
- Lawford, G. R., Kligerman, A., Williams, T., & Lawford, H. G. (1979). Dextran biosynthesis and dextransucrase production by continuous culture of *Leuconostoc mesenteroides*. *Biotechnology and bioengineering*, 21(7), 1121-1131.
- Lefticariu, M., Perry, E. C., Ward, W. C., & Lefticariu, L. (2006). Post-Chicxulub depositional and diagenetic history of the northwestern Yucatan Peninsula, Mexico. *Sedimentary Geology*, 183(1), 51-69.

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., & Darnell, J. (2005). *Biología molecular*. (5ª ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Lombard, V., Ramulu, H. G., Drula, E., Coutinho, P. M., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research*, 42(D1), D490-D495.
- Lu, G. T., Ma, Z. F., Hu, J. R., Tang, D. J., He, Y. Q., Feng, J. X., & Tang, J. L. (2007). A novel locus involved in extracellular polysaccharide production and virulence of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris*. *Microbiology*, 153(3), 737-746.
- Luque, J., & Herráez, A. (2001). *Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. (1ª ed.). España: Harcourt, S. A.
- Madhuri, K. V., & Prabhakar, K. V. (2014). Microbial Exopolysaccharides: Biosynthesis and Potential Applications. *Oriental Journal of Chemistry*, 30(3), 1401-1410.
- Mata Gómez, J. (2006). *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Holomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger*. (Tesis doctoral). Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Medina-González, R. M. (2009). Recursos biológicos de los cenotes de Yucatán. SEDUMA Yucatán. Recuperado el 22 de octubre de 2012, de <http://www.seduma.yucatan.gob.mx/cenotes-grutas/articulos-cenotes.php>
- Melo, F. C. B. C. D., Zaia, C. T. B. V., & Celligoi, M. A. P. C. (2012). Levan from *Bacillus subtilis* Natto: its effects in normal and in streptozotocin-diabetic rats. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1613-1619.
- Meyer, F., Paarmann, D., D'Souza, M., Olson, R., Glass, E. M., Kubal, M., Paczian, T., Rodriguez, A., Stevens, R., Wilke, A., Wilkening, J., & Edwards, R. A. (2008). The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics*, 9(1), 386.

- Moore, A. (2014). *Characterization of the native communities in the karst aquifer of Yucatan Peninsula, Mexico*. (Doctoral dissertation). Northern Illinois University.
- Neu, T. R., & Lawrence, J. R. (2014). Advanced techniques for in situ analysis of the biofilm matrix (structure, composition, dynamics) by means of laser scanning microscopy. En G. Donelli (Ed.). *Microbial Biofilms: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 43-64). Springer New York.
- Núñez, C., Peña, C., Kloeckner, W., Hernández-Eligio, A., Bogachev, A. V., Moreno, S., Guzmán, J., Büchs, J., & Espín, G. (2013). Alginate synthesis in *Azotobacter vinelandii* is increased by reducing the intracellular production of ubiquinone. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(6), 2503-2512.
- Pacheco A, J., Cabrera S, A., & Marín, L. E. (2000). Bacteriological contamination in the karstic aquifer of Yucatán, Mexico. *Geofísica internacional*, 39(3), 285-291.
- París Ripoll, X. (2009). *Obtención de exopolisacáridos de interés industrial a partir del lactosuero y permeatos*. (Tesis doctoral). Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Perry, E., Paytan, A., Pedersen, B., & Velazquez-Oliman, G. (2009). Groundwater geochemistry of the Yucatan Peninsula, Mexico: constraints on stratigraphy and hydrogeology. *Journal of Hydrology*, 367(1), 27-40.
- Petit, A. C. (2005). *Modifications of a bacterial exopolysaccharide from deep-sea hydrothermal origin*. (Doctoral dissertation). Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes. University of Rennes.
- Poli, A., Anzelmo, G., & Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Marine drugs*, 8(6), 1779-1802.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., & Ziebuhr, W. (2000). Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intracellular Adhesin Expression on

- Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobiel agents and chemotherapy*, 44, 3357-3363.
- Rendueles, O., Travier, L., Latour-Lambert, P., Fontaine, T., Magnus, J., Denamur, E., & Ghigo, J. M. (2011). Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides. *MBio*, 2(3), e00043-11.
- Reuber, T. L., & Walker, G. C. (1993). Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell*, 74(2), 269-280.
- Rojas-Herrera, R., Zamudio-Maya, M., Arena-Ortiz, L., Pless, R. C., & O'Connor-Sánchez, A. (2011). Microbial diversity, metagenomics and the Yucatán aquifer. *Phyton (Buenos Aires)*, 80(2), 231-240.
- Rollefson, J. B., Stephen, C. S., Tien, M., & Bond, D. R. (2011). Identification of an extracellular polysaccharide network essential for cytochrome anchoring and biofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*. *Journal of bacteriology*, 193(5), 1023-1033.
- 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., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J., & Goodman, R. M. (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and environmental microbiology*, 66(6), 2541-2547, 10.1128/AEM.66.6.2541-2547.2000.
- Ruas-Madiedo, P., & De Los Reyes-Gavilán, C. G. (2005). Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 843-856.
- Sá-Correia, I., Fialho, A. M., Videira, P., Moreira, L. M., Marques, A. R., & Albano, H. (2002). Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 170-176.

- Schmitter-Soto, J. J., Comín, F. A., Escobar-Briones, E., Herrera-Silveira, J., Alcocer, J., Suárez-Morales, E., Elías-Gutiérrez, M., Díaz-Arce, V., Marín, L. E. y Steinich, B. (2002). Hydrogeochemical and biological characteristics of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia*, 467(1-3), 215-228.
- Sebat, J. L., Colwell, F. S., & Crawford, R. L. (2003). Metagenomic profiling: microarray analysis of an environmental genomic library. *Applied and environmental microbiology*, 69(8), 4927-4934.
- Shih, I. L., Yu, Y. T., Shieh, C. J., & Hsieh, C. Y. (2005). Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(21), 8211-8215.
- Simsek, S., Wood, K., & Reuhs, B. L. (2013). Structural analysis of succinoglycan oligosaccharides from *Sinorhizobium meliloti* strains with different host compatibility phenotypes. *Journal of bacteriology*, 195(9), 2032-2038.
- Sleator, R. D., Shortall, C., & Hill, C. (2008). Metagenomics. *Letters in applied microbiology*, 47(5), 361-366.
- Stasinopoulos, S. J., Fisher, P. R., Stone, B. A., & Stanisich, V. A. (1999). Detection of two loci involved in (1→3)- β -glucan (curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium* sp. ATCC31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene. *Glycobiology*, 9(1), 31-41.
- Steele, H. L., & Streit, W. R. (2005). Metagenomics: advances in ecology and biotechnology. *FEMS Microbiology Letters*, 247(2), 105-111.
- Stokes, H. W., Holmes, A. J., Nield, B. S., Holley, M. P., Nevalainen, K. H., Mabbutt, B. C., & Gillings, M. R. (2001). Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 5240-5246.
- Streit, W. R., & Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics—the key to the uncultured microbes. *Current opinion in microbiology*, 7(5), 492-498.

- Suárez-Morales, E., & Rivera-Arriaga, E. (1998). Hidrología y fauna acuática de los cenotes de la península de Yucatán. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 48, 37-47.
- Sutherland, I. W. (2001). Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 663-674.
- Taupp, M., Mewis, K., & Hallam, S. J. (2011). The art and design of functional metagenomic screens. *Current opinion in biotechnology*, 22(3), 465-472.
- Taupp, M., Mewis, K., & Hallam, S. J. (2011). The art and design of functional metagenomic screens. *Current opinion in biotechnology*, 22(3), 465-472.
- Thomas, T., Gilbert, J., & Meyer, F. (2012). Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2(3).
- Uribe Vélez, D. (2009). Metagenómica. ¿Una oportunidad para el estudio de la diversidad microbiana en Colombia?. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 4-7.
- Van Hengstum, P. J., Reinhardt, E. G., Beddows, P. A., & Gabriel, J. J. (2010). Linkages between Holocene paleoclimate and paleohydrogeology preserved in a Yucatan underwater cave. *Quaternary Science Reviews*, 29(19), 2788-2798.
- van Kranenburg, R., Marugg, J. D., Van Swam, I. I., Willem, N. J., & De Vos, W. M. (1997). Molecular characterization of the plasmid-encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Molecular microbiology*, 24(2), 387-397.
- van Kranenburg, R., Vos, H. R., van Swam, I. I., Kleerebezem, M., & de Vos, W. M. (1999). Functional analysis of glycosyltransferase genes from *Lactococcus lactis* and other Gram-positive cocci: complementation, expression, and diversity. *Journal of bacteriology*, 181(20), 6347-6353.
- Vojnov, A. A., Zorreguieta, A., Dow, J. M., Daniels, M. J., & Dankert, M. A. (1998). Evidence for a role for the *gumB* and *gumC* gene products in the formation of xanthan

- from its pentasaccharide repeating unit by *Xanthomonas campestris*. *Microbiology*, 144(6), 1487-1493.
- Wang, L. L., Wang, L. F., Ren, X. M., Ye, X. D., Li, W. W., Yuan S. J., Sun, M., Sheng G. P., Yu, H. Q., & W, X. K. (2012). pH Dependence of Structure and Surface Properties of Microbial EPS. *Environmental Science & Technology*, 46, 737-744.
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in biotechnology*, 21(6), 269-274.
- Whitfield, C., & Valvano, M. A. (1993). Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in gram-negative bacteria. *Advances in microbial physiology*, 35, 135-246.
- Whitney, J. C., & Howell, P. L. (2013). Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends in microbiology*, 21(2), 63-72.
- Wilches Flórez, A. M. (2005). Estudio genético preliminar de bacterias ácido lácticas productoras de exopolisacáridos (EPS). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 3(2), 12-18.
- Wilkinson, J. F. (1958). The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bacteriological reviews*, 22(1), 46.
- Wilson, C. B. (1936). Copepodos from the cenotes and caves of the Yucatan Peninsula: with notes on cladocerans. En A. S. Pearse, E. P. Creaser, y F. G. Hall (Eds). *The cenotes of Yucatan. Camegie Inst. Washington Publ.* 457:77-78.
- Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H. C. (1999). What are bacterial extracellular polymeric substances?. En *Microbial extracellular polymeric substances* (pp. 1-19). Springer Berlin Heidelberg.
- Ye, F., Peng, G. & Li, Y. (2011). Influences of influent carbon source on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge. *Chemosphere*, 84, 1250-1255.

Ye, F., Ye, Y., & Li, Y. (2011). Effect of C/N ratio on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge flocs. *Journal of Hazardous Materials*, 188, 37-43.

Yegorenkova, I. V., Tregubova, K. V., Matora, L. Y., Burygin, G. L., & Ignatov, V. V. (2011). Biofilm formation by *Paenibacillus polymyxa* strains differing in the production and rheological properties of their exopolysaccharides. *Current microbiology*, 62(5), 1554-1559.

V. ARTÍCULO CIENTÍFICO
BÚSQUEDA DE GENES RELACIONADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE
EXOPOLISACÁRIDOS EN EL AGUA DE UN POZO DEL ESTADO DE YUCATÁN

Alejandra S. Cabañas Sandoval^{1*}, Francisco Rodríguez Valera², Rafael A. Rojas Herrera^{1*}

*¹Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Km 33.5, Tablaje Catastral 13615, Col. Chuburná de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán, México, C.P. 97203; email: ale.casan12@gmail.com *Autor de correspondencia.*

²Grupo de Genómica Evolutiva, División de Microbiología, Universidad Miguel Hernández. Avenida de la Universidad, Elche, Alicante, España, C. P. 03202.

Manuscrito elaborado conforme a las normas editoriales de la revista *Applied Microbiology and Biotechnology*. El documento no ha sido sometido a revisión editorial.

Resumen

Las técnicas metagenómicas permiten aprovechar los recursos inmersos en ambiente. Este trabajo se centra en la búsqueda de genes involucrados en la biosíntesis de exopolisacáridos (EPS) bacterianos por su alto valor industrial y que el conocimiento que se tiene sobre estos polímeros está limitado a bacterias cultivables. Además, la comunidad microbiana de una zona del acuífero de Yucatán ha sido muy poco estudiada y está sufriendo constantes modificaciones a causa de las actividades antropogénicas que están contaminándolo. En este trabajo, tras la pirosecuenciación del ADN metagenómico (ADNmg) se identificaron géneros bacterianos con la capacidad de producir EPS y secuencias con alta similitud de genes que codifican proteínas involucradas en la producción de estos polisacáridos. El análisis funcional evaluó la capacidad de las clonas de producir EPS con las técnicas de siembra en placas con agar Rojo Congo y tinción con Cristal Violeta, seleccionándose 13 clonas positivas de las 9025 clonas analizadas. Después del análisis de los insertos secuenciados no se encontraron secuencias que codifiquen genes involucrados en la biosíntesis de exopolisacáridos, pero la clona CEps6 obtuvo un 90% de identidad con el género *Delftia*. Las clonas CEps4 y CEps8 demostraron la capacidad de incrementar la viscosidad cinemática del medio de cultivo y de producir 26.2 y 43.3 mg de EPS en 100 mL, respectivamente.

Palabras clave: Análisis funcional, exopolisacárido, metagenómica, pirosecuenciación.

Introducción

Los exopolisacáridos bacterianos son polímeros de alto peso molecular, compuestos por residuos de azúcares y excretados al ambiente como respuesta a situaciones de estrés biótico y abiótico (Donot *et al.*, 2012; Poli *et al.*, 2011; Poli, Anzelmo, y Nicolaus, 2010). Estos compuestos son importantes debido a la amplia variedad de propiedades aprovechables en la biorremediación y diversas industrias. Existe una gran cantidad de estudios que describen su estructura, condiciones de producción, propiedades, aplicaciones y genes involucrados en la síntesis de estos compuestos, sin embargo éstas se centran en los géneros *Xantomonas*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Rhodococcus* y tienen en común el previo aislamiento de estas bacterias.

Para evitar los límites que impone el aislamiento, se emplean los análisis metagenómicos, los cuales han permitido obtener un conocimiento más profundo en la ecología microbiana y acelerado el descubrimiento de nuevos compuestos. La construcción y análisis de bibliotecas a partir de ADN metagenómico (ADNm_g) se ha convertido en una de las herramientas más empleadas para este fin, generalmente para la búsqueda de lipasas, antibióticos y proteasas.

En la búsqueda de exopolisacáridos se recurre a sitios extremos, por lo que este estudio se centró en el acuífero subterráneo de Yucatán, que es un ambiente ícono de México que está sufriendo un rápido deterioro debido a las actividades antropogénicas no controladas. Además, existe poco conocimiento sobre la comunidad microbiana presente en este hábitat, pues los estudios previos se centran en la búsqueda de metabolitos, microorganismos o comunidades microbianas específicos (González Burgos, 2011; Pacheco, Cabrera, y Marín, 2000). En este trabajo, a través del análisis bioinformático, se describió a la comunidad microbiana nativa de una muestra de agua de pozo de la ciudad de Mérida, Yucatán y se identificó a las proteínas involucradas en la biosíntesis de exopolisacáridos; también se analizó funcionalmente una biblioteca de fósmidos construida a partir de la muestra de agua anterior; por último se evaluó la capacidad de las clonas positivas para producir EPS.

Materiales y métodos

Muestreo y construcción de biblioteca de fósmidos

En septiembre de 2011 se tomó una muestra de 50 L de agua de un pozo profundo (pzM) localizado al norte de la ciudad de Mérida, Yucatán, México (coordenadas 21°01'48.3" latitud norte y 89°38'15.9" longitud oeste), de acuerdo a la metodología descrita por Martín-Cuadrado *et al.* (2007).

Personal del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) llevó a cabo la caracterización del agua que arrojó una demanda química de oxígeno (DQO) de 0 mg/L, nitrógeno total de 20 mg/L, sólidos totales de 495 mg/L, fosfatos de 0.23 mg/L, oxígeno disuelto 7.19 mg/L, pH 7.18 y penetración de la luz >20 m. El mismo equipo de trabajo realizó la extracción del ADN metagenómico (ADNm_g), según las indicaciones del estuche comercial Metagenomic DNA Isolation for Water (Epicentre, Madison, WI) que posteriormente se pirosecuenció usando la plataforma 454 de Roche, los resultados fueron

guardados y procesados usando el servidor de análisis metagenómico MG-RAST (Meyer *et al.*, 2008). También, con el ADNmg extraído se construyó una biblioteca metagenómica siguiendo el protocolo descrito en el estuche comercial TransforMax™ EPI300™ Electrocompetent *E. coli* (Epicentre, Madison, WI) empleando como hospedero a *E. coli* EPI300 y como vector el fósido pCC2FOS™ (Epicentre, Madison, WI).

Para el mantenimiento de la biblioteca de fósidos se empleó el medio LB con cloranfenicol (LB_{cl}) (1% p/v triptona, 0.5% p/v extracto de levadura, 0.5% p/v NaCl y 12.5 µg mL⁻¹ cloranfenicol) y se incubó a 37 °C. Para la selección de las clonas productoras de exopolisacáridos (EPS) el medio LB_{cl} se suplementó con 3% (p/v) sacarosa (LB_{cl}-Sac) ó 3% (p/v) cloruro de sodio (LB_{cl}-NaCl). En algunos casos, para inducir la producción multicopia del vector empleado, se adicionó arabinosa 0.001 % (v/v) al medio (Jendrisak *et al.*, 2006).

Selección de bacterias productoras de EPS

Rojo Congo (RC). Este método se emplea para evaluar la habilidad de la clona para enlazar el RC a los polisacáridos excretados. Se siguió la metodología descrita por Berkhoff y Vinal (1986), las clonas se sembraron en agar tripticaseína de soya (TCS) adicionado con RC al 0.03% p/v. Se observaron las características macroscópicas de las colonias en agar TCS-RC (control) y agar TCS-RC suplementado con glucosa y con sacarosa al 2% p/v. Se incubó a 37°C durante 72 horas.

Tinción con Cristal Violeta (CV). Con esta técnica se evaluó la habilidad de las clonas para formar adhesinas sobre una superficie de borosilicato (BS) o poliestireno (PS) como describen O'Toole y Kolter (1998). Las clonas fueron transferidas, una a una y por duplicado, a tubos de ensaye de BS o a placas de 96 pozos (Sarstedt) de PS con los medios LB_{cl}-Sac y LB_{cl}-NaCl, se incubaron a 37 °C durante 3 días y se tiñeron con una solución 0.1% (p/v) CV.

Extracción del fósido y secuenciación

Un matraz con 15 mL de medio LB_{cl} se inoculó con 1.5 mL de un cultivo previo y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación vigorosa. Se centrifugó un volumen de 1.5 mL de medio LB_{cl} previamente inoculado a 15 000 xg durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y la pastilla formada se lavó 3 veces con 1 mL de buffer TEG (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM

EDTA, 50 mM glucosa). Para la extracción se siguió el método de lisis alcalina del estuche comercial FosmidMAX DNA Purification Kit (Epicentre, Madison, WI). La calidad del ADN se corroboró en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA pH 8). Para evitar secuenciar clonas iguales, las muestras fueron digeridas con las enzimas *EcoR* I y *Hind* III (1 μ L buffer 10X, 1 U de la enzima, 5 μ L de muestra, 2 μ L agua destilada), a 37°C durante una hora. Seguidamente se compararon los patrones de bandeo mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1mM EDTA pH 8). Las muestras se secuenciaron usando la plataforma Illumina en Utah State University.

Cinética de viscosidad cinemática

Se midió la viscosidad cinemática de las clonas seleccionadas como positivas tras el análisis con CV después de un mes de incubación a 37 °C, para elegir a las clonas con las que se realizó la cinética de viscosidad cinemática (mm^2/s) durante tres semanas (días: 0, 1, 3, 4, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18) (González Burgos, 2011). La cinética se realizó en tubos de ensaye con LB_{cl}-Sac por triplicado, haciendo diez mediciones por cada tubo. El medio se inoculó al 4% con un precultivo de la noche anterior, para cada muestra. Como control positivo se empleó una cepa del género *Vibrio* previamente caracterizada como productora de EPS en el laboratorio de biotecnología de la Universidad Autónoma de Yucatán, como control negativo se usó a *E. coli* EPI300. La viscosidad cinemática se midió a 37°C con un viscosímetro de tubo capilar Oswald de 1/3" tipo Cannon-Frenske No. 200.

Producción y extracción de EPS

Para la producción de exopolisacáridos se emplearon 960 mL de medio LB_{cl}-Sac, induciendo con arabinosa al 0.001% la producción multicopia del vector y se incubó a 37 °C durante 30 días, sin agitación. Pasado el tiempo de incubación, se inactivaron las enzimas presentes en un baño María a 97 °C durante 15 minutos y posteriormente se precipitación los EPS con etanol absoluto como describen Gong *et al.* (2009). Después la muestra se dializó durante 48 horas en una membrana Biotec de Celulosa Ester (CE) de 10 000 Da (Spectrum Labs, México, D.F.). El producto dializado se congeló, liofilizó, pesó y reguardo para futuros análisis.

Resultados

Muestreo y secuenciación de la muestra pzM

Con la pirosecuenciación de la muestra se agua se obtuvo 157,907 secuencias que se ingresaron a la base de datos del MG-Rast (MG-Rast ID 4503026.3). Tras el control de calidad (CC) del servidor, 101,983 secuencias fueron desechadas, obteniéndose un total de 55,924 secuencias de alta calidad en el agua de pozo. De éstas, 47,184 secuencias codifican regiones de proteínas conformadas en un 73.3% por secuencias de proteínas conocidas y 26.7% por secuencias de proteínas desconocidas (Cuadro 3).

Además, de los 113 géneros bacterianos pertenecientes a la comunidad microbiana de la muestra pzM, se identificó que el phylum predominante es *Firmicutes* con el 79.7% de la comunidad bacteriana, seguido por las *Proteobacterias* (9.9%) y las *Actinobacteria* (4.2 %) (Figura 4). En la muestra de agua los *Firmicutes* están caracterizados por la presencia de los géneros *Bacillus* (38%) y *Paenibacillus* (23%); las *Proteobacterias* por *Burkholderia* (9%) y *Pseudomona* (5%); y las Actinobacterias por *Streptomyces* (18%) y *Mycobacterium* (15%).

Cuadro 3. Datos de la pirosecuenciación de la muestra de agua pzM.

Característica	Sin CC	Con CC
Pares de bases ingresados	67.1 Mb	26.4 Mb
Número de secuencias ingresadas	157 907	55 924
Longitud promedio de las secuencias ingresadas	424 ±139 pb	471±118 pb
Secuencias con regiones codificantes de proteínas	---	47 184
Secuencias de proteínas conocidas	---	34 590
Secuencias de proteínas desconocidas	---	12 594
Secuencias de funciones conocidas	---	31 345
Bacteria	---	98.4%
Archeas	---	0.8%
Eubacteria	---	0.7%

La comparación funcional del Mg-Rast arrojó que el 1 % de las secuencias de funciones conocidas están relacionadas con la biosíntesis de polisacáridos extracelulares (Cuadro 4), principalmente polímeros como: alginato, ácido hialurónico, ácido colánico y ácido siálico y otras secuencias que se relacionan con la biosíntesis de compuestos importantes para la formación de exopolisacáridos capsulares como los ácidos legiomanímico y pseudomónico.

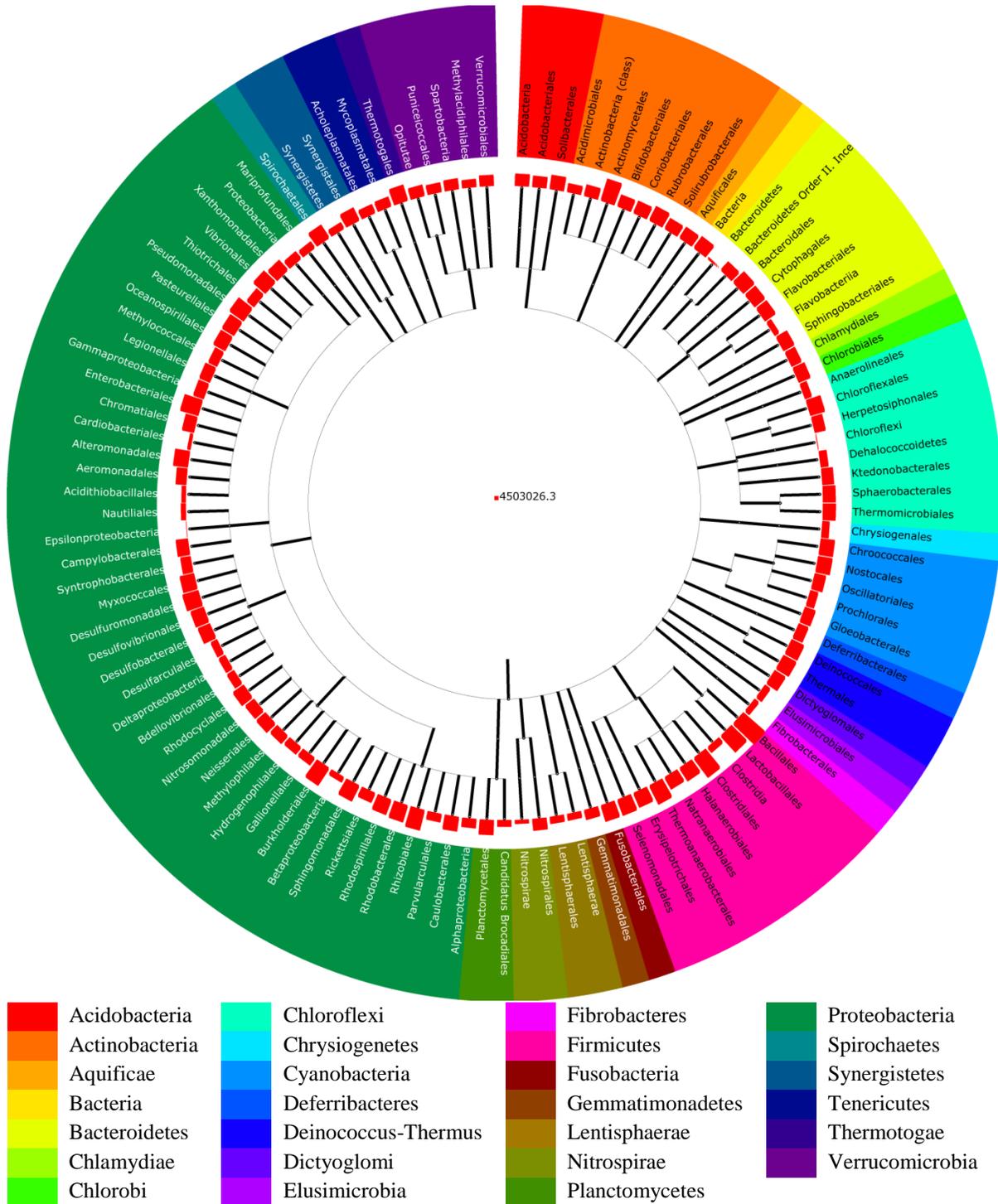


Figura 4. Distribución de la comunidad bacteriana presente en la muestra de agua. El sombreado en color de los nombres del nivel orden indica la pertenencia a una familia. Las barras de color rojo indican la abundancia de cada miembro.

Cuadro 4. Proteínas involucradas en la biosíntesis de exopolisacáridos encontrados en la muestra pzM tras la comparación funcional del Mg-Rast.

Polisacárido	Proteína involucrada
Ácido siálico	Glucosamina--fructosa-6-fosfato aminotransferasa
	Fosfoglucosamina mutasa
	Sistema PTS, N-acetilglucosamina-especifica IIB componente
	Sistema PTS, N-acetilglucosamina-especifica IIC componente
	Sistema PTS, N-acetilglucosamina-especifica IIA componente
	N-acetilglucosamina-6-fosfato deacetilasa
	Glucosamina-6-fosfato deaminasa
	UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerasa
	Ácido siálico transportador (permeasa) NanT
	Sistema Transportador tipo-TRAP
	Ácido siálico regulador, familia RpiR
	Sistema PTS, Componente específico manosa IIC
	N-acetilneuraminato sintasa
	Sistema PTS, Componente específico manosa IID
	N-acetilmanosamina cinase
	Glucosamina-1-fosfato N-acetiltransferasa
	N-acetilglucosamina-1-fosfato uridiltransferasa
	N-acetilmanosamina-6-fosfato 2-epimerasa
	ABC transportador
	Sistema PTS, Componente específico manosa IIA
N-Acetylneuraminato citidililtransferasa	
Sistema PTS, Componente específico manosa IIB	
Alginato	Manosa-1-fosfato guanililtransferasa (GDP)
	Manosa-6-fosfato isomerasa
	Transportador Hexuronato
	Fosfomanomutasa
	Proteína reguladora en la biosíntesis de alginato
Ácido Hialurónico	UDP-glucosa deshidrogenasa
	UTP-glucosa-1-fosfatouridililtransferasa
	Hialuroran sintasa
	Proteína Tirosina fosfatasa <i>CpsB</i>
Ácido colánico	GDP-L-fucosa sintetasa
	Proteína de biosíntesis para lipopolisacarido WzxC
	Ácido colánico biosíntesis glicosil transferasa WcaE
	GDP-manosa 4,6-deshidratasa
	Ácido colánico biosíntesis glicosiltransferasa WcaI

Análisis funcional de la biblioteca de fósmidos

La biblioteca de fósmidos fue evaluada funcionalmente con las técnicas de crecimiento en agar LB con rojo Congo y la tinción de biopelículas con cristal violeta en dos soportes diferentes. Los resultados obtenidos son resumidos en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Resultados del análisis de tinción de polisacáridos con RC y CV.

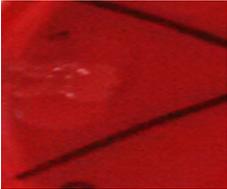
Técnica	No. de clonas evaluadas	No. de clonas positivas	No. de clonas seleccionadas
Rojo Congo	100	-	0
Cristal violeta-BS	700	16	8
Cristal violeta-PP	8325	17	5
Total	9025	46	13

Simbología: BS= Borosilicato, PP= Polipropileno.

El primer análisis funcional consistió en distinguir la capacidad de las clonas de producir EPS formando complejos con el Rojo Congo (Figura 5). Aunque las clonas evaluadas mostraron una coloración semejante al control positivo, éste no fue uniforme. Además Las clonas evaluadas mostraron un aspecto semejante a las colonias del control negativo (*E. coli* EPI300). Debido a la dificultad para distinguir entre clonas positivas y negativas, se decidió descartar la técnica y proseguir la inspección con cristal violeta.

El análisis con cristal violeta determinó cualitativamente la capacidad de la clona para adherirse a una superficie al modificar la presión osmótica provocada por el exceso NaCl y Sacarosa (Sac). Las primeras 700 clonas se evaluaron con la superficie de BS y se seleccionaron las clonas que dieron positivo en ambos medios fortificados y también que el anillo visualizado con la tinción de cristal violeta estuviera completamente cerrado y con un grosor considerable. (Figura 6). Se seleccionaron 8 clonas para secuenciar, dichas clonas son: CEps1 – CEps8.

Figura 5. Descripción morfológica de las cepas en agar con rojo Congo

Cepa	<i>E. coli</i> EPI 300 Control (-)		<i>P. putida</i> Control (+)	
Medio	LB	LB-Sac	LB	LB-Sac
Imagen				
Presencia -ausencia	+++	+++	+++	+++
Aspecto de las colonias	Forma redonda con bordes definidos, plana, opaca y coloración roja.	Forma redonda con bordes definidos, ligeramente elevada, opaca y coloración roja.	Forma redonda con bordes definidos, plana, opaca y coloración roja.	Redonda con elevación en el centro, bordes definidos, opaca, viscosas y coloración negro.
Clona	Clona 39		Clona 41	
Medio	LB _{cl}	LB _{cl} -Sac	LB _{cl}	LB _{cl} -Sac
Imagen				
Presencia -ausencia	++	+++	++	+++
Aspecto de las colonias	Forma redonda sin bordes definidos, plana, opaca y coloración roja.	Forma redonda sin bordes definidos, ligeramente elevada, opaca y coloración roja con negro.	Forma redonda sin bordes definidos, plana, opaca y coloración roja.	Forma redonda sin bordes definidos, ligeramente elevada, opaca y coloración roja con negro.

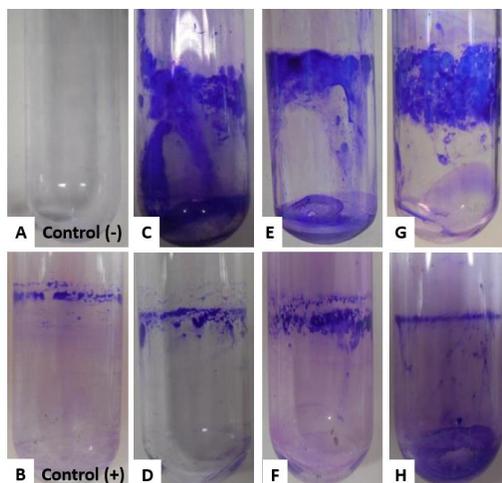


Figura 6. Tinción con cristal violeta de películas adheridas a borosilicato. A) *E. coli* Epi 300, B) aislado de *Vibrio*, C) CEps5 en LB_{cl} con sacarosa, D) CEps5 en LB_{cl} con NaCl, E) CEps6 en LB_{cl} con sacarosa, F) CEps6 en LB_{cl} con NaCl, G) CEps7 en LB_{cl} con sacarosa y H) CEps7 en LB_{cl} con NaCl.

Las siguientes 8,325 clonas se evaluaron en placas de 96 pozos de PP, donde se observó la presencia de las biopelículas en distintas zonas (Figura 7): superficial (CEps9), interfase líquido-aire (CEps10, CEps11 y CEps12) y al fondo del pocillo (CEps13). Las clonas CEps9 y CEps13 fueron seleccionadas debido a que fueron las únicas en presentar ese fenotipo y CEps10-CEps12 fueron las clonas que cumplieron las mismas condiciones que en el soporte de BS. Éstas mismas son las que se enviaron a secuenciar.

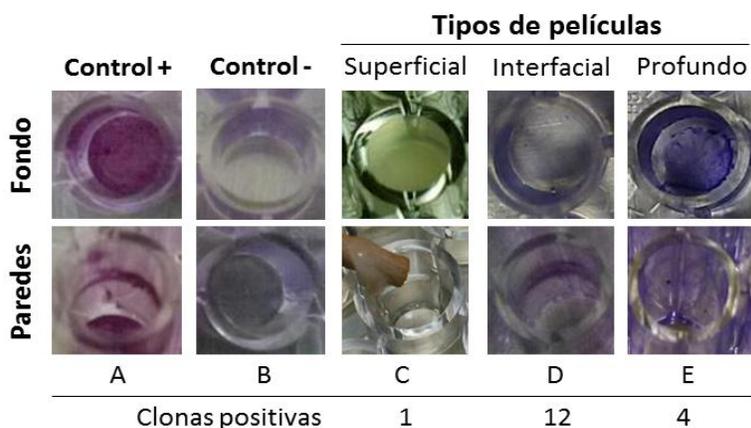


Figura 7. Fenotipo de biopelículas formadas en pozos de polipropileno. El cristal violeta tiñó las biopelículas adheridas a la superficie de polipropileno, sin embargo también hubo formación de una biopelícula sin capacidad de adherirse a la superficie, por lo que al efectuar la tinción no se fijó el colorante. A) Aislado de *Vibrio*, B) *E. coli* Epi300, C) CEps9, D) CEps11 y E) CEps13.

Secuenciación de insertos

De las clonas secuenciadas, únicamente la clona CEps6 pudo ser ensamblada, obteniéndose 10 *contigs*, cuyos resultados después del análisis BLAST se listan en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Resultados de la secuenciación del fósido de la clona CEps6

Contig	Longitud (pb)	Microorganismo	Identidad	Valor E	Descripción
1	7130	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	97 %	0.0	Proteína de secreción tipo VI IcmF
2	6670	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	99%	0.0	Proteína de resistencia acriflavina
3	6071	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	100%	0.0	Proteína de función desconocida DUF437GCN5 relacionada con N-acetiltransferasa
4	8671	<i>Delftia</i> sp. Cs1-4	96%	0.0	Proteína putativa transmembrana
5	9112	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	97%	0.0	Transportador ABC (urea)
6	6123	<i>Delftia</i> sp. Cs1-4	94%	0.0	Proteína hipotética
7	10174	<i>Delftia</i> sp. Cs1-4	90%	7e-172	Trans-hexapreniltransferasa
8	7460	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	96%	0.0	Proteína B de segregación y condensación pseudouridina sintasa, familia RluA
9	9031	<i>Delftia</i> sp. Cs1-4	93%	0.0	Biosíntesis de policétidos
10	2154	<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1	99%	1e-103	Regulador transcripcional

Cinética de viscosidad cinemática y producción de EPS

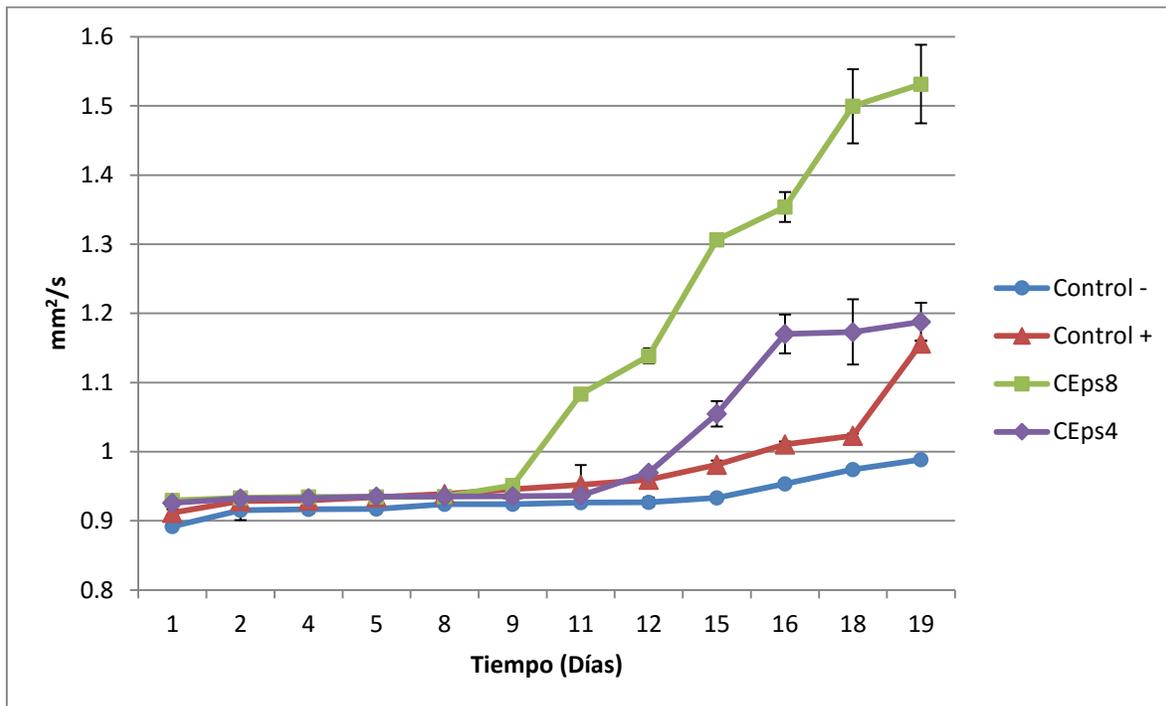
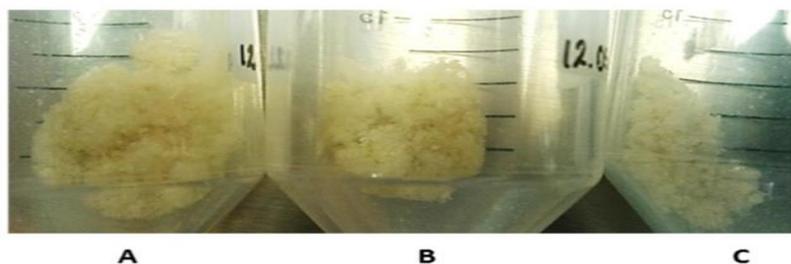


Figura 8. Cambio en la viscosidad del medio de cultivo durante el período de incubación. Comparación de producción de EPS entre dos clonas de la biblioteca de fósmidos y las cepas *E. coli* EPI300 (control negativo) y un aislado de *Vibrio* (control positivo). Se graficó la media \pm desviación estándar (n=10)

Las clonas con mayor viscosidad cinemática, después de un mes de incubación fueron las clonas CEps4 y CEps8. A éstas se les monitoreó el incremento en la viscosidad cinemática (Figura 8). A partir del día 9, se hizo evidente el incremento de la viscosidad en la clona CEps8, misma que al tiempo final (día 19) obtuvo los valores más altos, registrando $1.52 \text{ mm}^2/\text{s} \pm 0.0568$; por otra parte, la clona CEps4 presentó aumentos de viscosidad cinemática del día 12 al día 16. El control negativo, *E. coli* EPI300 demostró un ligero aumento en la viscosidad del medio, aumentando sólo $0.09 \text{ mm}^2/\text{s}$ durante el tiempo de incubación; el control positivo, cepa de *Vibrio*, mantuvo la viscosidad del medio constante hasta el día 12, presentando el mayor aumento hasta el día 19.

Después de 17 días de incubación, se procedió a extraer los polímeros. De un volumen inicial de 100 mL de cultivo la clona CEps8 es la que tuvo la mayor producción de EPS ($43.3 \text{ mg}/100 \text{ mL}$). De *E. coli* EPI300 se obtuvieron 16.7 mg de polímero, siendo congruente con la cinética de VC en ser la cepa menos productora (Figura 9).



Cepa	EPI300	CEps4	CEps8
mg de EPS por 100mL de medio	16.7	26.2	43.3

Figura 9. Gramos de EPS producidos por las clonas CEps 4, CEps 8 y EPI300 despues de un mes de incubación.

Discusión

La comunidad microbiana de un cuerpo de agua está influenciada por el tipo y condiciones ambientales (temperatura, pH, salinidad, etc.) del sitio de muestreo (Griebler y Lueders, 2009; Gounot, 1994). Los estudios orientados a la caracterización de la diversidad microbiana del agua subterránea del estado de Yucatán y otros ambientes prístinos de tipo kársticos son muy escasos, en comparación con los trabajos enfocados en aguas superficiales, acuíferos contaminados y otros ambientes extremos (Varin *et al.*, 2012; González Burgos, 2011; Pronk, Goldscheider, y Zopfi, 2009; Martín-Cuadrado *et al.*, 2007; Goldscheider, Hunkeler, y Rossi, 2006; Fusconi y Godinho, 2002). En la muestra pzM, los tres *phyla* predominantes (Firmicutes, Proteobacterias y Actinobacteria) coinciden con los sitios de origen kárstico estudiados por Moore (2014) y otros cuerpos de agua de diferente origen (Varin *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2009); con la diferencia de que pzM presenta una elevada abundancia de Firmicutes (79%), comparable con cuerpos de agua contaminados (N'Guessan *et al.*, 2008; Vieira *et al.* 2008; Sharmin *et al.*, 2003). Pero según los resultados de la caracterización hecha por el CICY, la muestra pzM se clasifica como un sitio oligotrófico (OCDE, 1982) así que, concerniente a la abundancia de flora microbiana alóctona, la alta permeabilidad del suelo podría ser la responsable (Griebler y Lueders, 2009; Perry *et al.*, 2009; Goldscheider *et al.*, 2006).

Por otra parte, los subgrupos α -, β - y γ -*Proteobacteria*, pertenecientes al segundo filo más abundante en la muestra de estudio, son considerados parte de los microorganismos

autóctonos de acuíferos kársticos y también son detectados frecuentemente en lagos de agua dulce a nivel mundial (Moore, 2014; Mueller-Spit *et al.*, 2009; Pronk, Goldscheider y Zopfi, 2009; Goldscheider *et al.*, 2006; Zwart *et al.*, 2002; Gounot, 1994). Aunque la abundancia de este filo es bajo (9.9%), se encontraron géneros como *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Azotobacter* y *Zymomonas*, de los que hay una vasta evidencia sobre su capacidad para producir EPS. Sin embargo, es recomendable no enfocar estos estudios en las células planctónicas (células suspendidas en el agua), pues en este medio el número de células es de $10^4 - 10^6 \text{ mL}^{-1}$ en aguas subterráneas y los polímeros producidos por estos géneros bacterianos están estrechamente relacionados a biopelículas y sedimentos donde el número de células es, al menos, dos veces mayor (Todhanakasem *et al.*, 2014; Fernández-Delgado *et al.*, 2013; Gauri, Mandal y Pati, 2012; Byrd *et al.*, 2010; Pronk *et al.*, 2009; Goldscheider *et al.*, 2006).

El análisis bioinformático también reveló la presencia de proteínas involucradas en la síntesis de alginato, ácido hialurónico, ácido siálico y ácido colánico. Éstos son algunos de los polímeros que usan las bacterias para adherirse fuertemente a superficies, así que para aumentar la presencia de bacterias capaces de producir exopolisacáridos se recomienda estudiar a la comunidad bentónica presentes en biopelículas o tapetes microbianos del punto de muestreo (pzM), pues la turbulencia de las corrientes del acuífero de Yucatán limita el encuentro de nutrientes necesarios para cubrir las necesidades bacterianas y es la capacidad de una bacteria para elaborar adhesinas y unirse a una superficie la que determina su supervivencia, al excretar sustancias receptoras de nutrientes y propiciar las condiciones adecuadas para el crecimiento de la comunidad microbiana residente (Bauer-Gottwein *et al.*, 2011; Goldscheider *et al.*, 2006; Bester *et al.*, 2005; Danese, Pratt, y Kolter, 2000; Davies, Chakrabarty, y Geesey, 1993; Bartlett, Wright, y Silverman, 1988). Es importante aclarar que con el estudio de la comunidad bentónica se induce el aumento de actividad de los genes involucrados en la biosíntesis de EPS, como reportan Davies y Geesey (1995), donde demostraron que la actividad del gen *algC* es 19 veces más alta en bacterias presentes en biopelículas que en las bacterias planktónicas de la misma especie. Además, el estudio de la comunidad bentónica no se limitaría a la obtención de exopolisacáridos con capacidades de adhesión, sino que también se encuentran EPS con otras actividades, como la reportada por Rendueles *et al.* (2011), donde el exopolisacárido sintetizado por un aislado de *E. coli* es

capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de cepas Gram positivas de la comunidad residente de una biopelícula.

La evaluación funcional de la biblioteca metagenómica con RC fue descartada al no presentar coincidencia con las observaciones realizadas por Berkhoff y Vinal (1986) para distinguir entre cepas de *E. coli* invasivas (coloración roja) y no invasivas (coloración blanca) según su capacidad de producir exopolisacáridos con los cuales fijarse a la superficie del hospedero. Esta técnica se ha empleado con éxito en otras cepas como *Pseudomona fluorescens* SBW25 (Spiers, Bohannon, Gehrig, y Rainey, 2003), *Yersenia enterocolitica* (Prpic, Robins-Browne, y Davey, 1983) y *Pastelurella petis* (Surgalla y Beesley, 1969). No obstante, la técnica con RC puede presentar falsos positivos, como describen Sharma, Soni, y Meharchandani (2006) donde se probó que el 34 % de los aislados considerados como positivos realmente no eran productores de exopolisacáridos. Este comportamiento es explicado por Berkhoff y Vinal (1986), quienes mencionan que el rojo Congo tiene una alta afinidad por los enlaces β -D-glucan que comúnmente forman parte de la membrana exterior de algunas *Salmonellas* y otras bacterias Gram negativas. Por otro lado, la coloración marrón oscuro presentada por *P. putida* (control positivo), también se ha empleado como indicadores de cepas productoras de biopelículas, Kaiser *et al.* (2013) reportan que en aislados de *Staphilococcus* los aislados positivos presentan una coloración marrón oscuro mientras que las negativas presentan una coloración roja, coincidiendo con los controles positivo y negativo en este trabajo. La diferencia de coloraciones está influenciada por factores como: 1) el tipo de microorganismo (Prpic, Robins-Browne, y Davey, 1983) y 2) las variaciones fisicoquímicas como el tipo de sustrato, la temperatura de incubación y el pH que provocan que una misma cepa produzca diferentes EPS (Kuttel *et al.*, 2012; Degeest, Mozzi, y De Vuyst, 2002). Es por ello que en la actualidad, para estudios poblacionales, se recurre a técnicas moleculares para confirmar la presencia de glicosiltransferasas u otros genes involucrados en la producción de EPS (Kaiser *et al.*, (2013, Rollefson *et al.*, 2011; Los *et al.*, 2010). Particularmente, las características fenotípicas presentadas por las clonas en el medio enriquecido con sacarosa no permiten una adecuada clasificación, pues aunque macroscópicamente las colonias presentan un borde irregular y una superficie ligeramente rugosa, como suelen observarse en cepas de *Vibrio* y *Salmonella* productoras de EPS (Yildiz *et al.*, 2004; Solano *et al.*, 2002; Yildiz y Schoolnik, 1999), la combinación de coloración en las colonias podría deberse a daños causados a la

membrana celular por la electroporación durante la construcción de la biblioteca metagenómica (Pagan y Mañas, 2006).

Naturalmente, *P. aeruginosa* y otros microorganismos son capaces de formar biopelículas a partir de las células planctónicas en contacto con las superficies del medioambiente (O'Toole y Kolter, 1998a). Así que, tras descartar la técnica con RC, se decidió evaluar dicha capacidad a través del aumento de la presión osmótica con sacarosa y NaCl. Zielinski *et al.*, (1992) concluyen que el incremento de osmolaridad del medio también aumenta la expresión de genes involucrados en este proceso. Además, Rachid *et al.* (2000) demuestran que el NaCl es uno de los mejores suplementos para inducir la formación de biopelículas y la sacarosa es uno de los sustratos más empleados para la producción de diversos EPS (Donot *et al.*, 2012; Santos, Teixeira, y Rodrigues, 2000). El conjunto de estos factores es lo que pudo provocar la alta incidencia de clonas positivas en el estudio, en comparación con el número de positivos encontrados en otras bibliotecas metagenómicas (Terrón-González *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2013; Courtois *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2008; Knietsch *et al.* 2003; Henne *et al.*, 1999). Como Yegorenkova *et al.* (2011) y O'Toole y Kolter (1998b) demuestran, no todos los microorganismos tienen la misma habilidad para adherirse a superficies hidrofóbicas (polipropileno) o hidrofílicas (borosilicato), también mencionan que, entre los factores más importantes para la formación de biopelículas, las propiedades fisicoquímicas del material colonizado juegan un papel importante. En la naturaleza, las biopelículas están conformadas por una alta cantidad de proteínas y en menor proporción están los EPS y residuos de ADN extracelular (Böckelmann, Lünsdorf, y Szewzyk, 2007; Flemming y Wingender, 2001). La afinidad al soporte de BS indica la presencia de polímeros hidrofílicos como los EPS, estructuralmente indispensables en las biopelículas porque determinan su estabilidad mecánica y fácilmente aprovechables en la industria, mientras que la presencia de biopelículas adheridas a la interfase aire-líquido del soporte de PP sugiere que estructuralmente dominan proteínas involucradas en enlaces hidrofóbicos (Donot *et al.*, 2012; Freitas, Alves y Reis, 2011; Pasquel, 2001, Wingender, Neu, y Flemming, 1999).

La elección del hospedero es un paso primordial para la construcción de bibliotecas metagenómicas. Se sabe que *E. coli* no siempre es capaz de expresar genes heterólogos, se estima que esta cepa puede expresar sólo el 7% de secuencias codificantes de la clase

actinobacteria, mientras que de la clase firmicutes el 73%. Sin embargo, Yan *et al.* (2013) caracterizaron el cluster de genes (30 Kb) involucrados en la producción de EPS de *Bacillus licheniformis* mediante el escrutinio de una biblioteca genómica construida con *Escherichia coli*. Se recomienda que en estudios posteriores la biblioteca metagenómica estudiada en este trabajo sea evaluada en otro hospedero, pues para la búsqueda de EPS generalmente se recurre a modificar especies bacterianas que naturalmente pueden producir estos compuestos (Rollefson *et al.*, 2011; Uchimiya y Miyazaki, 2009; Gabor, Alkema, y Janssen, 2004; Courtois *et al.*, 2003; Yoshida *et al.*, 2001; Fournet-Fayard, Joly, & Forestier, 1995; Liu *et al.*, 1988).

Tras el análisis funcional y la secuenciación de los fósmidos seleccionados, solamente de la clona CEps6 se pudo tener secuencias ensambladas. El BLAST reveló que los 10 contigs obtenidos de la clona CEps6 tienen una elevada similitud con el género bacteriano *Delftia* (Gram negativo). Este género, presente en suelos y agua dulce, es capaz de acumular intracelularmente polímeros como los polihidroxicanoato (PHA) y los poli- β -hidroxibutirato (PHB) con altos rendimientos (Loo y Sudesh, 2007; Mothes y Ackermann, 2005; Wen *et al.*, 1999). Sin embargo, no se encontró semejanza con alguna secuencia de glicosiltransferasas en los contigs evaluados, Wen *et al.* (1999) mencionan que el género *Delftia* no tiene la capacidad de sintetizar levano a partir de sacarosa y tampoco se halló evidencia de que otros exopolisacáridos sean sintetizados por este género. Es posible que las demás clonas positivas no pudieran ser ensambladas debido a que la calidad de la secuenciación no fue buena (Thomas, Gilbert, y Meyer, 2012), por lo que se recomienda realizar nuevamente la secuenciación de los fósmidos de mayor interés.

Funcionalmente, la clona CEps8 sobresalió de las demás, pues demostró el mayor incremento en la viscosidad cinemática durante el período de incubación, concordando con la mayor cantidad de EPS (43 mg /100 mL) extraído. Aunque no se obtuvo cantidades como las reportadas para EPS como levano, xantan y gelano, cuya producción rebasa los 30 g/L, a la clona CEps8 aún falta especificar sus condiciones óptimas de producción y el tipo de sustrato a emplear, pues en algunos casos la fuente de carbono es primordial para definir el tipo de polímero que se sintetizará, por ejemplo: el género *Pseudomonas* que si crece en un medio rico en sacarosa produce levano, pero si crece en glucosa produce alginato. Pero, en otros

casos, como con las bacterias lácticas el polímero es independiente de la fuente de carbono, como el caso de *Streptococcus* y *Lactobacillus* que presentan una máxima producción de polímero en un medio con glucosa y menor producción cuando la fuente de carbono se cambia por lactosa y sacarosa (Mata Gómez, 2006).

En resumen, algunos sitios pertenecientes al acuífero de Yucatán albergan una gran variedad de géneros bacterianos capaces de producir EPS y que juegan un rol importante para su supervivencia en el ambiente. Además, el análisis funcional con cristal violeta, reveló la capacidad de trece clonas para producir sustancias poliméricas extracelulares evaluando su capacidad para adherirse a superficies hidrofílicas o hidrofóbicas tras ser inducidas por un exceso de cloruro de sodio o sacarosa, diferenciándose tres fenotipos de biopelículas (superficie, interfacial y al fondo del recipiente). Por otra parte el análisis funcional con rojo Congo, no se recomienda para este tipo de análisis por la afinidad que tiene en los componentes de la membrana celular de bacterias Gram negativas. El análisis de los contigs obtenidos de la clona CEps6 demostró una elevada similitud con el género *Delftia*, aunque ninguna de las secuencias obtenidas tiene similitud con genes que codifican glicosiltransferasas. Sin embargo, este trabajo es un primer acercamiento para conocer el potencial biotecnológico inmerso en el agua de un sitio poco estudiado desde este enfoque.

Referencias

- Bartlett DH, Wright ME, Silverman M (1988) Variable expression of extracellular polysaccharide in the marine bacterium *Pseudomonas atlantica* is controlled by genome rearrangement. PNAS Biological Sciences: Genetics 85(11):3923-3927.
- Bauer-Gottwein P, Gondwe BRN, Charvet G, Marín LE, Rebolledo-Vieyra M, Merediz-Alonso G (2011) Review: The Yucatan Peninsula karst aquifer, Mexico. Hydrogeol J 19(3):507-524. doi:10.1007/s10040-010-0699-5.
- Berkhoff HA, Vinal AC (1986) Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry. Avian Dis 30(1):117-121.
- Bester E, Wolfaardt G, Joubert L, Garny K, Saftic S (2005) Planktonic-cell yield of a pseudomonad biofilm. Appl Environ Microbiol 71(12):7792-7798.
- Böckelmann U, Lünsdorf H, Szewzyk U (2007) The detection of extracellular DNA as a structural component in the EPS of bacterial strains. Geophys Res Abstr 9:01325.
- Byrd MS, Pang B, Mishra M, Swords WE, Wozniak DJ (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF- κ B activation in A549 cells. MBio, 1(3):e00140-10.
- Courtois S, Cappellano CM, Ball M, Francou FX, Normand P, Helynck G, Martinez A, Kolvek SJ, Hopke J, Osburne MS, August PR, Nalin R, Guérineau M, Jeannin P, Simonet P, Pernodet JL (2003) Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. Appl Environ Microbiol 69(1):49-55.
- Danese PN, Pratt LA, Kolter R (2000) Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. J Bacteriol 182(12):3593-3596.
- Davies DG, Geesey GG. (1995) Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. Appl Environ Microbiol 61(3):860-867.

Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey GG (1993) Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol 59(4):1181-1186.

Degeest B, Mozzi F, De Vuyst L (2002) Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations. Int J Food Microbiol 79(3):161-174.

Donot F, Fontana A, Baccou JC, Schorr-Galindo S (2012) Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydr Polym 87(2):951-962.

Feng BW, Li XR, Wang JH, Hu ZY, Meng H, Xiang LY, Quan ZX (2009) Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. FEMS Microbiol Ecol 70(2):236-248.

Fernández-Delgado M, Suárez P, Duque Z, García-Amado MA, Contreras M (2013) Supervivencia y formación de biopelículas de *Vibrio cholerae* sobre quitina de camarón. Interciencia, 38(6), 443-448.

Fournet-Fayard S, Joly B, Forestier C (1995) Transformation of wild type *Klebsiella pneumoniae* with plasmid DNA by electroporation. J Microbiol Methods 24(1):49-54.

Fusconi R, Godinho MJL (2002) Screening for exopolysaccharide-producing bacteria from sub-tropical polluted groundwater. Braz J Biol 62(2):363-369.

Gabor EM, Alkema WB, Janssen DB (2004) Quantifying the accessibility of the metagenome by random expression cloning techniques. Environ Microbiol 6(9):879-886.

Gauri SS, Mandal SM, Pati BR (2012) Impact of *Azotobacter* exopolysaccharides on sustainable agriculture. Appl Microbiol Biotechnol 95(2):331-338.

Goldscheider N, Hunkeler D, Rossi P (2006) Review: microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. Hydrogeol J 14(6):926-941.

Gong AS, Bolster CH, Benavides M, Walker SL (2009) Extraction and analysis of extracellular polymeric substances: comparison of methods and extracellular polymeric substance levels in *Salmonella pullorum* SA 1685. *Environ Eng Sci* 26(10):1523-1532.

González Burgos A (2011) Caracterización genómica y funcional de consorcios microbianos procedentes de una laguna costera. Tesis, Universidad Autónoma de Yucatán.

Gounot AM (1994). Microbial ecology of groundwaters. En Gilbert J, Danielopol D, Stanford JA (eds.) *Groundwater ecology*, Academic Press, INC, Estados Unidos de América, pp. 189-215.

Griebler C, Lueders T (2009) Microbial biodiversity in groundwater ecosystems. *Freshwater Biol* 54:649–677. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02013.x.

Henne A, Daniel R, Schmitz RA, Gottschalk G (1999). Construction of Environmental DNA Libraries in *Escherichia coli* and Screening for the Presence of Genes Conferring Utilization of 4-Hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* 65(9):3901-3907.

Henne A, Schmitz RA, Bömeke M, Gottschalk G, Daniel R (2000) Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Lipolytic Activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 66(7):3113-3116.

Hu Y, Zhang G, Li A, Chen J, Ma L (2008) Cloning and enzymatic characterization of a xylanase gene from a soil-derived metagenomic library with an efficient approach. *Appl Microbiol Biotechnol* 80(5):823-830.

Kaiser TDL, Pereira EM, dos Santos KRN, Maciel ELN, Schuenck RP, Nunes APF (2013) Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 75(3):235-239.

Knietsch A, Waschowitz 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*. *Appl Environ Microbiol* 69(3):1408-1416.

Kuttel M, Ravenscroft N, Foschiatti M, Cescutti P, Rizzo R (2012) Conformational properties of two exopolysaccharides produced by *Inquilinus limosus*, a cystic fibrosis lung pathogen. *Carbohydr Res*, 350:40-48.

Liu M, González JE, Willis LB, Walker GC (1998) A novel screening method for isolating exopolysaccharide-deficient mutants. *Appl Environ Microbiol* 64(11):4600-4602.

Loo CY, Sudesh K (2007) Biosynthesis and native granule characteristics of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Delftia acidovorans*. *Int J Biol Macromol* 40(5):466-471.

Los R, Sawicki R, Juda M, Stankevic M, Rybojad P, Sawicki M, Malm A, Ginalska G (2010) A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 310(2):97-103.

Martín-Cuadrado AB, López-García P, Alba JC, Moreira D, Monticelli L, Strittmatter A, Gottschalk G, Rodríguez-Valera F (2007) Metagenomics of the deep Mediterranean, a warm bathypelagic habitat. *PLoS One* 2(9):e914.

Mata Gómez J (2006) Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros *Holomonas*, *Alteromonas*, *Idiomarina*, *Palleronia* y *Salipiger*. Tesis, Universidad de Granada.

Meyer F, Paarmann D, D'Souza M, Olson R, Glass EM, Kubal M, Paczian T, Rodriguez A, Stevens R, Wilke A, Wilkening J, Edwards RA (2008) The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics* 9(1):386.

Moore A (2014) Characterization of the native communities in the karst aquifer of Yucatan Peninsula, Mexico. Dissertation, Northern Illinois University.

Mothes G, Ackermann JU (2005) Synthesis of Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with a Target Mole Fraction of 4-Hydroxybutyric Acid Units by Two-Stage Continuous Cultivation of *Delftia acidovorans* P4a. *Eng Life Sci* 5(1):58-62.

Mueller-Spitz SR, Goetz GW, McLellan SL (2009) Temporal and spatial variability in nearshore bacterioplankton communities of Lake Michigan. *Fems Microbiol Ecol* 67(3):511-522.

N'Guessan AL, Vrionis HA, Resch CT, Long PE, Lovley DR (2008) Sustained removal of uranium from contaminated groundwater following stimulation of dissimilatory metal reduction. *Environ Sci Technol* 42(8):2999-3004.

OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) (1982). *The OCDE Listo Social Indicators*, Paris.

O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28(3):449-461.

O'Toole GA, Kolter R (1998a) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30(2):295-304.

O'Toole, G. A., y Kolter, R. (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol Microbiol* 28(3):449-461.

Pacheco AJ, Cabrera SA, Marín LE (2000) Bacteriological contamination in the karstic aquifer of Yucatán, Mexico. *Geofl* 39(3):285-291.

Pagán R, Mañas P (2006) Fundamental aspects of microbial membrane electroporation. En: Raso J, Heinz V (eds.) *Pulsed electric fields technology for the food industry*. Springer, USA, pp 73-94.

Pasquel A (2001) Gomas: una aproximación a la industria de alimentos. *Alimentaria*, 1(1):1-8.

Perry E, Paytan A, Pedersen B, Velazquez-Oliman G (2009) Groundwater geochemistry of the Yucatan Peninsula, Mexico: constraints on stratigraphy and hydrogeology. *J Hydrol* 367(1):27-40.

Poli A, Anzelmo G, Nicolaus B (2010) Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Mar Drugs* 8(6):1779-1802.

Poli A, Di Donato P, Abbamondi GR, Nicolaus B (2011) Synthesis, production, and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalkanoates by Archaea. *Archaea*. doi:10.1155/2011/693253

Pronk M, Goldscheider N, Zopfi J (2009) Microbial communities in karst groundwater and their potential use for biomonitoring. *Hydrogeol J* 17(1):37-48.

Prpic JK, Robins-Browne RM, Davey RB (1983). Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using Congo red agar. *J Clin Microbiol* 18(3):486-490.

Rachid S, Ohlsen K, Witte W, Hacker J, Ziebuhr W (2000) Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44(12):3357-3363.

Rendueles O, Travier L, Latour-Lambert P, Fontaine T, Magnus J, Denamur E, Ghigo JM (2011) Screening of *Escherichia coli* species biodiversity reveals new biofilm-associated antiadhesion polysaccharides. *mBio* 2(3):e00043-11. doi: 10.1128/mBio.00043-11.

Rollefson JB, Stephen CS, Tien M, Bond DR (2011) Identification of an extracellular polysaccharide network essential for cytochrome anchoring and biofilm formation in *Geobacter sulfurreducens*. *J Bacteriol* 193(5):1023-1033.

Santos M, Teixeira J, Rodrigues A (2000) Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512 (f). *Biochem Eng J* 4(3):177-188.

Sharma KK, Soni SS, Meharchandani S (2006) Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *Escherichia coli*. *Vet Arhiv* 76(4):363-366.

Sharmin F, Wakelin S, Huygens F, Hargreaves M (2013) Firmicutes dominate the bacterial taxa within sugar-cane processing plants. *Scientific reports* 3.

Solano C, García B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* 43(3):793-808.

Spiers AJ, Bohannon J, Gehrig SM, Rainey PB (2003) Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* 50(1):15-27.

Surgalla MJ, Beesley ED (1969) Congo red-agar plating medium for detecting pigmentation in *Pasteurella pestis*. *Appl microbiol* 18(5):834-837.

Terrón-González L, Medina C, Limón-Mortés MC, Santero E (2013) Heterologous viral expression systems in fosmid vectors increase the functional analysis potential of metagenomic libraries. *Scientific reports* 3.

Thomas T, Gilbert J, Meyer F (2012) Metagenomics-a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp* 2(3):1-12. doi:10.1186/2042-5783-2-3.

Todhanakasem T, Sangsutthiseree A, Areerat K, Young GM, Thanonkeo P (2014) Biofilm production by *Zymomonas mobilis* enhances ethanol production and tolerance to toxic inhibitors from rice bran hydrolysate. *N Biotechnol* 31(5):451-459.

Uchiyama T, Miyazaki K (2009) Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr Opin Biotech* 20(6):616-622.

Varin T, Lovejoy C, Jungblut AD, Vincent WF, Corbeil J (2012) Metagenomic analysis of stress genes in microbial mat communities from Antarctica and the High Arctic. *Appl Environ Microbiol* 78(2):549-559.

Vieira RP, Gonzalez AM, Cardoso AM, Oliveira DN, Albano RM, Clementino MM, Martins OB, Paranhos R (2008) Relationships between bacterial diversity and environmental variables in a tropical marine environment, Rio de Janeiro. *Environ microbiol* 10(1):189-199.

Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI (1999) Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den

Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49(2):567-576.

Wingender J, Neu TR, Flemming HC (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? En Wingender J, Neu TR, Flemming H (eds.), *Microbial extracellular polymeric substances*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-19.

Yan S, Wang N, Chen Z, Wang Y, He N, Peng Y, Li Q, Deng X (2013) Genes encoding the production of extracellular polysaccharide bioflocculant are clustered on a 30-kb DNA segment in *Bacillus licheniformis*. *Funct Integr Genomics* 13(4):425-434.

Yegorenkova IV, Tregubova KV, Matora LY, Burygin GL, Ignatov VV (2011) Biofilm formation by *Paenibacillus polymyxa* strains differing in the production and rheological properties of their exopolysaccharides. *Curr Microbiol* 62(5):1554-1559.

Yildiz FH, Schoolnik GK (1999) *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(7):4028-4033.

Yildiz FH, Liu XS, Heydorn A, Schoolnik GK (2004) Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Mol Microbiol* 53(2):497-515.

Yoshida T, Ayabe Y, Horinouchi M, Habe H, Nojiri H, Omori T (2001) Improved conditions for the transformation by electroporation of the extracellular polysaccharide-producing methylotroph *Methylobacillus* sp. *Biotechnol Lett* 23(10):787-791.

Zielinski NA, Maharaj R, Roychoudhury S, Danganan CE, Hendrickson W, Chakrabarty AM (1992) Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Environmental regulation of the *algC* promoter. *J Bacteriol* 174(23):7680-7688.

Zwart G, Crump BC, Kamst-van Agterveld MP, Hagen F, Han SK (2002) Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat Microb Ecol* 28(2):141-155.