

**EVOLUCIÓN DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PARA PROCESOS DE  
FERMENTACIÓN INDUSTRIAL**

**CARLOS EDUARDO GARCÍA VARGAS**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2014**

**EVOLUCIÓN DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PARA PROCESOS DE  
FERMENTACIÓN INDUSTRIAL**

**CARLOS EDUARDO GARCÍA VARGAS**

**Trabajo de grado realizado en Texas A&M University presentado como  
requisito para optar al título de Ingeniero Químico**

**Directores**

**Ph. D. VIVIANA SÁNCHEZ TORRES**

**Ingeniero Químico**

**Ph. D. KATY C. KAO**

**Ingeniero Químico**

**Ph. D. JAMES WINLKER**

**Ingeniero Químico**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2014**

## DEDICATORIA

A Dios por ser la principal fuerza y motivación de mi vida.

A mis padres por su infinito amor y por su incalculable esfuerzo en mi formación.

A mi hermanita por su amor, por ser siempre mi ejemplo a seguir y por su gran apoyo en los momentos más difíciles. Definitivamente mi mayor orgullo.

A mis amigos Peter y Cáceres, con quienes todo esto comenzó y gratamente hoy estoy seguro que aún no termina.

A mis amigos de la Universidad Meli y William, Jose, Jorge, Rodrigo, Laura, Juancho y Robert por hacerme entender que con amigos la vida es mucho más fácil y en especial a Nati por estar a mi lado en el momento más complicado y por hacerme volver a sonreír.

A todas las personas que estuvieron a mi lado en esta etapa de mi vida.

Con mucho cariño este trabajo es en honor de todos ustedes, gracias.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Industrial de Santander y a mis tan apreciados maestros por transformar mi manera de ver y entender el mundo.

Al departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Texas A&M, en especial al grupo de investigación Katy kao por la oportunidad brindada.

A la Dra. Katy Kao por hacer realidad el sueño de introducirme en el maravilloso mundo de la investigación y sobretodo por las muy valiosas enseñanzas aprendidas.

A la Dra. Viviana Sánchez, cuyos valiosos aportes hicieron posible este trabajo.

A James Winlker por su paciencia y siempre buena voluntad para enseñarme las técnicas aprendidas en mi pasantía, además de dirigir cuidadosamente el trabajo investigativo.

## CONTENIDO

INTRODUCCION .....	13
1. MARCOTEÓRICO .....	15
1.1. Recombinación genética en bacterias .....	15
1.1.1. Conjugación .....	16
1.1.2. Transformación .....	16
1.1.3. Transducción .....	17
1.2. Mutaciones.....	17
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	19
2.1. Selección de cepas y medios de cultivo .....	19
2.2. Evolución .....	19
2.2.1. Experimentos de control y escaneo .....	20
2.3. Caracterización de mutantes .....	21
2.3.1. Aislamiento de mutantes.....	21
2.3.2. Pruebas de resistencia cruzada .....	21
2.3.3. Pruebas de resistencia hiperosmótica .....	22
2.4. Secuenciación del genoma mutante .....	22
2.4.1. Extracción, cuantificación y verificación del ADN genómico mutante .....	22
2.4.2. Secuenciamiento y verificación de mutaciones.....	23
2.4.3. Análisis de los tipos de mutaciones identificadas .....	23
2.5. Análisis del transcriptoma .....	24
2.6. Escaneo de genes .....	25
2.6.1. Sobreexpresión de genes .....	25
2.6.2. Pruebas de complementación.....	26

2.6.3. Delección de genes .....	26
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....	27
3.1. Experimentos de control y escaneo .....	27
3.1.1. Conservación de genotipos evolutivos con PCR .....	27
3.1.2. Prueba de verificación de conjugación .....	27
3.1.3. Coeficiente de "fitness" a través de la evolución.....	28
3.2. Caracterización de mutantes .....	29
3.2.1. Pruebas de resistencia cruzada .....	29
3.2.2. Prueba de resistencia hiperosmótica .....	31
3.3. Secuenciamiento .....	31
3.3.1. Análisis de las mutaciones identificadas .....	31
3.4. Sobreexpresión, complementación, y delección de genes .....	34
3.4.1. Sobreexpresión de genes .....	34
3.4.2. Complementación de genes .....	35
3.4.3. Delección de genes .....	35
3.5. Microarreglos. ....	36
3.5.1. Genes sobreexpresados y represados. ....	36
3.5.2. Análisis del perfil de expresión genético de las cepas mutantes. ....	37
4. CONCLUSIONES .....	40
BIBLIOGRAFIA .....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS.....	52

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conservación de la secuencia <i>mbhA::oriT</i> en cepas evolutivas. ....	27
Figura 2. Cultivos de las cepas evolutivas G1-G6 y H1-H6 conjugadas con BW25113/pC24N en platos de LB con los antibióticos cloramfenicol y gentamicina. ....	28
Figura 3. Coeficiente de fitness de las poblaciones evolutivas de 2xOriT, $\Delta$ y Hfr a través del experimento evolutivo.....	28
Figura 4. Coeficiente de fitness de las cepas mutantes bajo diferentes condiciones de inhibición.....	30
Figura 5. Número de colonias mutantes A, G y H, resultantes de la inhibición hiperosmótica.....	31
Figura 6. Efectos biológicos de las mutaciones genéticas en las cepas mutantes.. ..	32
Figura 7. Coeficientes de fitness de las pruebas de sobreexpresión, complementación y delección de genes bajo la condición de inhibición de 0.55 [M] de NaCl en el medio de cultivo M9.. ..	36
Figura 8. Efectos biológicos de la sobreexpresión y represión genética detectada en las cepas mutantes con el experimento de microarreglos.. ..	39
Figura 9. Mecanismos de recombinación genética bacteriana. ....	52
Figura 10. Etapas del proceso de PCR.....	56
Figura 11. Número de genes sobreexpresados.....	63

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Mecanismos de recombinación genética bacteriana.....	52
Anexo B. Procedimiento experimental.....	53
Anexo C. Análisis de resultados. ....	58

## RESUMEN

**TITULO:** EVOLUCION DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PARA PROCESOS DE FERMENTACIÓN INDUSTRIAL\*.

**AUTOR:** CARLOS EDUARDO GARCÍA VARGAS\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Osmotic pressure, *Escherichia coli*, evolution, sequencing, microarrays.

### DESCRIPCIÓN:

El uso de materias primas con altas concentraciones de inhibidores osmóticos (sales y carbohidratos), aguas salobres residuales y grandes densidades microbianas en bioprocesos de fermentación industrial, tienen como objetivo reducir sus costos generales, razón por la cual se hace necesaria la existencia de microorganismos resistentes a tales condiciones.

Con el objetivo de comprender los mecanismos de adaptación de fenotipos resistentes a la presión osmótica se planteó realizar la evolución independiente de dos tipos de cepas de *Escherichia coli*, la primera capaz de realizar recombinación entre sí y la segunda siendo un control asexual, ambas construidas previamente en *kaolab* por *James Winlker*, alcanzando una tolerancia hasta de 0.85 [M] del inhibidor NaCl. Posterior a la evolución, se llevó a cabo el secuenciamiento genético de dichos fenotipos, encontrándose frecuentes mutaciones en genes relacionados al control del catabolismo de N-Glucosamina, forma y movilidad celular. Finalmente se realizó un análisis de expresión genética con la técnica de microarreglos, encontrándose la sobreexpresión de genes de síntesis de porinas, importación de moléculas osmoprotectoras, aprovechamiento del hierro, captación de sulfatos y composición de la capa de peptidoglicano en las cepas mutantes.

Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación confirman la efectividad del sistema de evolución propuesto e identifican posibles mecanismos de adaptación en *E. coli* hacia la inhibición osmótica, ampliando así el conocimiento existente acerca de tales fenotipos. Finalmente, es posible realizar la aplicación de los mecanismos de adaptación propuestos en el presente trabajo en la generación e ingeniería de cepas con la resistencia necesaria para los anteriormente mencionados procesos biotecnológicos.

---

\*Trabajo de grado, Pasantía de investigación.

\*\*Facultad de ingenierías Físico-Químicas, Escuela de Ingeniería Química, Director: Ph. D Katy Kao. Ph D. James Winkler. Ph D. Viviana Sánchez Torres.

## ABSTRACT

**TITLE:** EVOLUTION OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS FOR INDUSTRIAL FERMENTATION PROCESSES\*.

**AUTHOR:** Carlos Eduardo García Vargas

**KEY WORDS:** Osmotic pressure, *Escherichia coli*, evolution, sequencing, microarrays.

### DESCRIPTION:

The use of raw materials with high concentrations of osmotic inhibitors (such as carbohydrates and salts), brackish water and high density microorganism cultures at industrial fermentation bioprocesses, seeks to reduce their overall costs, being that the reason why the engineering of resistant organisms is necessary to such conditions.

In order to understand the mechanisms of osmotic resistance in such organisms, a laboratory evolution experiment was carried out using two different types of *Escherichia coli*; the first has the ability to perform recombination itself and the second was an asexual control; both strains were constructed in *kao lab* by *James Winkler* and reached an osmotic resistance of 0.85 [M] of NaCl. After the evolution, genetic sequencing of the mentioned phenotypes was made, finding out mutations related to N-Glucosamine catabolism, shape and cellular mobility. Finally, a transcriptomal analysis was performed using microarrays and the over expression of genes related to porin synthesis, osmoprotectant molecules and iron uptake along with peptidoglycan wall composition was found.

The results of the current work are proofs of the proposed evolution system's effectiveness and help to identify unknown mechanisms of osmotic resistance in *E. coli*, expanding the actual knowledge of them. Finally, it is possible to engineer osmoresistant strains by applying the results of the present work at industrial fermentation bioprocesses

---

\* Bachelor thesis, Research internship.

\*\* Physical-Chemical Engineering Faculty, Chemical Engineering School, Director: Ph D. Katy Kao. Ph D. James Winkler. Ph D. Viviana Sánchez Torres.

## INTRODUCCION

Debido a la gran revolución científica y tecnológica experimentada en el último siglo [1], los bioprocesos se han ido desarrollando y optimizando para la fabricación[2] a gran escala de sofisticados productos como fármacos, suplementos nutricionales, biocombustibles, solventes orgánicos y sustancias biodegradables, entre otros [3] [4]. Para alcanzar el máximo potencial productivo de dichos métodos biotecnológicos se han desarrollado tanto operaciones de recuperación de producto de alta eficiencia como tecnologías y condiciones óptimas de cultivo para la maximización del rendimiento producto-sustrato [5], además se tiene un mayor conocimiento de los mecanismos involucrados en el crecimiento celular y la formación de metabolitos [6]. Adicionalmente, los avances en ingeniería evolutiva y metabólica[7] han permitido incrementar la eficiencia global de bioprocesos sujetos a diferentes tipos de inhibición, tales como condiciones no óptimas de temperatura, presión, pH, concentración de sustratos , productos[8][9].

La bacteria *Escherichia coli* ha sido fundamental en la biocatálisis de los procesos industriales para la fabricación de una gran variedad de proteínas, combustibles y productos de química fina. Por esta razón se han realizado grandes esfuerzos en ingeniería metabólica y evolutiva con el fin de dilucidar sus diferentes rutas metabólicas y mejorar la conversión de materias primas económicas en cada uno de los productos deseados. Como consecuencia de lo anterior, *E. coli* representa una importante alternativa biocatalítica con capacidad para metabolizar una amplia cantidad de sustratos bajo un holgado rango de variables de proceso de una manera eficiente, lo que la hace apropiada para un diseño flexible y económico de sistemas de producción a gran escala.[10][11][12]

Concentraciones altas de azúcares simples y sales iónicas en los medios de crecimiento celular, elevan la presión osmótica, forzando a las células a consumir recursos metabólicos excesivos para prevenir su desecación [13]. Existe un gran

interés en la obtención de cepas con mayor resistencia a la presión osmótica por las siguientes razones:

El uso corrientes de alimentación y salida bastante concentradas permite a su vez soportar gran densidad celular y cantidad de producto deseado en las mismas.[14]

El empleo de agua salobre para el crecimiento celular puede reducir los costos de proceso significativamente.[15]

Se desea optimizar el uso energético proveniente de los sustratos celulares en la elaboración de productos de interés, mas no en su mantenimiento celular.

Mejorar la resistencia osmótica de los biocatalizadores simplificaría el uso de materias primas provenientes de corrientes de glicerol residual con altas concentraciones salinas y de otros contaminantes, en la elaboración de un amplio rango de productos de interés industrial.[16] [17]

Como consecuencia de la importancia de la presión osmótica en la productividad de las empresas biotecnológicas, en los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos en ingeniería evolutiva para crear fenotipos de *E.coli* con mayor tolerancia a esta variable[18][19][20][21], sin embargo, el conocimiento general disponible de sus mecanismos genéticos adaptativos permanece aún muy limitado. La presente investigación busca aplicar la técnica de evolución adaptativa por lotes [22][23][24] empleando cepas de *E. coli* con la facultad de realizar alta recombinación genética [25][26][27] para obtener fenotipos resistentes a la presión osmótica y dilucidar tales mecanismos genéticos de adaptación mediante las técnicas de secuenciamiento y análisis de expresión del ADN.

# 1. MARCOTEÓRICO

## Definiciones

Genotipo: Información genética que posee un organismo en forma de ADN. [28][29]

Fenotipo: Se refiere a la expresión visible de algunas características de un genotipo en particular. [28], [29]

Plásmido: Son moléculas de ADN extra cromosómico que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias.[30]

Gen: Unidad del material genético cromosómico que determina la aparición de los caracteres hereditarios en los seres vivos. Está formado por la las diferentes estructuras que forma el ADN. [31]

Virus: Están formados por un fragmento de ARN o ADN, rodeado por proteínas llamadas capsómeros, que forman una cubierta denominada cápsida. Se propagan en el interior de las células y gracias a su material genético las obligan a crear réplicas de estos hasta que la cepa colapsa.[32]

### 1.1.Recombinación genética en bacterias

El objetivo de la reproducción de los organismos vivos es en esencia realizar recombinación genética con el fin de mejorar los fenotipos descendientes. Las bacterias, a diferencia de los organismos eucariotas no poseen mecanismos de reproducción sexual, sin embargo han desarrollado tres formas de recombinación ampliamente conocidas, que son: conjugación, transformación y transducción.

### 1.1.1. Conjugación

Proceso de transferencia de información genética desde una célula donadora a otra receptora mediante la acción del plásmido conocido como factor de fertilidad "F<sup>+</sup>". Dicho plásmido posee alrededor de sesenta genes detectados hasta la fecha [33], capaces de: establecer canales moleculares de transferencia de material genético entre las superficies celulares (genes *tra*) [34], realizar integración cromosómica (genes *IS3* y *IS2*) [33] y controlar las zonas de origen de replicación (genes *ori*) [34].

Es de interés para la comprensión de la presente investigación, conocer cuatro variaciones de cepas relacionadas con las distintas funciones que el plásmido "F<sup>+</sup>" desempeña en estas. En primer lugar se encuentran las Cepas "F<sup>+</sup>", capaces de transferir material genético en el proceso de conjugación a las células receptoras "F<sup>-</sup>" que carecen de dicho plásmido. Seguidamente están las cepas de alta recombinación genética "hfr", las cuales al haber integrado el mencionado plásmido a su cromosoma, aumentan la probabilidad de transferir más material genético a las cepas receptoras "F<sup>-</sup>". Cabe aclarar que existen dos tipos de estas, las cepas "hfr+", de alta recombinación genética que contienen el gen de exclusión superficial (*traT*, *traS*) [35], [36], el cual disminuye la transferencia de material genético entre cepas de la misma clase. Por otra parte, están las cepas de recombinación genética que no contienen dicho gen, llamadas "hfr-" y por tanto no experimentan el efecto nombrado anteriormente.

### 1.1.2. Transformación

Proceso mediante el cual la célula incorpora material genético exógeno ya sea en forma de cadena lineal o de plásmido, mejorando así la recombinación genética de las cepas que lo reciben. Existen varias técnicas de laboratorio para realizar el presente mecanismo cuyos principios físicos se basan fundamentalmente en la utilización de compuestos químicos, choques de temperatura o aplicación de

campos eléctricos a las membranas celulares para volverlas más permeables al material genético [6].

### **1.1.3. Transducción**

Es el proceso en el cual hay transferencia de genes entre distintas cepas bacterianas por medio de virus llamados bacteriófagos, los cuales pueden infectar las células bacterianas de dos formas distintas. La primera, *lítica*, consiste en la transferencia del ADN presente en el virus hacia la célula receptora, cuya información genética obliga a dicha cepa a reproducir el virus hasta que esta explota, liberando muchas copias del virus original. La segunda forma de infección, *lisogénica*, que es de interés para la presente investigación, consiste en la integración del ADN contenido en el bacteriófago al cromosoma bacteriano, principio que puede aplicarse para la eliminación selectiva de genes en un genotipo a estudiar [37] [6].

Los diferentes mecanismos de recombinación genética se pueden visualizar en el **anexo A**.

## **1.2. Mutaciones**

Es común clasificar las mutaciones genéticas de acuerdo a la cantidad de nucleótidos involucrados y al efecto que estas tienen sobre el fenotipo afectado.

- **Clasificación por la cantidad de nucleótidos involucrados:** Llamadas mutaciones puntuales y se originan por la inserción, deleción o sustitución de una base o grupo de estas.

**Inserción:** Aparición de uno o varios nucleótidos en la secuencia original del ADN, generando un cambio en la lectura en la construcción de las proteínas.

**Deleción:** Pérdida de nucleótidos que pueden generar un cambio de lectura en la construcción de proteínas. Se presenta en zonas del ADN no codificante.

Sustitución: Consiste en el cambio puntual de un nucleótido por otro, alterando la secuencia proteica original. No es frecuente en grupos de nucleótidos y se manifiesta tanto en zonas codificantes como no codificantes.

**Clasificación por efectos en el fenotipo afectado:** Los cambios en los nucleótidos de las secuencias originales del ADN generan codificaciones diferentes de las proteínas que cifran, lo cual puede o no ser apreciable en los fenotipos resultantes.

**Mutaciones silenciosas:** Frecuentes en el ADN codificante y no afectan la secuencia de la proteína, debido al carácter degenerado del código genético.

**Mutaciones no silenciosas:** Afectan la secuencia proteica y pueden ocasionar tanto efectos negativos como benéficos en el fenotipo resultante. Existen principalmente cuatro tipos de estas:

Mutaciones que cambian el sentido: Consisten en la modificación de un nucleótido que cambia la secuencia peptídica.

Mutaciones que no cambian el sentido: Se generan por la inserción o delección de tres pares de bases en la secuencia del ADN, los cuales codifican distintos aminoácidos, mientras que el resto de la cadena se conserva idéntica. No afectan, necesariamente, la función de la proteína.

Mutaciones que modifican el marco de lectura: Consisten en inserciones o delecciones que generan un desfase o alteración en la lectura de los tripletes, modificando notablemente la secuencia peptídica y su función proteica.

Mutaciones con terminación prematura: Se producen cuando se forma un codón de parada (UAA, UAG, UGA) como consecuencia de la inserción o delección de nucleótidos en la secuencia del ADN, provocando la terminación prematura de la síntesis de proteínas. [38]

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1. Selección de cepas y medios de cultivo

La descripción de las cepas [39][40] más utilizadas mediante el experimento evolutivo y posteriores análisis se presenta en el **anexo B**.

Entre los medios utilizados para el cultivo de las cepas durante el experimento se utilizó el líquido "M9" con suplemento de 0.5% [w/v] glucosa+ 50 [ug/ml] triptófano + cloruro de Sodio con un rango de concentraciones entre [0,6-0,75] M durante la evolución. Adicionalmente se empleó el caldo de Luria-Bertoni "LB". Por otra parte, se manejó el medio sólido de "LB" con agar en platos de Petri. Para experimentos de transformación fueron añadidos los antibióticos: cloramfenicol, kanamicina, ampicilina y estreptomycinina cada vez que fueron requeridos.

### 2.2. Evolución

Se seleccionaron seis réplicas de cada cepa inicial para su evolución independiente mediante la técnica de adaptación evolutiva por lotes (**anexo B**).

Las condiciones del experimento evolutivo por lotes fueron las siguientes:

1. La inoculación en serie fue realizada cada 24-48 horas, asegurando el traspaso de 6-7 generaciones y empleando (1-3)% de cultivo como inóculo en medio fresco.
2. La concentración de cloruro de sodio se aumentó gradualmente en un rango de 0,55-0,75 [M] NaCl.
3. El experimento fue llevado a cabo hasta la obtención de aproximadamente 150 generaciones en cada población.

4. Aproximadamente cada 24 generaciones se criopreservaron los cultivos; con el propósito de conservar los diferentes fenotipos obtenidos a lo largo de la evolución.

## 2.2.1. Experimentos de control y escaneo

### 2.2.1.1. Fitness vs. número de generaciones

Con el fin de observar el comportamiento evolutivo de cada cepa, se utilizó el criterio matemático llamado coeficiente de *fitness* (F) (ver ecuación 1) para comparar cada 24 generaciones aproximadamente la velocidad de crecimiento bajo presión osmótica de las cepas mutantes [ $\mu_{mut} \text{ s}^{-1}$ ] respecto a sus predecesores [ $\mu_{ps} \text{ s}^{-1}$ ]. Con el fin de calcular la velocidad de crecimiento de cada cepa, se utilizó la técnica de crecimiento de cepas en micro platos (**anexo B**), usando el equipo "*Infinite® 200 PRO multimodereader*" (TECAN, Suiza).

$$F = \frac{\mu_{mut}}{\mu_{ps}} - 1 [1]$$

Ecuación 1. Coeficiente de *fitness*.

### 2.2.1.2. Prueba de conservación de fenotipos

Para descartar contaminación con microorganismos diferentes a los seleccionados para el experimento evolutivo, se llevaron a cabo tres pruebas de confirmación de genotipos durante el transcurso de la evolución, usando la técnica PCR y gel de electroforesis (**anexo B**), amplificando la secuencia de ADN denominada *mbhA::oriT*, común en todas las cepas iniciales con el uso del iniciador delantero y reverso de secuencias CAGAAACCTCGGAAATACGC y GCATTGCTCACCTCTCAACA respectivamente [41].

### 2.2.1.3. Prueba de conjugación

Pruebas de conjugación entre las cepas donadoras G1-G6 y H1-H6, las cuales poseen un gen de resistencia a la gentamicina, junto con la receptora

BW25113/pCA24N, de resistencia al cloranfenicol, se realizaron con el fin de detectar posibles pérdidas de la habilidad conjugativa en dichas cepas durante el transcurso de la evolución. Dicha prueba se realizó mezclando 100 [uL] de cada cepa evolutiva con la misma cantidad del cultivo receptor cuando estos se encuentran en la fase de crecimiento exponencial durante una hora junto en el medio de cultivo M9 a 37 [°C]. Posteriormente, las mezclas se cultivaron en platos de LB con gentamicina y cloramfenicol con el fin de detectar su crecimiento o muerte. Adicionalmente se cultivaron las mencionadas cepas sin realizar conjugación en los mismos platos para contar con un control negativo del experimento.

### **2.3. Caracterización de mutantes**

Con el fin de caracterizar las cepas mutantes obtenidas al culminar el experimento evolutivo, se realizaron los siguientes experimentos:

#### **2.3.1. Aislamiento de mutantes**

Al finalizar la evolución se realizaron cultivos en platos de Petri con medio sólido LB más agar para cada cultivo. Seguidamente se tomó una colonia de cada réplica evolutiva y se propagaron en medio líquido M9 durante aproximadamente diez generaciones.

#### **2.3.2. Pruebas de resistencia cruzada**

Debido a que los mecanismos de adaptación a la variable de estrés principal generados en la cepa mediante su evolución, suelen conferir resistencia cruzada frente a otros inhibidores [42], pruebas de determinación del coeficiente de *fitness* fueron realizadas para cada réplica evolutiva utilizando los inhibidores: exceso de glucosa 54 [g/L], n-butanol 0,8% [v/v] y alta temperatura 42 [°C].

### **2.3.3. Pruebas de resistencia hiperosmótica**

Las mutantes obtenidas mediante la evolución no solo deben crecer mejor en un medio con altas concentraciones de inhibidor; sino también deben resistir condiciones de inhibición que impedirían el desarrollo de una cepa ancestral bajo las mismas. Con el propósito de determinar la respuesta de las mutantes obtenidas durante su exposición a condiciones extremas de inhibición en un corto periodo de tiempo, se realizaron cultivos de las cepas G1-G6, H1-H6 y A1-A6 junto con sus ancestros en M9 sin inhibidor hasta alcanzar la mitad de la fase de crecimiento exponencial (alrededor de 0.6 de densidad óptica). Ulteriormente se centrifugaron las muestras y se resuspendieron en el mismo medio pero esta vez con 5.45 [M] de NaCl como inhibidor. Seguidamente se incubaron por una hora a treinta y siete grados centígrados y se cultivaron en un plato de Petri de LB para cada tipo de cepa (G, H y A) usando diluciones de cien, mil y diez mil veces, con el objetivo de tener la cantidad de células adecuadas para realizar el conteo de las colonias sobrevivientes.

### **2.4. Secuenciación del genoma mutante**

Con el fin de conocer el genotipo de los mutantes y compararlo con el de sus antecesores para tratar de identificar los posibles mecanismos de resistencia resultantes de la evolución, se procedió a secuenciar el ADN genómico de las cepas G1-G6 y A1-A6.

#### **2.4.1. Extracción, cuantificación y verificación del ADN genómico mutante**

Se cultivaron las cepas G1-G6, A1-A6 hasta alcanzar estado estacionario; posteriormente se extrajo su respectivo ADN genómico usando el kit de biología molecular "*ZymoFungal/Bacterial Genomic DNA miniprep*" (ZymoResearch, USA) (ver anexo D). En seguida, se determinó la concentración de ADN extraído usando el equipo "*NanoDropspectrophotometer*" (Thermofisherscientific, USA).

Posteriormente, se hizo un ensayo usando la técnica "gel electroforesis" para detectar su degradación o posible contaminación con ARN.

#### **2.4.2. Secuenciamiento y verificación de mutaciones**

Las muestras de ADN extraídas fueron enviadas al *Texas A&M Genomics Center* para su secuenciamiento usando el equipo "*IlluminaHiSeq 2000*" (Illumina, USA).

Para la identificación de las mutaciones se compararon los datos obtenidos del secuenciamiento tanto de las cepas mutantes e iniciales con el genoma de referencia MG1665 utilizando el software breseq[43], de esta manera se identificaron mutaciones del tipo: polimorfismo de núcleo simple, inserciones y deleciones de uno a varios nucleótidos en la región codificante, entre otras.

A pesar de que las técnicas actuales de secuenciamiento gozan de gran precisión, es muy importante verificar que las mutaciones identificadas no son falsos positivos, resultado de técnicas utilizadas en dichos métodos, por esta razón se utilizaron las técnicas de PCR junto con gel electroforesis y resecuenciamiento local para verificar las grandes inserciones y deleciones junto con polimorfismos de núcleo simple.

#### **2.4.3. Análisis de los tipos de mutaciones identificadas**

Una vez identificadas las mutaciones de las cepas, se procedió a buscar información acerca de los genes afectados en la base de datos "ECOCYC" [44] para la bacteria *Escherichia coli*K-12 MG1655 y en la literatura científica en general, con el fin de identificar posibles genes cuya función no haya sido caracterizada previamente y puedan ser objeto de estudio hacia la resistencia osmótica.

## 2.5. Análisis del transcriptoma

El conocimiento del nivel de expresión genético de las cepas mutantes es una herramienta fundamental para dilucidar sus mecanismos de adaptación, por esta razón se utilizaron microarreglos para determinar el nivel de sobreexpresión y represión de sus distintos genes comparados con los de sus cepas iniciales bajo las mismas condiciones de inhibición osmótica de la evolución. Las cepas seleccionadas para este análisis fueron: A2, A4, G2, G3, G5 y G6 junto con sus antecesoras 2xOriT y  $\Delta$ .

### Procedimiento

Se cultivaron las cepas mencionadas anteriormente en 5 [mL] de M9 durante doce horas en la noche; se diluyeron los cultivos cincuenta veces en frascos de 25 [mL] usando el medio M9, permitiendo su crecimiento hasta la mitad de la fase exponencial (densidad óptica 0,5) donde existe la mayor expresión de ARN mensajero; seguidamente se recuperaron las células mediante el uso de un filtro de 0,45 [ $\mu$ m] de tamaño de poro y se resuspendieron en la solución *RNAlater*® (lifetechnologies, USA) para prevenir la degradación de suARNm. A continuación se llevó a cabo la extracción del ARN celular usando el kit de biología molecular "*Quick-RNA MiniprepZymoResearch*" (Zymoresearch, USA) junto con su cuantificación y verificación mediante el uso de los equipos "*Qubit*® *2.0 Fluorometer*" (lifetechnologies, USA) y "*Gel electrophoresischamber*" (Bio-Rad,USA) respectivamente, esto con el propósito de calcular la concentración de ARN extraída y verificar que no hay degradación ni contaminación con ADN. En seguida se ejecutó la conversión del ARN mensajero en ADN complementario para generar mayor estabilidad molecular utilizando la enzima "*SuperScript*® *III Reverse Transcriptase*" (lifetechnologies, USA). Ulteriormente se llevó a cabo la purificación del ADN complementario mediante precipitación con etanol, destruyendo el ARN mensajero remanente y eliminando sales y nucleótidos residuales. Posteriormente se realizó el etiquetado molecular del ADN

complementario mediante el uso de los marcadores químicos: Cy3, Cy5 (GE healthcare, UK) y se hibridizó sobre el chip "*E. Coli V2 gene expression microarrays*" (Agilent technologies, USA) para su posterior lavado y escaneo en el equipo *Axon 4200A* (molecular devices, USA).

#### Manejo de datos y análisis

La normalización y análisis estadístico de significancia de los genes sobreexpresados y represados se llevó a cabo utilizando el algoritmo de LOWESS, [45] en el programa MIDAS, [46] y el método TM4 MeV [46] respectivamente. Seguidamente, se realizó un análisis de ontología génica usando el programa en línea DAVID [47], con el fin de conocer las funciones biológicas de los genes identificados anteriormente.

## 2.6. Escaneo de genes

Basados en la información del secuenciamiento genómico, se seleccionaron once genes cuyas mutaciones se presentaron con alta frecuencia en cada una de las réplicas mutantes, con el fin de realizar ensayos de crecimiento de la siguiente forma:

### 2.6.1. Sobreexpresión de genes

El objetivo de esta prueba es analizar el efecto de la sobreexpresión de los genes mutados identificados mediante el secuenciamiento, sobre el crecimiento de una cepa de *E. coli* sin previa adaptación a la presión osmótica.

Mediante el uso de la técnica de transformación química se construyeron cepas de *E. coli* BW25113 con los genes seleccionados: *nmpC*, *yobF*, *ydjK*, *cadB*, *mreB*, *fimA*, *nagC*, *nagA*, *proV*, *treR*, *ydhP*; presentes en el plásmido pCA24N y previamente extraídos con el kit de biología molecular "*Zyppy™ Plasmid Miniprep*" (ZymoResearch, USA) de la librería genética ASKA [48]. Posteriormente se

realizaron ensayos de crecimiento bajo condiciones de presión osmótica (0.55 [M] de NaCl) utilizando el medio M9 y la cepa de control BW25113 con el plásmido vacío pCA24N, teniendo como objetivo calcular los respectivos coeficientes de *fitness* para su posterior análisis.

### 2.6.2. Pruebas de complementación

El propósito del actual ensayo fué compensar el efecto de inactivación de las mutaciones detectadas en los genes *nagC*, *nagA*, *fimA* y *proV*; experimentadas por la mayoría de las cepas evolucionadas, mediante la transformación química de plásmidos derivados de pCA24N que contienen tales genes. Para esto, se empleó el kit de biología molecular "Zyppy™ PlasmidMiniprep" (ZymoResearch, USA) en la extracción de dichos plásmidos obtenidos de la librería genética ASKA [48]. Posteriormente se transformaron químicamente en las cepas mutantes de la siguiente forma: el plásmido de *nagC* en los mutantes G2,G5,A4,A5 y A6; el mismo conteniendo el gen *nagA* en los mutantes A1,A2 y A3; por último los genes *fimA* y *proV* fueron introducidos en las cepas A3, A5 y A3, A4 respectivamente. Para culminar, se cultivaron tales colonias bajo condiciones de inhibición osmótica (0.55 [M] de NaCl) y se calcularon los respectivos coeficientes de *fitness* para su posterior análisis.

### 2.6.3. Delección de genes

La finalidad del presente experimento es construir cepas de BW25113 con la ausencia de los genes *nagC*, *nagA*, *fimA* y *proV* en diferentes combinaciones (**ver anexo B**), los cuales fueron inactivados en la mayoría de los mutantes durante la evolución, mediante el uso de la librería genética KEIO [37] y la técnica de transducción con bacteriófagos [49], con la finalidad de averiguar sus efectos en la resistencia a la presión osmótica mediante la determinación del coeficiente de "fitness" de las cepas construidas bajo condiciones de inhibición (0.55 M de NaCl).

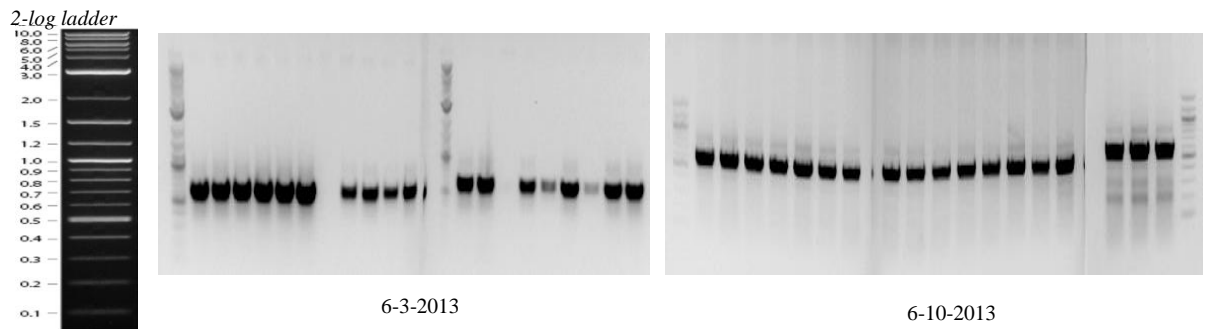
### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1. Experimentos de control y escaneo

##### 3.1.1. Conservación de genotipos evolutivos con PCR

Utilizando la referencia de identificación de tamaño de ADN llamada *2-log ladder* (New England Biolabs, Reino Unido) se corroboró la amplificación de la secuencia **mbhA::oriT** de tamaño aproximado de 0.6 kb, presente en las cepas evolutivas H1-H6, G1-G6, A1-A6 como se observa en la **figura 1** (de izquierda a derecha). Con el presente resultado se comprueba la presencia de dichas cepas durante el transcurso de la evolución, descartando cualquier tipo de contaminación con otro cultivo biológico.

Figura 1. Conservación de la secuencia *mbhA::oriT* en cepas evolutivas.



##### 3.1.2. Prueba de verificación de conjugación

Se logró corroborar la transmisión y recepción de los genes de resistencia a los antibióticos gentamicina y cloramfenicol de las cepas evolutivas G1-G6 y H1-H6, ya que quedó evidenciada la capacidad de las cepas conjugadas para crecer en los platos de LB con la presencia de dichos antibióticos como se puede observar en la **figura 2**. Como se esperaba, no se obtuvieron colonias en el plato correspondiente al control negativo.

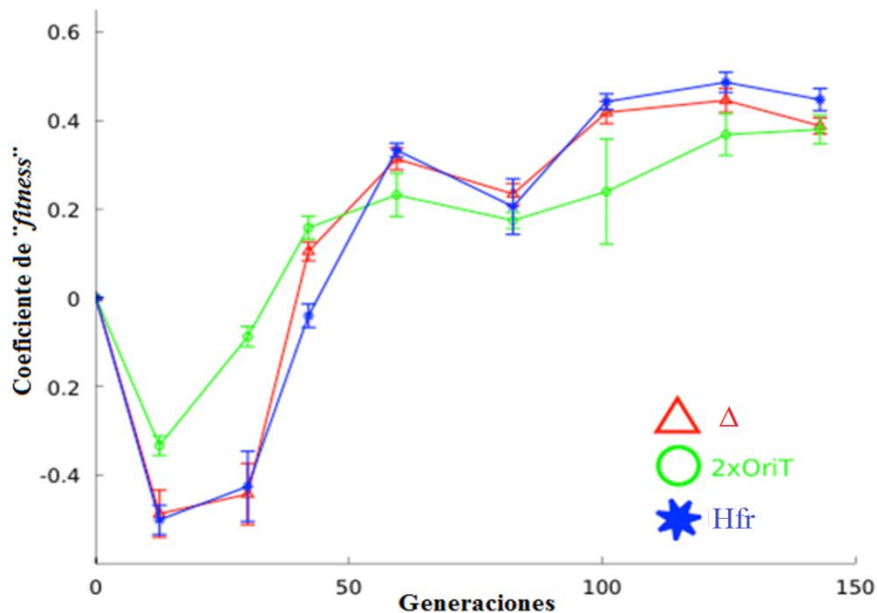
Figura 2. Cultivos de las cepas evolutivas G1-G6 y H1-H6 conjugadas con BW25113/pCA24N en platos de LB con los antibióticos cloramfenicol y gentamicina.



### 3.1.3. Coeficiente de "fitness" a través de la evolución

Durante el transcurso de la evolución, se calculó el coeficiente de *fitness* de ocho generaciones para cada población mutante, entendiéndose por población al conjunto de las 6 réplicas evolutivas de cada cepa ancestral 2xOriT,  $\Delta$  y Hfr (figura 3).

Figura 3. Coeficiente de fitness de las poblaciones evolutivas de 2xOriT,  $\Delta$  y Hfr a través del experimento evolutivo.



Fuente: [41]

Es natural evidenciar una mayor sensibilidad por parte de las cepas con alta recombinación genética Hfr+ y Hfr- hacia el inhibidor osmótico NaCl, en comparación con la población asexual 2xOriT, durante el transcurso de las primeras cuarenta generaciones aproximadamente. Debido a esto, no se puede afirmar con plena seguridad que la notable mejoría en el crecimiento celular experimentado por las cepas Hfr+ y Hfr- por encima de la población no recombinante (2xOriT), entre las generaciones treinta y cinco y sesenta y cinco aproximadamente, se debe exclusivamente a fenómenos de recombinación genética, ya que en los experimentos evolutivos es ampliamente conocido que entre mayor sea la presión del agente inhibidor de la evolución, más rápidamente se verán los efectos de adaptación de los fenotipos mutantes. Finalmente, los tres tipos de poblaciones en evolución obtuvieron aproximadamente el mismo valor de coeficiente de *fitness* al culminarse esta, el cual estuvo alrededor de 0.4, resultado del que se puede concluir que el sistema de alta recombinación genética propuesto para la evolución es como mínimo igual de eficiente que el modelo asexual de evolutivo.

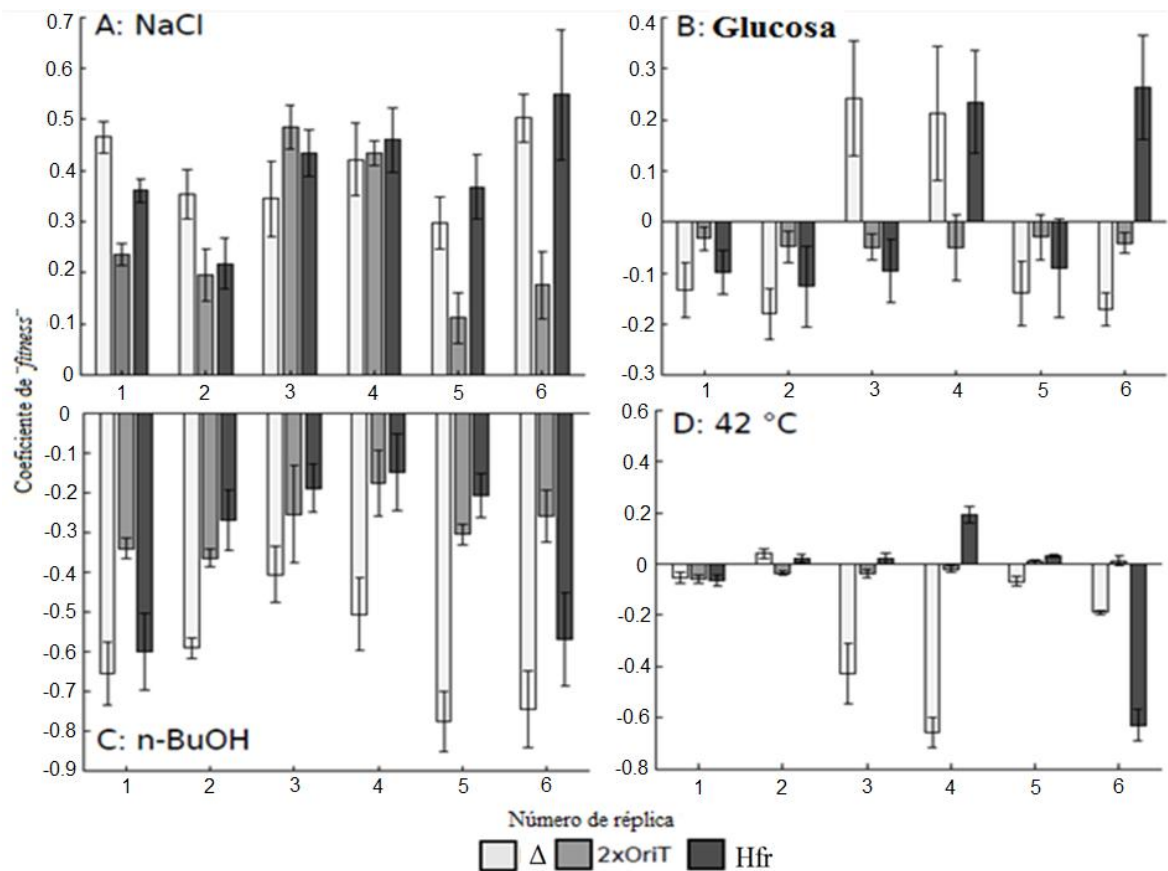
## **3.2. Caracterización de mutantes**

### **3.2.1. Pruebas de resistencia cruzada**

Se verificó un aumento significativo en la velocidad de crecimiento de todas las cepas mutantes con respecto a sus ancestros bajo las condición de inhibición de 0.65 [M] de NaCl, como era de esperarse debido a la evolución directa hacia dicho inhibidor. Por otra parte, solamente las cepas G3, G4, H4 y H6 presentaron una mejoría en su coeficiente de *fitness* respecto a sus antecesores frente a los 0.3 [M] de glucosa de inhibición, esto puede significar la existencia de rutas evolutivas diferentes a las de las demás cepas mutantes. Seguidamente se observó un detrimento estadísticamente significativo en todas las velocidades de crecimiento de las cepas mutantes bajo la condición de inhibición de 0.8% [v/v] de n-butanol, con lo que se concluye que los mecanismos de evolución presentes en dichas

cepas son inútiles para la resistencia a dicho inhibidor. Finalmente se determinó que únicamente las cepas G2 y H4 tuvieron un coeficiente de *fitness* mayor a cero cuando se incrementó la temperatura de incubación en cinco grados centígrados, sin embargo, dicho incremento para la cepa G2 es muy pequeño respecto al de H4, razón por la cual se puede especular que solamente la última cepa mutante puede tener un mecanismo de evolución diferente a las demás, el cual le confiere dicha resistencia cruzada (**figura 4**).

Figura 4. Coeficiente de *fitness* de las cepas mutantes bajo diferentes condiciones de inhibición. A) 0.65 [M] de NaCl, B) 0.3 [M] de glucosa, C) 0.8% [v/v] de n-butanol, D) 42 [°C]. Las barras de error tienen un intervalo de confianza de 95% para una distribución

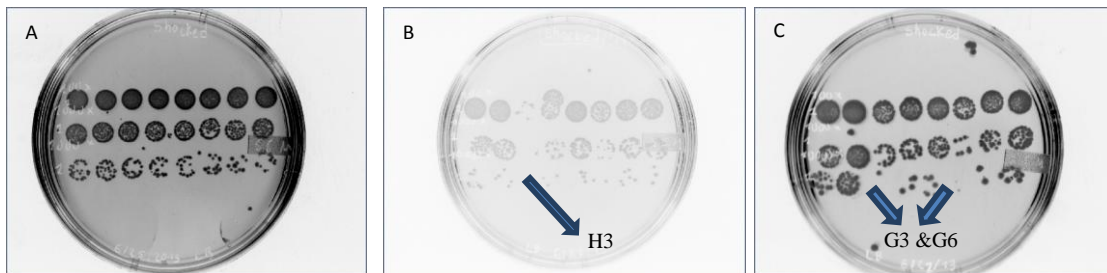


Fuente: [41]

### 3.2.2. Prueba de resistencia hiperosmótica

La tasa de dilución donde se puede apreciar el número de colonias sobrevivientes cuando estas son expuestas a 5.45 [M] de NaCl fue de diez mil veces para todas las cepas. En el caso de las mutantes A1-A6 ninguna presentó una alteración significativa en su crecimiento debido a los efectos del NaCl, ya que se pueden contar aproximadamente el mismo número de colonias en cada réplica (**figura 5**). Por otra parte, para el caso de las cepas H3, G3 y G6 dicha condición de inhibición fue suficiente para impedir el crecimiento de estas, lo cual implica que la supervivencia bajo condiciones extremas de inhibición versus el crecimiento a bajas concentraciones (alrededor de 0.85 [M] de NaCl) requiere mecanismos divergentes de evolución.

Figura 5. Número de colonias mutantes A, G y H, resultantes de la inhibición hiperosmótica. A) Mutantes A1 hasta A6 con dos réplicas de su ancestro 2xOriT, B) Mutantes H1 hasta H6 con dos réplicas de su ancestro Hfr, C) Mutantes G1 hasta G6 con dos réplicas de su ancestro  $\Delta$ . Todas las cepas están organizadas de izquierda a derecha en orden ascendente.



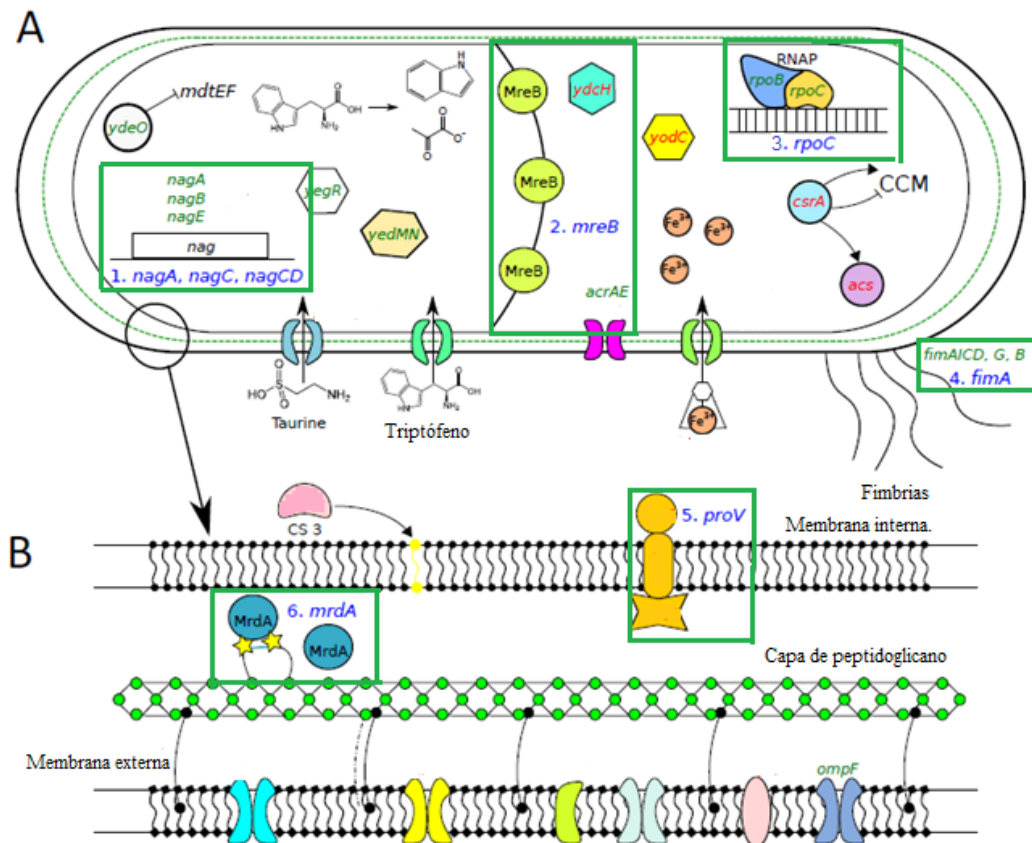
### 3.3. Secuenciamiento

#### 3.3.1. Análisis de las mutaciones identificadas

Como resultado del secuenciamiento genómico de las cepas G1-G6 y A1-A6, se construyó una lista de todos los genes mutados por cepa, con la respectiva función biológica de la proteína que codifica, utilizando la base de datos ECOCYC [44], y el tipo de mutación obtenida (**anexo C**).

Entre las mutaciones identificadas anteriormente, vale la pena resaltar la importancia de seis de ellas como posibles contribuidoras en el desarrollo de los mecanismos de adaptación experimentados por las cepas evolucionadas. Tales variaciones son descritas en detalle a continuación, además, es posible observar sus efectos en la función biológica celular mediante la **figura 6**.

Figura 6. Efectos biológicos de las mutaciones genéticas en las cepas mutantes. A) Citoplasma celular, B) Membrana celular. Los genes mutados son numerados de uno a seis de acuerdo a la descripción siguiente a la presente figura.



1. Mutaciones del operón *nagBACD*[50]: Ocho de doce cepas evolucionadas presentaron mutaciones de inactivación, ya sea de los genes *nagC* o *nagA*, cuyas funciones son el control de expresión de dicho operón, el cual interviene en el aprovechamiento y degradación de amino azúcares como la N-acetil-D-

glucosamina y la glucosamina [51] [52]. Es posible plantear la hipótesis de que el mecanismo adaptativo hacia el estrés osmótico haga esfuerzos en disminuir gastos energéticos de la célula en la degradación de la N-acetilglucosamina, ya que se ha reportado previamente [53] que dicho compuesto es fundamental en la construcción de la capa de peptidoglicano presente entre las membranas celulares interna y externa, la cual podría conferir mayor resistencia hacia la presión osmótica.

2, 6. Mutación no silenciosa de cambio de sentido de los genes *mreB* y *mrdA*: Tales mutaciones se presentaron en cinco cepas mutantes (A1, A2, A5, A6 y G6), de lo cual podría inferirse que cambios en la morfología celular podrían estar relacionados con los mecanismos de resistencia a la presión osmótica presentes en dichas cepas, ya que dichos genes están relacionados con la regulación del tamaño celular [54] y el mantenimiento de la forma alargada de las cepas de *E.coli*[55].

3. Mutación de duplicación de una región de 84 pares de bases en el gen *rpoC*: Tales modificaciones genéticas se presentaron en las cepas G3 y G4. Dicho gen codifica la subunidad  $\beta'$  de la ARN polimerasa [56], responsable de la transcripción de todo el genoma de *E. coli* y por tanto de cualquier alteración fenotípica obtenida. Además, se ha encontrado en la literatura que en previos experimentos evolutivos se han presentado tales alteraciones genéticas [57] en el mismo gen, lo cual es un buen indicio de que se pueden obtener mecanismos de resistencia a la presión osmótica por tal ruta. Finalmente, se corroboró mediante la técnica de microarreglos (**ver sección 3.5**) que la cepa G3 tuvo mayor número de genes sobreexpresados en comparación a las demás mutantes, lo cual hace al presente mecanismo adaptativo responsable del mejoramiento de la resistencia a la presión osmótica en dicha cepa.

4, 5. Mutaciones de inactivación de los genes *proV* y *fimA* a causa de la inserción de los transposones *IS1* e *IS186*: Tales alteraciones genéticas fueron encontradas

en las cepas A3, A4 y A5. Las funciones celulares de los mencionados genes son, codificar una subunidad de la proteína transportadora [58][59] de la molécula osmoprotectora de glicina betaína [60] y regular la producción de las proteínas responsables de la formación de las fimbrias celulares [61], cuya sobreexpresión ha sido documentada previamente bajo condiciones de presión osmótica [62], razón por la cual se cree que la inhibición en la producción de tal organelo responde a un mecanismo de adaptación en el cual las cepas mutantes utilizan la energía proveniente de las moléculas carbonadas para otras funciones celulares de mayor relevancia. Por otra parte, se considera que la inactivación del gen *proV* se debe a la ausencia de la molécula de glicina betaína en el medio evolutivo M9, a pesar de que se ha reportado previamente su activación en extensos estudios de resistencia osmótica [63][64].

### **3.4. Sobreexpresión, complementación, y delección de genes**

#### **3.4.1. Sobreexpresión de genes**

Como se puede observar en la **figura 7A**, la sobreexpresión individual de los genes *cadB*, *ydhp*, *treR*, *proV* y *nagA* en la cepa BW25113 resulta en un detrimento estadísticamente significativo en la velocidad de crecimiento comparado con la misma cepa sin sobreexpresión alguna. Dichos resultados son consecuentes con el hecho de que los nombrados genes fueron inactivados en la mayoría de las cepas evolucionadas. Por el contrario y sorprendentemente, se obtuvo un coeficiente de *fitness* para la cepa BW25113/*ydjK* mejor que el de su cepa de referencia, generando así la posibilidad de realizar una investigación más detallada de dicho gen, cuya función es de transporte de un metabolito hasta ahora desconocido [65]. Finalmente, no se observó un incremento significativo en el coeficiente de *fitness* para la sobreexpresión de los genes *nmpC*, *yobF*, *mreB* y *fimA*.

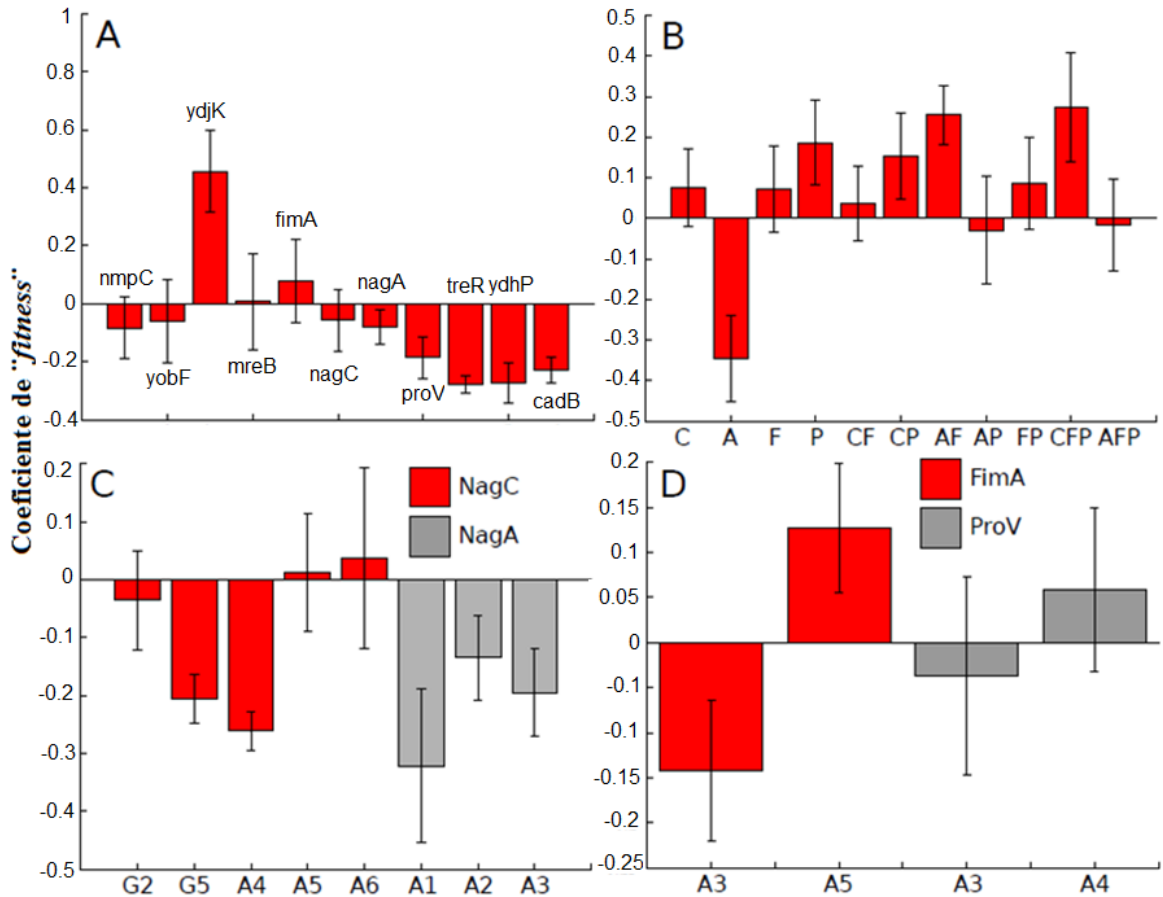
### 3.4.2. Complementación de genes

Se determinaron los coeficientes de “*fitness*” para las mutantes construidas por complementación de genes (**figura 7C y D**). Se comprobó el efecto favorable hacia la resistencia osmótica que tiene la inactivación de los genes *nagA* y *nagC* en los mutantes A1, A2, A3 y G5, A4 respectivamente. Sin embargo, para el caso de la compensación del ya nombrado gen *nagC* en las cepas G2, A5 y A6, no se obtuvieron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento que permitan establecer un efecto global causado por la inactivación de dicho gen en el crecimiento de las mutantes generadas, por lo cual se puede especular que la obtención de coeficientes de *fitness* diferentes para cada cepa se debe a mecanismos de adaptación divergentes experimentados en cada mutante. De la misma forma, la inactivación de los genes *fimA* y *proV* en las cepas A3, A5 y A3, A4 respectivamente, generaron efectos diferentes en sus velocidades de crecimiento, lo cual no permite establecer una hipótesis clara acerca de los mecanismos de adaptación relacionados a dichos genes.

### 3.4.3. Delección de genes

Se calcularon los coeficientes de *fitness* para las cepas construidas en la **sección 2.6.3** del procedimiento experimental (**figura 7B**). Solamente las cepas P, CP, AF y CFP experimentaron un mejoramiento significativo en su velocidad de crecimiento con respecto a la cepa de referencia BW25113, de las cuales únicamente la combinación CP se encuentra inactivada en las cepas mutantes. Cabe resaltar la importancia que tiene la generación de cepas resistentes a las condiciones de presión osmótica de una manera rápida y a partir de cepas no evolucionadas, mediante la utilización de la información genética de las cepas mutantes obtenida del secuenciamiento y el uso de la técnica de transducción con bacteriófagos.

Figura 7. Coeficientes de *fitness* de las pruebas de sobreexpresión, complementación y delección de genes bajo la condición de inhibición de 0.55 [M] de NaCl en el medio de cultivo M9. (A) Sobreexpresión, (B) Complementación, (C) y (D) Delección.



.Fuente: [41].

### 3.5. Microarreglos.

#### 3.5.1. Genes sobreexpresados y represados.

Como resultado del análisis de los datos generados en el experimento de microarreglos, se encontraron un total de 432 genes sobreexpresados y 479 represados en todas las cepas analizadas (**anexo C**). Además, a pesar que cada mutante posee un perfil de expresión genético diferente, se detectó la

sobreexpresión y represión de varios genes comunes entre las cepas estudiadas (anexo C).

### 3.5.2. Análisis del perfil de expresión genético de las cepas mutantes.

Entre los perfiles genéticos determinados a través de la técnica de microarreglos, se determinaron patrones de expresión que se pueden clasificar en las siguientes categorías de funciones biológicas:

1. Importación de moléculas osmoprotectoras: Los genes relacionados con el transporte y metabolismo de sulfonatos hacia el interior de las células de *E. coli*, fueron frecuentemente sobreexpresados en las mutantes estudiadas. Sin embargo, a pesar de la ausencia de sulfonatos en el medio de inhibición, es posible que dichos genes tengan la facultad de importar otro tipo de moléculas, ya que se ha reportado previamente su importancia en el transporte de moléculas osmoprotectoras hacia el interior celular como la taurina, bajo condiciones de presión osmótica [66].

2. Importación de triptófano hacia las cepas mutantes: Se presentó la sobreexpresión del par de genes *tnaAB*, relacionados con el transporte y catabolismo [67] del aminoácido triptófano, posiblemente como un mecanismo para optimizar la absorción de tal compuesto del medio evolutivo con el objetivo de compensar la inhabilidad de las cepas en su producción. El gen *tnaA* tiene la facultad de convertir el ya mencionado aminoácido en piruvato y posteriormente en indol, molécula que está fuertemente relacionada con la formación de biopelículas celulares [68][69][70], mecanismo que puede contribuir a la resistencia osmótica. Adicionalmente, se han reportado en la literatura mutaciones del gen *tnaA* en previos experimentos evolutivos con *E. coli* hacia otros inhibidores [71].

3. Absorción y aprovechamiento de compuestos de hierro: La sobreexpresión de los genes *entCEFH*, *feoB*, *fepG* y *fiu* involucrados con el aprovechamiento del

hierro [72][73] ha sido también reportada en previos experimentos evolutivos hacia el inhibidor n-butanol [74][75]. Perturbaciones en la ruta metabólica del hierro de las cepas mutantes pueden por lo tanto influir en los mecanismos de resistencia a la presión osmótica experimentados por dichas cepas, a pesar de que el nivel de expresión genética de *fiu* fue represado en los mutantes G2 y G6.

4. Metabolismo de compuestos carbonados: Se detectó la sobreexpresión del gen *csrA* en las cepas G2, G3 y G5, el cual es un regulador del metabolismo de carbohidratos relacionados con la biosíntesis [76] y degradación [77] de glicógeno. Tal polisacárido a su vez actúa como una molécula de almacenamiento de energía para las funciones celulares, de lo que podría especularse la existencia de cambios significativos en la eficiencia de la obtención energética a partir de diferentes fuentes de carbono. Es posible que tal mecanismo adaptativo contribuya al mejoramiento de la resistencia de los mutantes a la presión osmótica.

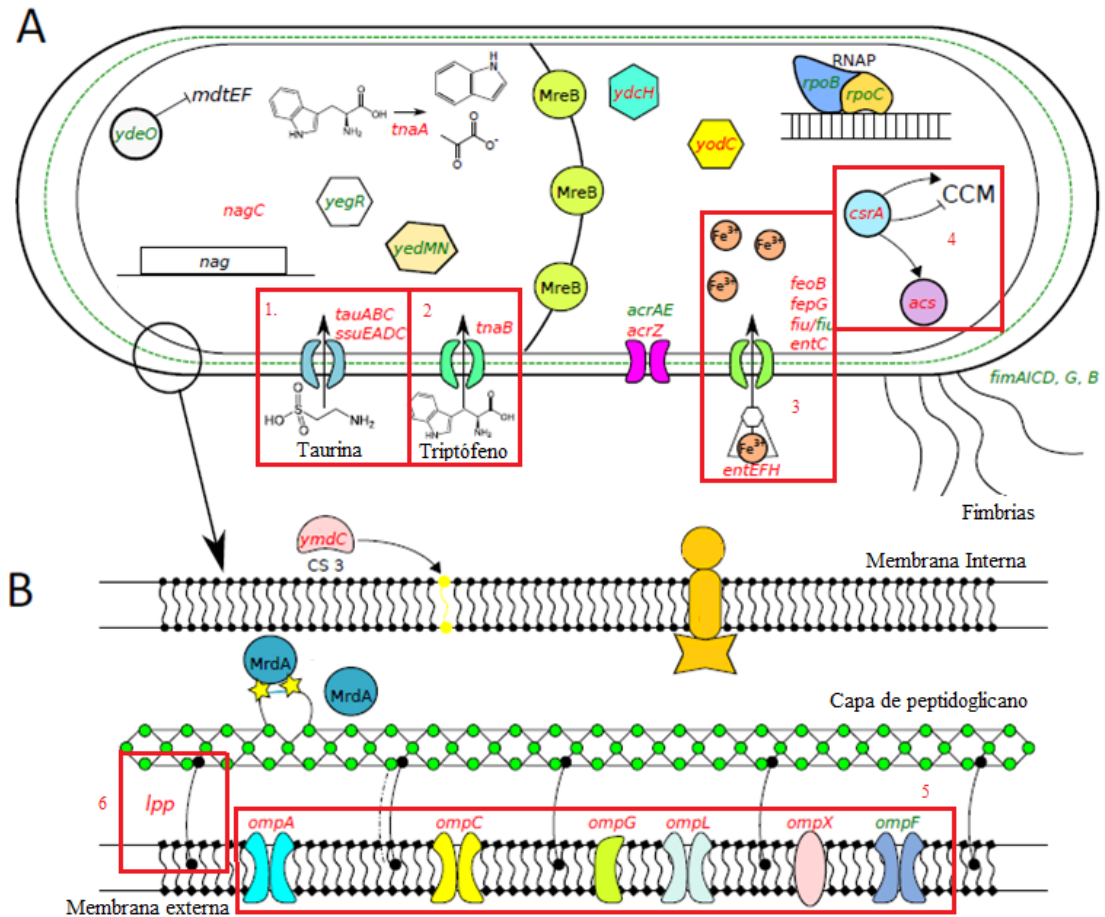
5. Composición de la membrana celular externa: La sobreexpresión del operón *ompACGLX*, detectada en las cepas mutantes puede conferirles mecanismos de resistencia a la presión osmótica, ya que es conocido que la sobreexpresión del gen *ompA* permite importar compuestos hasta ahora desconocidos a través de la membrana celular [78] y ayuda a realizar la conjugación generada por el factor F [79]. De la misma forma, se ha reportado que la activación del gen *ompC* está relacionada con la adherencia de la membrana celular externa a la capa de peptidoglicano[80]. Al mismo tiempo, existe la posibilidad de transportar solutos de gran (>600 daltons) y pequeño (600 daltons) tamaño cuando los genes *ompG* y *ompL* son respectivamente sobreexpresados [81][82]. Adicionalmente, se ha reportado la activación del gen *ompX* cuando cepas de *E. coli* son sometidas a factores de inhibición osmóticos [83].

6. Composición de la capa intermembranaria de peptidoglicano: La lipoproteína de mureína, producida por el gen *lpp*[84], fue sobreexpresada en cuatro mutantes

diferentes (A2, A4, G2, G3), lo cual parece indicar una adherencia más fuerte de la capa de peptidoglicano junto con la membrana celular externa, con el fin de endurecer la envoltura celular para generar mayor resistencia a los factores de presión osmótica externos.

Finalmente, se presenta un diagrama ilustrativo (**ver figura 8**) de las funciones biológicas llevadas a cabo por los genes que mayor influencia pueden tener en los mecanismos de adaptación a la presión osmótica descritos previamente.

Figura 8. Efectos biológicos de la sobreexpresión y represión genética detectada en las cepas mutantes con el experimento de microarreglos. Los genes sobreexpresados son resaltados en color rojo y numerados de acuerdo a la descripción previa a la presente figura. Los genes represados son resaltados en color verde.



#### 4. CONCLUSIONES

Como resultado del experimento evolutivo se obtuvo un aumento en la tolerancia a la presión osmótica de 0.55 [M] a 0.75 [M] de NaCl en las cepas mutantes. Sin embargo, no se presentó el efecto de resistencia cruzada hacia los inhibidores n-butanol, exceso de glucosa y altas temperaturas de incubación como es reportado en la literatura usualmente.

El secuenciamiento genómico de las cepas mutantes G1-G6 junto con A1-A6, reveló mutaciones relacionadas con el catabolismo de la N-Acetil-Glucosamina, la regulación de la forma celular (*mreB*), el aprovechamiento de moléculas osmoprotectoras y la regulación del nivel de expresión genético debido a variaciones en la secuencia genómica del factor de transcripción global *rpoC*.

A nivel de expresión genético, los genes relacionados con la expresión de porinas, la síntesis de la membrana y capa de peptidoglicano celular, el metabolismo de hierro y aprovechamiento de sulfonatos fueron significativamente perturbados en varios de los mutantes obtenidos respecto a sus cepas antecesoras y pueden ser los futuros pilares de investigación en la profundización del presente trabajo investigativo.

## BIBLIOGRAFIA

BABA T, ARA T, HASEGAWA M, TAKAI Y, OKUMURA Y, BABA M, MORI H. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*. 2006; 2.

CONEPCIÓN J, PUERTA B. *Prácticas de biología molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. 2005; p.31.

Ecocyc database. [en línea]. < <http://ecocyc.org/publications.shtml>>.[citado en 15 de febrero de 2014]

Reyes L, Abdelaal A, Kao K. Genetic Determinants for n-Butanol Tolerance in Evolved Escherichia coli Mutants: Cross Adaptation and Antagonistic Pleiotropy between n-Butanol and Other Stressors. *Applied and environmental microbiology*. 2013; 79, 5313-5320.

SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Metabolic Engineering*. 2001; 73, 129-169.

WILCHES A. *Fundamentos de biología molecular*. Ediciones UniBoyacá. 2009; p.135-149.

WINKLER J, REYES L, KAO K. Adaptive Laboratory Evolution for Strain Engineering. *Systems Metabolic Engineering*. 2013; 985, 211–222.

WINKLER J, KAO K. Harnessing Recombination to Speed Adaptive Evolution in Escherichia Coli. *Metabolic Engineering*. 2012; 14, 487–495.

WINKLER J, GARCIA C, OLSON M, CALLAWAY E, KAO KATY. Evolved Escherichia coli osmotolerant mutants frequently exhibit defective n-acetylglucosamine catabolism and point mutations in the cell-shape regulating protein MreB. *Applied and Environmental*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Bioproces Engineering. [en línea] < <http://www.mpi-magdeburg.mpg.de/bpe>>.[citado en 26 de agosto de 2013]
- [2]. Bioprocess: AnIntroduction. [en línea] < <http://web.ornl.gov/sci/techresources/meetings/bacpac/>>.[citado en 26 de agosto de 2014]
- [3]. Biotecnología. [en línea] < <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades&note=405&opt=11>>.[citado en 26 de agosto de 2014]
- [4]. The Role of Bioprocess Engineering in Biotechnology. [en línea] < <http://www.nae.edu/File.aspx?id=7291>>.[citado en 26 de agosto de 2014]
- [5]. DORAN P. *Bioprocess Engineering Principles*. McGraw-Hill Higher Education. 2011; p.333-391.
- [6]. WILLEY J, SHERWOOD L, WOOLVERTON C .*Prescott's Microbiology*. McGraw-Hill Higher Education. 2011; p.112-135,306,307.
- [7]. SAUER, U. *Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes*. *Metabolic Engineering*. 2001; 73, 129-169.
- [8]. WINKLER J, REHMANN M, KAO K. *Novel Escherichia coli hybrids with enhanced butanol tolerance*. *Biotechnology letters*. 2010; 32, 915-920.
- [9]. ALMARIO M, REYES L, KAO K. *Evolutionary engineering of Saccharomyces cerevisiae for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass*. *Biotechnology and bioengineering*. 2013; 110, 2616-2623.
- [10]. ATSUMI S, HANAI T, AND LIAO J. *Non-Fermentative Pathways for Synthesis of Branched-Chain Higher Alcohols as Biofuels*. *Nature*. 2008; 451, 86–89.
- [11]. STRUDSHOLM K, NIELSEN J, EMBORG C. *Product Formation during Batch Fermentation with Recombinant Escherichia Coli Containing a Runaway Plasmid*. *Bioprocess Engineering*. 1992; 8, 173–181.

- [12]. ZHENG Z, CHEN T, ZHAO M, WANG Z, ZHAO X. *Engineering Escherichia Coli for Succinate Production from Hemicellulose via Consolidated Bioprocessing*. *Microbial Cell Factories*, 2012; 11, 37.
- [13]. RECORD M, COURTENAY E, CAYLEY D, GUTTMAN H. *Responses of E. Coli to Osmotic Stress: Large Changes in Amounts of Cytoplasmic Solutes and Water*. *Trends in Biochemical Sciences*. 1998, 143–148.
- [14]. SHILOACH J, FASS R. *Growing to High Cell density—A Historical Perspective on Method Development*. *Biotechnology Advances*. 2005; 23, 345–357.
- [15]. PATE R, KLISE G, WU B. *Resource Demand Implications for US Algae Biofuels Production Scale-Up*. *Applied Energy*. 2011; 88, 3377–3388.
- [16]. ITO T, NAKASHIMADA Y, SENBA K, MATSUI T, NISHIO N. *Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process*. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2005; 100, 260–265.
- [17]. RUMBOLD K, VAN BUIJSEN H, OVERKAMP K, VAN GROENESTIJN J, PUNT P, VAN DER WERF M. *Microbial Production Host Selection for Converting Second-Generation Feedstocks into Bioproducts*. *Microbial cell factories*. 2001; 8,
- [18]. PURVIS J, YOMANO L, INGRAM L. *Enhanced Trehalose Production Improves Growth of Escherichia Coli under Osmotic Stress*. *Applied and environmental microbiology*. 2005; 71, 3761–3769.
- [19]. LANDFALD B, STRØM A. *Choline-Glycine Betaine Pathway Confers a High Level of Osmotic Tolerance in Escherichia Coli*. *Journal of bacteriology*. 1986; 165, 849–855.
- [20]. CHAMBERS S, KUNIN C, MILLER D, HAMADA A. *Dimethylthetin Can Substitute for Glycine Betaine as an Osmoprotectant Molecule for Escherichia Coli*. *Journal of bacteriology*. 1987; 169, 4845–4847.
- [21]. ROZWADOWSKI K, KHACHATOURIANS G, SELVARAJ G. *Choline Oxidase, a Catabolic Enzyme in ArthrobacterPascens, Facilitates Adaptation to Osmotic Stress in Escherichia Coli*. *Journal of bacteriology*. 1991; 173, 472–478.

- [22]. WINKLER J, REYES L, KAO K. *Adaptive Laboratory Evolution for Strain Engineering*. Systems Metabolic Engineering. 2013; 985, 211–222.
- [23]. PORTNOY V, BEZDAN D, ZENGLER K. *Adaptive Laboratory Evolution- Harnessing the Power of Biology for Metabolic Engineering*. Current Opinion in Biotechnology. 2011; 590–594.
- [24]. DRAGOSITS M, MATTANOVICH D. *Adaptive Laboratory Evolution -- Principles and Applications for Biotechnology*. Microbial cell factories. 2013; 12, 64.
- [25]. GRAY J, GODDARD M. *Sex Enhances Adaptation by Unlinking Beneficial from Detrimental Mutations in Experimental Yeast Populations*. BMC Evolutionary Biology. 2012; 12, 43.
- [26]. COOPER F. Recombination Speeds Adaptation by Reducing Competition between Beneficial Mutations in Populations of Escherichia Coli. PLoS Biology. 2007; 5, 1899–1905.
- [27]. WINKLER J, KAO K. *Harnessing Recombination to Speed Adaptive Evolution in Escherichia Coli*. Metabolic Engineering. 2012; 14, 487–495.
- [28]. CUBERO J. *Introducción a la mejor genética vegetal*. Editorial Aedos. 2002; p.55.
- [29]. MAHNER M, BINGE M. *Fundamentos de biofilosofía*. Editorial Siglo Veintiuno Editores. 2000; p.329.
- [30]. CONEPCIÓN J, PUERTA B. *Prácticas de biología molecular*. Editorial Pontificia Universidad Javeriana. 2005; p.31.
- [31]. TEIJÓN J, PERTIERRA A, GAITAN B, VILLARVERDE C, OLTRAS C, RAMÍREZ J. *Fundamentos de bioquímica estructura*. Editorial Tébar. 2006; p.261.
- [32]. PRATS G. *Microbiología clínica*. Editorial Médica Panamericana. 2000; p.119.
- [33]. Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada. Conjugación. [en línea]. <[http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/investigacion/file.php/38/ARCHIVOS\\_2010/textos/guia\\_Bibliografia.PDF](http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/investigacion/file.php/38/ARCHIVOS_2010/textos/guia_Bibliografia.PDF)>. [citado en 14 de abril de 2014]

- [34]. FIRTH N, IPPEN-IHLER K, SKURRAY R. Structure and function of the F Factor and mechanism of conjugation [en línea]. <<http://bio.classes.ucsc.edu/bio105I/EXERCISES/F%20TRANSFER/Chap126.pdf>> .[citado en 15 de abril de 2014]
- [35]. ACHTMAN M, KENNEDY N, SKURRAY R. *Cell-cell interactions in conjugating Escherichia coli: role of traT protein in surface exclusion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1977; 74, 5104–5108.
- [36]. JALAJAKUMARI M, GUIDOLIN A, BUHK H, MANNING P, HAM L, HODGSON A, SKURRAY R. *Surface exclusion genes traS and traT of the F sex factor of Escherichia coli K-12. Determination of the nucleotide sequence and promoter and terminator activities*. Journal of Molecular Biology. 1987; 198, 1–11.
- [37]. BABA T, ARA T, HASEGAWA M, TAKAI Y, OKUMURA Y, BABA M, MORI H. *Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection*. Molecular Systems Biology. 2006; 2.
- [38]. WILCHES A. *Fundamentos de biología molecular*. Ediciones UniBoyacá. 2009; p.135-149.
- [39]. WINKLER J, KAO K. *Harnessing recombination to speed adaptive evolution in Escherichia coli*. Metabolic Engineering. 2012; 14, 487–495.
- [40]. Coli Genetic Stock Center. Fuente de obtención de la cepa BW25113. [en línea]. <<http://cgsc.biology.yale.edu>>.[citado en 6 de mayo de 2013]
- [41]. WINKLER J, GARCIA C, OLSON M, CALLAWAY E, KAO KATY. *Evolved Escherichia coli osmotolerant mutants frequently exhibit defective n-acetylglucosamine catabolism and point mutations in the cell-shape regulating protein MreB*. Applied and Environmental Microbiology. 2014; 80.
- [42]. Reyes L, Abdelaal A, Kao K. *Genetic Determinants for n-Butanol Tolerance in Evolved Escherichia coli Mutants: Cross Adaptation and Antagonistic Pleiotropy between n-Butanol and Other Stressors*. Applied and environmental microbiology. 2013; 79, 5313-5320.

- [43]. BRESEQ online software. [en línea]. <<http://barricklab.org/twiki/bin/view/Lab/ToolsBacterialGenomeResequencing>>.[citado en 30 de julio de 2013]
- [44]. Ecocyc database. [en línea]. < <http://ecocyc.org/publications.shtml>>.[citado en 15 de febrero de 2014]
- [45]. XIONG J. *Essential Bioinformatics*. Cambridge University. 2006; p.243-249,267-
- [46]. SAEED A, BHAGABATI N, BRAISTED J, LIANG W, SHAROV V, HOWE E, QUACKENBUSH, J. *TM4 Microarray Software Suite*. Methods in enzymology. 2006; 411, 134-193.
- [47]. DENNIS J, SHERMAN B, HOSACK D, YANG J, GAO W, LANE H, LEMPICKI R. *DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery*. Genome biology. 2003; 4, 3.
- [48]. KITAGAWA M, ARA T, ARIFUZZAMAN M, IOKA-NAKAMICHI T, INAMOTO E, TOYONAGA H, MORI H. *Complete set of ORF clones of Escherichia coli ASKA library (a complete set of E. coli K-12 ORF archive): unique resources for biological research*. DNA research. 2006; 12, 291-299.
- [49]. P1vir phage transduction. [en línea]. < [http://openwetware.org/wiki/Sauer:P1vir\\_phage\\_transduction](http://openwetware.org/wiki/Sauer:P1vir_phage_transduction)>.[citado en 15 de febrero de 2013]
- [50]. PLUMBRIDGE J. *Sequence of the nagBACD operon in Escherichia coli K12 and pattern of transcription within the nag regulon*. Molecular microbiology. 1989; 3(4), 505-515. 51.
- [51]. PLUMBRIDGE J. *Co-ordinated regulation of amino sugar biosynthesis and degradation: the NagC repressor acts as both an activator and a repressor for the transcription of the glmUS operon and requires two separated NagC binding sites*. The EMBO journal. 1995; 14, 3958.
- [52]. BDILLO A, BUENO C, CALCAGNO M, OLIVA G, FERREIRA F, RUVACALBA-SIM J. *La N-Acetilglucosamina-6-fosfato desacetilasa de E. coli es una metaloenzima con Zn<sup>2+</sup>*.[en línea].<<http://www.smb.org.mx/smb->

anterior/XXVICONGRESO/text/Resumen\_Orales/SSVI03.pdf>.[citado en 15 de febrero de 2013]

[53]. VOLLMER W, BLANOT D, DE PEDRO M. *Peptidoglycan structure and architecture*. FEMS microbiology reviews. 2008; 32, 149-167.

[54]. VATS P, SHIH Y, ROTHFIELD L. Assembly of the MreB-associated cytoskeletal ring of Escherichia coli. *Molecular microbiology*. 2009; 72, 170-182.

[55]. SPRATT B, PARDEE A. *Penicillin-binding proteins and cell shape in E. coli*. Nature. 1975; 254, 516-517.

[56]. GESZVAIN K, LANDICK R. The structure of bacterial RNA polymerase. [en línea]. <[http://landick.wisc.edu/images/Geszvain\\_Landick.pdf](http://landick.wisc.edu/images/Geszvain_Landick.pdf)>. [citado en 16 de abril de 2014]

[57]. CONRAD T, FRAZIER M, JOYCE A, CHO B, KNIGHT E, LEWIS N, PALSSON B. *RNA polymerase mutants found through adaptive evolution reprogram Escherichia coli for optimal growth in minimal media*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010; 107, 20500-20505.

[58]. Transporter: glycine betaine / proline ABC transporter. [en línea]. <<http://ecocyc.org/publications.shtml>>.[citado en 17 de abril de 2014]

[59]. Transportador ABC. [en línea]. <<http://medmol.es/glosario/transportador-abc/>>.[citado en 17 de abril de 2014]

[60]. MCNEIL S, NUCCIO M, HANSON A. *Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance*. Plant Physiology. 1999; 120, 945-949.

[61]. ORNDORFF P, FALKOW S. *Identification and characterization of a gene product that regulates type 1 piliation in Escherichia coli*. Journal of bacteriology. 1984; 160, 61-

[62]. SNYDER J, HAUGEN B, BUCKLES E, LOCKATELL C, JOHNSON D, DONNENBERG M, MOBLEY H. *Transcriptome of uropathogenic Escherichia coli during urinary tract infection*. Infection and immunity. 2004; 72, 6373-6381.

- [63]. WEBER A, JUNG K. *Profiling early osmostress-dependent gene expression in Escherichia coli using DNA macroarrays*. Journal of bacteriology. 2002; 184, 5502-5507.
- [64]. BARRON A, MAY G, BREMER E, VILLAREJO M. *Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in Escherichia coli*. Journal of bacteriology. 1986; 167, 433-438.
- [65]. Polypeptide: predicted transporter. [en línea]. <<http://ecocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=GENE&object=G6962>>.[citado en 18 de abril de 2014]
- [66]. VERHEUL A, WOUTERS J, ROMBOUTS F, ABEE T. A possible role of ProP, ProU and CaiT in osmoprotection of Escherichia coli by carnitine. Journal of applied microbiology, (1998). 85(6), 1036-1046.
- [67]. KHODURSKY A, PETER B, COZZARELLI N, BOTSTEIN D, BROWN P, YANOFSKY C. *DNA microarray analysis of gene expression in response to physiological and genetic changes that affect tryptophan metabolism in Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000; 97, 12170-12175.
- [68]. HAN T, LEE J, CHO M, WOOD T, LEE J. *Environmental factors affecting indole production in Escherichia coli*. Research in microbiology. 2011; 162, 108-116.
- [69]. LEE H, LEE J. *Indole as an intercellular signal in microbial communities*. FEMS microbiology reviews. 2010; 34, 426-444.
- [70]. CHANT E, SUMMER D. *Indolesignalling contributes to the stable maintenance of Escherichia coli multicopy plasmids*. Molecular microbiology. 2007; 63, 35-43.
- [71]. ATSUMI S, WU T, MACHADO I, HUANG W, CHEN P, PELLEGRINI M, LIAO J. *Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in Escherichia coli*. Molecular systems biology. 2010; 6, 449.
- [72]. NAHLIK M, BRICKMAN T, OZENBERGER B, MCINTOSH M. *Nucleotide sequence and transcriptional organization of the Escherichia coli enterobactin biosynthesis cistrons entB and entA*. Journal of bacteriology. 1989; 171, 784-790.

- [73]. Transporter: Fe<sup>2+</sup> transporter FeoB. [en línea]. <<http://ecocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=GENE&object=EG12102>>.[citado en 18 de abril de 2014]
- [74]. REYES L, ALMARIO M, WINKLER J, OROZCO M, KAO K. *Visualizing evolution in real time to determine the molecular mechanisms of n-butanol tolerance in Escherichia coli*. Metabolic engineering. 2012; 14, 579-590.
- [75]. DRAGOSITS M, MOZHAYSKIY V, QUINONES-SOTO S, PARK J, TAGKOPOULOS I. *Evolutionary potential, cross-stress behavior and the genetic basis of acquired stress resistance in Escherichia coli*. Molecular systems biology. 2013; 9, 643.
- [76]. SABNIS N, YANG H, ROMEO T. *Pleiotropic regulation of central carbohydrate metabolism in Escherichia coli via the gene csrA*. Journal of Biological Chemistry. 1995; 270, 29096-29104.
- [77]. YANG H, LIU M, ROMEO T. *Coordinate genetic regulation of glycogen catabolism and biosynthesis in Escherichia coli via the CsrA gene product*. Journal of bacteriology. 1996; 178, 1012-1017.
- [78]. SUGAWARA E, NIKAIDO H. *Pore-forming activity of OmpA protein of Escherichia coli*. Journal of Biological Chemistry. 1992; 267, 2507-2511.
- [79]. VAN ALPHEN L, HAVEKES L, LUGTENBERG B. *Major outer membrane protein d of Escherichia coli K12. Purification and in vitro activity of bacteriophages k3 and f-pilus mediated conjugation*. FEBS letters. 1977; 75, 285-290.
- [80]. LAMBERT P. *Enterobacteriaceae: composition, structure and function of the cell envelope*. Journal of Applied Microbiology. 1988; 65, 21S-34S.
- [81]. FAJARDO D, CHEUNG J, ITO C, SUGAWARA E, NIKAIDO H, MISR R. *Biochemistry and Regulation of a Novel Escherichia coli K-12 Porin Protein, OmpG, Which Produces Unusually Large Channels*. Journal of bacteriology. 1998; 180, 4452-4459.
- [82]. DARTIGALONGUE C, NIKAIDO H, RAINA S. *Protein folding in the periplasm in the absence of primary oxidant DsbA: modulation of redox potential in periplasmic space via OmpLporin*. The EMBO journal. 2000; 19, 5980-5988.

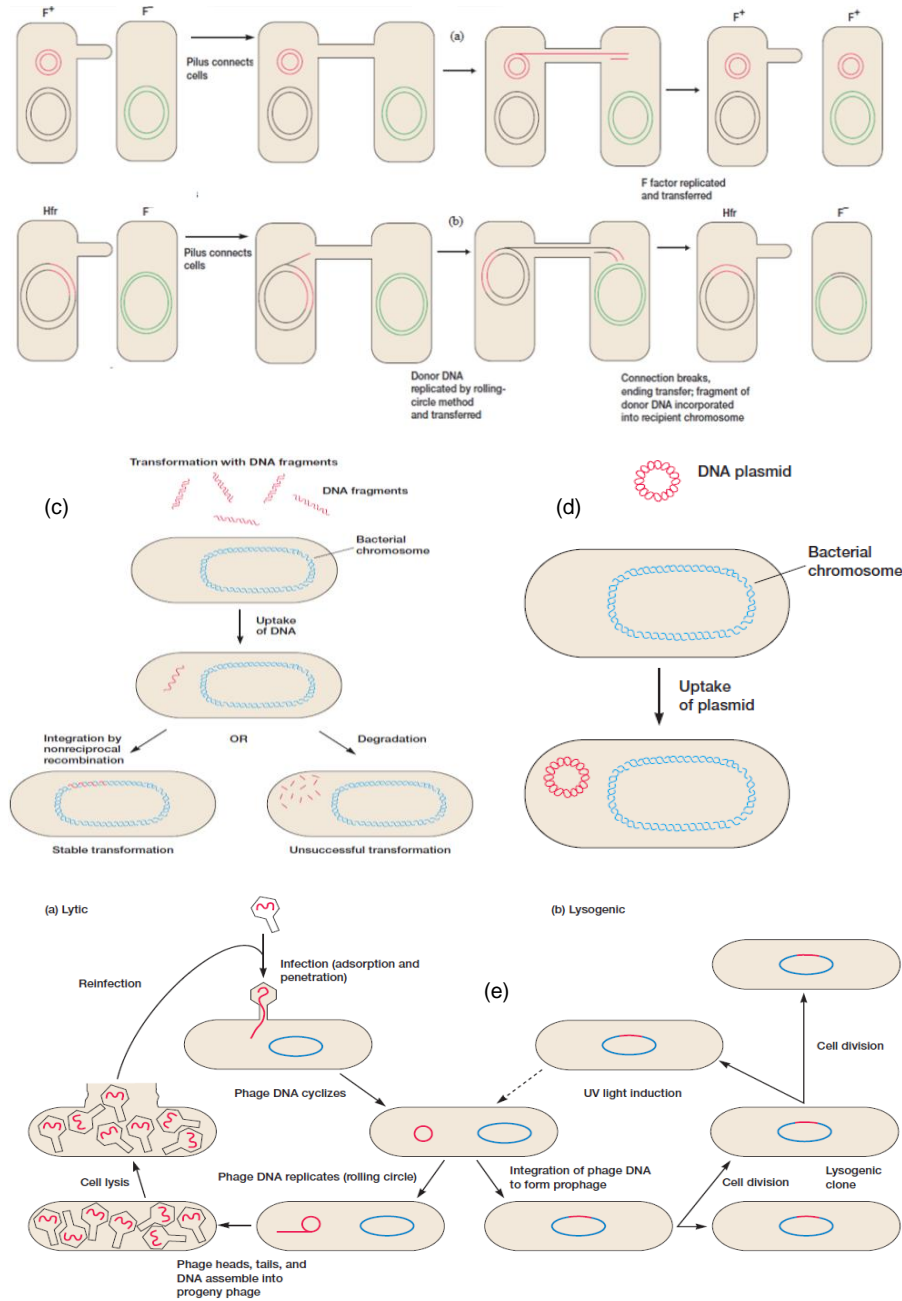
- [83]. NAKASHIIVIA K, HORIKOSI-II K, MIZUNO T. *Effect of Hydrostatic Pressure on the Synthesis of Outer Membrane Proteins in Escherichia coli*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 1995; 59, 130-132.
- [84]. Polypeptide: murein lipoprotein. [en línea]. <<http://ecocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=GENE&object=EG12102>>.[citado en 18 de abril de 2014]
- [85]. Optical density. [en línea]. <[https://www.princeton.edu/~achaney/tmve/wiki100k/docs/Optical\\_density.html](https://www.princeton.edu/~achaney/tmve/wiki100k/docs/Optical_density.html)>.[citado en 18 de abril de 2014]
- [86]. LOPEZ C. *Fundamentos y técnicas básicas en biología molecular*. 2011; p.19-24,67-69.
- [87]. Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos. [en línea] <[http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso\\_tb\\_mico\\_bacterias/metodos\\_de\\_secuenciacion\\_de\\_acidos\\_nucleicos.pdf](http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/metodos_de_secuenciacion_de_acidos_nucleicos.pdf)>.[citado en 18 de abril de 2014]
- [88]. OLIVA R, BALLESTA F, ORIOLA J, CLARIA J. *Genética médica*. Publicaciones y ediciones de la universidad de Barcelona. 2004; p.68.
- [89]. SCHEIBYE-ALSING K, HOFFMANN S, FRANKEL A, JENSEN P, STADLER P, MANG Y, GORODKIN J. *Sequence assembly*. *Computational Biology and Chemistry*. 2009; 33, 121-136.
- [90]. STC Production on Human BACs. [en línea] <<http://web.ornl.gov/sci/techresources/meetings/bacpac/>>.[citado en 18 de abril de 2014]
- [91]. BIEL S, BERG D. *Mechanism of IS1 transposition in E. coli: choice between simple insertion and cointegration*. *Genetics*. 1984; 108, 319-330.
- [92]. Polypeptide: IS186/IS421 transposase. [en línea] <<http://ecocyc.org/ECOLI/NEW-IMAGE?type=ENZYME&object=G6083-MONOMER>>.[citado en 18 de abril de 2014]
- [93]. CURTIS H, SCHNEK A. *Biología*. Editorial médica panamericana. 2008; p.256-258.
- [94]. DNA Microarray Technology. [en línea] <<http://www.genome.gov/10000533>>.[citado en 18 de abril de 2014]

- [95]. PEÑA A, ARROYO A, GOMEZ P, IBARGÜEN G. *Bioquímica*. Editorial Limusa. 1988; p.350.
- [96]. Cyanine dyes: Cy3, Cy5 and others. [en línea] <<http://www.genome.gov/10000533>>.[citado en 18 de abril de 2014]
- [97]. Model Org/Non-Human GeneEx Microarrays. [en línea] <[http://www.genomics.agilent.com/en/Gene-Expression-Model-Organism-Non-Human-Microarrays/Model-Org-Non-Human-GeneEx-Microarrays/?cid=AG-PT-135&tabId=AG-PR-1114&callback=datacallback&searchText=E.%20coli%20v2&\\_=1382491615399](http://www.genomics.agilent.com/en/Gene-Expression-Model-Organism-Non-Human-Microarrays/Model-Org-Non-Human-GeneEx-Microarrays/?cid=AG-PT-135&tabId=AG-PR-1114&callback=datacallback&searchText=E.%20coli%20v2&_=1382491615399)>.[citado en 18 de abril de 2014]
- [98]. QUACKENBUSH J. *Microarray data normalization and transformation*. Nature genetics. 2002; 32, 496-501.
- [99]. BREITLING R, ARMENGAUD P, AMTMANN A, HERZYK P. *Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments*. FEBS letters. 2004; 573, 83-92.

## ANEXOS

### Anexo A. Mecanismos de recombinación genética bacteriana.

Figura 9. Mecanismos de recombinación genética bacteriana. Conjugación: (a) Entre "F+" y "F-". (b) Entre "Hfr" y "F-". Transformación: (b) Con fragmentos de ADN lineal. (c) Con plásmidos. Transducción: (d) Lítica. (e) Lisogénica.



Fuente: [6]

## Anexo B. Procedimiento experimental.

Tabla 1. Cepas utilizadas durante el experimento.

Evolución		
Nombre	Abreviatura	Descripción
Hfr-2xSFX+	Hfr	Tiene la habilidad de realizar conjugación. Posee el gen de exclusión superficial. Contiene un marcador de resistencia a la gentamicina. Obtenida de [39]
Hfr-2xSFX-	$\Delta$	Posee la habilidad de realizar conjugación. Carece del gen de exclusión superficial. Contiene un marcador de resistencia la gentamicina. Obtenida de [39]
2xOriT	2xOriT	No posee la habilidad de realizar conjugación. Usada como un control asexual. Obtenida de [39]
BW25113	BW25113	Usada para experimentos de sobreexpresión y delección de genes relacionados con la resistencia osmótica. Obtenida de: <i>Coli Genetic Stock Center, Yale University</i> . [40]
BW25113 /pCA24N	BW25113 /pCA24N	Contiene un marcador de resistencia al cloramfenicol. Es utilizada para el control de conjugación de las cepas Hfr y $\Delta$ durante la evolución. Construida en el proyecto.

Tabla 2. Nomenclatura usada para los cultivos empleados en la evolución.

Cepainicial	Nombre de réplica					
	1	2	3	4	5	6
Hfr	H1	H2	H3	H4	H5	H6
$\Delta$	G1	G2	G3	G4	G5	G6
2xOriT	A1	A2	A3	A4	A5	A6

Tabla 3. Cepas con delección ( $\Delta$ ) de genes.

	Cepa obtenida	Abreviatura	Método de obtención
Una delección	BW25113/ $\Delta$ (nagC)	C	Librería KEIO
	BW25113/ $\Delta$ (nagA)	A	Librería KEIO
	BW25113/ $\Delta$ (proV)	P	Librería KEIO
	BW25113/ $\Delta$ (fimA)	F	Librería KEIO
Dos delecciones	BW25113/ $\Delta$ (nagC) $\Delta$ (fimA)	CF	Transducción con bacteriófago P1
	BW25113/ $\Delta$ (nagC) $\Delta$ (proV)	CP	Transducción con bacteriófago P1
	BW25113/ $\Delta$ (nagA) $\Delta$ (fimA)	AF	Transducción con bacteriófago P1
	BW25113/ $\Delta$ (nagC) $\Delta$ (proV)	AP	Transducción con bacteriófago P1
	BW25113/ $\Delta$ (fimA) $\Delta$ (proV)	FP	Transducción con bacteriófago P1
Tres delecciones	BW25113/ $\Delta$ (nagC) $\Delta$ (fimA) $\Delta$ (proV)	CFP	Transducción con bacteriófago P1
	BW25113/ $\Delta$ (nagA) $\Delta$ (fimA) $\Delta$ (proV)	AFP	Transducción con bacteriófago P1

### **Técnica de crecimiento de cepas en microplatos.**

En la presente técnica se mide la absorbancia o densidad óptica de un cultivo bacteriano líquido con el fin de determinar su curva y velocidad de crecimiento utilizando una fuente [600 nm] y receptor de luz antes y después de la muestra para cuantificar la cantidad de luz absorbida por este. Los datos obtenidos durante el crecimiento del cultivo son utilizados para calcular su velocidad de crecimiento mediante la linearización de la curva de crecimiento en la fase exponencial (ecuación 2).[85]

$$\mu_{vc} = \frac{\ln(OD-0.044)}{t} \text{(Ecuación 2)}$$

Donde  $\mu_{vc}$  es la velocidad de crecimiento en [ $s^{-1}$ ],  $OD$  es la absorbancia y  $t$  el tiempo de crecimiento en [s].

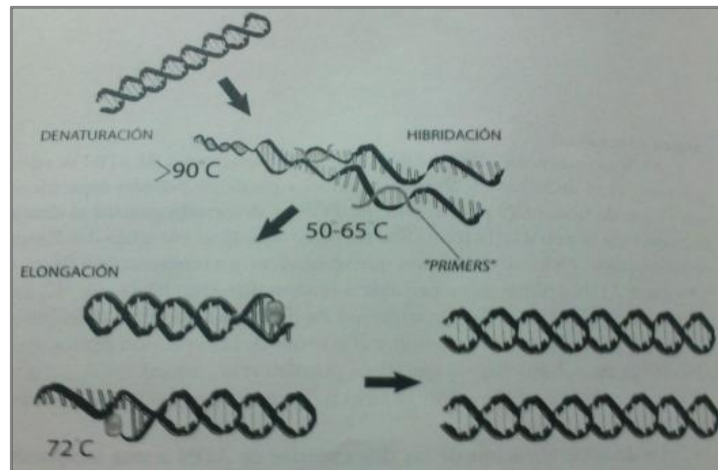
Procedimiento:

Añadir 95  $\mu L$  de medio de cultivo M9 y 5  $\mu L$  de cultivo bacteriano inoculador realizado previamente (durante la noche anterior) a cada canal del microplato (Thermofisherscientific, USA) a utilizar. Posteriormente, introducir las muestras en el "Infinite® 200 PRO multimodereader" (TECAN, Suiza) y utilizar el protocolo de agitado a 37 °C durante la elaboración de la curva de crecimiento. Finalmente, detener el proceso de mezclado e importar los datos recolectados en un archivo .xls para realizar el cálculo de la velocidad de crecimiento con la ecuación 2.

## Técnica de PCR

La PCR es una técnica mediante la cual se pueden amplificar secuencias de ADN como producto de la reacción de elongación a partir de el uso de primers y la enzima ADN polimerasa. Dicha técnica se basa en la repetición de tres procesos, los cuales son descritos e ilustrados a continuación en la **figura 10**.

Figura 10. Etapas del proceso de PCR.



Fuente: [86]

1. La desnaturalización de las dos cadenas de ADN a una temperatura elevada (cerca de 95 [°C]) para producir moléculas de ADN monocatenarias.
2. La hibridación o *annealing* de los *primers* oligonucleóticos complementarios a las secuencias de los extremos del ADN por amplificar (para ello se baja la temperatura hasta valores normalmente comprendidos entre 40 y 65 [°C]).
3. La reacción de elongación a partir de los *primers* usando una enzima ADN polimerasa termoestable.

Posterior a las nombradas tres etapas, los productos de elongación se desnaturalizan de nuevo por calor y se repite el proceso, de manera que en cada

ciclo el número de copias de ADN se duplica, por lo que se obtienen  $2^n$  moléculas después de  $n$  ciclos.

### **Técnica de gel de electroforesis**

La técnica de electroforesis separa fragmentos de ADN en función de su carga eléctrica, tamaño y nivel de enrollamiento, aplicando muestras de este en una matriz de agarosa de tamaño de poro constante y generando un campo eléctrico, el cual permite la migración de tal molécula hacia el polo positivo de la cámara de electroforesis. Se espera que los fragmentos más pequeños y enrollados de ADN migren con menor dificultad a través de la matriz. Por otra parte, es fundamental utilizar bromuro de etidio (lifetechnologies, USA) como marcador químico del ADN y la sustancia conocida como "ADN ladder" (New England Biolabs, UK) para determinar la cantidad y el tamaño de los fragmentos separados.

## Anexo C. Análisis de resultados.

Tabla 4. Mutaciones identificadas con el secuenciamiento genómico. Las mutaciones IS1 [91] junto con IS186 [92] corresponden a transposones [93] que inactivan la función del gen que la presenta.

Cepa	Gen mutado	Tipo de mutación	Función Conocida.
G1	nmpC,essD	PNS	Proteína de membrana exterior (holina)
	cadB	PNS	Producir lisina, transportadora de cadaverina
G2	nagCD	Delección	Metabolismo de amino azúcares
	yhdP	PNS	Desconocida
G3	rpoC	Duplicación	Subunidad de la ARN polimerasa
	treR	PNS	Regulador del nivel de trehalosa
G4	rpoC	Duplicación	Subunidad de la ARN polimerasa
	hisC	PNS	Biosíntesis de histidina
G5	nagCD	Delección	Metabolismo de amino azúcares
G6	mrdA	PNS	Proteína 2 de adherencia a la penicilina
	rpsA	PNS	Proteína ribosomal
	ydjK	PNS	Transportador de una molécula desconocida
A1	nagA	Delección	Producción de N-Acetilglucosamina-6-fosfato deacetilasa
	bcr	PNS	Proteína de eflujo de drogas
	mreB	PNS	Proteína de control del ancho de la célula
A2	nagA	Delección	Producción de N-Acetilglucosamina-6-fosfato deacetilasa
	mreB	PNS	Proteína de control del ancho de la célula
A3	nagA	PNS	Producción de N-Acetilglucosamina-6-fosfato deacetilasa
	proV	IS1	Glicina Betaina, transportador molecular relacionado con tolerancia osmótica
	msrB	PNS	Detención en la reducción del aminoácido metionina
	fimA	IS186	Adhesión fimbrial a la superficie de otras células
A4	nagCD	Delección	Metabolismo de amino azúcares
	proV	IS1	Glicina Betaína, transportador molecular relacionado con tolerancia osmótica
	yejM	Duplicación	Proteína de la membrana celular interna de

		n	función esencial desconocida
A5	nagCD	Delección	Metabolismo de amino azúcares
	mreB	PNS	Proteína de control del ancho de la célula
	fimA	IS186	Adhesión fimbrial a la superficie de otras células
A6	nagC	Inserción	Metabolismo de amino azúcares
	mreB	PNS	Proteína de control del ancho de la célula
	bglB	Delección	Producción de 6-fosfo- $\beta$ -glucosidasa, hidrólisis de enlaces glucosídicos.
	yobD, yebO	PNS	Proteína de membrana celular interior

### Microarreglos

La tecnología de microarreglos sirve para determinar cuáles genes son expresados por un organismo bajo ciertas condiciones definidas[94]. Su funcionamiento puede explicarse en cuatro etapas fundamentales, que son:

La tecnología de microarreglos es utilizada, entre otras cosas, para determinar la diferencia en los niveles de expresión genética de cepas obtenidas como resultado de un experimento de evolución y sus predecesoras. Su funcionamiento puede explicarse en cuatro etapas fundamentales, que son:

1. Realización del procedimiento experimental: Mediante la activación de los genes de la cepa a evolucionada y su predecesor, bajo su exposición a las condiciones deseadas, se procede a realizar el aislamiento del ARNm producido en la mitad de la fase de crecimiento exponencial, convirtiéndolo rápidamente en ADNc con el uso de una enzima de transcripción reversa [95] para evitar su degradación y diferenciándolo con los marcadores químicos Cy5 y Cy3 respectivamente [96] para una fácil detección. Posteriormente, aprovechando el principio de complementariedad de cadenas de ADN, estas son mezcladas e hibridizadas junto con el chip de genes [97], el cual contiene secuencias de oligonucleótidos que representan los genes de interés en el organismo que se desea estudiar.

2. Colección de datos: Una vez hibridizado el ADNc, se procede a la excitación de las moléculas de etiquetado químico Cy3 y Cy5 mediante el uso de láseres monocromáticos de longitud de onda de 532 y 635 [nm] respectivamente, la cual es detectada por espectrofotómetros y superpuesta para crear una imagen compuesta, cuya relación de colores representa el nivel de expresión genética de ambas cepas, siendo el amarillo el radio de expresión genética neutral. Finalmente, dicha información es almacenada para su posterior análisis.

3. Transformación y normalización de datos: Ulterior al almacenamiento de imágenes, estas son procesadas y convertidas a valores numéricos con el objetivo de simplificar la detección de patrones en los niveles de expresión genética mediante el uso del algoritmo de normalización "LOWESS" [45][98].

4. Análisis de significancia estadística de los perfiles de expresión genéticos: Con el fin de establecer la veracidad en los niveles de expresión genética obtenidos experimentalmente se utilizó el método estadístico "rankproducts" para un valor p de 0.1 [99] mediante el uso del programa "TM4 Microarray Software Suite" [46].

Tabla 5. Genes sobreexpresados de interés para la resistencia a la presión osmótica encontrados en las mutantes A2, A4, G2, G3, G5 y G6 mediante el ensayo de microarreglos.

Genes sobreexpresados		
Gen	Función	Cepas
<i>acrZ</i>	Respuesta al estrés de la envoltura celular	A4,G2,G3,G5,G6
<i>ssuD</i>	Aprovechamiento de alcanosulfonatos para crecimiento celular	G2,G3,G5,G6
<i>proV</i>	Subunidad transportadora de glicina betaina	G3,G5
<i>proW</i>	Subunidad transportadora de glicina betaina	A4,G5
<i>proX</i>	Subunidad transportadora de glicina betaina	A4,G3,G5,G6
<i>tnaA</i>	Absorción y metabolismo del triptófano	G2,G3,G5,G6
<i>tnaB</i>	Transportador de triptófano	G2,G4,G6
<i>entC</i>	Isocorismatosintetasa	G3
<i>acs</i>	Acetil-coenzima-A sintetasa	G5,G6
<i>ymdC</i>	Cardiolipinasintetasa	G2
<i>fabF</i>	beta-cetoacil-acp-sintetasa	G6
<i>nagC</i>	Represor del operon NAG	A4,G2
<i>arnC</i>	Proteína de membrana interna, resistencia a	A2,A4

	poliximina	
<i>lpp</i>	Lipoproteína de mureína, síntesis de la pared de peptidoglicano	A2,A4,G2,G3
<i>ompA</i>	Porina A de membrana externa, difusión de solutos hacia la célula.	G2
<i>ompC</i>	Porina C de membrana externa, difusión de solutos hacia la célula.	G2,G3,G5,G6
<i>ompG</i>	Porina G de membrana externa, difusión de solutos hacia la célula.	A2,A4
<i>ompL</i>	Porina L de membrana externa, difusión de solutos hacia la célula.	A2,A4
<i>ompX</i>	Porina X de membrana externa, difusión de solutos hacia la célula.	A2,A4,G3,G5
<i>feoB</i>	Transportador de hierro	G5
<i>fepG</i>	Subunidad transportadora de enterobactina	G5
<i>fiu</i>	Receptor de aprovechamiento de compuestos de hierro	G3
<i>ssuA</i>	Transportador de sulfonatos	G2,G3,G5
<i>ssuC</i>	Transportador de sulfonatos	A2,A4,G2,G3,G6
<i>tauA</i>	Subunidad transportadora de la molécula osmoprotectora taurina	G2,G3
<i>tauB</i>	Subunidad transportadora de la molécula osmoprotectora taurina	G2,G3,G6
<i>tauC</i>	Subunidad transportadora de la molécula osmoprotectora taurina	A4,G2,G3,G5,G6
<i>entE</i>	Síntesis de enterobactina	G3
<i>entF</i>	Síntesis de enterobactina	G3,G5
<i>entH</i>	Síntesis de enterobactina	G3
<i>tauD</i>	Síntesis de la enzima tarina-dioxigenasa	G3,G6
<i>fadM</i>	Tioesterasa de la acil-coenzima-A, oxidación del ácido oléico.	G2,G3,G6
<i>ssuE</i>	Flmanín-mononucleótido reductasa	G2,G3,G5,G6
<i>ydch</i>	Proteína de función desconocida hasta la fecha	G2,G3,G5,G6
<i>yodC</i>	Proteína de función desconocida hasta la fecha	G2,G3,G5,G6
<i>csrA</i>	Regulación del metabolismo de carbono	G2,G3,G5

Tabla 6. Genes represados de interés para la resistencia a la presión osmótica encontrados en las mutantes A2, A4, G2, G3, G5 y G6 mediante el ensayo de microarreglos.

Represados		
Gen	Función	Cepas
<i>yegR</i>	Proteína de función desconocida hasta la fecha	A4,G2,G3,G5,G6
<i>rfaZ</i>	Proteína de biosíntesis de lipopolisacáridos	A2,A4
<i>nagB</i>	Glucosamina-6-fosfatasa deaminasa	A4,G2,G3,G5,G6
<i>nagE</i>	Metabolismo de N-acetil-glucosamina	G2,G3,G5
<i>nagA</i>	N-acetil-glucosamina-6-fosfato diacetilasa	G2,G3
<i>fabD</i>	Malonil-coenzima-A transacilasa	G6
<i>ydeO</i>	Respuesta celular a la resistencia de ácidos	G2,G3,G5,G6
<i>rpoB</i>	Subunidad beta de la ARN polimerasa	A2,A4
<i>rpoC</i>	Subunidad beta prima de la ARN polimerasa	A2,A4
<i>rpoE</i>	Factor 24 sigma de la ARN polimerasa	A2,A4
<i>fimB</i>	Promotor del gen <i>fimA</i> , responsable de la generación de fimbrias celulares	G6
<i>bamC</i>	Biogénesis de lipoproteínas de la membrana celular externa	A2,A4
<i>kdsB</i>	Síntesis de la enzima "3-deoxy-manno-octulosonate cytidilyltransferase"	A2,A4
<i>mltD</i>	Síntesis de una subunidad de transglicosilasa	A2,A4
<i>murC</i>	Síntesis de la enzima alanina-ligasa	A2,A4
<i>murI</i>	Síntesis de glutamato-racemasa	A2,A4
<i>ompF</i>	Síntesis de la porina F de la membrana celular externa	G3,G6
<i>wbb</i>	Proteína de biosíntesis de lipopolisacáridos	A2,A4
<i>acrA</i>	Sistema de eflujo de compuestos químicos	G6
<i>acrE</i>	Proteína de la membrana citoplasmática	G5
<i>amiB</i>	Síntesis de la enzima N-acetilmuramil-L-alanina-amidasa	A4,G2,G3,G5,G6
<i>flgJ</i>	Muromidasa, catálisis de hidrólisis de uniones beta 1,4 de N-acetil-D-glucosamina	G5
<i>fimC</i>	Síntesis de los organelosfimbriales	G5,G6
<i>fimA</i>	Síntesis de los organelosfimbriales	G6
<i>fimD</i>	Síntesis de los organelosfimbriales	G5
<i>fimG</i>	Síntesis de los organelosfimbriales	G5
<i>fimI</i>	Síntesis de los organelosfimbriales	G6
<i>ydeN</i>	Proteína de función desconocida hasta la fecha	A2,A4,G3,G5
<i>fiu</i>	Receptor de aprovechamiento de compuestos de hierro	G2,G6
<i>cirA</i>	Receptor de compuestos de la membrana celular externa, familia de las porinas	G6

<i>efeO</i>	Proteína periplástica involucrada en el transporte de iones de hierro	G6
<i>fecD</i>	Subunidad de la proteína tipo ABC transportadora de compuestos de hierro	G5
<i>fepA</i>	Subunidad transportadora de enterobactina en la membrana celular externa	G6
<i>ydeM</i>	Proteína de función desconocida hasta la fecha	G2,G3,G5
<i>rtcB</i>	Proteína de función desconocida hasta la fecha	G3,G5,G6

Figura 11. Número de genes sobreexpresados (a) y represados (b) comúnmente entre las cepas mutantes.

	<b>SE</b>	A2	A4	G2	G3	G5	G6
(a)	A2	143	93	7	11	6	2
	A4	93	148	13	16	8	9
	G2	7	13	79	31	22	26
	G3	11	16	31	91	32	30
	G5	6	8	22	32	88	26
	G6	2	9	26	30	26	100
(b)	<b>RE</b>	A2	A4	G2	G3	G5	G6
	A2	149	97	0	3	1	3
	A4	97	148	4	9	3	6
	G2	0	4	55	11	9	3
	G3	3	9	11	72	16	14
	G5	1	3	9	16	121	12
G6	3	6	3	14	12	99	