

“Detección y estudio de plásmidos en muestras de sedimento/suelo de diferentes sitios del continente antártico”



Matías Giménez Martínez

Tutor: Dra. Silvia Batista

Cotutor: Dr. Héctor Romero

Unidad de Microbiología Molecular- Departamento de Bioquímica y Genómica
Microbiana

IIBCE

12 de diciembre de 2016

Agradecimientos

Quiero agradecer y dedicar este trabajo a todos los que me apoyaron en la realización del mismo y en la culminación de la licenciatura.

En primer lugar a toda mi familia y amigos de la vida que me dan para adelante en todo momento y de manera incondicional.

A todos los compañeros del departamento que me enseñaron y apoyaron (en el acierto y en el error) durante estos dos años.

A Silvia, Vero, yuyo y Gastón de quienes aprendí mucho.

A Magui por bancarme en todo el camino.

A Maru, Lula y Simao.

A los Microfagos.

A lo chamucos que me ayudaron con las muestras y con las costumbres antárticas.

A todos los que preguntaron “cómo vas con la tesis?”

Acá va...

RESUMEN

La transferencia horizontal de genes es un proceso reconocido por su aporte a la innovación y evolución del genoma bacteriano. Los plásmidos son elementos genéticos que participan activamente en la transferencia de genes, principalmente a través de la conjugación. El continente antártico constituye un ambiente extremo en el cual la microbiota ha evolucionado por mucho tiempo en ausencia del ser humano. Actualmente la península Fildes constituye el sitio de mayor densidad de bases, lo cual conlleva a un impacto de la actividad humana en el ambiente. La presencia de plásmidos en estos sedimentos puede ser una fuerza que guía la adaptación a este cambio ambiental.

Se utilizaron muestras de sedimentos con diferentes características dentro de la península Fildes para detectar la presencia de plásmidos a través de la búsqueda de genes que regulan su replicación. A través de estos mismos genes se los clasificó en grupos de incompatibilidad. Además se vincularon los mismos a las características fenotípicas que generaban. Complementariamente se utilizaron metagenomas de diferentes sitios del continente antártico para la búsqueda y clasificación de replicones. En este caso se utilizaron los genes de las replicasas para detectar la presencia de plásmidos y clasificarlos.

Se logró detectar a través de técnicas de biología molecular la presencia de replicones del grupo IncW en una muestra tomada en las cercanías de la Base Artigas. A partir de la misma muestra se logró capturar y secuenciar un plásmido de tipo ColE1 que aún no había sido secuenciado. Por último, se logró detectar y clasificar plásmidos en los distintos metagenomas trabajados. En el caso de los replicones del grupo IncP-9 se realizó un estudio filogenético de las replicasas detectadas.

Palabras clave: Transferencia horizontal de genes, plásmidos, grupo de incompatibilidad, replicasas, IncP-9.

Tabla de contenidos

Agradecimientos	1
RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Transferencia horizontal de genes.....	5
1.1.1 Conjugación.....	6
1.2 Plásmidos	7
1.2.1 Clasificación de plásmidos	8
1.2.3 Replicación en plásmidos con iterones.....	11
1.3 Adaptación de la microbiota antártica al cambio ambiental.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Toma de muestras	16
3.2 Condiciones de cultivo	17
3.3 Técnicas de Biología Molecular.....	18
3.3.1 Extracción de ADN ambiental total.....	18
3.3.2 Extracción de ADN plasmídico	19
3.3.3 Reacción de PCR.....	20
3.3.4 Purificación de fragmentos de ADN.....	21
3.3.5 Construcción de bibliotecas de amplicones.....	22
3.3.6 Protocolo de transformación química	22
3.3.7 Incorporación de ADN plasmídico por electroporación	24
3.3.7 Secuenciación y análisis de secuencias de ADN.....	25
3.4 Búsqueda y clasificación de replicones en metagenomas.....	26
4. RESULTADOS	28
4.1 Extracciones de ADN ambiental total	28
4.2 Replicon Typing.....	29
4.3 Replicon typing dependiente de cultivo	31
4.5 Aislamiento y secuenciación de plásmidos.....	33
4.6 Búsqueda y clasificación de replicones en metagenomas.....	37
5. DISCUSIÓN	41
6. CONCLUSIONES	46
7. BIBLIOGRAFÍA.....	47
8. ANEXO	51

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Transferencia horizontal de genes

La transferencia horizontal de genes (THG) entre bacterias engloba al conjunto de procesos a través de los cuales dos células son capaces de transferir material genético entre sí. Las bacterias logran intercambiar su información genética a través de diferentes formas. Entre estas se destacan la transformación, transducción y conjugación ¹. Recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo denominado *gene transfer agents*, el cual deriva de profagos que han perdido la capacidad de reconocer su material genético. En todos estos mecanismos existe un organismo dador y otro aceptor de la información genética compartida ².

Los procesos de transferencia horizontal no afectan a todo el genoma de la misma manera, se ha observado que hay una diferencia en la función de los genes que se transfieren de esta forma. Existe una mayor transferencia de genes *housekeeping* (operacionales) respecto a los genes que están involucrados en la regulación de la replicación, transcripción y traducción (informativos), esto puede ser explicado por la hipótesis de la complejidad. A diferencia de los genes informativos, los genes operacionales pueden generar una molécula funcional a través de un menor número de interacciones con otros productos génicos. Esto redundaría en que la probabilidad de funcionalidad de los genes operacionales transferidos horizontalmente sea mucho mayor a la de los informativos ³.

A pesar de las dificultades metodológicas que presenta la identificación de genes que han sido transferidos de manera horizontal, se ha observado que parte importante del genoma de muchos procariontes ha sido adquirido a través de este tipo de procesos ⁴. Estas observaciones han sido posibles por la disponibilidad de genomas completamente secuenciados y ha puesto en tela de juicio la representación de la evolución a través de árboles filogenéticos que no tienen en cuenta el intercambio de genes entre organismos ⁵.

La contribución a la innovación genética y a la evolución que genera la THG es ampliamente reconocida. Los organismos procariontes tienen reproducción asexual, por lo que la THG es primordial para intercambiar información genética. A su vez, este proceso cuenta con la ventaja de no estar restringido a microorganismos de una misma especie o cercanamente emparentados, por lo cual se amplía la diversidad de material genético que puede ser intercambiado.

Una herramienta fundamental para que la THG genere un cambio efectivo en el genoma de un microorganismo es el moviloma. Este concepto incluye a todos los elementos genéticos que se pueden mover de forma intra o inter-genómica. Dentro de estos se pueden encontrar transposones, plásmidos y bacteriófagos, entre otros. Esta maquinaria molecular genera cierta fluidez entre los genes que se encuentran en elementos genéticos y que pueden ser transferidos a otros organismos. Pero también genera la capacidad de intercambio de genes entre el cromosoma de la bacteria y aquellos elementos que son transferibles, como los plásmidos ⁶.

1.1.1 Conjugación

La conjugación es uno de los procesos a través de los cuales se transfiere información genética entre dos células procariotas. Este mecanismo, a diferencia de otros, necesita de un contacto físico entre las células donadoras y receptoras. Esto permite la formación de un canal de conjugación entre las paredes de ambas células, a través del cual ocurre la transferencia. El material genético compartido se encuentra en forma de plásmido, uno de los elementos genéticos móviles que se discutirán en profundidad más adelante. Para que ocurra la conjugación es necesario que se encuentren y expresen ciertos genes que codifican para las proteínas que llevan a cabo este proceso. Los plásmidos conjugativos cuentan con dos sets de genes fundamentales en este aspecto: *dtr* contiene los genes que se encargan del procesamiento del ADN plasmídico pre y post transferencia y *Mpf*, el cual tiene los genes de formación del sistema de secreción tipo IV que representa el canal de conjugación a través del cual pasa el ADN. También existen plásmidos que se denominan movilizables, que cuentan únicamente con el set de procesamiento del ADN. Estos replicones necesitan de la presencia de otros plásmidos conjugativos para poder ser transferidos, ya que utilizan el canal de conjugación formado por otros plásmidos⁷. El reconocimiento de un nuevo hospedero se da por interacción de sus lípidos y proteínas de membrana con el pili de conjugación del organismo donador ⁸.

Se cree que cuantitativamente la conjugación es el mecanismo más importante de transferencia horizontal de genes en los suelos. Además, este proceso es capaz de generar un intercambio entre células muy distantes desde el punto de vista filogenético, lo cual es una gran fuente de generación de diversidad genética.

1.2 Plásmidos

Los plásmidos son elementos genéticos extracromosomales que se replican de manera autónoma. Estos elementos son claves en la adaptación de bacterias a ambientes cambiantes, ya que se ha visto que muchos de ellos contienen genes que confieren ventajas adaptativas, como la resistencia a antibióticos y a metales pesados o la capacidad de degradar compuestos xenobióticos.

Los plásmidos se replican de manera autónoma, independientemente del cromosoma y del ciclo celular. Debido a esto, necesitan de genes que controlen su replicación y en este sentido se conocen sistemas de replicación muy diversos y con características diferentes. En este trabajo nos centraremos en los plásmidos que utilizan secuencias repetidas denominadas iterones y codifican para su propia proteína iniciadora de la replicación.

Además de los sistemas de replicación, muchos plásmidos contienen módulos de genes que controlan la cantidad de copias del replicón dentro de la célula. Este sistema aparece ligado a la regulación de la replicación, ya que actúa reprimiendo este proceso y se activa en la medida que el plásmido alcanza una concentración intracelular determinada. En los plásmidos con iterones se cree que una forma de regular negativamente el inicio de la replicación es a través de la interacción de los orígenes de replicación de diferentes copias del plásmido unidos a sus proteínas iniciadoras de la replicación. La formación de estos complejos no permitiría la continuación de la replicación. Este mecanismo se denomina *handcuffing* y la chance de que suceda aumenta cuando aumenta el número de copias del plásmido dentro de la célula. Es por ello que se piensa que es un mecanismo de control del número de copias^{9,10}.

Por otra parte, una vez que un plásmido se ha establecido en una célula, puede disponer de sistemas que tienen como fin la herencia estable de ese replicón en dicha línea celular. Es importante destacar la diversidad que pueden presentar estos sistemas, los cuales varían con las características del replicón. Por ejemplo, en plásmidos de alto peso molecular que generalmente se encuentran en un bajo número de copias, es necesario asegurar que por lo menos una de estas copias sea transferida a cada célula hija en cada ronda de división celular. Para esto, se expresan los denominados sistemas de partición. Las proteínas del sistema de partición se unen a sitios parecidos a centrómeros que actúan en *cis* en el plásmido y a zonas de la membrana celular de cada célula hija, generando una correcta segregación¹¹. Estos sistemas de partición cumplen una función similar a los sistemas de adicción, aunque su mecanismo de acción es diferente. Los sistemas de adicción

generan una toxina que es estable y una antitoxina. Esta última puede ser un contra-transcripto de ARN, que se une al ARNm de la toxina impidiendo su traducción u otra proteína con alta especificidad por la toxina diana, uniéndose a ella. Ambos tipos de antitoxinas son más lábiles que su toxina diana. Es por esto que cuando una célula se divide y pierde los genes de este sistema, la antitoxina se degradará más rápido que la toxina. Así, esta última podrá actuar perjudicando el metabolismo celular ¹². La mayoría de estos sistemas tienen un efecto bacteriostático sobre la célula, lo cual perjudica su competencia por nutrientes. Esto tiene como consecuencia que aquellas células que pierden este tipo de plásmidos se encuentren en menor proporción dentro de una población que las que conservan el plásmido. Por último, se ha visto que estos sistemas se pueden encontrar en cromosomas pero aún se desconoce la función que cumplen en ese caso ¹³.

1.2.1 Clasificación de plásmidos

La creación de un sistema de clasificación de plásmidos surge a partir de la necesidad de sistematizar el estudio de este tipo de elementos genéticos. Como se ha visto, los plásmidos son fundamentales en la evolución de bacterias, por lo cual su caracterización y clasificación es de gran importancia. La primera forma de clasificación de plásmidos fue introducida en la década del '60 y se basó en características generales como el tamaño, la capacidad de ser transferido, espectro de hospedero y maquinaria de replicación. También se consideraban las características fenotípicas y funcionales generadas por la expresión de los genes portados por el replicón.

Sin embargo, a medida que se fueron describiendo una mayor cantidad de plásmidos se observó que estas características no evidenciaban ningún tipo de origen evolutivo en común y la clasificación podía ser confusa. De esta manera, Richard P. Novick propuso la clasificación en grupos de incompatibilidad, basados en el hallazgo de que dos plásmidos con los mismos elementos reguladores de la replicación no podían mantenerse de manera estable en una misma línea celular. Además, se observó que la presencia de las mismas secuencias reguladoras en plásmidos diferentes denotaba un origen evolutivo en común. Las bases moleculares del fenómeno de incompatibilidad han sido extensamente estudiadas y se detallan más adelante ¹⁴.

Con la introducción de técnicas de secuenciación, la clasificación de plásmidos ha tomado nuevos rumbos. Un ejemplo de esto es la caracterización de replicones basada en la secuencia de las proteínas iniciadoras de la replicación ¹⁵. Cada grupo se define como Rep y un número subíndice que indica de manera arbitraria la familia a la que pertenece esta proteína y por ende el plásmido

involucrado. Sin embargo, esta forma de clasificación se ha podido aplicar sólo a plásmidos secuenciados y que presentan replicasas¹⁶.

Por último, también se ha utilizado la diversidad de sistemas de movilización (MOB) para clasificar plásmidos en diferentes grupos bacterianos. Esta caracterización, también dependiente de la técnica de PCR, se basa en la diversidad de relaxasas que poseen los plásmidos conjugativos y movilizables. De todas formas, existe el problema de clasificar plásmidos con relaxasas nuevas y además quedan por fuera aquellos replicones que no son conjugativos ni movilizables.¹⁷

1.2.2 Incompatibilidad entre plásmidos

La incompatibilidad ha sido definida como la incapacidad de dos plásmidos de ser heredados en la misma línea celular en ausencia de una presión selectiva para ambos. Como se ha visto, los plásmidos se heredan de manera estable y con un número de copias característico que depende de la regulación del inicio de la replicación y de las características del replicón. Se ha demostrado que la incompatibilidad se puede deber a que los plásmidos co-residentes comparten uno o más elementos del sistema de control de la replicación o del sistema de control de la partición. En estas condiciones, dichos plásmidos son incapaces de corregir fluctuaciones en su número de copias, lo cual llevaría a la pérdida de uno de los mismos¹⁸. En términos probabilísticos, aquellos plásmidos que tienen mayor número de copias suelen desplazar a los que se presentan en menor número dentro de la célula. La incompatibilidad entre plásmidos ha sido utilizada para clasificar estos elementos ya que es una consecuencia del parentesco evolutivo de dos replicones.

Históricamente, se han observado algunos fenómenos que han sido atribuidos a la incompatibilidad entre plásmidos y a través de esto diferentes investigadores han propuesto explicaciones de las bases moleculares que gobiernan los mecanismos de incompatibilidad. Un ejemplo de estas observaciones es la inhabilidad que presentan los plásmidos F de *Escherichia coli* de establecerse en una cepa Hfr. La explicación de este comportamiento se basa en el modelo de represión de la replicación. El sistema de control del número de copias, que comparten ambos plásmidos, es incapaz de diferenciarlos y los detecta como si fueran el mismo, esto genera que se reprima la replicación de ambos, aunque uno de ellos se encuentre en muy bajo número dentro de la célula. Por esto resulta imposible que el plásmido F aumente su número de copias y se establezca correctamente en la célula.⁷⁰

También se ha visto que al ser introducido un plásmido incompatible en una cepa hospedera que ya posee un plásmido residente, se puede dar un retraso en la replicación del plásmido introducido por

varias generaciones. Sin embargo, luego de algunas generaciones puede comenzar la replicación en cepas que aún cuentan con ambos plásmidos. Esto se explica también por la inhibición de la replicación por el sistema de control del número de copias⁷¹. Si se tiene en cuenta que el plásmido introducido se encuentra en mucha menor proporción que el residente, es entendible que la probabilidad de que se replique en las primeras divisiones es muy baja (dependiendo del número de copias del plásmido residente). La probabilidad de que el plásmido introducido se replique aumenta a medida que se suceden las rondas de replicación, ya que el número de copias del plásmido residente disminuye temporalmente luego de cada división celular.

En trabajos posteriores se logró comprobar que no sólo el sistema de control del número de copias a través de la regulación negativa es un determinante de incompatibilidad. También, cuando la replicación depende de un factor en *trans*, como lo son las proteínas iniciadoras de la replicación (Rep), la presencia de dos plásmidos que compartan el pool de este factor genera incompatibilidad entre ellos. Cuando hay fluctuaciones en el número de copias, el replicón que se encuentra en menor número tiende a producir mayor cantidad de su proteína iniciadora para corregir esta fluctuación. Sin embargo, al actuar en *trans*, es muy probable que esta proteína tenga también efecto en el otro replicón presente en la célula, aumentando su número de copias en lugar de la del plásmido que la produce¹⁹.

Por último, también se ha visto que en el caso de dos plásmidos homólogos incompatibles, cuya única diferencia se encuentra en un gen de resistencia, cuando se selecciona a favor del gen de resistencia del plásmido desafiante, el plásmido residente se pierde. Sin embargo, esto no puede ser explicado por la regulación de la replicación, ya que afectaría a ambos plásmidos por igual. Por esto, se generó la hipótesis de que el sistema que se ve implicado como determinante de incompatibilidad es el de partición, el cual se encarga de que por lo menos una copia de cada plásmido sea segregado a cada célula hija. En la situación descrita, el sistema de partición no podría diferenciar entre replicones del mismo grupo de incompatibilidad, por lo cual de manera azarosa se puede perder cualquiera de los dos plásmidos homólogos. En este caso particular se perderá aquel que no está siendo seleccionado²⁰. Más tarde se obtuvieron algunos resultados a favor de esta hipótesis. Para probarlo, Austin y Nordstrom (1990)²¹ diseñaron plásmidos con elementos de control de replicación diferentes entre sí pero con los mismos sistemas de regulación de la partición. Estas construcciones eran incompatibles.

El test de incompatibilidad consiste en introducir el plásmido que se desea testear en diferentes cepas de referencia que tienen plásmidos de grupos de incompatibilidad ya conocidos. Luego, a través de marcadores moleculares, se monitorea la permanencia del plásmido introducido

(denominado desafiante) y del de referencia, observando si existe algún tipo de desplazamiento de un plásmido por el otro. En caso de que se diera la herencia inestable de alguno de los dos replicones, se logra identificar al grupo de incompatibilidad del plásmido en cuestión. Sin embargo, esta técnica tiene algunos inconvenientes. Existen plásmidos que no son transferibles por los métodos más conocidos, lo cual dificulta la entrada del plásmido a testear y muchas veces puede ser difícil de diferenciar con la incompatibilidad ²². Además, algunos plásmidos no cuentan con marcadores moleculares adecuados, haciéndose difícil observar su segregación.

Por estas razones, algunos equipos de investigadores han intentado cambiar la metodología a través de la cual se clasifica los distintos replicones. Hoy en día, debido a la gran disponibilidad de secuencias nucleotídicas y al trabajo de clasificación previo de algunos autores, se han logrado identificar secuencias conservadas y específicas de replicones de diferentes grupos de incompatibilidad ²³. A partir de esto se pueden generar sondas que hibriden con estas secuencias, logrando de una forma menos trabajosa y más repetible, la clasificación de replicones. La técnica de clasificación más utilizada en la actualidad se denomina *PCR based replicon typing* y se basa en el uso de cebadores que tienen como objetivo las secuencias determinantes de incompatibilidad de cada grupo. Estos cebadores se utilizan para amplificar las regiones conservadas mediante PCR para luego caracterizar dichas secuencias, ya sea por hibridación con sondas o secuenciación ^{24, 25, 26}.

Con el advenimiento de técnicas de secuenciación masiva se han diseñado nuevas estrategias para el estudio de plásmidos. La ventaja de éstas es que son independientes de cultivo, por lo cual se puede obtener un pantallazo más cercano a la realidad del ambiente que se estudia. De todas formas, la secuenciación y el estudio del metagenoma plasmídico de una muestra es una estrategia nueva que presenta dificultades prácticas, ya que se debe separar el ADN cromosómico del plasmídico. Los trabajos publicados que utilizan este tipo de estrategia son recientes y han demostrado que es muy poco lo que se sabe respecto a la incidencia que pueden llegar a tener los plásmidos en una comunidad. De hecho, se ha observado en metagenomas plasmídicos obtenidos de muestras de plantas de tratamientos de efluentes, que sólo el 18% de las proteínas predichas pudieron ser asignadas a secuencias aminoacídicas anotadas en GenBank con al menos 80% de identidad ²⁷.

1.2.3 Replicación en plásmidos con iterones

El origen de replicación de los plásmidos que contienen iterones está formado por diferentes elementos. Los iterones son secuencias repetidas que varían en tamaño y número para cada grupo de incompatibilidad ^{28, 29}. La función de estas regiones es actuar como sitios de unión para las

proteínas iniciadoras de la replicación, también denominadas replicasas (Rep). Estas deben formar un complejo ADN-proteína como paso inicial del proceso. En este sentido, se ha observado que es muy importante la secuencia de los iterones, ya que mutaciones puntuales pueden alterar la estabilidad del complejo e inhibir la replicación del plásmido ³⁰. También se ha observado que la información posicional de estas secuencias es fundamental para la formación del complejo iniciador de la replicación. Tanto el espaciamiento entre iterones como su posición relativa a otros elementos génicos han demostrado ser claves para que ocurra la duplicación del ADN ^{31, 32}.

La función del complejo que forma la proteína Rep al unirse a los iterones es la de desestabilizar la doble hebra, permitiendo el acceso a la maquinaria de replicación. La secuencia que se desestabiliza en primera instancia corresponde a un segmento rico en A-T, que puede diferir entre plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad. La replicasa no es la única proteína que actúa al inicio de la replicación, sino que además recluta otras proteínas que actúan directamente sobre el plásmido. Las DnaA son el ejemplo más común de este tipo de proteínas, cuyos genes están ubicados en el cromosoma del organismo hospedero y que también actúan en la replicación de este tipo de plásmidos. Son reclutadas por las proteínas Rep y se unen a regiones presentes en el origen de replicación, denominadas *DnaA-boxes* ^{33, 34}. Estos elementos tienen secuencias de alrededor de 9 pares de bases que varían levemente entre plásmidos. También se ha observado que estos elementos son imprescindibles para la estabilidad de este tipo de replicones en diferentes hospederos. Incluso se ha probado que diferentes hospederos utilizan distintas repeticiones de las secuencias *DnaA-boxes* para la replicación de un plásmido ³⁵.

1.2.3.1 Proteínas Rep

Los genes que codifican para estas proteínas se encuentran localizados en los plásmidos y son los encargados de regular el inicio de su replicación. Sólo los monómeros son capaces de activar la replicación, cuando ocupan por completo los iterones presentes en el origen de replicación ³⁶. Se ha observado también que la unión de monómeros a los iterones ocurre de manera cooperativa, lo cual desencadena la formación del complejo activador de la replicación ³⁷.

El estudio de la estructura de las replicasas no ha sido fácil debido a su inestabilidad, por lo cual se han utilizado modelos predictivos a partir de la información de las secuencias codificantes de estos genes. La estructura de la proteína Rep del plásmido pPS10 posee dos dominios de tipo *Winged-*

Helix. Estos dominios contienen hélices de unión a ADN. A pesar de las diferencias de secuencia que presentan este tipo de proteínas en plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad, la estructura terciaria de las mismas parece ser conservada de la misma manera que su función ³⁸.

Además, como se mencionó anteriormente, esta proteína está involucrada en el mantenimiento del número de copias en este tipo de replicones. La unión de dímeros de Rep a plásmidos, a través de sus iterones, puede tener lugar pero no activa el proceso de replicación. Esto ocurre únicamente cuando se une en forma de monómeros. Por ello, se cree que la unión de dímeros es una forma de regular negativamente la replicación cuando los niveles de proteína Rep son altos ^{39, 40}. También se ha visto que los dímeros se pueden unir a secuencias que se solapan con el promotor del gen *rep*, inhibiendo su expresión. Este proceso se denomina autoregulación y genera un impedimento estérico para el acceso de la ARN polimerasa. En este caso, el control del número de copias se efectúa bajando las concentraciones celulares de Rep ⁴¹.

1.3 Adaptación de la microbiota antártica al cambio ambiental

La diversidad microbiana en el ambiente antártico ha sido un tema de gran interés en la investigación antártica. En un principio se pensaba que estos suelos presentaban muy baja abundancia y diversidad de microorganismos. Esto se debía a la observación de las características ambientales y fisicoquímicas de los suelos: bajas temperaturas, baja disponibilidad de nutrientes y amplia cobertura de hielo. Sin embargo, hoy se sabe que estos sitios no han escapado de la colonización de organismos procariontes. Además, según estudios recientes no han sido unas pocas especies las que han logrado establecerse en este continente, sino que la diversidad de microorganismos en ecosistemas antárticos es mucho más importante de lo que se presumía ⁴². Se ha observado que, al igual que la diversidad en ambientes templados, ésta disminuye con el aumento de la latitud, aunque también afectan algunos factores locales como la vegetación del sitio ⁴³.

En un momento el continente antártico era de gran interés científico porque representaba un sitio aislado de la presencia del ser humano y que era considerado prístino. Esto se ha intentado resguardar a través de la creación de Zonas Antárticas Especialmente Protegidas (ZAEP). Estas se definen y establecen en el anexo V del Protocolo del Tratado Antártico, documento que rige la convivencia en dicho continente (<http://www.ats.aq/e/ep.htm>). El acceso a estas zonas es restringido y solamente se puede ingresar con permisos expedidos por las autoridades competentes.

De todas formas, el impacto ambiental que genera la presencia humana no ha podido ser evitado. Desde el punto de vista microbiológico el hombre actúa como un vector trasladando bacterias que componen su microbiota y liberándolas en el ambiente antártico. Un ejemplo claro de esto se puede observar en el trabajo de Hernández et al. (2012), quienes aislaron *E. coli* viables de origen humano en muestras de suelo de la isla Rey Jorge. Se pudo rastrear el origen de estos aislamientos, debido a que los que provenían de aves antárticas, por ejemplo, y que no habrían tenido contacto con el humano presentaban gran susceptibilidad a antibióticos. Sin embargo, aquellos aislamientos provenientes del ser humano presentaban un perfil de resistencia mucho mayor^{44,45}. Además, en muestras tomadas de sitios cercanos a los trabajos anteriores se han encontrado elementos genéticos móviles que confieren resistencia a antibióticos y que se encuentran altamente vinculados a ambientes clínicos⁴⁶.

La Península Fildes en la Isla Rey Jorge es la zona antártica con mayor densidad de bases científicas, esto supone un impacto importante al ambiente⁴⁷. Debido a esto podría ser un sitio adecuado para el estudio del impacto humano sobre la microbiota antártica. Esta interacción se puede dar de diferentes maneras. Una forma es a través del impacto sobre el ambiente en sí, lo cual tiene un efecto en las poblaciones microbianas del sitio⁴⁸. Otra sería a través de la introducción de cepas no nativas. Podría ser difícil que los microorganismos asociados a la actividad humana se establezcan como poblaciones en el ambiente antártico, sobre todo porque comúnmente se trata de microorganismos mesófilos. Sin embargo, existen algunos trabajos que discuten la posibilidad de eventos de transferencia horizontal en estos ambientes y sus posibles implicancias cuando se da entre microorganismos nativos y no nativos⁴⁹.

Los plásmidos podrían tener un rol crucial en la adaptación de la microbiota nativa al cambio ambiental que supone la presencia del ser humano en el continente Antártico. De hecho, en algunos casos se ha logrado correlacionar el aumento en ciertos grupos de plásmidos con el impacto generado por el vertido de desechos al ambiente⁵⁰. El estudio de plásmidos en ecosistemas antárticos no ha sido muy amplio⁵¹ y se desconoce el rol que pueden llegar a tener frente al cambio que supone la presencia del ser humano en este sitio.

2. OBJETIVOS

- 1- Detectar la presencia de plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncN, IncQ, IncW, IncP-1 α e IncP-9 en muestras de sedimento/suelo de diferentes sitios del continente antártico a través de diferentes aproximaciones dependientes e independientes de cultivo.
- 2- Vincular los plásmidos detectados con caracteres fenotípicos transferibles de manera horizontal como la resistencia a los antibióticos kanamicina, ampicilina y ácido nalidíxico.
- 3- Detectar y clasificar plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncN, IncQ, IncW, IncP-1 α e IncP-9, en metagenomas obtenidos de diferentes sitios del continente antártico.
- 4- Clasificar los plásmidos del grupo IncP-9 obtenidos en base a la secuencia de su proteína Rep.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Toma de muestras

La toma de muestras se realizó durante la campaña de mayo 2015, organizada por el Instituto Antártico Uruguayo. Se visitaron diferentes sitios de la península Fildes, tomando muestras de zonas que presentaban sedimentos/suelo con características diversas. Se colectaron muestras de aquellos sitios que presumiblemente hubiesen estado expuestos a diferentes grados de influencia antrópica y animal. Se determinaron las coordenadas geográficas de los mismos y debido a las limitaciones de los instrumentos disponibles, se determinó la temperatura y pH de las muestras de sedimento sumergidas en agua de cañadas y charcos. Las muestras utilizadas en este trabajo se detallan en la tabla 1 y los sitios de donde fueron colectadas se muestran en la figura 1.



Fig. 1. Sitios de muestreo en Península Fildes, Isla rey Jorge Antártida Marítima.

Tabla1. Localización de sitios de muestreo en la Península Fildes.

Sitio	Nombre	Coordenadas
Isla Ardley	I.A.	S 62° 12' 35,78'' W 58° 55' 41,83''
Playa del Mar Drake	P.D.	S 62° 09' 03'' W 58° 56' 27''
Half Three Point	H.T.P.	S 62° 13' 37,07'' W 58° 57' 8,93''
Caleta Norma	C.N.	S 62° 11' 30,72'' W 58° 55' 3,85''
Tanques Rusos	T.R.	S 62° 11' 38,32'' W 58° 56' 15,6''
Cámara Séptica BCAA	C.S.	S 62° 11' 05,5'' W 58° 54' 15,8''

3.2 Condiciones de cultivo

Para las metodologías dependientes de cultivo se usó medio R2A y LB (Luria Bertani) (ver anexo). Para ello, se incubaron una serie de matraces con 25 mL de medio R2A y caldo LB a 4°C y 25°C, inoculados con 1 gramo de cada una de las muestras. Se usaron estos medios de cultivo para tratar de favorecer el crecimiento de diferentes comunidades. Las muestras incubadas a 25°C se mantuvieron durante 48 hs. y las de 4°C se incubaron por 96 hs. A su vez, a los matraces con ambos medios e incubados a ambas temperaturas se les agregó 3 antibióticos distintos: ampicilina (amp), kanamicina (km) y ácido nalidíxico (nal). Las concentraciones finales de los antibióticos en los medios de cultivo fueron: 50 µg/mL de ampicilina y kanamicina y 20 µg/mL de ácido nalidíxico. Esto determinó que se ensayaran 12 condiciones de cultivo diferentes para cada muestra. Luego del tiempo de incubación indicado se tomaron 5 mL de sobrenadante para extraer el ADN plasmídico.

3.3 Técnicas de Biología Molecular

3.3.1 Extracción de ADN ambiental total

A partir de las muestras obtenidas se realizaron extracciones de ADN total ambiental. Estas fueron utilizadas posteriormente para detectar la presencia de plásmidos a través de diferentes métodos, tanto dependientes como independientes del cultivo.

Las extracciones de ADN fueron llevadas a cabo con un kit comercial y con el método de separación de fases con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. El kit utilizado fue ZR soil Microbe DNA miniprep de Zymo Research™ (California, EEUU). Al utilizar este kit se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante, comenzando con un paso de lisis mecánica en el cual la muestra de suelo se agita con partículas que rompen las células. Las mismas se encuentran en suspensión en un *buffer* de lisis que contiene detergentes, que contribuyen a la ruptura celular. Luego de esto se utiliza una columna a la que se adhiere el ADN, se lava y por último se eluye en *buffer* TE. Uno de los cometidos importantes de los pasos de lavado es la eliminación de posibles inhibidores de reacciones enzimáticas, como lo son las sustancias húmicas, presentes en suelos en diferentes concentraciones.

En cuanto al método de extracción por separación de fases, se utilizó el protocolo propuesto por Griffiths *et al* ⁵². El mismo también consiste en la lisis mecánica y química de las células y además la purificación de los ácidos nucleicos se hace a través de sucesivas extracciones con solventes inmiscibles, separándose en distintas fases. Para esto se colocó 1,0 gr de muestra de sedimento/suelo en un tubo Corex® junto con un volumen igual de cuentas de zircornio (0,1 mm zircornia/silicabeads, BioSpecProducts, Inc.) en presencia de 0.5 ml de *buffer* de extracción (CTAB 5% w/v, NaCl 0.35 M en *buffer* fosfato de potasio 200 mM, pH=8,0), 1 mL de *buffer* TE “alto” (Tris HCl 100 mM, EDTA 100 mM, pH=8,0) y 0,5 mL de una mezcla de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico en proporciones 25:24:1.

Las células se lisaron durante 3 minutos en vortex con adaptador y luego los tubos se centrifugaron a 8×10^3 r.p.m durante 10 minutos a temperatura ambiente para lograr la separación de fases. Luego se transfirió la fase acuosa (superior) a otro tubo Corex®. En éste, se realizó una nueva separación de fases con igual volumen de la mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico y posterior centrifugación a 8×10^3 r.p.m. De esta manera se buscó eliminar el fenol remanente de la extracción anterior y extraer los ácidos nucleicos de manera más pura. La fase acuosa fue nuevamente transferida a un tubo Corex®. Los ácidos nucleicos totales fueron precipitados por agregado de igual volumen de una solución de polietilenglicol (PEG 8000 30% en solución acuosa de NaCl 1,6M) e incubación a -20°C

overnight. A continuación se centrifugó a 10×10^3 r.p.m durante 30 minutos a 4°C , descartándose el sobrenadante. Se lavó el *pellet* con etanol 70% v/v frío y se secó en un rotaevaporador SpeedVac Centrivap®, Labconco (Missouri, EEUU).

Se resuspendió el pellet en 50 μL de agua ultrapura (miliQ, marca) y se dejó reposar por una hora a temperatura ambiente de forma de favorecer la hidratación de los ácidos nucleicos. Al cabo de este tiempo se agregó un volumen de 2 μL de RNAasa 1 mg/mL y se incubó a 37°C por 15 minutos. La calidad y cantidad de ADN extraído con ambas metodologías fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa 0,9 % en buffer TAE 1X (ver anexo), teñido en solución de Goodview™ (China, Beijing). La corrida electroforética se realizó a 90 V por 1 hr. Utilizando una fuente Owl™ EC-105 Thermo Scientific.

3.3.2 Extracción de ADN plasmídico

Para las extracciones de ADN plasmídico se utilizaron dos abordajes de lisis alcalina, dependiendo del uso posterior de los plásmidos obtenidos. Ambos protocolos se basaron en la precipitación diferencial del ADN plasmídico, debido a su diferencia de tamaño con el ADN genómico. Cuando el ADN plasmídico se utilizó como molde para reacciones de PCR se siguió un protocolo con pasos de purificación menos estrictos. En primer lugar se centrifugaron 5 mL de cultivo a 13000 r.p.m durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* de células en 100 μL de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl 25 mM, pH= 8.0), dejando incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadieron 200 μL de solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%) recién preparada, se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, promoviendo la lisis celular. Se añadieron 150 μL de solución III (Acetato de potasio 3.0M, ácido acético 5.0M) y se incubó 15 minutos en hielo. De esta manera se precipitaron las proteínas y restos celulares, que fueron luego descartados por centrifugación a 15000 r.p.m por 15 minutos y posterior transferencia del sobrenadante a un tubo nuevo.

En el siguiente paso se añadió 1 mL de etanol 70% a temperatura ambiente para precipitar los ácidos nucleicos y se centrifugó durante 15 minutos a 15000 r.p.m. Se descartó el sobrenadante inmediatamente y se añadió 50 μL de una solución de RNAasa 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en *buffer* TE (1X), se incubó 5 minutos a 37°C y se utilizó el vortex para lograr resuspender y disolver totalmente el *pellet*. Como paso adicional de purificación, se agregó un volumen de 30 μL de PEG 8000 20%, NaCl 2,5M a la

solución, se mezcló con vortex e incubó *overnight* a -20°C . Luego se centrifugó 15 minutos a 15000 r.p.m., obteniendo un *pellet* que se lavó con 500 μL de etanol 70% frío. Se secó en rotaevaporador SpeedVac Centrivap[®], Labconco (EEUU, Missouri, EEUU) a 30°C y por último se resuspendió en 30 μL de TE (ver anexo).

El otro protocolo utilizado fue el correspondiente al kit Flexiprep[™] (Buckinghamshire, Inglaterra), el cual se basa en una lisis alcalina similar a la descrita anteriormente, el último paso de purificación incluye el uso de una matriz de vidrio denominada Sephaglass TE. Esta une selectivamente el ADN para poder realizar lavados y luego eluirlo en un *buffer* de baja fuerza iónica.

3.3.3 Reacción de PCR

La técnica utilizada para la detección y clasificación de plásmidos se denomina "*RepliconTyping*". En esta técnica se utilizan cebadores específicos para secuencias determinantes de incompatibilidad de plásmidos de diferentes grupos. Una vez realizada la reacción de PCR y al obtener productos del tamaño esperado, se deben secuenciar los mismos para poder comprobar la presencia de plásmidos de determinado grupo en las muestras.

Para realizar las reacciones de PCR se utilizó la enzima DNA Polimerasa Mango Taq[™], incorporada en la mezcla de reacción MangoMix[™] de Bioline Inc. (Massachussets, EEUU). Esta mezcla también incluye el *buffer* de reacción, la mezcla de dNTPs, MgCl_2 (concentración final 2.5 mM) y *buffer* de carga, incorporado para la evaluación de los productos de la reacción en el ensayo de electroforesis en gel de agarosa. Los cebadores se utilizaron a una concentración de 1 μM cada uno. En cada tubo de reacción se agregaron 2 μL de ADN molde o 2 μL de agua bidestilada, en el caso del control, llegando a un volumen final de 25 μL .

Los cebadores utilizados para la detección de grupos de incompatibilidad en extracciones de ADN se especifican en la Tabla 1, incluyendo un par de cebadores para cada grupo de incompatibilidad.

Tabla 2. Cebadores utilizados para detectar grupos de incompatibilidad.

Primer	Región	Secuencia	Tamaño del producto (bp)	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Accession Number
IncP	<i>trfA2 1</i> <i>trfA2 2</i>	CGA AAT TCR TRT GGG AGA AGT A CGY TTG CAA TGC ACC AGG TC	241	57	X00713
IncP-9	<i>repF</i> <i>repR</i>	CCA GCG GGT ACW TGG G GTC GGC AGC TGC TTG AGC TT	554	54	
IncP-9	<i>korA 3Fa</i> <i>repR</i>	GCA GAC CCA TTC CAT GAC CAC C CCA CCG ACA CTG ATG GTC GT	2108	53	
IncP-9	<i>oriV</i> <i>Rep</i>	GAG GGT TTG GAG ATC ATW AGA GGT CTG TAT CCA GTT RTG CTT	610-637	53	KF706553
IncN	<i>Rep1</i> <i>Rep2</i>	AGT TCA CCA CCT ACT CGC TCC G CAA GTT CTT CTG TTG GGA TTC CG	164	55	X52972
IncQ	<i>oriV1</i> <i>oriV2</i>	CTC CCG TAC TAA CTG TCA CG ATC GAC CGA GAC AGG CCC TGC	436	57	M28829
IncW	<i>oriV1</i> <i>oriV2</i>	GAC CCG GAA AAC CAA AAA TA GTG AGG GTG AGG GTG CTA TC	1140	58	M95790

25

Los controles positivos utilizados en las reacciones de PCR incluyeron preparaciones de plásmidos obtenidos a través de la colaboración con la Dra. Florencia Del Papa de la UNLP (La Plata, Argentina). Los plásmidos de cada grupo de incompatibilidad fueron RSF1010 (IncQ), RN3 (IncN), R388 y pSA (IncW) y pM3 (IncP-9). Además, en todas las reacciones de PCR se incluyeron controles negativos sin ADN para evidenciar posibles contaminaciones que generasen falsos positivos.

3.3.4 Purificación de fragmentos de ADN

Para purificar los fragmentos de ADN a partir de los geles de agarosa sometidos a electroforesis, se utilizó el kit PureLink™ de Life Technologies (Massachussets, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit se basa en el corte de un trozo de agarosa conteniendo el fragmento de interés, el agregado de *buffer* de solubilización de gel e incubación del tubo con la mezcla a 50°C, con el fin de hidrolizar la agarosa. Luego se une el ADN a una matriz que se lava y luego eluye, utilizando

diferentes reactivos provistos en el kit. La escisión del fragmento de agarosa se realizó con bisturí estéril en transiluminador de luz azul Safe Imager™ 2.0 de Life technologies (California, EEUU).

Luego de las purificaciones de los fragmentos, el ADN obtenido fue reamplificado mediante PCR, en las mismas condiciones que la primera reacción de PCR, debido a que la cantidad de ADN obtenida con el kit fue baja.

3.3.5 Construcción de bibliotecas de amplicones

Para clonar los productos de PCR de interés se utilizó el kit Topo™ TA™ cloning vector (Massachusetts, EEUU) (ver anexo). En este kit, el vector pCR™ 2.1 TOPO™ es provisto de manera lineal y conteniendo “overhangs” de un residuo de Timidina (T) en los extremos 3', además de la enzima Topoisomerasa I unida covalentemente. La Taq Polimerasa tiene una actividad no dependiente del molde, que agrega un residuo deoxiadenosina en los extremos 3' de los productos de PCR. En la clonación se da la unión T-A por complementariedad de bases y luego la Topoisomerasa I genera la unión de las cadenas fosfatídicas del vector con el segmento insertado. La enzima se escinde luego de la formación de este enlace.

El protocolo utilizado fue provisto por el fabricante. Se colocaron 5 µL de la mezcla de reacción de PCR con 1 µL del vector. Esta mezcla de ligación se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y luego se utilizó para transformar las células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes. Este vector también cuenta con dos sitios complementarios a los cebadores M13f y M13r, adyacentes al sitio de clonado que se pueden utilizar para amplificar el inserto (ver anexo).

3.3.6 Protocolo de transformación química

Para las transformaciones se utilizaron células químicamente competentes de *E. coli* TOP10. Esta cepa y el vector permiten la selección de los clones de interés por α complementación de la enzima β -galactosidasa. La selección se efectúa por el agregado de X-gal y ampicilina o kanamicina al medio de crecimiento (ver anexo). El X-gal es un sustrato artificial que puede ser hidrolizado por la enzima β -galactosidasa a galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, el cual luego es oxidado a un compuesto insoluble de color azul. Esto permite identificar macroscópicamente los clones que incorporaron un segmento de ADN en el sitio múltiple de clonado que presenta el vector. Además, estas cepas no sobre-expresan el represor LacI, por lo cual no es necesaria la adición de IPTG al medio.

La enzima β -galactosidasa es activa únicamente cuando se encuentra tetramerizada. Esto depende de la región N terminal de la proteína LacZ. En ausencia de este dominio se genera un péptido denominado omega que no tiene capacidad de formar tetrámeros y por lo tanto tampoco presenta actividad enzimática. Sin embargo, se ha visto que la actividad se puede recuperar en presencia del péptido N-terminal, denominado α . A este efecto se le llama α complementación. La cepa de *E. coli* TOP10 contiene la región $\phi 80lacZ\Delta M15$. El gen *lacZ* modificado codifica para el péptido ω . En la secuencia que codifica para el péptido α presenta un sitio múltiple de clonado intercalado. Si se logra insertar el fragmento de interés, este interrumpirá la secuencia, impidiendo la síntesis de péptidos α funcionales y por lo tanto las enzimas generadas por esas células serán inactivas. En este caso se observarán colonias blancas por no existir actividad β -galactosidasa, que serán útiles a nuestros fines.

El protocolo de transformación química incluyó una primera etapa de preparación de las células a un estado de competencia. Para ello, se cultivó la cepa de *E. coli* TOP10 en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) a 37°C con agitación, *overnight*. Un volumen de 3 mL de este cultivo se transfirió a un matraz conteniendo 300 mL de caldo LB. Se incubó a 37°C con agitación por 3 horas aproximadamente, hasta que el cultivo alcanzara una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0,2 y 0,3. Se centrifugó el cultivo a 5000 r.p.m por 10 min a 4°C y se lavó el *pellet* con una solución estéril de $CaCl_2$ 0.1 M frío. Luego, se resuspendió el *pellet* en 5 mL de $CaCl_2$ 0,1 M frío y se dejó reposar unos 30 minutos en hielo. Al cabo de este tiempo se centrifugó la suspensión nuevamente por 10 minutos a 5000 r.p.m, se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de $CaCl_2$ 0,1 M y glicerol 20 % (v/v) frío. Por último, se transfirieron volúmenes de 100 μ L de esta suspensión a tubos estériles de microfuga fríos y se conservaron a $-80^\circ C$.

El protocolo de transformación utilizado se basó en el *shock* térmico de las células competentes. Se agregaron 2 μ L de la preparación de ADN a los tubos con las células competentes en baño de hielo y se dejaron reposar durante 20 minutos. Se incubaron los tubos durante 2 minutos en *block* térmico a 42°C, luego se transfirieron a baño de hielo y se agregó 1 mL de caldo LB, dejando incubar 1 hora a 37°C con agitación. Por último, se sembró con rastrillo 100 μ L de este cultivo en el medio LB sólido correspondiente. En cada ensayo de transformación se incluyeron controles positivos para probar que las células eran viables y competentes y un control negativo sin ADN para probar que los resultados de la transformación no se vieran afectados por contaminaciones.

3.3.7 Incorporación de ADN plasmídico por electroporación

Para la electroporación se utilizó un electroporador MicroPulser™ de BioRad, Inc (California, EEUU). Este equipo genera una alta diferencia de voltaje entre dos electrodos que hacen contacto con la cubeta de electroporación, dentro de la cual se encuentra la suspensión de células con el ADN utilizado para transformar. Es necesario que esta suspensión exhiba una resistencia alta, por lo cual el ADN debe estar disuelto en agua desionizada y la suspensión con las células no puede contener sales disueltas. Las condiciones de electroporación para *E. coli* usadas fueron las recomendadas por el fabricante del equipo. Se usaron cubetas de 0,2 cm, con 40 µL de células en suspensión y con un voltaje de 2,5 kV.

Para el ensayo de electroporación se usaron células de *E. coli* TOP10™ electrocompetentes. Para esto, se inoculó una colonia de esta cepa (crecidas en placas con medio LB) en 5 mL de caldo LB. Este tubo se incubó en agitador orbital *overnight* a 37°C. Estos 5 mL se utilizaron para inocular 300 mL de caldo LB líquido y se cultivó por 2-3 hrs. en las mismas condiciones, hasta llegar a una DO_{600nm} entre 0,5 y 0,6. Se enfriaron los cultivos colocándolos 10 minutos en hielo y se transfirieron a botellas de centrífuga estériles de 250 mL, también frías. Se centrifugó esta suspensión durante 20 minutos a 5000 g y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 30 mL de glicerol 10% frío. Las suspensiones se transfirieron a tubos de centrífuga Sigma® de 50 mL y se centrifugaron 10 minutos a 5000 g a 4°C en centrífuga refrigerada Hitachi 2OPR-52. Luego se descartó el sobrenadante y se repitió un nuevo paso de lavado con 30 mL de glicerol 10 % frío, resuspendiendo y centrifugando en las mismas condiciones. Por último se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en glicerol 10% en un volumen total de 2 mL y se transfirieron volúmenes de 100 µL a tubos de microfuga de 1,5 mL estériles, para ser guardados en freezer a -80°C.

Para la electroporación se agregaron unos 2 µL de preparación de ADN en las suspensiones de células electrocompetentes incubadas en hielo. Se colocaron 40 µL de esta mezcla en la cubeta de electroporación previamente enfriada y cuidando de no dejar burbujas de aire dentro del líquido. Se colocó la cubeta en la cámara de electroporación rápidamente y se dio un pulso a la muestra con el electroporador. Se retiró la cubeta rápidamente y se agregó 1 mL de medio SOC (anexo) en la propia cubeta, para luego transferirlo a un tubo de microfuga. Se cultivaron las células a 37 °C por una hora en agitador orbital y por último se sembraron por rastrillado 100 µL en diferentes medios selectivos para evaluar la adquisición de caracteres fenotípicos nuevos. Se utilizaron controles negativos sin ADN para descartar posibles contaminaciones y positivos para verificar el estado de competencia de las células.

3.3.7 Secuenciación y análisis de secuencias de ADN

Todo el material nucleotídico a analizar fue enviado al servicio secuenciación de Macrogen Inc (Seúl, Corea del Sur). Los cebadores utilizados para las reacciones de secuenciación variaron dependiendo del fragmento y la secuencia y se detallan en anexos. La técnica utilizada para secuenciar fue la de Sanger. Se analizaron los cromatogramas de secuencias con el software MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 6.0⁵³, editando manualmente las secuencias de los extremos que presentaran una calidad menor a 80. Las secuencias obtenidas en todos los casos se compararon con las bases de datos no redundante de secuencias nucleotídicas del GenBank® usando la herramienta BLASTn⁵⁴.

Para la secuenciación de plásmidos se utilizó el mismo servicio de secuenciación. Se envió una alícuota de plásmido purificado de acuerdo con las indicaciones requeridas por el servicio. La primera reacción de secuenciación incluyó el uso de los cebadores *nptIIF* y *nptIIR* (ver anexo), ya que se logró constatar la presencia de este gen en los plásmidos a secuenciar. Se secuenció este gen y a partir de la secuencia obtenida se diseñaron nuevos cebadores para continuar el proceso de secuenciado. Para el diseño de cebadores se utilizó el software Premier Primer (California, EEUU), usando las secuencias ya depuradas, eliminando las bases de baja calidad hacia los extremos del fragmento (ver anexo). Con el nuevo cebador generado se continuó avanzando en las reacciones de secuenciación. Este proceso se repitió hasta obtener como resultado nuevamente la secuencia del gen *nptII* a partir del cual se comenzó. Además, se constató que la secuencia total obtenida fuera de un tamaño cercano al estimado en el ensayo de electroforesis en gel de agarosa.

Luego de esto se procedió a secuenciar la hebra complementaria y se verificó que el resultado confirmara las secuencias obtenidas para la primera hebra. Por último se quitaron las bases que no tuvieran una calidad buena y se ensamblaron los *contigs*, para obtener la secuencia completa del plásmido.

3.4 Búsqueda y clasificación de replicones en metagenomas

Para la búsqueda de replicones *in silico* se utilizaron los metagenomas obtenidos por el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad Nacional Autónoma de México (México) durante la campaña abril de 2015. La Tabla 3 muestra los sitios de recolección de muestras para la obtención de cada metagenoma, ordenados en un gradiente de latitud Sur-Norte. Las muestras fueron tomadas de tapetes microbianos en cañadas de deshielo.

Tabla 3. Sitios de recolección de muestras de tapetes microbianos para la obtención de metagenomas.

Metagenomas	Gradiente de coordenadas			
	Número	Sitio	S	W
	10	B012 - 2015 - 14	78° 01'399'' S	163° 55'049'' W
	11	B012 - 2015 - 15	78° 01'389'' S	163° 54'938'' W
	12	B012 - 2015 - 16	78° 01'380'' S	163° 54'117'' W
	13	B012 - 2015 - MidGarwood "midG"	78° 01'504'' S	164° 06'034'' W
	14	B012 - 2015 - 18	77° 39.66'' S	163° 05.511'' W
	9	San Martín	68°07'45.66''S	67°06'02.74''W
	8	Primavera	64°09'22.5''S	60°57'30.7''W
	7	Esperanza	63° 24'280'S	56° 59'825'W
	3	H3P	62° 11'59.918'' S	58° 57 '2.659'' W
	4	Pista	62° 10' 8.663'' S	58° 58' 58.903'' W
	2	Espejo	62° 9'50.002'' S	58° 58 '46.552'' W
	1	Drake I	62° 9'31.7'' S	58° 56'31.5'' W
	5	Carlini I	62° 14' 35'' S	58° 39' 99'' W
	6	Carlini II	62° 14' 34'' S	58° 39' 86'' W

Para el análisis se usó la herramienta tBLASTn del programa BLAST+. Se emplearon como banco de datos los distintos metagenomas disponibles y como *query* las secuencias aminoacídicas deducidas de las proteínas Rep. Estas son los elementos determinantes de incompatibilidad en los plásmidos de amplio espectro de hospedero RN3 (IncN), RSF1010 (IncQ), R388 (IncW), RK2 (IncP) y pM3, pWW0, pDTGI, pBS267, pNI15, NAH7 y pSVS15 (IncP-9). El E-value de corte utilizado para esta búsqueda fue de 1×10^{-5} .

Los *contigs* en los que se encontraron *hits* para replicasas de los grupos de incompatibilidad IncP-9, IncN, IncQ e IncW, fueron utilizados para explorar el contexto genómico en el que se encontraban

estas secuencias. Para ello, se anotaron los *contigs* a través del servicio web de RAST ⁵⁵ y se analizaron los ORFs que se encontraban en las cercanías de nuestro gen de interés.

Por otra parte, se realizó un estudio filogenético de las replicasas de tipo IncP-9 encontradas. Utilizando el programa *getorf* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/getorf>), se obtuvieron las secuencias deducidas de estas proteínas, que fueron alineadas junto con las de las proteínas usadas como *query* para este grupo. Para el alineamiento se utilizó el software SeaView4 ⁵⁶ con el algoritmo Muscle ⁵⁷. A partir de este alineamiento se realizó un árbol filogenético, nuevamente con el programa SeaView4, utilizando el método *Neighbour-joining*. Las imágenes fueron obtenidas con el programa FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Para caracterizar las secuencias más alejadas en términos de similitud de secuencia de las replicasas de IncP-9 conocidas se realizó una aproximación basada en filogenia. Para ellos se comenzó con un análisis con el programa BLASTp, empleando algunas de las secuencias representantes de cada *cluster* como *query* y la base de datos *nr* del *Genbank*[®]. Se eligieron los hits más informativos, teniendo en cuenta únicamente las 5 que tuvieron los mayores valores de *E-value*, porcentajes de *query cover* y de identidad. Estas secuencias se agregaron al alineamiento y al árbol filogenético construido, junto con secuencias de replicasas de plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncP-7, IncP-1 e IncP-2, incluidas como *outgroups*. Por último, se utilizó la secuencia de la replicasa del plásmido pGLE121P2, único plásmido descrito que no se ha podido clasificar dentro de los subgrupos que se utilizan para IncP-9 ⁵⁸.

4. RESULTADOS

4.1 Extracciones de ADN ambiental total

La integridad y concentración del ADN extraído con el kit DNA Miniprep™ se evaluó mediante el análisis del perfil electroforético en gel de agarosa 0,9%. Como se puede observar en la figura 4A, a pesar de que el ADN ambiental total extraído en cada muestra fue de una calidad aceptable, la cantidad obtenida fue baja y dependió del tipo de suelo o sedimento del cual se partió. Se pueden observar diferencias considerables entre las distintas muestras. Debido a que las reacciones de PCR empleando estas preparaciones como templado no siempre generaron productos de amplificación, se usó un método alternativo para la extracción de ADN. En la figura 4B se puede observar el resultado de las extracciones con el método de Griffiths modificado. En este caso se puede apreciar que la cantidad de ADN obtenido fue mucho mayor que con el kit. Sin embargo, es de una calidad menor lo cual también pudo afectar los resultados posteriores. Se utilizó el ADN obtenido con el kit, ya que se priorizó la calidad del ADN respecto a la cantidad. Es de orden destacar que cuando la extracción se hizo con kit se partió de 0,25 gramos de muestra lo cual también generó menor cantidad de ADN.

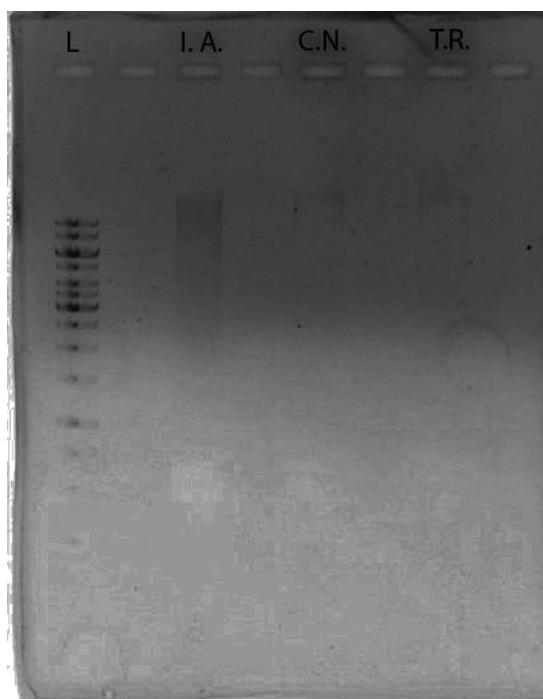


Figura 4A. Perfil electroforético de las extracciones de ADN ambiental total utilizando el kit DNA Miniprep™. Las muestras utilizadas provinieron de Isla Ardley (I.A.), Caleta Norma (C.N.) y Tanques Rusos (T.R.). Se sembraron 5 μ L de marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

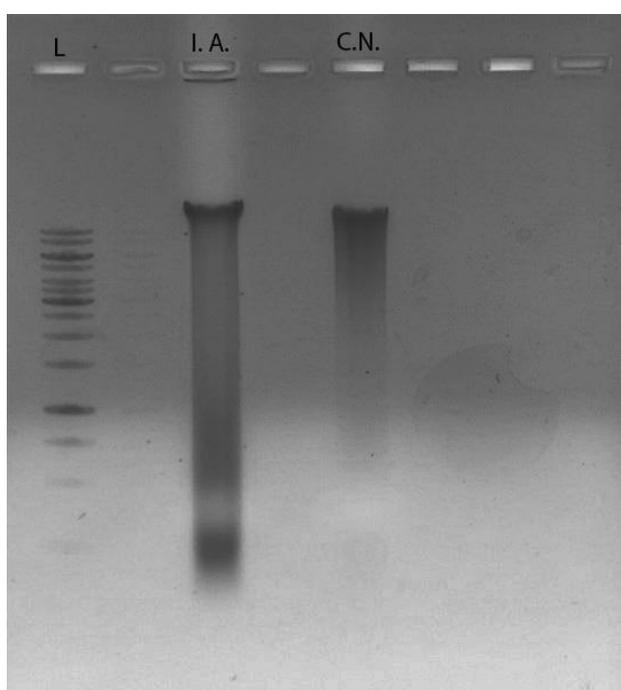


Figura 4B. Perfil electroforético de las extracciones de ADN preparadas con el método de Griffiths modificado. Las muestras utilizadas fueron colectadas en las zonas de Isla Ardley (I.A.) y Caleta Norma (C.N.). Se sembraron 5 μ L de marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

4.2 Método de *Replicon Typing*

La presencia de plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad se evaluó mediante la técnica de *Replicon Typing*. El resultado del primer paso de esta metodología se puede visualizar en la figura 5. En este caso se utilizaron los cebadores específicos para el grupo de incompatibilidad IncP-9, denominados *repF-repR*, que reconocen parte de la secuencia de ADN codificante de la proteína RepA, que interviene en la replicación de los plásmidos de este grupo. El producto de PCR esperado al utilizar estos cebadores es de 554 pb. En la figura se aprecia que las reacciones de amplificación generaron productos inespecíficos, de tamaños muy diferentes para cada muestra. Sin embargo, también se puede ver que en las muestras de Playa del Mar Drake y Cámara Séptica de la BCAA se obtuvieron amplicones de tamaño similar al esperado. Se procedió a aislar esos fragmentos de ADN del gel, para usarlos como plantados en nuevas reacciones de PCR empleando los mismos cebadores. Todas las reacciones presentaron, en mayor o menor medida, un perfil de amplificación complejo (figuras no mostradas).

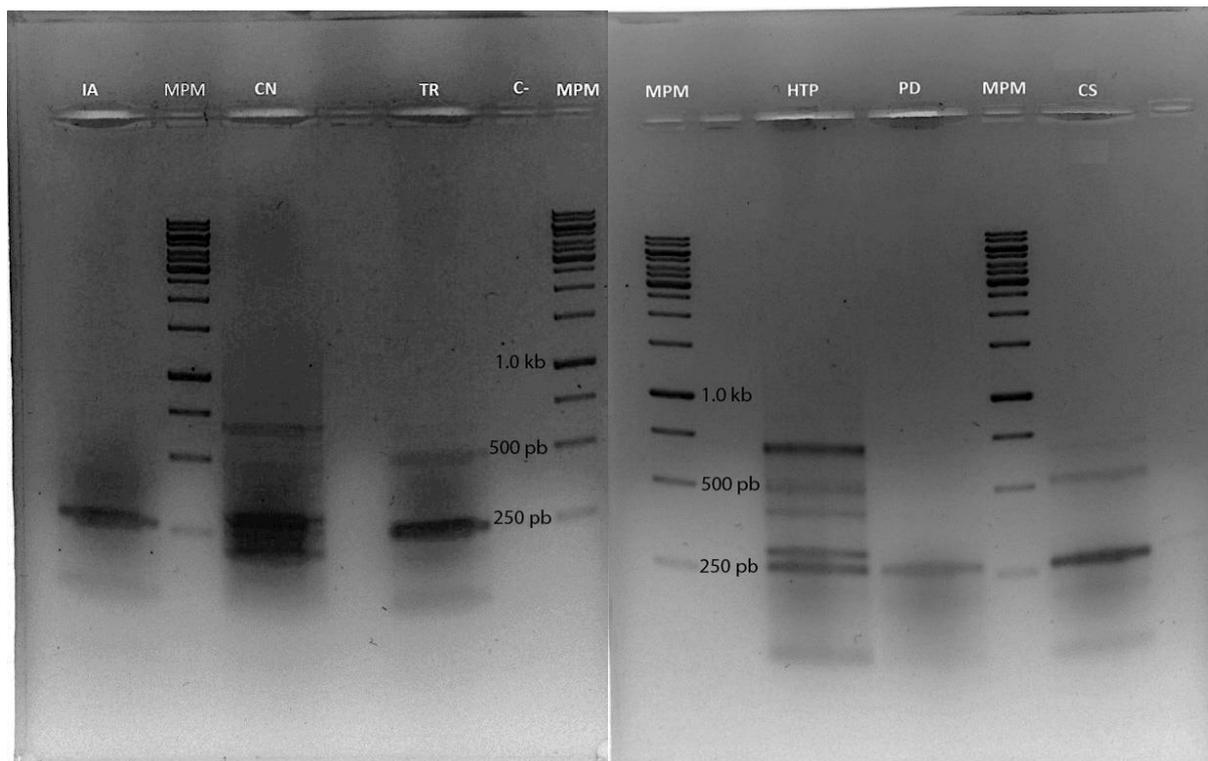


Figura 5. Perfil electroforético de los productos de PCR usando como molde las extracciones de ADN de las muestras tomadas en Isla Ardley (IA), Caleta Norma (CN), Tanques Rusos (TR), Half Three Point (HTP), Costa del mar Drake (PD) y Cámara séptica del AINA (CS) con los cebadores RepF/RepR. Se sembraron 5 μ L de marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

A partir de los productos de PCR purificados se construyeron bibliotecas de amplicones clonados en el vector pCR 2.1™. Se obtuvieron 21 clones para la muestra CS y 3 para las muestras de HTP.

Se aislaron los plásmidos a partir de los 24 clones totales de la biblioteca HTP y CS. Se evaluó el tamaño de los plásmidos mediante el análisis del perfil electroforético y los mismos fueron usados como templados para amplificar por PCR los insertos correspondientes, usando los cebadores M13f y M13r. La Figura 6 muestra el perfil electroforético de los productos de amplificación obtenidos. Si comparamos el tamaño de los amplicones con los fragmentos del marcador de peso molecular, vemos que los productos amplificados son de 700 pb aproximadamente. Esto es cercano al tamaño esperado, ya que el inserto debería ser de 554 pb y los sitios de reconocimiento de los cebadores M13 distan, juntos, unos 170 pb respecto al sitio de inserción del amplicón.

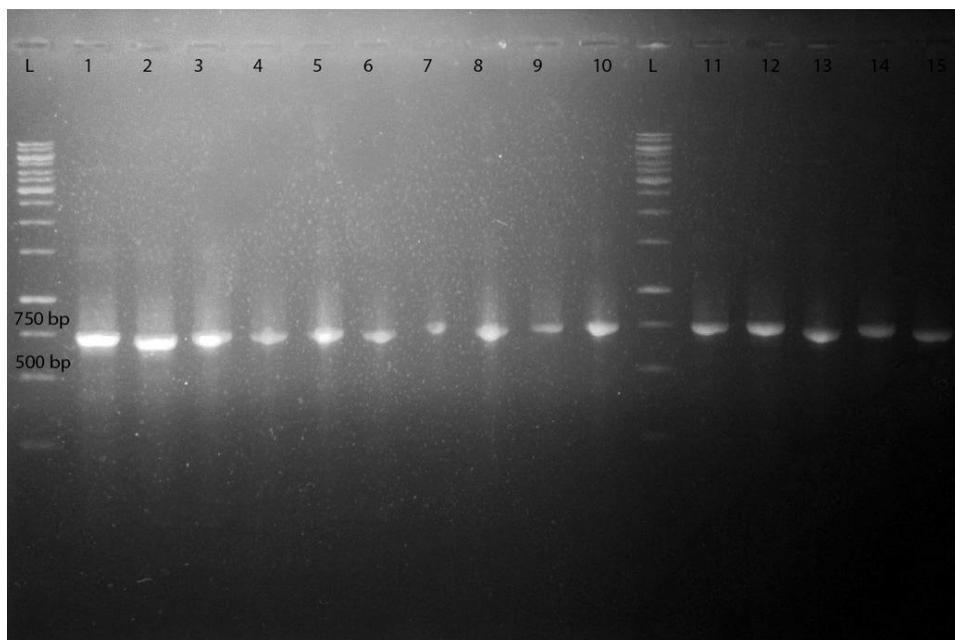


Figura 6. Perfil electroforético de los productos de PCR generados a partir de la biblioteca HTP usando los cebadores M13F/M13R, específicos para el vector pCR™ 2.1 TOPO™. No se muestra el resultado para todos los clones. Se sembraron 5 µL de marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Las minipreps utilizadas para evaluar el tamaño del inserto también se utilizaron como molde para nuevas reacciones de PCR, realizadas en este caso para generar fragmentos de ADN para secuenciar. Se utilizó el primer M13f como cebador para la reacción de secuenciación en el servicio de Macrogen

Inc. Las secuencias obtenidas fueron editadas eliminando las regiones correspondientes al vector y las secuencias de baja calidad. Las secuencias depuradas fueron analizadas mediante BLASTn, comparando con la base de datos de secuencias no redundantes (nr) Del GenBank®. El resultado del análisis se muestra en la Tabla 2. En la misma se puede ver que si bien los tamaños de los fragmentos eran cercanos al del producto esperado, las secuencias no presentaron similitud con las de los genes que se buscaba amplificar. Por el contrario, presentaron alta identidad con las secuencia nucleotídicas de transposasas identificadas en diferentes organismos, incluyendo una que se encuentra codificada en un megaplásmido de *Ruegeria pomeroyi*.

Tabla 2. Resultados obtenidos por BLASTn usando como query las secuencias de los amplicones de la biblioteca HTP y CS RepF/RepR.

Secuencia	Tamaño (pb)	Organismo	Gen	Identidad
C.S. 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12	533	<i>Ruegeria pomeroyi</i>	<i>ISSp09 transposase</i>	83%
C.S. 2, 6, 8	511	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	<i>Putative transposase ISRm10-1</i>	75%
H.T.P 1, 2, 3	511	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	<i>Putative transposase ISRm10-1</i>	74%

4.3 Método de *Replicon typing* dependiente de cultivo

Al obtener estos resultados nos planteamos desarrollar estrategias alternativas, incorporando un sesgo al estudio, como lo es el cultivo y la resistencia a antibióticos. Las muestras fueron usadas para inocular medios de cultivo en presencia de antibiótico. Luego se extrajo el ADN plasmídico a partir de estos cultivos “enriquecidos”. En la figura 7 se puede observar el perfil electroforético en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos usando como molde algunas de las minipreps de los cultivos mixtos crecidos en medio R2A a 25°C con diferentes antibióticos. Se obtuvieron productos de amplificación con los cebadores *repF/repR*, específicos para IncP-9 y *oriv1/oriv2*,

específicos para IncW. Los tamaños de los productos esperados eran de 1140 pb para el grupo de incompatibilidad IncW y de 554 pb para el grupo IncP-9.

Se puede ver en la figura que nuevamente las reacciones con los cebadores *repF/repR* presentaron un perfil de amplificación inespecífico, obteniendo bandas muy intensas pero de tamaños diferentes al esperado. Se decidió no tener en cuenta las bandas cercanas al tamaño esperado, sobre todo debido a la baja intensidad de las mismas. Distinto fue el caso de los cebadores *oriv1/oriv2*, en los cuales se observa una única banda en todas las reacciones, de tamaño muy parecido al del control positivo. Este resultado se obtuvo a partir de la muestra tomada de suelo/sedimento cercano a la Cámara séptica del AINA, incubado en presencia de kanamicina en medio R2A a 25°C.

Con los cebadores específicos para plásmidos de los grupos IncN e IncQ no se obtuvieron productos de PCR. En el caso de los cebadores dirigidos a plásmidos IncP, los productos no fueron del tamaño esperado, por lo cual no se tuvieron en cuenta. Al igual que en el caso de los replicones IncP-9 se corría el riesgo de que los productos de PCR fueran inespecíficos.

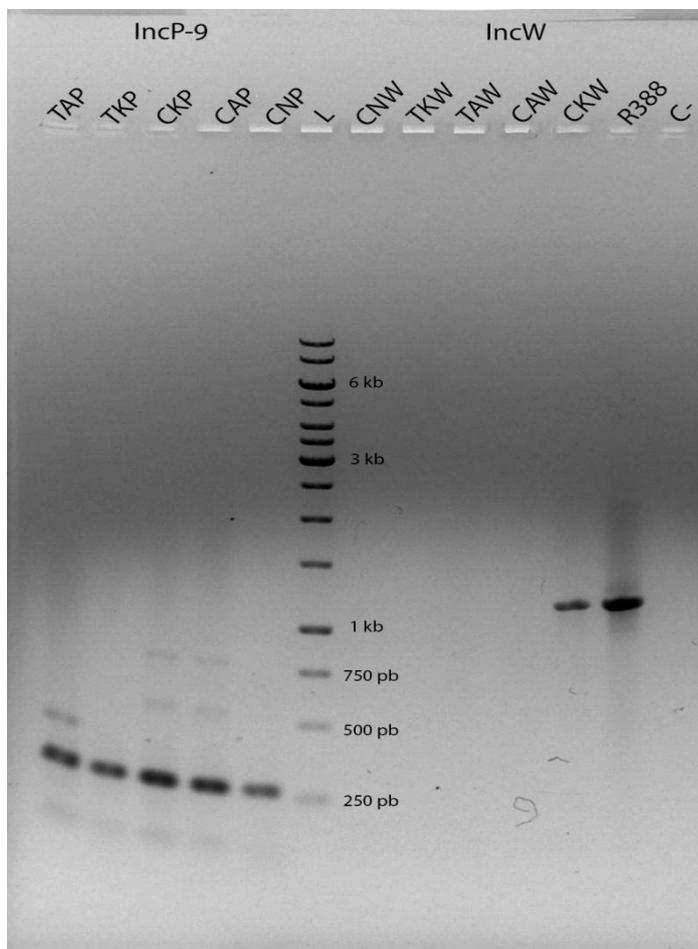


Figura 7. Perfil electroforético de las reacciones de PCR usando como molde extracciones de ADN plasmídico de muestras de las zonas de los Tanques Rusos (TR) y Cámara Séptica de la B.C.A.A (CS) cultivadas en medio R2A líquido a 25°C por 48 hs. A su vez, el medio contenía alguno de los antibióticos Kanamicina 50 µg/mL (K), Ampicilina 50 µg/mL (A) y Ác. Nalidíxico 20 µg/mL (N).

Se utilizaron los cebadores RepF/RepR y Oriv1/Oriv2 IncW. Se utilizó el plásmido R388 como control positivo del grupo IncW.

Se sembraron 5 µL de marcador de peso molecular GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Luego de haber obtenido esta banda y debido a que no se apreciaban otros productos de amplificación, se procedió directamente a ligar la mezcla de reacción en el vector de clonación pCR2.1 del kit TOPO® TA y luego se transformaron células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes con la mezcla de ligación. Al plaquear la reacción de clonado en medio LB Km Xgal, se obtuvieron colonias blancas y azules. Se eligieron 14 colonias blancas para secuenciar el inserto (biblioteca de amplicones). Se siguió el mismo procedimiento que para los clones de la biblioteca anterior, se aislaron los plásmidos y se enviaron a secuenciar utilizando el cebador M13f.

En la tabla 5 se pueden ver los resultados del análisis de secuencia de la biblioteca generada para los replicones del grupo IncW. Los insertos clonados exhibieron una identidad del 99% con las secuencias de genes reguladores de plásmidos pertenecientes a este grupo, como R388 y pSA, que de hecho son los que utilizamos como control de este grupo de incompatibilidad. Las secuencias que presentaron esta identidad son parte de los genes *repA* y *resP*, los cuales codifican para una replicasa y una resolvasa, implicadas en la replicación y partición de estos replicones.

Tabla 5. Blastn obtenido a partir de la secuenciación de los insertos de la biblioteca IncW

Clones secuenciados	Tamaño de la secuencia	Organismo	Genes	Id., Q. cover, E-value
C.S. 3, 6, 8, 17, 25, 31	1048 pb	<i>Escherichia coli</i>	<i>repA, resP</i>	99%, 87%, 0

4.5 Aislamiento y secuenciación de plásmidos

Debido a la presencia de replicones del grupo IncW en la muestra CSK, se optó por utilizar la *midiprep* obtenida a partir de esa muestra para transformar células competentes de *E. coli* TOP10 . De esta forma, se pretendía recuperar los plásmidos contenidos en el cultivo que portaran genes de

resistencia a Km. Previamente, las preparaciones de ADN total ambiental a partir de las mismas muestras fueron usadas para transformar células de *E. coli* TOP10. Las mezclas del ensayo de transformación fueron luego plaqueadas en medio sólido LB con diferentes antibióticos, no obteniéndose resultados positivos para los antibióticos ensayados (km, amp y nal).

Sin embargo, en este caso se lograron obtener dos colonias crecidas en medio LB Km. Esto era de esperar, ya que la midiprep de la muestra CSK se obtuvo a partir de un cultivo en medio selectivo con Km, enriqueciendo la comunidad en los microorganismos que exhibieran resistencia a esa droga. Los controles del ensayo permitieron verificar que las dos colonias adquirieron la resistencia a partir del ADN purificado.

El paso siguiente consistió en la preparación de plásmidos (*minipreps*) a partir de estas colonias, para evaluar si realmente se había dado la incorporación de un plásmido. En la figura 8 se puede ver el perfil de electroforesis. En este ensayo se visualizan tanto las *minipreps* a partir de ambas colonias, como los perfiles de restricción con *EcoRI* (falta en mat y métodos) de ambas *minipreps*.

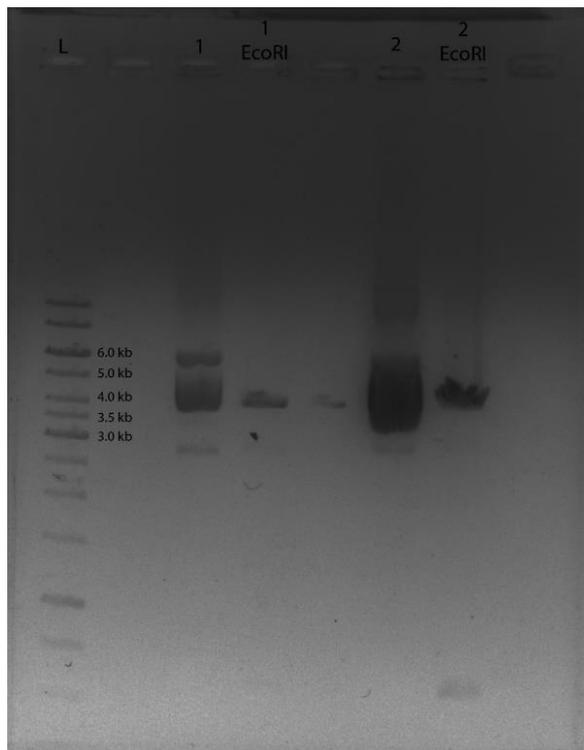


Figura 8. Perfil electroforético de las *minipreps* obtenidas a partir de las colonias crecidas en LB Km. Se incluye el perfil de digestión con *EcoRI* de ambos clones. Se sembraron 5 μ l por carril.

En los carriles 3 y 6, indicados en la figura como 1 y 2, se observan tres bandas, lo cual podría indicar la presencia de plásmidos en sus 3 conformaciones, circular relajado, lineal y superenrollado. Las

minipreps se realizaron con un protocolo clásico de lisis alcalina, por lo que era de esperar que no se obtuviera la mayoría del plásmido en su conformación superenrollada, si no que la mayor cantidad recuperada del mismo se encontraría en forma lineal.

En los carriles 1 EcoRI y 2 EcoRI se sembraron 4 μ l de las *minipreps* obtenidas, digeridas con la enzima mencionada. Se puede observar que ambas digestiones presentan dos bandas, correspondientes a dos fragmentos de aprox 4000 pb y 500 pb. En ambos casos, la banda de 500 pb es de poca intensidad pero nos da una idea de que 1 y 2 se podrían tratar del mismo plásmido, ya que ambos compartirían los sitios de corte de esta enzima, además de tener el mismo tamaño aproximadamente.

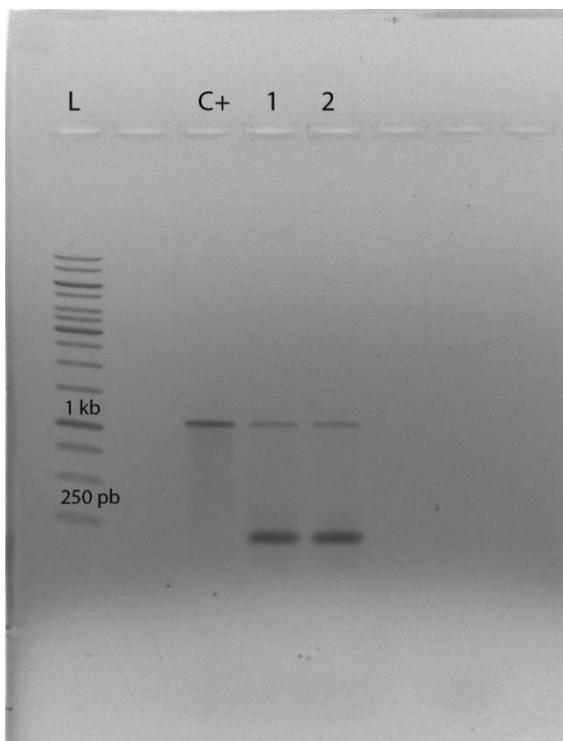


Figura 10. Perfil electroforético de los productos de PCR obtenidos con los cebadores oriV1/oriV2. Se utilizaron como molde las *minipreps* 1 y 2.

Empleando las *minipreps* como templado, se realizaron ensayos de PCR para determinar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos capturados. En la figura 10 se observan los productos obtenidos al utilizar los cebadores específicos para los determinantes de incompatibilidad del grupo IncW. Para ambos plásmidos se observa una banda del mismo tamaño que la banda obtenida para el plásmido utilizado como control positivo, pero también obtuvimos una banda más intensa, menor a 250 pb, por lo cual no podemos concluir la pertenencia o no de estos plásmidos al grupo IncW.

Por otra parte, se pudo comprobar por PCR la presencia de un gen determinante de resistencia a Kanamicina. Se utilizaron cebadores específicos para el gen que codifica para la enzima

aminoglicósido fosfotransferasa (ver anexo). Se logró amplificar una única banda del tamaño esperado a partir de ambas *minipreps*. Los resultados obtenidos hasta ese punto nos llevaron a pensar que estos plásmidos podrían ser iguales, ya que se comportaron de la misma forma en todos los ensayos realizados. Es por esto que se tomó la decisión de secuenciar únicamente uno de los dos.

Se procedió a secuenciar el plásmido 1, obteniendo la secuencia completa del mismo que se detalla en el apéndice. El largo total obtenido fue de 4478 pb y se lograron detectar 5 ORFs, que se muestran en la figura 9. Se pueden observar dos genes de resistencia a antibióticos de diferentes tipos: aminoglicósidos y β -lactámicos. En el caso del gen de resistencia a β -Lactámicos, la enzima codificada es una β -lactamasa de tipo TEM-116 (*bla*_{TEM-116}), mientras que la enzima de resistencia a aminoglicósidos se denomina Neomicina fosfotransferasa II (*nptII*). Además, se detectó la presencia del gen de la transposasa ISS-p09 y su origen de replicación pUC OriV. También se observa la presencia del ARN regulador RNAI que es el determinante de incompatibilidad en el grupo ColE1. De este modo, este replicón no se clasificaría como IncW a pesar de los resultados anteriores obtenidos.

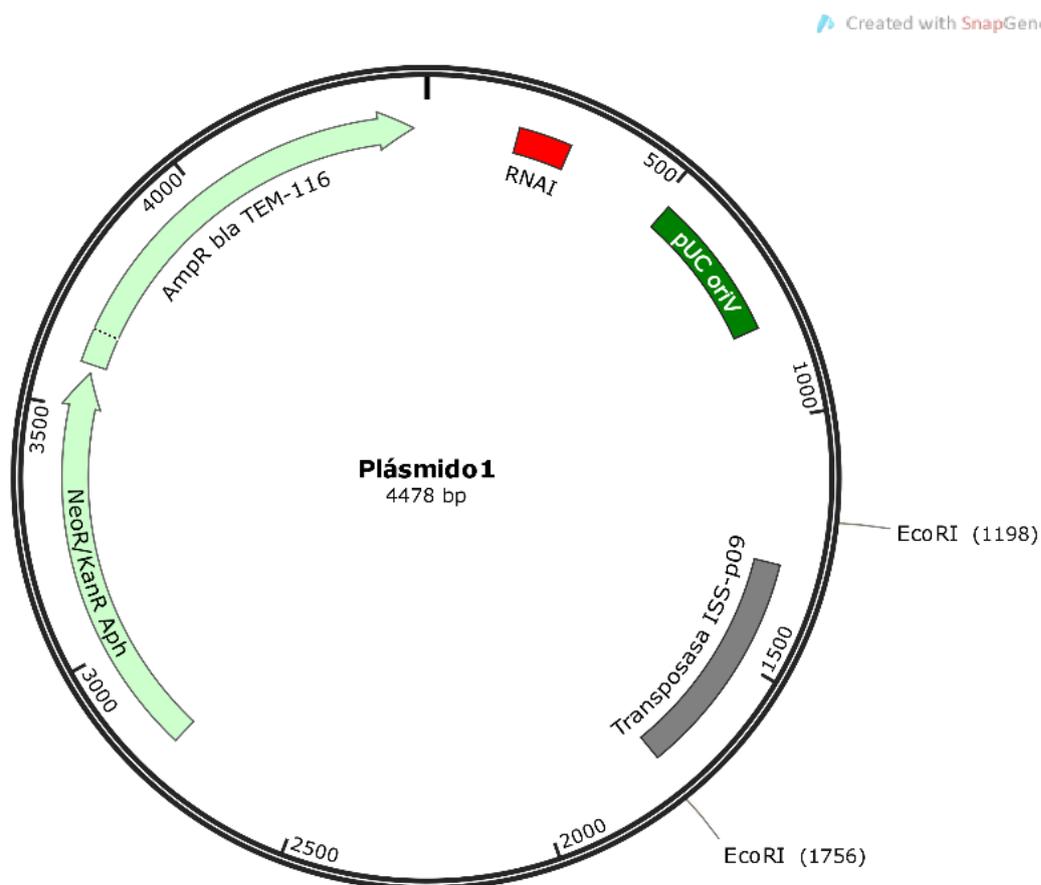


Figura 9. ORFs presentes en el plásmido 1.

4.6 Búsqueda y clasificación de replicones en metagenomas

Al analizar los metagenomas, el perfil general de ORFs que codificarían para proteínas determinantes de incompatibilidad fue similar al obtenido a partir de las muestras de suelo/sedimento, empleando estrategias moleculares más clásicas. El estudio usando tBLASTn no permitió identificar secuencias de replicasas del grupo IncQ en ninguno de los metagenomas.

Al usar como *query* la secuencia de la replicasa del plásmido RN3 (IncN), se obtuvieron algunos hits en los metagenomas 7 y 14, provenientes de un sitio cercano a la base Esperanza y a la zona de Dry Valley, respectivamente (ver apéndice). Posteriormente, estudiamos el contexto genómico de esos ORFs analizando las regiones adyacentes en los *contigs* correspondientes. En el metagenoma 7, las únicas dos proteínas con funciones identificadas de los 8 ORFs encontrados corresponderían a sistemas toxina-antitoxina (*Phd antitoxin-Doc toxin*), involucrados en el mantenimiento de plásmidos aunque no exclusivamente asociados a estos. En el caso de los dos *contigs* positivos del metagenoma 14, se encontraron ORFs que codificarían para proteínas de virulencia (VapD), relaxasas (RelB y RelE) y una de las replicasas "*TrfA-related protein*". En el resultado del análisis con la herramienta BLASTn usando como *query* las secuencias de estas supuestas replicasas encontradas contra la base de datos nr del Genbank, se detectó que los dos ORFs exhibían alta identidad con la misma proteína hipotética del plásmido pRGRH1852, variando la identidad y *query cover* en cada caso.

En el caso de la búsqueda de replicones del grupo IncW, los ORFs que codificarían para replicasas de este grupo, se distribuyeron en 11 *contigs* de los metagenomas 1, 9, 10 y 12. El metagenoma 1 corresponde a una muestra obtenida en una zona de deshielo cercana a la playa del mar Drake en la isla Rey Jorge. Este ORF constituyó el único determinante de incompatibilidad encontrado en los metagenomas de la isla Rey Jorge. Además, al analizar este ORF como *query* con BLASTn comparado con la base de datos nr del Genbank, el mismo exhibió una identidad del 70% con una proteína hipotética del plásmido pRMAN01 de *Ralstonia mannitolilytica*. Para el resto de los hits se observó que todos se encontraban en *contigs* que contenían ORFs que codificaban para proteínas comúnmente presentes en elementos genéticos móviles, como las proteínas del sistema de partición ParA, ParB y la enzima implicada en los sistema de conjugación TraA (Tabla en apéndice). Además, la anotación generada por RAST asignó a las replicasas de muchos de estos *contigs* la denominación "*IncW-like Rep proteins*".

El análisis dirigido al grupo de incompatibilidad IncP-9 permitió identificar mayor cantidad de replicasas. Las mismas se distribuyeron en los metagenomas 8, 9, 10, 12 y 14, siendo el metagenoma 9 el que presentó mayor número: 28. En este caso se observó que los *contigs* nuevamente contenían, en su mayoría, secuencias codificantes de proteínas vinculadas a elementos genéticos móviles. Por otro lado, el servicio web del RAST anotó las replicasas encontradas simplemente como “*Replication Proteins*” y en varios de estos *contigs* se pudieron detectar secuencias codificantes para proteínas asociadas a plásmidos. Por último, es de orden destacar que el análisis por BLASTn de estos ORFs usados como *query*, tuvieron como resultado las secuencias de replicasas de diferentes plásmidos, de los cuales desconocemos el grupo de incompatibilidad al que pertenecen (tabla en apéndice).

En la Figura 10 se puede observar el árbol filogenético construido con las secuencias de las proteínas del grupo IncP-9 encontradas en los diferentes metagenomas. En primer lugar se puede apreciar la disposición en *clusters*, formados principalmente por secuencias de replicasas procedentes de los mismos metagenomas. No se logró identificar exactamente el grupo de incompatibilidad de cada uno de los *clusters* que se encuentran alejados de las secuencias de replicasas del grupo IncP-9. Sólo uno de los *clusters* pudo ser representado por la replicasa del plásmido pCAR1, que ha sido utilizada en varios trabajos como control del grupo de incompatibilidad IncP-7. Sin embargo, sí se logró caracterizar el origen filogenético utilizando los resultados de BLASTp, realizados a partir de secuencias representantes de cada *cluster* contra la base de datos de secuencias aminoacídicas del Genbank®. Todos los *clusters* fueron caracterizados por proteínas de tipo RepB pertenecientes a aislamientos ambientales.

Las replicasas de los grupos de incompatibilidad IncP-1 e IncP-2, reportadas como filogenéticamente cercanas al grupo IncP-9, tampoco lograron representar ninguno de los *clusters* presentes en el árbol. Si bien estas secuencias se disponen más cercanas a las secuencias de IncP-9 que la representante del grupo IncP-7, se puede observar que existe una distancia considerable entre las replicasas de cada grupo de incompatibilidad. Estas distancias tan marcadas se tienden a desdibujar si tomamos en cuenta las proteínas encontradas en los metagenomas.

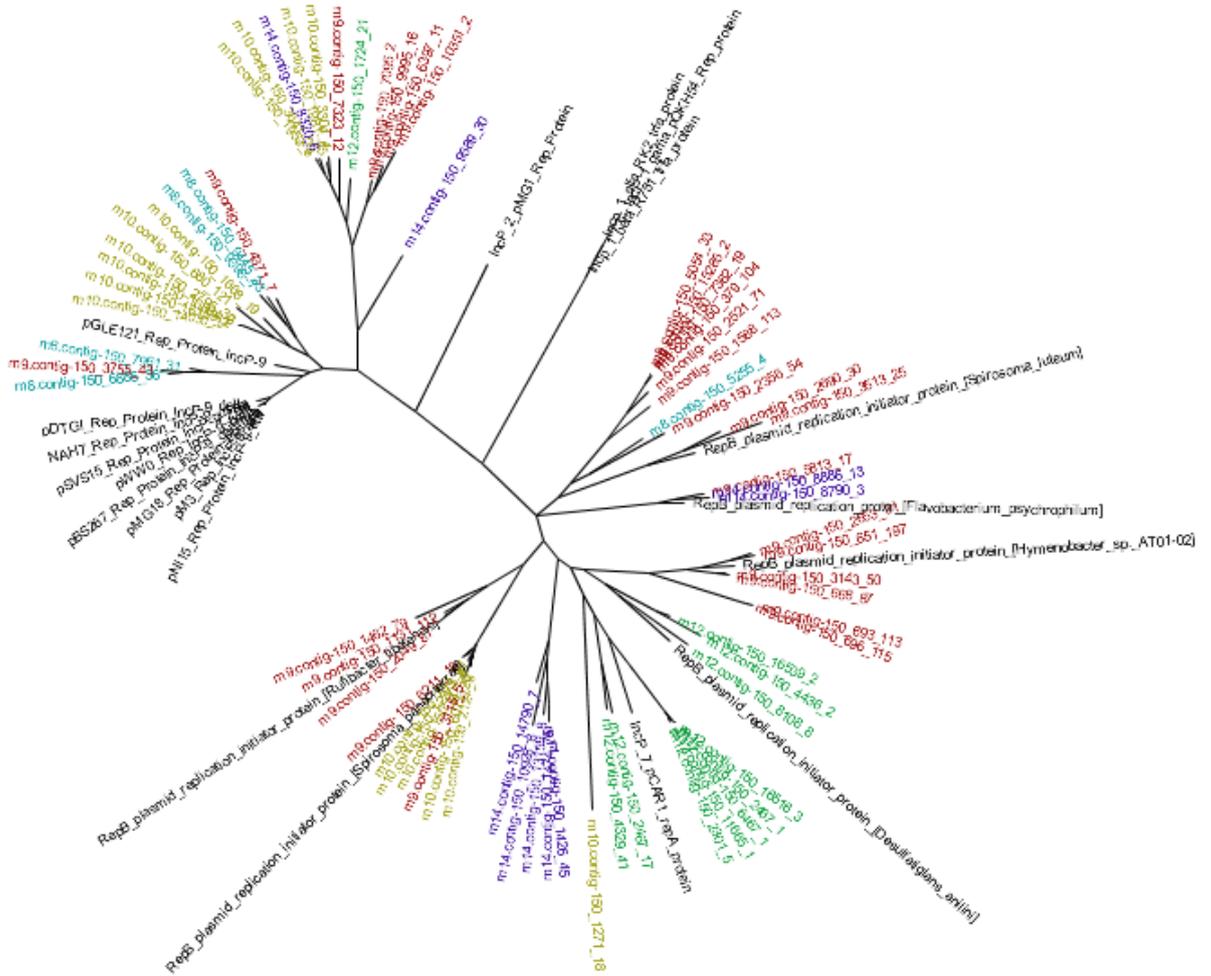


Figura 10. Árbol filogenético de las secuencias de proteínas Rep obtenidas para el grupo IncP-9 en los metagenomas analizados. Se obtuvieron secuencias en el metagenoma 8 (celeste), metagenoma 9 (rojo), metagenoma 10 (amarillo), metagenoma 12 (verde) y metagenoma 14 (azul). Las secuencias de referencia se encuentran en color negro.

Para clasificar las replicasas dentro de los subgrupos que se han descrito para los replicones del grupo IncP-9, se utilizaron como referencia secuencias de replicasas pertenecientes a cada uno de estos subgrupos. Se esperaba que las secuencias encontradas en los metagenomas se dispusieran cercanas a las secuencias representantes de cada subgrupo. Sin embargo, por lo que se observa en la figura 10 principalmente, no vemos que la zona donde se disponen las secuencias de los diferentes subgrupos de IncP-9 esté interrumpida por secuencias de proteínas encontradas en metagenomas, sino que más bien el grupo IncP-9 es un *cluster* más dentro del árbol y que estas divergen a partir de un mismo nodo. Por otra parte, también se utilizó la

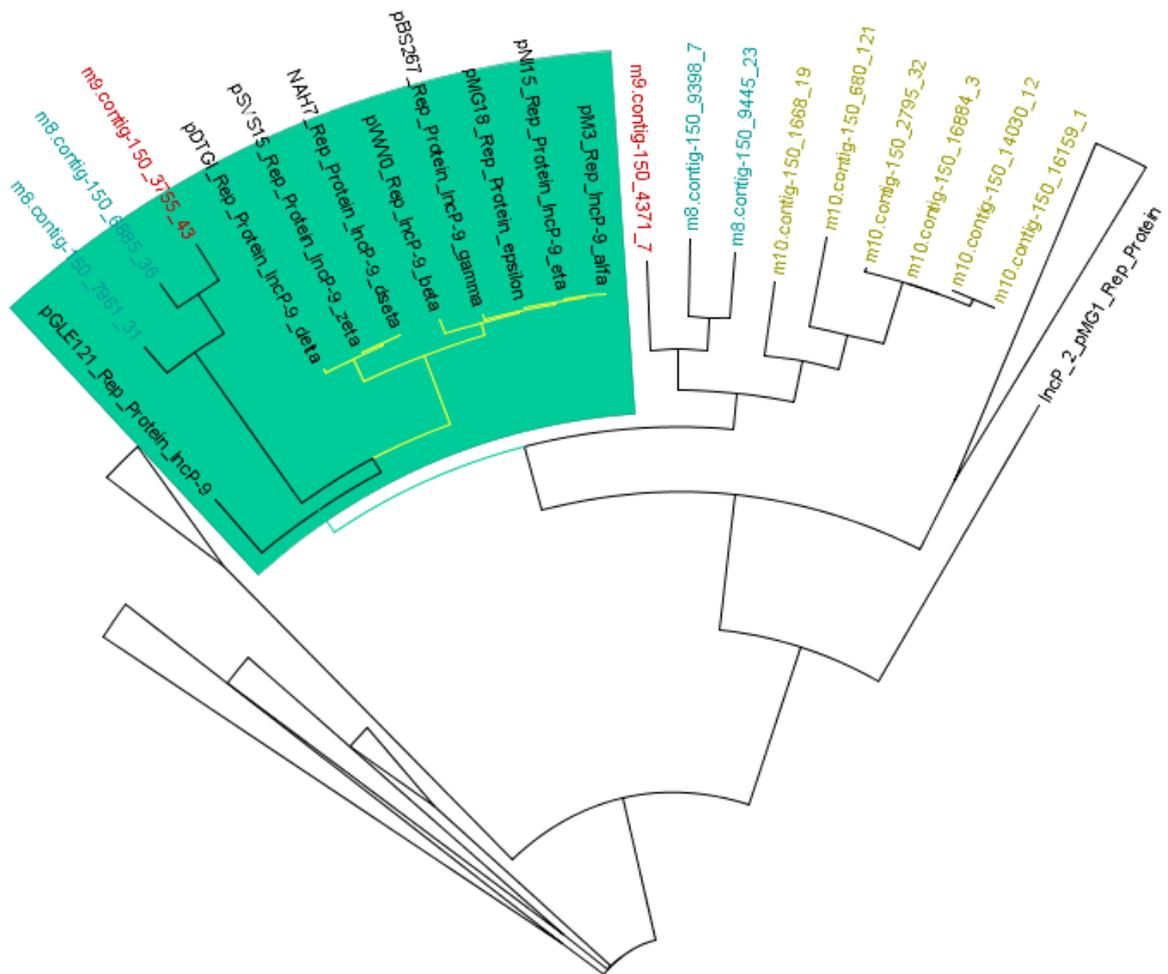


Figura 11. Ampliación de la Figura 10 en la zona de los subgrupos de IncP-9 descritos en bibliografía hasta el momento. En recuadro verde se muestran las secuencias de proteínas Rep que por identidad corresponderían a IncP-9. Las ramas amarillas corresponden a los diferentes subgrupos de IncP-9. En letra negra se muestran las que han sido probadas experimentalmente por test de incompatibilidad. Se muestran las secuencias Rep del metagenoma 8 (letras celestes), metagenoma 9 (letras rojas) y metagenoma 10 (letras amarillas) encontradas.

secuencia de la replicasa del plásmido PGLE121P1, que como se explicó anteriormente pertenece a un replicón que no se ha logrado clasificar dentro de ninguno de los subgrupos de IncP-9 descritos hasta el momento, aunque sí se ha visto que pertenece al grupo IncP-9. La misma se dispone cercana al resto de las del grupo IncP-9 pero se separa del *cluster* que mencionamos anteriormente. Esta secuencia a su vez nos amplía el rango de los replicones que han sido probados como pertenecientes a IncP-9 y es por esto que 3 secuencias encontradas en los metagenomas: dos del metagenoma 8 y una del metagenoma 9, se disponen dentro de esta zona delimitadas por replicasas que sabemos que pertenecen a IncP-9.

5. DISCUSIÓN

Al analizar los resultados se destaca la inespecificidad de los cebadores utilizados para detectar la presencia de plásmidos en el ambiente. Si bien en los trabajos en los que se reporta el uso de estos cebadores para determinar que se sintetizaran productos de PCR de manera específica, los ensayos fueron realizados usando ADN plasmídico de aislamientos como templado ²⁵. La diversidad a la que exponemos los cebadores al utilizar ADN ambiental como templado es mucho mayor y por lo tanto aumenta la probabilidad de hibridaciones con secuencias similares pero no deseadas. Existe otra diferencia metodológica entre las técnicas utilizadas en la bibliografía consultada y nuestro trabajo. En la mayoría de los casos, el método utilizado para revelar la identidad de secuencia del producto obtenido es la técnica de *Southern blot*. Con el paso de hibridación se evitaría la obtención de falsos positivos, aunque estos tuvieran el mismo tamaño de banda que los productos esperados ⁵¹. No logramos realizar la técnica de *Southern blot* debido a la falta de algunos recursos.

Al enriquecer las muestras en determinados microorganismos, utilizando medios, condiciones de cultivo y presiones selectivas, se introducen sesgos. Esto determina que se pierda la capacidad de describir la mayor parte de la diversidad de las muestras y se aumenta la concentración de algunas secuencias que en la muestra original no eran tan abundantes. Esto se puede apreciar de manera cualitativa, en las reacciones de PCR donde al utilizar extracciones de ADN de enriquecimientos en lugar de extracciones de ADN de suelo, cambian los perfiles electroforéticos con bandas de tamaños inespecíficos por ausencia de productos. De todas, formas a través de esta estrategia se logró detectar la presencia de plásmidos del grupo IncW en la muestra correspondiente a suelo/sedimento cercano a la cámara séptica del AINA. Se sabe que la cámara séptica en el período estival se rebasa, derramando parte de su contenido al suelo circundante. Esto sucede debido a la presencia de una mayor cantidad de personas alojándose en el edificio. El efecto de la cámara séptica también se puede apreciar en la vegetación que presenta el suelo que rodea este reservorio. La presencia de plásmidos de tipo IncW en esta muestra podría ser esperable, si tenemos en cuenta que los mismos han sido reportados como plásmidos de amplio espectro de hospedero, lo cual incluye la familia Enterobacteriaceae ⁵⁹. A modo de ejemplo, en aislamientos de *Escherichia coli* se ha encontrado el plásmido R388, uno de los que utilizamos como control positivo para este grupo. A su vez, muchos trabajos previos han reportado que *E. coli* puede encontrarse en el ambiente antártico como resultado del impacto humano y/o animal, por lo cual no descartamos que esta sea la fuente de los replicones IncW en esta muestra en particular ^{60,61}.

Por otra parte, nos parece interesante la sobrevivencia de este tipo de bacterias en el ambiente antártico. Se sabe que *E. coli*, al igual que el resto de las bacterias que componen la microbiota del ser humano, no están adaptadas a vivir en condiciones de alta radiación ultravioleta ni bajas temperaturas⁶². Sin embargo, se ha visto que algunas bacterias capaces de esporular provenientes de suelos con impacto antrópico, pueden perdurar por años en los suelos antárticos⁶³. Ha sido extensamente documentado que las condiciones de estrés, sobre todo aquellas que generan daños en el ADN, como la radiación ultravioleta, son factores inductores de la THG⁶⁴. Esto nos llevaría a pensar que por más que los hospederos originales de estos plásmidos tengan un tiempo de sobrevivencia corto en el ambiente antártico, los elementos genéticos móviles introducidos a través de éstos podrían permanecer.

En la muestra CS en particular, detectamos la presencia de plásmidos por *Replicon Typing* y paralelamente logramos capturar un plásmido de aproximadamente 4500 pb. Sin embargo, luego de secuenciarlo concluimos que este replicón era de tipo ColE1 y que no presentaba en su secuencia un gen *rep* del grupo de incompatibilidad IncW. Los plásmidos de tipo ColE1 tienen un sistema de regulación de la replicación que depende de dos transcritos de ARN. Uno de ellos, al ser clivado por la enzima RNAsaH, genera un extremo 3'OH libre, actuando como cebador para la replicación del plásmido (RNAII). El otro es un contratranscripto que se une al ARN mensajero anteriormente generado, para que no llegue a transcribirse (RNAI)⁶⁵. Por ende, la expresión basal de RNAI regula negativamente la replicación en este tipo de plásmidos. Esto también, en cierta manera, regula el número de copias que resulta de un equilibrio entre la expresión y la degradación de ambos ARN. Cuando el número de copias es muy alto, aumenta la concentración del contratranscripto, lo cual genera un cese en la replicación y por tanto un control en el número de copias⁶⁶. Logramos identificar ambos ARN en la secuencia del plásmido y con un nivel de identidad muy alto respecto a otros replicones de este mismo grupo de incompatibilidad.

Sin embargo, la secuencia entera de este plásmido no presentó alta identidad con ninguna de las secuencias guardadas en el Genbank. Esto podría ser fácil de discutir al tener en cuenta que las muestras son de suelo antártico y quizás tienen una diversidad microbiana que no ha sido tan ampliamente estudiada. Sin embargo, es sabido que los plásmidos de este grupo están asociados a hospederos como enterobacterias⁵⁹, incluso más que los plásmidos del grupo IncW, ya que a diferencia de éstos, los replicones ColE1 son de tipo *narrow host range*. Los ColE1 se mantienen establemente únicamente en especies cercanamente relacionadas a las gammaproteobacterias⁶⁷. Además, es de interés destacar que este plásmido a pesar de ser muy pequeño, codifica para dos enzimas determinantes de resistencia a antibióticos. Una de ellas es una β -Lactamasa de tipo TEM-116. Para esta variante aún no existen reportes en el continente antártico, aunque sí los hay para

varios países que tienen bases en la Isla Rey Jorge. De hecho, Corea del Sur fue el primer país en el que se encontró esta variante del gen y el segundo fue Uruguay hace poco más de una década ⁶⁸. Aunque no podemos probarlo en este trabajo, este podría ser un ejemplo más del impacto que genera el ser humano en la microbiota antártica, no solo transportando bacterias si no también diseminando genes que luego pueden ser transferidos a la microbiota nativa.

A través de la aproximación metagenómica, se logró obtener solamente un hit en las muestras correspondientes a la Isla Rey Jorge y este coincidió con el grupo de incompatibilidad detectado a través de las metodologías de biología molecular (IncW). Sin embargo, las muestras de metagenomas eran tapetes microbianos y fueron tomadas de sitios diferentes respecto a las muestras utilizadas para la búsqueda de plásmidos por métodos de biología molecular. Por ende, la vinculación de estos dos eventos no sería útil de discutir. Sería bueno utilizar las mismas muestras para poder comparar entre ambas técnicas y así evaluar su poder de resolución.

Se trató de confirmar que las proteínas encontradas a través del programa BLAST+ fueran realmente replicasas de los distintos grupos de incompatibilidad. Para esto se utilizó, por un lado, el límite en el E-value de 1×10^{-5} , que a diferencia del parámetro "Identidad" toma en cuenta el largo de nuestra *query*. Así, se calcula la probabilidad de encontrar un *hit* por azar en nuestra base de datos. Además, se buscó el contexto genómico de cada secuencia encontrada. En la mayoría de los casos se lograron encontrar genes vinculados a plásmidos, lo cual nos permitiría afirmar que los *contigs* en los cuales se encontraron los genes de las proteínas iniciadoras de la replicación, corresponden a secuencias de ADN plasmídico. Otra herramienta que se podría haber utilizado para ser más concluyente en cuanto a la función es la búsqueda de dominios conservados. Esto se puede llevar a cabo comparando los ORFs de cada replicasa encontrada con la base de datos *Conserved Domain Database (CDD)* ⁶⁹, lo cual se realizó para algunos resultados pero no de manera sistemática. Con esta herramienta se podrían encontrar dominios conservados y clasificar las proteínas en familias. En este caso deberían presentar motivos de unión a ADN como dominios hélice-vuelta-hélice o cierre de Leucinas. Otra estrategia que podría arrojar luz en este sentido sería realizar búsquedas a través de psi-BLAST. Este tipo de BLAST se basa en la generación de un perfil a partir de proteínas homólogas que tienen una identidad determinada. Este perfil está compuesto por los aminoácidos conservados en todas las proteínas encontradas y por ende por los aminoácidos que se encuentran conservados para cumplir determinada función ⁷⁰.

Por otra parte, al observar el árbol filogenético obtenido para las secuencias de proteínas Rep del grupo IncP-9, resulta interesante la disposición en *clusters* de las secuencias de dichas proteínas y que cada uno de estos esté formado principalmente por proteínas encontradas en los mismos

metagenomas. Esto podría ser una evidencia de la evolución de la secuencia de los genes codificantes de replicasas. En muestras antárticas, el estrés generado por la exposición a radiación ultravioleta podría generar mayores tasas de mutación que las normales. Este hecho podría afectar estos genes ⁷¹, que al estar codificados en plásmidos se replican mayor cantidad de veces por ciclo celular que los genes codificados en el cromosoma. Así, tendrían mayor probabilidad de generar errores en la replicación.

Si tenemos en cuenta que estas proteínas por lo general presentan un dominio de interacción con el ADN (Hélice-vuelta-hélice) y otro dominio de interacción con las proteínas del hospedero que intervienen en la replicación del plásmido, la aparición de cambios en la secuencia de las replicasas podría implicar cambios importantes a nivel biológico. De hecho, en algunos trabajos se logró demostrar que mutaciones en el gen *repA*, que codifica para la proteína iniciadora de la replicación del plásmido pPS10, generaban un cambio en el espectro de hospedero ⁷². El mismo pasaba de no replicarse en *E. coli* a heredarse establemente luego de estas mutaciones. También observaron que éstas generaban cambios en la interacción con proteínas codificadas en el genoma del nuevo hospedero y que cumplen roles en el proceso de replicación. En este mismo sentido, Sota *et al* (2010) encontraron que la adaptación de replicones de tipo IncP a nuevos hospederos ocurría a través de mutaciones puntuales en el gen *trfa2*, que codifica para la proteína iniciadora de la replicación en este tipo de plásmidos ⁷³. A su vez, estas mutaciones también generaron cambios en el número de copias de estos replicones. Ambos trabajos fueron realizados *in vitro* y en presencia de diferentes presiones selectivas. Sería de interés comprobar si en ambientes naturales también ocurren este tipo de cambios evolutivos, a través de los cuales el número de copias y el espectro de hospedero de plásmidos podría ser algo variable y adaptable a diferentes situaciones. Tener esta información sería de gran interés, por ejemplo, en la lucha contra la dispersión de genes de resistencia a antibióticos. Para ello podría resultar interesante evaluar diferencias en las funciones biológicas (número de copias y espectro de hospedero) de las proteínas dentro de un *cluster* generado con secuencias del mismo metagenoma.

Por otra parte, se observó que la búsqueda a través de BLAST también recuperó secuencias de replicasas de otros grupos de incompatibilidad, como las del grupo IncP-7, que se encuentran dispuestas en el extremo opuesto del árbol. Aún se desconoce a nivel aminoacídico cuáles son exactamente los residuos que determinan la pertenencia o no a un grupo de incompatibilidad. Esto genera que la clasificación de los replicones, contando únicamente con la información de la secuencia, sea una tarea difícil y proclive a generar errores. Por ello, el criterio tomado para clasificación fue únicamente el de la ubicación dentro del *cluster*. Aquellas secuencias que se ubican cercanas al *cluster* pero no dentro del mismo no las podemos clasificar como pertenecientes a IncP-

9. Este criterio de clasificación nos genera que únicamente 3 secuencias puedan ser consideradas de este grupo de incompatibilidad y solamente al tener en cuenta a pGLE121P1, un plásmido que ha sido secuenciado a partir de un aislamiento de *Pseudomonas* del glaciar Ecology en la Isla Rey Jorge. Este ha sido catalogado como perteneciente al grupo IncP-9 a través de test de incompatibilidad ⁵⁸.

Al igual que las tres secuencias que encontramos en los metagenomas 8 y 9, la secuencia de la proteína Rep de pGLE121P1 no puede ser clasificada dentro de los subgrupos descritos para IncP-9 hasta el momento. Esto nos da la idea de que estos subgrupos, si bien clasifican de forma coherente los replicones de IncP-9, aún no son suficientes como para representar la diversidad de plásmidos de este grupo que existen en la naturaleza. Si a esto le agregamos lo que se discutió anteriormente de que estos genes podrían encontrarse bajo presiones evolutivas que los hicieran variar su secuencia, puede complejizar aún más la clasificación de replicones basada únicamente en la secuencia de proteínas iniciadoras de la replicación.

La conjunción de ambas partes del trabajo nos permite decir que si bien por técnicas de laboratorio no nos fue fácil la detección de plásmidos en las muestras estudiadas, pudimos ver que se puede deber a un problema de concentraciones. Esto se puede solucionar cultivando en presencia de presiones selectivas como antibióticos, que generen un enriquecimiento en aquellas células que tienen determinantes de resistencia que puedan estar codificados en plásmidos. La otra limitante que observamos es que a través del uso de cebadores generados en base a secuencias previamente descritas, podemos estar perdiéndonos la diversidad real de plásmidos que hay en esas muestras. Una forma de evitar esto es a través del uso de técnicas metagenómicas que no introduzcan grandes sesgos en la detección. La desventaja que presenta esta técnica es que no se contará con otra información que la secuencia de estos plásmidos, lo cual no permite otro tipo de estudios a nivel de función de esas secuencias encontradas, como podrían ser los test de incompatibilidad.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se logró detectar la presencia de replicones del grupo IncW en la muestra obtenida de un sitio con gran impacto del ser humano, como lo es el suelo cercano a la cámara séptica de la BCAA. Además, se logró capturar un plásmido a partir de la misma muestra, el cual aún no había sido secuenciado. Este, a pesar de ser un plásmido pequeño (4478 pb), contiene dos genes que codifican para la resistencia a dos antibióticos diferentes. La identificación de ambos replicones se logró realizar a través de la incubación de las muestras en medios de cultivos con antibióticos. En el resto de las muestras no se lograron detectar replicones tanto por métodos dependientes como independientes de cultivo. La selección en medios con antibióticos resultó una buena estrategia para aumentar la proporción de ciertos plásmidos en la muestra.

La estrategia utilizada para la búsqueda de plásmidos en metagenomas nos permitió detectar la presencia de los replicones IncW, IncN e IncP-9 en muestras de diferentes sitios del continente. Además, en algunos casos, se logró observar las características fenotípicas asociadas a cada replicón. Los metagenomas 10, 12 y 14, provenientes de la zona Dry Valley, fueron los que presentaron el mayor número de los replicones buscados. Por otra parte, se lograron clasificar replicones del grupo IncP-9 utilizando algunos plásmidos de referencia. Tres de estos replicones podemos asegurar que pertenecen al grupo IncP-9, sin embargo no se pueden sub-clasificar en ninguno de los subgrupos que existen descritos hasta el momento.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**, 711–721 (2005).
2. Soucy, S. M., Huang, J. & Gogarten, J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 472–482 (2015).
3. Jain, R., Rivera, M. C. & Lake, J. A. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3801–6 (1999).
4. Ochman, H., Lawrence, J. G. & Groisman, E. a. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**, 299–304 (2000).
5. Doolittle, W. F. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science* **284**, 2124–2129 (1999).
6. Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. & Toussaint, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat.Rev.Microbiol.* **3**, 722–732 (2005).
7. Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. & de la Cruz, F. Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**, 434–452 (2010).
8. Samuels, Lacey. Lanka, Erich and Davies, J. Conjugative junctions in RP4-mediated mating of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **182**, 2709–2715 (2000).
9. Chatteraj, D. K. Control of plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol. Microbiol.* **37**, 467–476 (2000).
10. del Solar, G. & Espinosa, M. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol. Microbiol.* **37**, 492–500 (2000).
11. Ross, D. & Thomas, M. Review Article Active partitioning of bacterial plasmids. (2016).
12. Hayes, F. Toxins-Antitoxins: Plasmid Maintenance, Programmed Cell Death, and Cell Cycle Arrest. *Science (80-.).* **301**, 1496–1499 (2003).
13. Magnuson, R. D. Hypothetical functions of toxin-antitoxin systems. *J. Bacteriol.* **189**, 6089–6092 (2007).
14. Novick, R. P. Plasmid incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381–395 (1987).
15. Jensen, L. B. *et al.* A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods* **80**, 25–43 (2010).
16. Palmer, K. L., van Schaik, W., Willems, R. J. L. & Gilmore, M. S. Enterococcal Genomics. *Enterococci From Commensals to Lead. Causes Drug Resist. Infect.* 1–50 (2014). doi:NBK190425 [bookaccession]
17. Francia, M. V. *et al.* A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 79–100 (2004).
18. Novick, R. P. Plasmid Incompatibility. *Microbiol. Rev.* **51**, 381–395 (1987).
19. Projan, S. J. & Novick, R. P. Incompatibility between plasmids with independent copy control. *MGG Mol. Gen. Genet.* **204**, 341–348 (1986).
20. Novick, R. P. & Hoppensteadt, F. C. On plasmid incompatibility. *Plasmid* **1**, 421–434 (1978).

21. Austin, S. & Nordström, K. Partition-mediated incompatibility of bacterial plasmids. *Cell* **60**, 351–354 (1990).
22. Datta, N. & Hedges, R. Compatibility group among ϕ -R factors. *Nature* **234**, 222–3 (1971).
23. Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L. & Maas, W. K. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* **52**, 375–395 (1988).
24. Carattoli, A. *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* **63**, 219–228 (2005).
25. Götz, A. *et al.* Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2621–2628 (1996).
26. Holmsgaard, P. N., Sørensen, S. J. & Hansen, L. H. Simultaneous pyrosequencing of the 16S rRNA, IncP-1 trfA, and merA genes. *J. Microbiol. Methods* **95**, 280–284 (2013).
27. Sentchilo, V. *et al.* Community-wide plasmid gene mobilization and selection. *ISME J.* **7**, 1173–86 (2013).
28. Abeles, A. L., Snyder, K. M. & Chatteraj, D. K. P1 plasmid replication: Replicon structure. *J. Mol. Biol.* **173**, 307–324 (1984).
29. Stalker, D. M., Thomas, C. M. & Helinski, D. R. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Mol. Gen. Genet.* **181**, 8–12 (1981).
30. McEachern, M. J., Filutowicz, M. & Helinski, D. R. Mutations in direct repeat sequences and in a conserved sequence adjacent to the repeats result in a defective replication origin in plasmid R6K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 1480–1484 (1985).
31. Brendler, T. G., Abeles, A. L., Reaves, L. D. & Austin, S. J. The iteron bases and spacers of the P1 replication origin contain information that specifies the formation of a complex structure involved in initiation. *Mol. Microbiol.* **23**, 559–567 (1997).
32. Doran, K. S., Konieczny, I. & Helinski, D. R. Replication Origin of the Broad Host Range Plasmid RK2. *Biochemistry* **273**, 8447–8453 (1998).
33. Konieczny, I. & Helinski, D. R. Helicase delivery and activation by DnaA and TrfA proteins during the initiation of replication of the broad host range plasmid RK2. *J. Biol. Chem.* **272**, 33312–33318 (1997).
34. Kawasaki, Y., Matsunaga, F., Kano, Y., Yura, T. & Wada, C. The localized melting of mini-F origin by the combined action of the mini-F initiator protein (RepE) and HU and DnaA of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 42–49 (1996).
35. Doran, K. S., Helinski, D. R. & Konieczny, I. Host-dependent requirement for specific DnaA boxes for plasmid RK2 replication. *Mol. Microbiol.* **33**, 490–498 (1999).
36. Bowers, L. M., Krüger, R. & Filutowicz, M. Mechanism of Origin Activation by Monomers of R6K-encoded ϕ Protein. *J. Mol. Biol.* **368**, 928–938 (2007).
37. Díaz-López, T. *et al.* Structural changes in RepA, a plasmid replication initiator, upon binding to origin DNA. *J. Biol. Chem.* **278**, 18606–18616 (2003).
38. Sharma, S. *et al.* Plasmid P1 RepA Is Homologous to the F Plasmid RepE Class of Initiators. *J. Biol. Chem.* **279**, 6027–6034 (2004).
39. Giraldo, R., Fernández-tornero, C., Evans, P. R., Díaz-orejas, R. & Romero, A. A conformational switch between transcriptional repression and replication initiation in the RepA dimerization

- domain. **10**, 565–571 (2003).
40. Ishiai, M., Wada, C., Kawasaki, Y. & Yura, T. Replication initiator protein RepE of mini-F plasmid: functional differentiation between monomers (initiator) and dimers (autogenous repressor). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 3839–43 (1994).
 41. Vocke, C. & Bastia, D. The replication initiator protein of plasmid pSC101 is a transcriptional repressor of its own cistron. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 2252–6 (1985).
 42. Smith, J. J., Tow, L. A., Stafford, W., Cary, C. & Cowan, D. A. Bacterial diversity in three different antarctic cold desert mineral soils. *Microb. Ecol.* **51**, 413–421 (2006).
 43. Yergeau, E., Newsham, K. K., Pearce, D. A. & Kowalchuk, G. A. Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environ. Microbiol.* **9**, 2670–2682 (2007).
 44. Hernández, J. *et al.* Human-associated extended-spectrum ??-lactamase in the Antarctic. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2056–2058 (2012).
 45. Rabbia, V. *et al.* Antibiotic resistance in Escherichia coli strains isolated from Antarctic bird feces, water from inside a wastewater treatment plant, and seawater samples collected in the Antarctic Treaty area. *Polar Sci.* **10**, 123–131 (2016).
 46. Antelo, V., Romero, H. & Batista, S. Detection of integron integrase genes on King George Island, Antarctica. *Adv. Polar Sci.* **26**, 30–37 (2015).
 47. Peter, H., Braun, C., Janowski, S., Nordt, A. & Stelter, M. The current environmental situation and proposals for the management of the Fildes Peninsula Region. 195 (2013).
 48. Yakimov, M. M. *et al.* Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* **49**, 419–432 (2004).
 49. Martínez-Rosales, C., Fullana, N., Musto, H. & Castro-Sowinski, S. Antarctic DNA moving forward: Genomic plasticity and biotechnological potential. *FEMS Microbiol. Lett.* **331**, 1–9 (2012).
 50. Smalla, K. *et al.* Increased abundance of IncP-1 β plasmids and mercury resistance genes in mercury-polluted river sediments: First discovery of IncP-1 β plasmids with a complex mer transposon as the sole accessory element. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7253–7259 (2006).
 51. Imperio, T., Bargagli, R. & Marri, L. Detection of IncP replicon-specific regions in DNA from Antarctic microbiota. *Open Life Sci.* **2**, 378–384 (2007).
 52. Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O ’donnell, A. G. & Bailey, M. J. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5488–5491 (2000).
 53. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**, 2725–2729 (2013).
 54. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–10 (1990).
 55. Aziz, R. K. *et al.* The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* **9**, 75 (2008).
 56. Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**, 221–224

- (2010).
57. Edgar, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).
 58. Dziewit, L. *et al.* Sequence determination and analysis of three plasmids of *Pseudomonas* sp. GLE121, a psychrophile isolated from surface ice of Ecology Glacier (Antarctica). *Plasmid* **70**, 254–262 (2013).
 59. Carattoli, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2227–2238 (2009).
 60. Delille, D. & Gleizon, F. Distribution of enteric bacteria in Antarctic seawater surrounding the Port-aux-Français permanent station (Kerguelen Island). *Mar. Pollut. Bull.* **46**, 1179–1183 (2003).
 61. Sjöling, S. & Cowan, D. a. Detecting human bacterial contamination in Antarctic soils. *Polar Biol.* **23**, 644–650 (2000).
 62. Statham, J. a. & McMeekin, T. a. Survival of faecal bacteria in Antarctic coastal waters. *Antarct. Sci.* **6**, 333–338 (1994).
 63. Hughes, K. a. & Nobbs, S. J. Long-term survival of human faecal microorganisms on the Antarctic Peninsula. *Antarct. Sci.* **16**, 293–297 (2004).
 64. Aminov, R. I. Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front. Microbiol.* **2**, 1–19 (2011).
 65. Cesareni, G., Helmer-Citterich, M. & Castagnoli, L. Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet.* **7**, 230–5 (1991).
 66. Lin-Chao, S. & Cohen, S. N. The rate of processing and degradation of antisense RNA regulates the replication of ColE1-type plasmids in vivo. *Cell* **65**, 1233–1242 (1991).
 67. Smorawska, M. *et al.* Mobilizable narrow host range plasmids as natural suicide vectors enabling horizontal gene transfer among distantly related bacterial species. *FEMS Microbiol. Lett.* **326**, 76–82 (2012).
 68. Vignoli, R. *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum beta-lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2940–3 (2005).
 69. Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD: A Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res.* **33**, 192–196 (2005).
 70. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PS I-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389–3402 (1997).
 71. Foster, P. L. Stress Responses and Genetic variation in bacteria. *Mutat. Res.* **569**, 3–11 (2000).
 72. Maestro, B., Sanz, J. M., Díaz-Orejas, R. & Fernández-Tresguerres, E. Modulation of pPS10 host range by plasmid-encoded RepA initiator protein. *J. Bacteriol.* **185**, 1367–1375 (2003).
 73. Sota, M. *et al.* Shifts in the host range of a promiscuous plasmid through parallel evolution of its replication initiation protein. *ISME J.* **4**, 1568–80 (2010).

8. ANEXO

Tabla 1. Información de ORFs encontrados de replicasas del grupo IncN.

Grupo	Metagenoma	Contig	Largo	RAST's ORFs	Contig BLASTn	Q cover, Ident, E-value
IncN	7 (Esperanza) 63° 24'280"S 56° 59'825"W	150_2 845	4627	-Phd antitoxin #A. -Doc toxin. HP (4)	Plasmid pRGRH1852	45% 68% 4e-103
IncN	14 163° 05.511" W 77° 39.66" S	150_3 866	6125	-VapD (virulence protein) HP (8)	Plasmid pRGRH1852	48% 79% 2e-176
IncN	14 163° 05.511" W 77° 39.66" S	150_3 922	6072	-RelE/StbE -RelB/StbD -TrfA-related protein. HP (5)	Plasmid pRGRH1852	48% 83% 0.0

Tabla 2. Información de ORFs encontrados de replicasas del grupo IncW

Grupo	Metagenoma	Contig	Largo	RAST's ORFs	Contig BLASTn	Query cover, Identity, E-value
IncW	10	150_8438 26.52% 1e-49 3-545	1648	-ParA partitioning protein. HP (1)	pFLIM02 plasmid.	37% 70% 5e-65
IncW	10	150_5680 36.31% 8e-42 976-1926	2411	-IncW-like Rep protein -Phenylalanine-4- hydroxylase. HP (1)	Polaromonas naphthalenivorans CJ2, complete genome.	25% 79% 2e-149
IncW	9	150_3330 24.84% 8e-17	4486	-ParA -IncW-like Rep protein -DNA primase (EC 2.7.7) HP (2)	Plasmid pSLIN03.	35% 74% 0,0
IncW	10 163° 55'049" W	150_1084	14545	(21) -Type III restriction modification system. -partitioning protein ParA. -Phage DNA bindingprotein. -IncW-like replication protein.	Plasmid pXAC33.	12% 78% 8e-118

IncW	10	150_617	10472	(8) – Serine Protease. - Mobile element protein. - IncW-like Rep protein. - ParA Phage DNA invertase.	Plasmid pCHQ1.	34% 77% 0,0
IncW	10	150_80	39297	(32) – Transcriptional regulator, AraC family - Lytic transglycosylase - Plasmid replication protein RepA - partitioning protein ParB - Integrase-like protein - GTP pyrophosphokinase - Type II restriction enzyme, methylase subunits - DNA double-strand break repair Rad50 ATPase - DNA repair exonuclease family protein YhaO	Thioalkalivibrio sp. K90mix, complete genome.	4% 69% 8 e-171
IncW	12	150_29	31399	(43) –Conjugal transfer protein TraA -RelB/StbD replicon stabilization protein (antitoxin to RelE/StbE) - RelE/StbE replicon stabilization toxin. - DNA-damage-inducible protein. - YafQ toxin protein - Transcriptional regulator, Cro/Ci family - Permease of the drug/metabolite transporter (DMT) superfamily - DNA-invertase - Tyrosine recombinase XerC. - putative phospholipase protein. - Multidrug resistance transporter, Bcr/CfiA family. - Conjugal transfer protein TrbE - Growth inhibitor - IncW-like replication protein Alpha-helical coiled coil protein	Polaromonas naphthalenivorans CJ2 plasmid pPNAP05.	7% 75% 6e-174

IncW	10	150_3180	3745	(5) IncW like Rep protein	Gluconobacter oxydans H2, complete genome.	17% 75% 3e-117
IncW	10	150_11428	1160	-	-	-
IncW	9	150_12353	851	-	Thauera sp. MZ1T plasmid pTha01.	39% 67% 3e-8
IncW	1 Drake	150_5244	1241	-	Ralstonia mannitolilytica, plasmid pRMAN01.	20% 70% 1e-20

Tabla 3. Información de ORFs encontrados de replicasas del grupo IncP-9.

Grupo	Metagenoma	Contig	Largo	RAST's ORFs	ORFs BLASTp	Qcover E-value Id.
IncP-9	10	150_1668	5744	Mobilization protein, HTH motif, putative membrane protein, replication protein. Mobilization protein (10)	replication protein [Acidiphilium multivorum]	90 70 6e-91
IncP-9	10	150_680	9923	Resolvasa N-terminal, putative phage encoded peptidoglycan binding protein, Replication protein, mobilization protein (17)	replication protein [Sphingobium xenophagum]	90 54 2e-65
IncP-9	12	150_1724	5940	Mobilization protein BmgA, hypothetical proteins (7)	Firmicute plasmid replication protein (Repl)	67 36 1e-19
IncP-9	10	150_1953	5210	Hypothetical protein. Replication protein (7)	firmicute plasmid replication protein Repl	78 38 7e-24
IncP-9	10	150_1981	5168	Mob protein BmgA, Mob protein BmgB, replication protein (8)	Firmicute plasmid replication protein (Repl)	76 35 1e-23
IncP-9	10	150_2795	4091	Putative metal-dependent membrane protease, Replication protein, hypothetical protein (6)	replication protein [Sphingomonas taxi]	100 95 2e-70
IncP-9	10	150_3304	3642	Hypothetical protein (5)	replication protein [Fibrisoma limi]	92 69 1e-74
IncP-9	10	150_3641	3428	Phage capsid proteins, hp (3)	replication protein [Fibrisoma limi] (Repl)	98 72 3e-79
IncP-9	9	150_3755	4024	Conjugal transfer protein traA, hp (5)	plasmid replication initiation protein [Aeromonas caviae]	66 39 4e-24
IncP-9	9	150_4371	3476	Replication protein, mobilization protein, hp (4)	replication protein [Acetobacter malorum]	82 60 2e-72

IncP-9	9	150_6397	2327	Hp (2)	replication protein [Fibrisoma limi]	75 41 1e-30
IncP-9	14	150_8320	3003	Mob 421 protein, Replication protein, hp (4)	replication protein [Fibrisoma limi]	96 72 4e-80
IncP-9	14	150_1426	12155	Hypothetical protein (7) TrsE protein	RepB plasmid replication protein [Planomicrobium glaciei]	66 33 6e-26
IncP-9	14	150_1474	11887	TrsE like protein H. P. (8)	Protein involved in initiation of plasmid replication [Azotobacter beijerinckii]	70 29 2e-24
IncP-9	14	150_8790	2823	RepA H.P (2)	initiator RepB protein [Labilibacter aurantiacus]	86 56 8e-123
IncP-9	14	150_8886	2789	RepA H.P. (2)	initiator RepB protein [Labilibacter aurantiacus]	96 53 1e-119
IncP-9	12	150_1724	5940	H.P. (5) BmgA Mob. protein	replication protein [Fibrisoma limi]	72 52 2e-44
IncP-9	12	150_2301	5097	KfrA protein RepB initiator protein H.P. (4)	Initiator Replication protein [Paracoccus aminovorans]	87 67 2e-113
IncP-9	12	150_4329	3409	Mobile element Prot. DUF829 Unknown Function HP (1)	RepB family plasmid replication initiator protein [Methylomicrobium buryatense]	89 48 8e-83
IncP-9	12	150_4436	3351	ParA HP (5)	RepB family plasmid replication initiator protein [Methylobacter whittenburyi]	95 61 2e-116
IncP-9	12	150_6467	2618	HP (2)	RepB family plasmid replication initiator protein [Aureimonas sp. AU20]	83 75 2e-19
IncP-9	12	150_8108	2186	Rep protein HP (2)		
IncP-9	10	150_1271	6831	HP (9) TraA RepB Phage PBP	replication protein RepB [Sphingomonas sp. PAMC 26617]	92 78 0
IncP-9	10	150_1668	5744	Mobilization Prot. HTH motif Rep Prot. Put. Membrane protein HP (4)	replication protein [Acidiphilium multivorum]	90 70 2e-78
IncP-9	10	150_2127	4930	Rep protein RelE/stbE stabilization system SodM Superoxide dismutase HP (7)	initiator RepB protein [Spirosoma panaciterrae]	95 86 0
IncP-9	10	150_6073	2277	HP(2) RelE StbE stabilization system	initiator RepB protein [Spirosoma panaciterrae]	93 0 90

IncP-9	10	150_3304	3642	HP (5)	replication protein [Fibrisoma limi]	91 2e-74 69
IncP-9	10	150_733	9583	RepA HP (14)	RepB family plasmid replication initiator protein [Spirosoma panaciterrae]	96 0 90
IncP-9	10	150_901	8499	Replication Prot. ReIE StbE stabilization system HP (15)	RepB family plasmid replication initiator protein [Spirosoma spitsbergense]	100 0 96
IncP-9	9	150_1131	10591	Conserved transmembrane domain, transcriptional regulator Crp/Fnr, RepB, Two-component sensor histidine-kinase, ParA, Chloride channel protein, Flavohemoglobin, HP (1)	RepB family plasmid replication initiator protein [Hymenobacter sp. DG25B]	88 0 78
IncP-9	9	150_1462	8760	YoeB toxin protein, Replication protein, mobilization protein, HP (6)	Initiator Replication protein [Hymenobacter psychrophilus]	96 1e-167 76
IncP-9	9	150_1588	8217	repA, ParA, Mobile element protein, Retron-type RNA-directed DNA polymerase, HP (8)	RepB family plasmid replication initiator protein [Spirosoma spitsbergense]	94 6e-87 42
IncP-9	9	150_2049	6665	Replication Protein, HP (5)	RepB family plasmid replication initiator protein [Hymenobacter sp. CCM 8643]	91 2e-161 70
IncP-9	9	150_2356	5981	Replication initiator protein, DNA topoisomerase III, HP (3)	RepB family plasmid replication initiator protein [Runella limosa]	92 2e-44 34
IncP-9	9	150_2521	5691	repA, putative predicted metal-dependent hydrolase, type I restriction-modification system, HP (2)	RepB family plasmid replication initiator protein [Spirosoma spitsbergense]	96 1e-156 60
IncP-9	9	150_2653	5483	ParA, Plasmid replication initiator protein, Mobile element protein, HP (2)	RepB family plasmid replication initiator protein [Hymenobacter sp. IS2118]	95 1e-139 57
IncP-9	9	150_2690	5429	Mobile element protein, Replication initiator protein, HP (2)	RepB family plasmid replication initiator protein [Spirosoma luteum]	87 7e-77 37
IncP-9	9	150_3115	4763	Mobilization Protein B, HP (3)	initiator RepB protein [Spirosoma panaciterrae]	97 2e-175 76
IncP-9	9	150_3143	4720	ParA, Replication initiator protein, HP (2)	RepB family plasmid replication initiator protein [Hymenobacter sp. AT01-02]	89 2e-119 51

IncP-9	9	150_3513	4277	HP (2)	Initiator Replication protein [Spirosoma endophyticum]	91 8e-55 32
IncP-9	9	150_379	23765	Beta-lactamase class C, Type II restriction enzyme, repA, two-component system response regulator, nucleotide binding protein (DNA uptake), probable DNA methylase, short chain oxydoreductase dehydrogenase/reductase family, HP (7)	RepB family plasmid replication initiator protein [Spirosoma luteum]	90 7e-160 64
IncP-9	9	150_5813	2580	repA, HP (4)	initiator RepB protein [Labilibacter aurantiacus]	92 3e-120 53
IncP-9	9	150_6211	2404	Replication initiator protein, HP (2)	RepB family plasmid replication initiator protein [Spirosoma panaciterrae]	95 0 80
IncP-9	9	150_651	16429	ParA, Mobile element protein, plasmid replication initiator, Mobile element protein, ankyrin like protein, Phospholipase, ClpB protein, Rhs protein, VgrG protein, HP (10)	RepB family plasmid replication initiator protein [Hymenobacter sp. IS2118]	94 3e-135 55
IncP-9	9	150_668	16091	blI5010 resolvase, Aspartyl tRNA amidotransferase subunit A, ParA, Plasmid replication initiation protein, Nuclease NucA homolog, mobile element protein, HP (14)	RepB family plasmid replication initiator protein [Hymenobacter sp. APR13]	93 2e-124 51
IncP-9	9	150_693	15659	Asparagine synthetase, Serine kinase of the Hpr family, Arylsulfatase, putative RepA, endonuclease phosphatase family protein, nutrient binding protein, HP (9)	RepB family plasmid replication initiator protein [Spirosoma spitsbergense]	90 0 61
IncP-9	9	150_696	15641	Nutrient binding protein (membrane protein), Glycosyl hydrolase BNR repeat precursor, repA, conjugative transposon protein TraA, HP (1)	RepB family plasmid replication initiator protein [Spirosoma spitsbergense]	93 9e-160 55
IncP-9	8	150_6885	2747	Replication protein, HP (2)	replication protein [Pseudomonas sp. Ant30-3]	75 6e-25 40
IncP-9	8	150_7961	2439	Replication protein, HP (1)	replication protein [Acidithiobacillus thiooxidans]	91 2e-29 39

IncP-9	8	150_9445	2121	Replication protein, HP (3)	replication protein [Acidiferrobacter thiooxydans]	92 8e-71 60
IncP-9	14	150_9589	2543	Plasmid partitioning protein ParA, Replication protein hp, (3)	plasmid replication initiation protein [Pseudomonas fragi]	71 31 8e-23

- IncP-1 e IncQ no dieron hits

Secuencia completa del plásmido obtenido

>Plásmido1

TACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
 CCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA
 GATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTGCC
 GGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTC
 TAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTG
 TTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA
 AGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAA
 CTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCC
 GGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATA
 GTCCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATG
 GAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGCTTTTGTGCTCACATGTTCTTCTGC
 GTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGA
 CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGT
 TGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATT
 AATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAAT
 TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGGTACCGAGCTCGG
 ATCCACTAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGCCCTTGTGCGCAGCTGCTTGGCTTCCGTTTCGATCGC
 CTGAGTTTCATGGCAAATCGCCTCGTCGAGCTGTTGGGGCTCTGTTGCACAAATGAGCTGACGGTCAGGGCTC
 CCCTTTCCCCCGGACAGCTTTATCCTACGGCTTCACTGACAGGGATTCCGAGCGCGGTGAAGCCGTTACAGGAC
 GGCCACACGAACCTGGAACCTCGGCGACCTGACGGTCAAGTCCCTCGCGGTGAGGCGTTGGCCCAAGAGTTT
 GACGCAATGCATCTTGGTTTCTGCGCGGCTTCGGCGGTGATAGCCGCTCCATCGTCGCCAGATGGTTTCGACCA
 AAGCGCCGCGATGCACGGAGGGCTTATTCCGTGCAATCGCCCCGGCGTCATCGGCCTTCCAGGGTTTAGCGT
 TCTTTCGGGGCGGGATGATCGCGGCTGCGCCGCGGGCGGCGATGGCGTCGTGGCACTTGCAGGGTGTGCAAG
 GCTCCGTCAGCGGTGACACTTGCATCTCCTGGTCCGGCGGGATCTGATCGAGAAGCTCAAGCAGCTGCCGA
 CAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCAATTCCGCC
 TATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCA
 ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTT
 CCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTGG
 TGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTT
 TCGCCACGTTCCGGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTA

CGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCCTGATAGACGGT
TTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACC
CTATCTTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATT
TAACAAAAATTTAACGGGGAATTTAACAAAATTCAGGGCGGCAAGGGCTGCTAAAGGAAGCGGAACACGTA
GAAAAGCCAGTCCGCAGAAACGGTGCTGACCCCGGATGAATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAA
AACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGGTAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTT
ATGGACAGCAAGCGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTAA
ACTGGATGGCTTTCTTGCCGCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATCAAGAGACAGGATGAG
GATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCG
GCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCC
CGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTG
GCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCAGTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCT
ATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCCCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCT
GATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACATCGCATCG
AGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTC
GCGCCAGCCGAACTGTTCCGCAAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGC
GATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTG
TGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTG
ACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGT
TCTTCTGAATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATT
TTGCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA
GTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAA
TGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGATTATCCCCTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGG
TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGC
ATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA
CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTG
GGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAAC
GTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGATGGAGGCG
GATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCG
GTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTA
CACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTA
GCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATA

ORFs anotados utilizando RAST

β-Lactamasa

Aminoglicósido fosfotransferasa

Transposasa ISS-po9

pUC oriV

Primers utilizados en cada ronda de secuenciación del plásmido

- 1- TCGGCCAGATCGTTATTCAGTA
- 2- ATCCATAGTTGCCTGAC
- 3- GTCGCCGAGTTCCAGGT
- 4- CCCTTGCCGCCCTGAAT
- 5- TCCTTTCGGTCCTCCCG

9. APÉNDICE

Lista de medios

LB (Luria Bertani)

NaCl 5 gr.
Bactotripton 5 gr.
Extracto levadura 3 gr.
Agar 18 gr.
Agua c.s.p. 1L

R2A (Reasoner's 2A)

Proteasa peptona 0.5 gr
Ácidos casamino 0.5 gr
Extractos de levadura 0.5 gr
Dextrosa 0.5 gr
Almidón Soluble 0.5 gr
Piruvato de Sodio 0.3 gr
K₂HPO₄ 0.3 gr
MgSO₄ 0.05gr
NaCl 3 gr
Agua C.s.p 1L
Agar 18 gr

Medio SOC

Extracto de levadura5 gr
Tryptona 20 gr
NaCl 0.584 gr
KCl 0.186 gr
MgSO₄ 2.4 gr

Soluciones y buffers utilizados

Soluciones para *minipreps*

Solución I GTE

50 mM Glucosa
10 mM EDTA
25 mM Tris-HCl pH= 8,00.

Solución II GTE

1M NaOH
1% SDS

Solución III GTE

Para 50ml:
30ml de 5M KOAC
5,75ml Ac. Acético Glacial
14,25ml de H₂O

Buffers

Buffer TE 1x

10 mM Tris HCl
1 mM EDTA
1L Agua
pH= 8,0

Buffer TAE 1x

11.42 ml Ácido acético
40 mM Tris
2 mM EDTA
1L Agua
pH= 7,6

Plásmidos utilizados como control

Hospedero	Plásmido	Grupo de incompatibilidad	Medio	Marcador de selección
<i>P. putida</i>	pM3	IncP-9 alfa	King B	Tetraciclina
<i>E. coli</i>	RP4	IncP-1 alfa	LB	Tetraciclina
<i>E. coli</i>	R388	IncW	LB	Trimetoprim
<i>E. coli</i>	RN3	IncN	LB	Tetraciclina
<i>E. coli</i>	RSF1010	IncQ	LB	Streptomycin

Cebadores utilizados para la secuenciación de amplicones.

M13f 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'

M13r 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

nptIIF5'-ATGATTGAACAAGATGGATTGC-3'

nptIIR5'-TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGG-3'

TOPO TA cloning kit

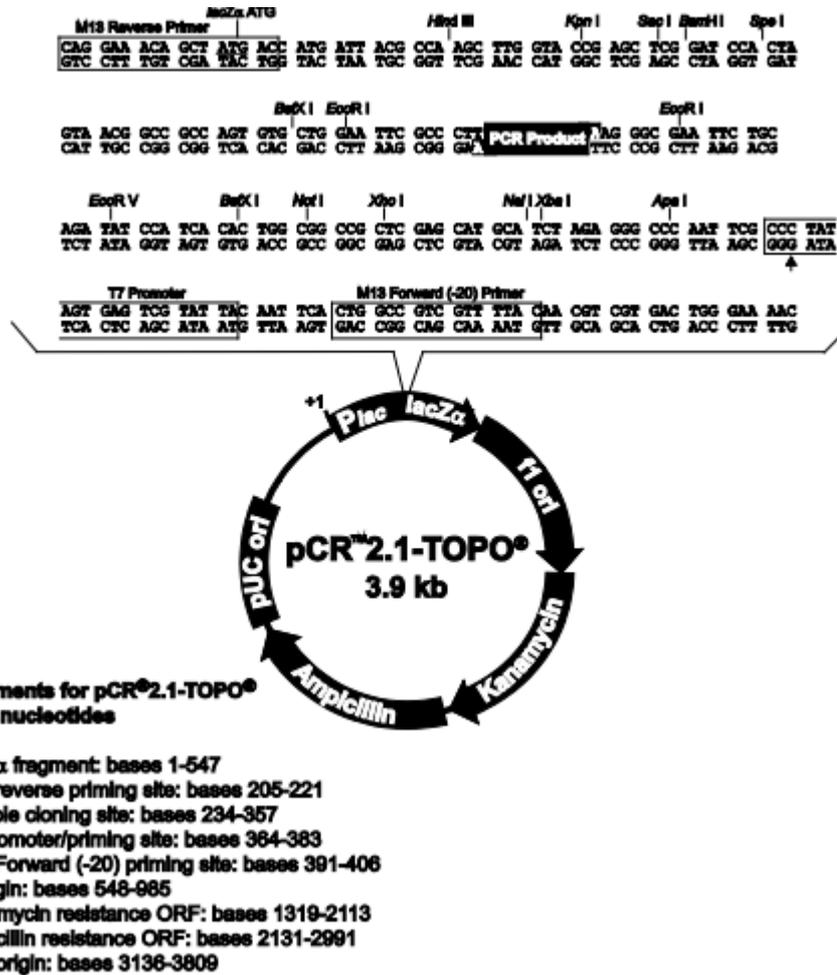


Fig. 13 Mapa del vector pCR™2.1-TOPO® utilizado para el clonado de productos de PCR.

Genotipo de la cepa utilizada para el clonado de productos de PCR incluida en el kit TOPO®TA

Escherichia coli TOP10

mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG