



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Sección Bioquímica y Biología Molecular



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

UDELAR fcien.edu.uy

Caracterización de la resistencia a metales pesados y búsqueda de integrines en cepas de *Delftia* sp.

Tesina de Grado

Licenciatura en Bioquímica

Bach. Fabiana Beatriz Sueiro Banhero

Orientador: Dra. Susana Castro Sowinski

Co-orientador: MSc. María Cecilia Martínez

Julio 2012

A mis padres

Tabla de contenidos

Resumen.....	6
1. Introducción.....	7
1.1 Metales pesados (MP)	7
1.2 Problemas de contaminación con Pb(II) y Cr(VI) en Uruguay.....	8
1.3 Mecanismos de toxicidad	9
1.3.1 Mecanismos de toxicidad de Cr	10
1.3.2 Mecanismos de toxicidad del Pb	11
1.4 Mecanismos de resistencia a MP	12
1.4.1 Exclusión de metales por barrera de permeabilidad.....	12
1.4.2 Eflujo de metales por transporte activo	12
1.4.3 Secuestro intracelular	14
1.4.4 Secuestro extracelular	14
1.4.5 Detoxificación enzimática de metales a una forma menos tóxica	14
1.4.6 Reducción de la sensibilidad de blancos celulares a metales	15
1.4.7 Otras formas de resistencia:	15
1.5 Co-resistencia de antibióticos y MP	15
1.6 Integrones.....	16
1.6.1 Definición.....	16
1.6.2 Estructura.....	16
1.6.3 Clasificación.....	18
1.6.4 Integrones móviles	18
1.6.5 Recombinación sitio específica	19
1.6.6 Integrones como mecanismos de resistencia	20
2. Hipótesis y Objetivos.....	21

2.1 Hipótesis de trabajo	21
2.2 Objetivos.....	21
2.1.1 Objetivo general	21
2.1.2 Objetivos específicos	21
3. Materiales y Métodos	22
3.1 Microorganismos utilizados en este trabajo.....	22
3.2 Medios de cultivo	22
3.3 Curvas de crecimiento: resistencia a metales pesados	23
3.3.1 Resistencia a Cr(VI)	23
3.3.2 Resistencia a Pb(II).....	23
3.4 Preparación de ADN	24
3.4.1 Purificación de ADN genómico.....	24
3.4.2 Lisados celulares.....	25
3.5 Búsqueda de integrones	25
3.5.1 Mezcla de PCR	25
3.5.2 Integrones de clase 1	26
3.5.3 Integrones de clase 2	28
3.5.4 Integrones de clase 3	28
3.5.5 Integrones cromosómico	28
3.5.6 Casetes asociados a integrones.....	28
3.5.7 Purificación de bandas de amplificación.....	29
3.5.8 Clonación de los fragmentos de amplificación	29
3.5.9 Transformación	31
3.5.10 Análisis de secuencia	32
4. Resultados	34
4.1 Curvas de crecimiento: resistencia a metales pesados	34
4.1.1 Resistencia a Cr(VI)	34

4.1.2 Resistencia a Pb(II).....	36
4.2 Búsqueda de integrones.....	37
4.2.1 Presencia de integrones por PCR.....	37
4.2.2 Análisis de secuencias.....	40
4.2.4 Búsqueda de casetes asociados a integrones.....	42
4.2.4.1 Amplificación por PCR.....	42
4.2.4.2 Identificación de casetes génicos.....	42
4.2.4.3 Análisis de secuencias.....	43
6. Discusión.....	45
7. Conclusiones y Perspectivas.....	47
8. Anexos.....	48
Anexo 1.....	48
Anexo 2.....	49
Anexo 3.....	50
9. Referencias.....	51

Resumen

Todos los componentes celulares, tanto en eucariotas como procariotas, son susceptibles al daño inducido por metales pesados. A nivel nacional, los metales pesados más relevantes por los casos de contaminación de conocimiento público son el cromo (Cr) y el plomo (Pb).

Los objetivos de esta tesina fueron determinar la resistencia a Cr(VI) y Pb(II), y la presencia de integrones en tres aislamientos de *Delftia* sp. (JD2, 3C y 6C) aislados de suelos contaminados con metales pesados.

Se realizaron curvas de crecimiento en medios de cultivo conteniendo concentraciones crecientes de Cr(VI) y Pb(II), determinando la turbidez a 620nm. La presencia de integrones se analizó mediante ensayos de PCR con cebadores específicos para las diferentes integrasas. Se analizó también la presencia de casetes génicos y se identificó el primero de ellos en uno de los aislamientos.

Los resultados obtenidos durante esta tesina muestran que los aislamientos de *Delftia* sp. poseen resistencia cruzada a Cr(VI) y Pb(II), y que todos fueron capaces de crecer hasta una concentración de Pb(II) de 0,3 mM. JD2 fue capaz de crecer hasta una concentración de 2 mM en Cr(VI), mientras que 3C y 6C crecieron hasta 1 mM. Además, se logró determinar la presencia de integrones de clase 1 para todos los aislamientos, y se caracterizó el primer gen del casete génico del aislamiento 3C, como una proteína de ensamblaje de fimbria de tipo 4.

Palabras claves: *Delftia*, integrones, cromo, plomo

1. Introducción

1.1 Metales pesados (MP)

Desde el punto de vista de la higiene ambiental y animal, el término MP se utiliza para denominar aquellos metales y semimetales que han sido asociados con contaminación y toxicidad/ecotoxicidad (Duffus, 2002). Los MP son contaminantes ambientales estables y persistentes ya que no pueden ser destruidos o degradados. La mayoría de los MP actúan como micronutrientes a muy bajas concentraciones, pero son tóxicos cuando éstas aumentan (Gagneten et al., 2007). Si bien los MP no pueden ser degradados, pueden ser transformados de un estado de oxidación a otro, o pueden formar complejos organometálicos también menos tóxicos (Agrawal et al., 2011).

Los MP pueden dividirse en tres grupos principales (Aguilar-Barajas et al., 2010):

- i) Micronutrientes catiónicos (cobre, cobalto, níquel y zinc)
- ii) Cationes tóxicos (cadmio, plomo, y mercurio)
- iii) Oxi-aniones tóxicos (arsénico, cromo y selenio)

Los MP tóxicos más conocidos son el mercurio (Hg), el plomo (Pb), el cromo (Cr), el cadmio (Cd) y el arsénico (As). En algunas ocasiones, algún no-metal como el selenio (Se) se considera también como un MP tóxico. A nivel nacional, los MP más relevantes por los casos de contaminación ocurridos (ver sección 1.2) son el Cr y el Pb.

El Cr es un oligoelemento esencial para los organismos vivos; en humanos potencia la acción de la insulina, favoreciendo su unión a los receptores en la superficie celular. Este metal existe en un amplio rango de estados de oxidación, desde -2 hasta +6. Mayormente, este metal está presente en su forma trivalente [Cr(III), su estado más estable] o en estado hexavalente [Cr(VI), actuando como agente altamente oxidante]. Ligeras elevaciones en los niveles de Cr(VI) provocan problemas ambientales y de salud debido a su elevada toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad (Barceloux et al., 1999; Cheung et al., 2007).

El Pb es un contaminante ambiental comúnmente encontrado en los suelos. A diferencia de otros metales, el Pb no tiene un rol biológico conocido, y es potencialmente tóxico para los organismos procariotas y eucariotas (Sobolev et al., 2008).

1.2 Problemas de contaminación con Pb(II) y Cr(VI) en Uruguay

En Uruguay, la Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA), dependiente del Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente (MVOTMA), es el organismo oficial encargado del monitoreo y control de los recursos naturales del país. En Montevideo, también el Departamento de Desarrollo Ambiental de la Intendencia Municipal de Montevideo (IMM) se encarga de tareas relacionadas al monitoreo de los recursos naturales del departamento (Morel et al., 2010).

Uruguay no dispone de una normativa nacional que regule la concentración de contaminantes en suelo, por lo cual se toman como valores guías los indicados por organismos internacionales como la EPA (Environmental Protection Agency, EPA – Estados Unidos de América) y el CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment, CCME, Canadá) (Grupo Ambiental de Montevideo 2007).

En nuestro país, el Cr se usa en la fabricación de pinturas, fundiciones metálicas, fabricación de productos químicos y en curtiembres. Todos estos sectores industriales generan residuos que en mayor o menor medida contienen Cr. En las curtiembres se generan efluentes líquidos que poseen alto contenido de Cr y materia orgánica, que son tratados y generan barros. Estos barros son vertidos en la red de saneamiento o son utilizados para rellenos sanitarios. Los restos de pinturas del proceso productivo de las mismas también se envían a rellenos sanitarios o son incinerados. Los residuos en los depósitos sanitarios pueden ser una importante fuente de contaminación humana, ya que usualmente sobre estos residuos se construyen viviendas de bajos recursos (DINAMA, 2005; Morel et al., 2009).

Las principales fuentes de contaminación por Pb en Uruguay son el uso de residuos industriales como rellenos de terrenos y la realización de actividades laborales contaminantes (por ej.: la quema de cables para recuperación del cobre, manejo de baterías, fundición artesanal del metal). También son contaminantes las

empresas tales como fundiciones y metalúrgicas funcionando en condiciones inadecuadas. Hasta hace unos años se sumaba las emisiones del tránsito vehicular, debido a que se usaba el tetraetilplomo como aditivo en los combustibles para aumentar el poder antidetonante. En el año 2004 mediante la ley N°17.775 se reglamentó que el contenido de Pb en los combustibles comercializados no debía superar los 13 mg/L. Es a través de estas fuentes de contaminación que el suelo se transforma en el depósito final del metal y por ende una importante vía de exposición humana. Las pinturas de pared a base de pigmentos con Pb y el agua potable (cuando las tuberías de abastecimiento y las conexiones son de Pb) también pueden ser una vía de contaminación en los hogares. En el año 2004, también mediante la ley N°17.775, se reglamentó el contenido de Pb en pinturas de uso decorativo (Grupo Ambiental de Montevideo 2007).

1.3 Mecanismos de toxicidad

Generalmente, los MP causan inactivación enzimática y daño celular, ya que actúan como antimetabolitos (sustancias que impiden un correcto metabolismo), forman precipitados o quelan metabolitos esenciales (Sobolev et al., 2008).

Todos los componentes celulares son susceptibles al daño inducido por MP. Por ejemplo, el magnesio (Mg) puede causar que la membrana celular pierda su funcionalidad. El hierro (Fe) y el cobre (Cu), pueden causar la destrucción de la membrana al catalizar la degradación oxidativa de lípidos, dando lugar a la formación de radicales libre. También en el citoplasma estos metales pueden catalizar la formación de radicales libres, altamente tóxicos para la célula (Rouch et al., 1995).

Las formas iónicas de los metales pesados pueden aumentar o disminuir la actividad y alterar la especificidad enzimática, así como inducir cambios conformacionales y formar enlaces estables con sitios activos de la enzima, entre otros efectos. Los iones metálicos también pueden producir daños en el ADN, al producir entrecruzamientos de las hebras de esta molécula, afectando así directamente la información contenida a nivel del mismo y disminuyendo la fidelidad de la síntesis de dicha molécula (Rouch et al. 1995).

1.3.1 Mecanismos de toxicidad de Cr

El Cr(VI) es considerado la forma más tóxica del Cr. Se encuentra usualmente asociado con el oxígeno en la forma de los aniones cromato (CrO_4^{-2}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$). El Cr(VI) es altamente soluble y por lo tanto móvil y biológicamente disponible en los ecosistemas. En contraste, el Cr(III) está presente en la forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos, es mucho menos móvil y se encuentra principalmente unido a materia orgánica en el suelo y ambientes acuáticos. El Cr(III) muestra una alta afinidad por los compuestos orgánicos resultando en la formación de complejos que precipitan como hidróxidos amorfos (Cervantes et al., 2001; Cheung et al., 2007).

La mayor parte de las células son impermeables al Cr(III), probablemente debido a que éste forma compuestos insolubles en soluciones acuosas no ácidas.

La toxicidad del Cr está relacionada con el proceso de absorción y reducción intracelular de Cr(VI). En condiciones fisiológicas normales, como se muestra en la Fig. 1.1, las células microbianas absorben Cr(VI) a través de los canales de transporte de sulfatos. En el interior celular, el Cr(VI) reacciona espontáneamente con reductores intracelulares como glutatión, ascorbato, y cisteína (entre otros). En estas reacciones se generan intermediarios de corta vida media, como Cr(V) o Cr(IV), radicales libres y finalmente el producto estable Cr(III). Todos estos productos participan en reacciones similares a las de Fenton (reacciones catalizadas por metales de transición, estos metales reaccionan junto con el peróxido de hidrogeno para dar lugar a la generación de radicales hidroxilo), produciendo cantidades significativas de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), que junto al Cr(III), provocan daño oxidativo en proteínas y son los candidatos a ocasionar daños al ADN (mutagénesis y carcinogénesis). Probablemente, la formación de Cr(V) es el principal factor implicado en la toxicidad de Cr (Stearns et al., 1994; Cervantes et al., 2001; Cheung et al., 2007).

Tanto el Cr(VI) como el Cr(III) son capaces de producir daños en el ADN coordinando interacciones entre macromoléculas, causando uniones ADN-proteínas, uniones ADN-ADN y cortes en las hebras de ADN (Stearns et al., 1994).

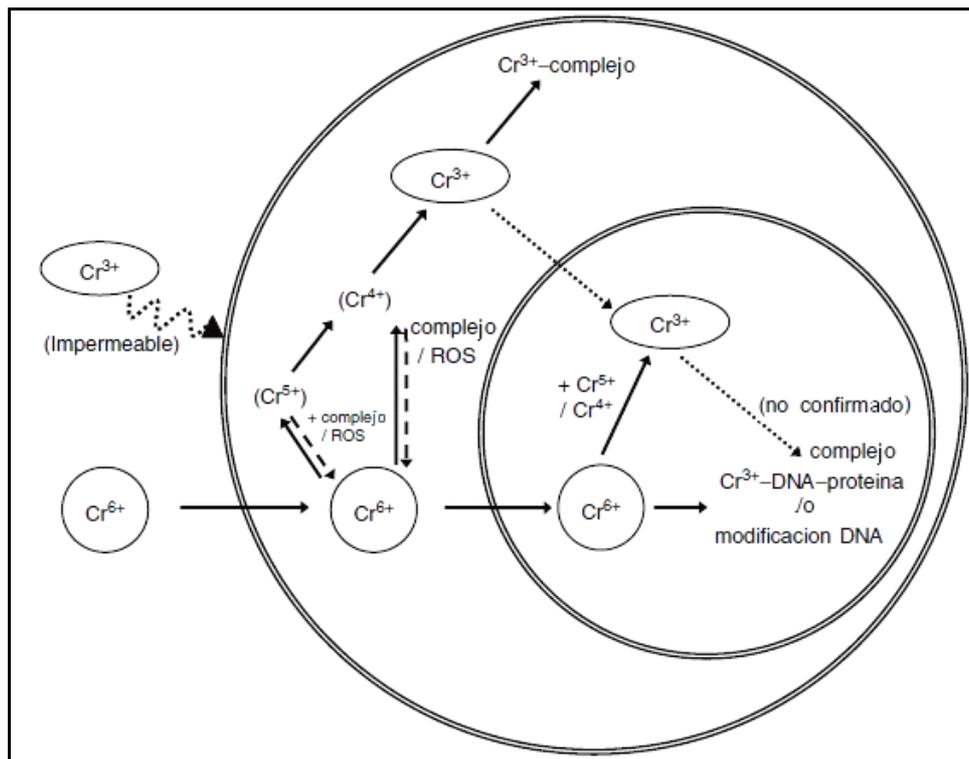


Figura 1.1 Entrada y ciclo del Cr(VI) en una célula. Modificado de Cheung et al., 2007.

1.3.2 Mecanismos de toxicidad del Pb

No se conoce con exactitud el mecanismo mediante el cual el Pb(II) ingresa a la célula. Se cree que una de las vías podría ser a través de los transportadores del Fe(II). Un ejemplo de esto podría ser el transportador de Fe(II), DMT1. Probablemente el Pb(II) ingrese a la célula mediante un mecanismo de "imitación iónica". El Pb(II) también podría ingresar en las células mediante canales de Ca(II) de la membrana o mediante bombas Ca(II)-ATPasa. Se cree que la "imitación iónica" ocurre debido a que el Pb(II) y el Ca(II) poseen radios iónicos de tamaños similares (1,19 Å y 1,00 Å, respectivamente). Además, el Pb(II) podría sustituir al Ca(II) como ligando de la Ca(II)-ATPasa (Bridges et al., 2005).

El mecanismo principal mediante el cual el Pb genera su toxicidad es a través de su interacción con proteínas. Varios factores influyen esta interacción. El Pb interactúa con grupos funcionales de enzimas, con proteínas de unión a metales y metalotioneínas (proteínas ricas en cisteínas, capaces de unirse a MP a través de sus grupos tiol). Una vez dentro de la célula el Pb(II) es capaz de actuar uniéndose a los sitios de unión del Ca(II), bloqueándolos e inhibiendo su función normal. Se ha demostrado en eucariotas que el Pb(II) sustituye al Ca(II) en el sitio de la calmodulina (proteína reguladora de muchas

enzimas, con un papel muy importante en la glucólisis), y también puede afectar la activación de la proteína quinasa C [regulada normalmente por Ca(II) e implicada en la división celular, comunicación célula-célula y reorganización del citoesqueleto]. La unión del Pb(II) a la proteína quinasa C puede generar que se active durante más tiempo del requerido, resultando en efectos nocivos para la célula (Goering, 1993; Bridges et al., 2005).

1.4 Mecanismos de resistencia a MP

Se postulan seis mecanismos mediante los cuales la célula puede desarrollar sistemas de resistencia a MP: limitando el acceso de los metales ya sea por barrera de permeabilidad o bombas de eflujo; transformándolos en moléculas menos tóxicas; alterando componentes celulares para disminuir su sensibilidad a los mismos; o mediante el secuestro intra o extracelular.

Varios factores determinan la resistencia a MP en microorganismos: el mecanismo de captación del metal, el rol que cada metal juega en el metabolismo normal, y la presencia de genes localizados en plásmidos, cromosomas o transposones que controlan la resistencia a metales (Agrawal et al. 2011).

1.4.1 Exclusión de metales por barrera de permeabilidad

Algunas alteraciones en la composición de la pared celular, membrana, o envoltura de un microorganismo son ejemplos de mecanismos de exclusión de metales por barrera de permeabilidad, ya que impiden el ingreso de los metales a la célula. De esta manera el microorganismo intenta proteger sus componentes celulares sensibles a los metales (Agrawal et al. 2011). Un ejemplo de esto es la exclusión de Cu(II) como resultado de la alteración de una porina de membrana en *Escherichia coli* (Rouch et al., 1995).

1.4.2 Eflujo de metales por transporte activo

El transporte activo o sistema de eflujo representa el mecanismo de resistencia a metales más estudiado. Los microorganismos utilizan este mecanismo para exportar los metales tóxicos desde su citoplasma al espacio extracelular. Estos mecanismos pueden estar codificados a nivel cromosómico o en plásmidos. Estos sistemas de eflujo pueden estar o no asociados a una ATPasa y suelen ser altamente específicos para el catión o el anión que exportan (Agrawal et al. 2011).

En el caso del Cr, se ha reportado la existencia de determinantes de resistencia ubicados en elementos móviles, como plásmidos y transposones. Por ejemplo, el operón *chrBACF* de *Ochrobactrum tritici* 5bv11 se encontró en asociación con un transposón. Este operón contiene el gen *chrA* perteneciente a la familia de los genes CHR. *chrA* codifica para una proteína de membrana con actividad de eflujo, la cual expulsa el Cr(VI) desde el citoplasma hacia el exterior celular. El gen *chrB* codifica para una proteína sensible a Cr(VI), que está encargada de la regulación del operón y que junto a los genes *chrC* y *chrF* proveen a la célula de protección a ROS (Cervantes et al., 2007; Branco et al., 2008).

Un mecanismo específico de resistencia a Pb(II) es el sistema *pbr* descrito en *Cupriavidus metallidurans*. El sistema *pbr* se encuentra constituido por varios genes ordenados en distintos operones, *pbrUTR* y *pbrABCD*. Estos operones codifican para proteínas involucradas en tres procesos: la captación, el eflujo y la acumulación de Pb(II). PbrA es una ATPasa de membrana interna del tipo P (transporta iones en contra de su gradiente de concentración), que se encarga del transporte del Pb(II) hacia el periplasma, utilizando la energía de la hidrólisis del ATP. PbrB es una lipoproteína de membrana externa, que se encarga de la remoción del Pb(II) desde el periplasma. En conjunto PbrA y PbrB serían un mecanismo de resistencia a Pb(II) como se muestra en la Fig 1.2. (Hynninen et al., 2009; Aguilar-Barajas et al., 2010).

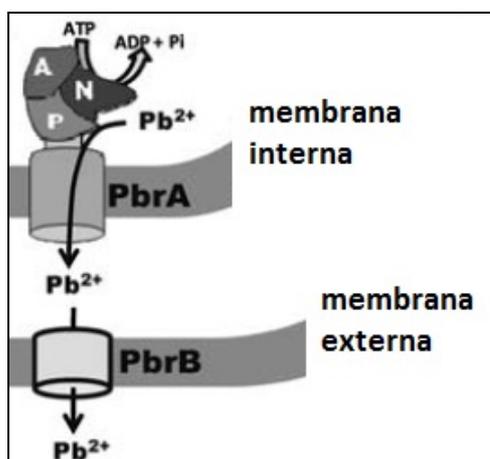


Figura 1.2. Sistema *pbr* de resistencia a Pb(II).

Modificada de Aguilar-Barajas et al., 2010.

1.4.3 Secuestro intracelular

El secuestro intracelular, mediante la unión a proteínas, es la acumulación de metales en el citoplasma de manera tal de prevenir la exposición de componentes celulares esenciales al mismo. Los metales comúnmente secuestrados por proteínas son: Cd(II), Cu(II), y Zn(II) (Agrawal et al., 2011). Existen dos ejemplos en procariotas de proteínas para esta forma de resistencia a metales: las metalotioneinas producidas por la cianobacteria *Synechococcus* sp. (Silver et al., 1996) y las proteínas ricas en cisteínas producidas por *Pseudomonas* sp. (Rouch et al., 1995).

1.4.4 Secuestro extracelular

En *Stenotrophomonas* sp. JD1 se observó que el exopolisacárido producido por el aislamiento posee la capacidad de secuestrar Cr(VI) y probablemente de esta forma proteger a la bacteria (Morel et al., 2009).

En el caso del Pb se reportó una cepa de *Citrobacter freundii* capaz de acumular Pb(II) en su superficie en la forma de una sal de fosfato, proveniente de la hidrólisis de fosfatos orgánicos por una fosfatasa ácida (Levinson et al., 1998).

También se encontró, en *Pseudomonas marginalis*, un mecanismo de resistencia que implica la exclusión del Pb mediante la formación de un polímero extracelular del cual no se especifica su composición (Roane 1999).

1.4.5 Detoxificación enzimática de metales a una forma menos tóxica

La reducción enzimática de Cr(VI) a su forma menos tóxica Cr(III) se ha sugerido como un mecanismo de resistencia en varios microorganismos (Cervantes et al., 2001). Las reductasas de cromato se han identificado en diversas especies bacterianas y en general se encuentran codificadas a nivel cromosómico. La mayoría de estas reductasas pertenecen a la familia de las flavoproteínas NAD(P)H dependientes, pueden funcionar en condiciones de aerobiosis o de anaerobiosis y pueden estar asociadas tanto con la fracción soluble como con la fracción de membrana (Cervantes et al., 2007). Un ejemplo es la reducción aeróbica de Cr(VI) a Cr(III) por *Delftia* sp. JD2 (Morel et al., 2011). En condiciones de anaerobiosis, algunas bacterias pueden usar Cr(VI) como un aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones (Cervantes, 2007).

1.4.6 Reducción de la sensibilidad de blancos celulares a metales

La protección de los blancos celulares puede provenir de mutaciones que disminuyen la sensibilidad de los componentes celulares a los MP, sin alterar su función básica, o por un aumento en la producción del componente celular evitando la inactivación total por el metal. El microorganismo puede también protegerse a sí mismo al producir componentes metalo-resistentes, o vías celulares alternativas, en un esfuerzo de eludir los componentes sensibles (Mergeay, 1991; Agrawal et al., 2011).

1.4.7 Otras formas de resistencia:

El crecimiento microbiano en forma de biofilms permite una mayor tolerancia a antibióticos (Stewart et al., 2001), desinfectantes de superficies e iones metálicos, y ha sido usado para remediar ambientes contaminados con MP (Peacock et al. 2004).

En resumen, los mecanismos de resistencia a Cr(VI) pueden estar codificados tanto a nivel cromosómico como plasmídico. Los sistemas de resistencia, con genes localizados en el cromosoma bacteriano están usualmente relacionados a estrategias como la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por Cr(VI) reductasas, sistemas de reparación del ADN y actividades de detoxificación. Por otro lado, los mecanismos codificados en plásmidos están mayormente asociados a genes de transportadores de membrana, un ejemplo son los que directamente median el flujo de los iones de cromato desde el citoplasma al exterior (Cervantes, 2007).

Se conoce relativamente poco sobre la resistencia a Pb en bacterias. Algunos de estos mecanismos involucran la unión intra y extra celular de Pb(II), bombas de eflujo y precipitación de Pb como sales de fosfato (Hynninen et al., 2009).

Otro elemento a tener en cuenta en la resistencia a MP es la presencia de integrones en los microorganismos. Estos se describen en las secciones que están a continuación.

1.5 Co-resistencia de antibióticos y MP

La co-resistencia suele ocurrir cuando los genes que codifican fenotipos de resistencia están localizados juntos, dentro del mismo elemento genético (como ser transposones, plásmidos o integrones). La co-resistencia, entendida como co-

localización, es uno de los motivos que explican el hecho de que ambos fenotipos sean co-seleccionados, como ocurre en el caso de los genes de resistencia a antibióticos y MP. A diferencia de los antibióticos, los MP no son degradados en el ambiente y por lo tanto pueden representar una presión de selección a largo plazo (Baker-Austin et al., 2006).

Existen varios reportes de co-resistencia a antibióticos y MP, tanto en aislamientos clínicos como ambientales. Un ejemplo fue reportado por Wireman et al., (1997), quienes encontraron un operón que codifica para resistencia a mercurio y un integrón que contiene genes de resistencia a múltiples antibióticos dentro de un mismo transposón del tipo Tn21.

1.6 Integrones

1.6.1 Definición

Según Hall y Collis (1995) el término integrón o elemento de integración describe un grupo de sistemas genéticos que contienen determinantes para el sistema de recombinación sitio específico, responsable de la inserción de casetes de genes.

Según Mazel (2006) los integrones son plataformas de ensamblaje que incorporan marcos abiertos de lectura (ORF, del inglés "open reading frame") exógenos por recombinación sitio específica y los convierten en genes funcionales al asegurar su correcta expresión. Estos ORF son comúnmente llamados casetes génicos.

1.6.2 Estructura

Los integrones están compuestos por una plataforma de ADN estable, que contiene los elementos funcionales requeridos para el funcionamiento del sistema, asociado a un arreglo variable de casetes génicos (Cambray et al. 2010).

Los componentes básicos requeridos para el funcionamiento del sistema se muestran en la Fig 1.3.

Estos son:

- el gen de la integrasa (IntI),
- el sitio de recombinación primaria denominado attI (**A**ttachm**e**nt **I**ntegron)
- un promotor (Pc), seguido por casetes génicos.

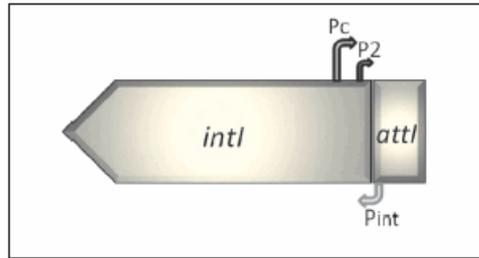


Figura 1.3. Estructura básica de un integrón.
Modificado de Conza *et al.* (2010).

La integrasa Intl codifica para una recombinasa sitio específico, perteneciente a la familia de las tirosina recombinasas que catalizan la escisión e integración específica de elementos genéticos conocidos como genes casete (Cambray *et al.* 2010).

Los casetes génicos están constituidos por un solo ORF, en forma de ADN cerrado, sin promotor, y poseen un sitio de recombinación attC (**Attachment Casette**) o elemento de 59-bases (59-be). Los sitios attC pertenecen a una diversa familia de secuencias nucleotídicas que funcionan como sitios de reconocimiento para la integrasa, y pueden variar en longitud (entre 57 y 141pb). Si bien en un principio se creía que estos dominios eran conservados entre todos los genes casetes, se han encontrado attCs que carecen de conservación de secuencia. Esto llevó a la hipótesis de que el reconocimiento de los sitios attC es independiente de su secuencia, y es debido a un tipo de reconocimiento estructural. Además se sabe que estas regiones presentan secuencias conservadas palindrómicas imperfectas en sus extremos como se muestra en la Fig 1.4. Esto les confiere la capacidad de formar estructuras tipo horquilla (Recchia *et al.*, 1995; Boucher *et al.*, 2007; Cambray *et al.*, 2010).



Figura 1.4. Secuencia de sitio attC donde se indican las secuencias conservadas palindrómicas. Tomado de Cambray *et al.*, 2010.

Los sitios attI contienen dos regiones de unión a la Intl orientadas en forma invertida. Se sabe que están conservados para cada clase de integrón y no están

relacionados entre las distintas clases de integrones, asegurando así que no ocurran recombinaciones del tipo attI x attI entre integrones de distintos tipos dentro de la misma célula (Cambray et al. 2010).

1.6.3 Clasificación

Los integrones pueden ser clasificados en (Mazel 2006):

- i) Superintegrones o integrones cromosómicos (CIs)
- ii) Integrones móviles (MIs)

Además de su ubicación génica, los integrones cromosómicos se diferencian de los móviles en que poseen un mayor número de genes casete asociados, y que existe más de un 80% de identidad entre los sitios attC de estos casetes, además de presentar conservación en el uso de codones (Cambray et al., 2010).

Los integrones móviles, si bien no son móviles *per se*, se movilizan gracias a estar ubicados en elementos móviles de ADN. Los MIs contienen solamente unos pocos casetes que aparentan ser de orígenes heterogéneos, involucrados generalmente en la propagación de los genes de resistencia a antibióticos y que probablemente fueron colectados de diferentes ambientes genómicos. La heterogeneidad de los casetes asociados es evidente por la inconsistencia en el uso de codones de sus ORFs, y por la diversidad de tamaño y secuencia de sus sitios attC (Boucher et al., 2007)

1.6.4 Integrones móviles

Hasta la fecha se han descrito cinco clases de MIs, basado en la secuencia de su integrasa (40-58% de identidad). Solamente las primeras tres clases (integrones de clase 1, clase 2 y clase 3) han sido relacionadas con fenotipos de multiresistencia, y por lo tanto son las más ampliamente estudiadas (Mazel, 2006 ; Cambray et al. 2010).

Los integrones de clase 1 son los más frecuentemente encontrados en ambientes clínicos y en general están asociados a fenotipos de multiresistencia. Éstos presentan secuencias no codificantes en sus extremos 3' y 5', las cuales constan de repetidos invertidos de unos 25 pb que se denominan IRi e IRt, que son considerados los límites del integrón. Un integrón de clase 1 típico consiste (en orden) de un repetido invertido IRi, la integrasa intI1, un sitio de recombinación attI1, los casete

génicos, el gen *qacE* que codifica para la resistencia a amonios cuaternarios, un modulo completo de transposición *tni* y finalmente otro repetido invertido *IRt* como se muestra en la Fig.1.5 (Gillings et al., 2008b).

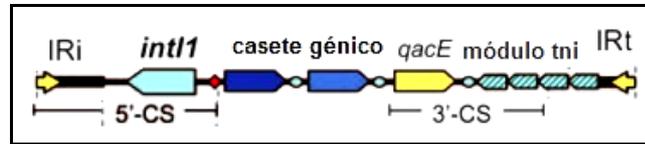


Figura 1.5. Estructura de un integrón de clase 1 aislado de un ambiente clínico. Modificado de Gillings et al., (2008b).

Los integrones de clase 2 están asociados con derivados del transposón Tn7. La integrasa de los integrones de clase 2 usualmente presentan una mutación sin sentido en el codón 179 de su secuencia codificante, generando que la integrasa no sea funcional. Esto podría explicar la baja variedad de casetes que se encuentran en asociación con esta clase de integrones (solo 12 casetes han sido descritos) (Cambray et al., 2010; Ramírez et al, 2010).

Los integrones de clase 3 son menos frecuentes que los integrones de las clases 1 y 2, y por lo tanto son los menos estudiados. En su región variable se han encontrado genes que codifican para resistencia a antibióticos (para una metalo- β -lactamasa y una aminoglicósido acetiltransferasa) (Xu et al., 2007).

1.6.5 Recombinación sitio específica

Los genes casete son usualmente capturados por la integrasa en una reacción de recombinación sitio específico entre los sitios *attC* y *attI*. Es común que ocurran múltiples eventos de inserción en el sitio *attI*, y los ORFs generalmente se insertan en la misma orientación, produciendo arreglos en tándem de genes co-transcritos por el promotor *Pc*, como se muestra en la Fig.1.6 (Boucher et al. 2007).

La integración del casete circular ocurre con mayor probabilidad en el sitio *attI*. Esta característica es esencial para asegurar la expresión del gen integrado. Pero también pueden darse con menor frecuencia recombinaciones entre sitios *attC* y

attC dentro de un integrón, ocurriendo entonces la escisión de uno o más casetes génicos (Cambray et al. 2010).

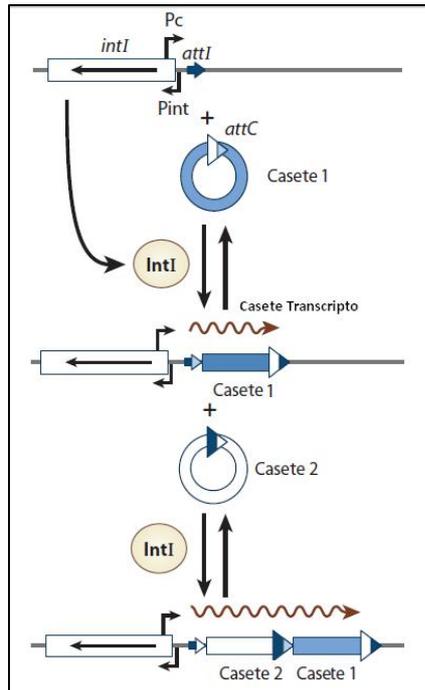


Figura 1.6. Diagrama de integración de casete génicos en un integrón. Tomada de (Mazel et al., 2011).

1.6.6 Integrones como mecanismos de resistencia

En ambientes clínicos los integrones portan genes que codifican para la resistencia a antibióticos, incluyendo los antibióticos de la familia de las β -lactamasas, todo los aminoglicósidos, cloranfenicol, trimetoprim, estreptotricina, rifampicina, eritromicina, fosfomicina, lincomicina, quinolonas y antisépticos de la familia de los amonios cuaternarios (Cambray et al. 2010). En su mayoría estos integrones son de clase 1 y están insertos dentro de transposones del tipo del Tn402 (Gillings et al., 2008b)

Nield et al. (2001) reportaron la presencia de integrones de clase 1 también en diversos ecosistemas. La presencia de integrones en estos ambientes refuerza la idea de que estos elementos están implicados en la transferencia horizontal de todo tipo de genes de resistencia. Estos integrones difieren de los encontrados en contextos clínicos en que generalmente son cromosómicos y además poseen ORFs de función desconocida (Gillings et al., 2008b).

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis de trabajo

Los microorganismos aislados de ambientes contaminados con un MP poseerían resistencia cruzada a otros MPs. Esta resistencia podría estar asociada a la presencia de integrones.

2.2 Objetivos

2.1.1 Objetivo general

Determinar la resistencia a Cr(VI) y Pb(II), y la presencia de integrones en tres aislamientos ambientales de *Delftia* sp. (JD2, 3C y 6C).

2.1.2 Objetivos específicos

- i) Determinar la resistencia a Cr(VI)
- ii) Determinar la resistencia a Pb(II)
- iii) Analizar la presencia de integrones de los tipos 1,2,3 y cromosómicos

3. Materiales y Métodos

3.1 Microorganismos utilizados en este trabajo

Durante este trabajo se utilizaron aislamientos bacterianos provenientes de suelos contaminados con metales pesados (Cr y Pb) (Morel et al., 2011; Ubalde et al., 2012), y bacterias control. En la Tabla 3.1 se describen algunas propiedades de estos microorganismos.

Tabla 3.1 Microorganismos utilizados y características de interés para este trabajo.

Microorganismo	Propiedad de interés	Referencia
<i>Delftia</i> sp. 3C	Resistente a Pb(II)	Ubalde et al., 2012
<i>Delftia</i> sp. 6C	Resistente a Pb(II)	Ubalde et al., 2012
<i>Delftia</i> sp. JD2	Resistente a Cr(VI)	Morel et al., 2011
<i>E. coli</i> DH5 α	Sensible a Pb(II) y Cr(VI)	Sambrook et al., 1989
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Sensible a Pb(II) y Cr(VI)	Fisher y Long, 1992
<i>Sinorhizobium meliloti</i> U143	Sensible a Pb(II) y Cr(VI)	Castro-Sowinski et al., 2002
<i>E. coli</i> R388 (U12441)	Integrón tipo 1	Datta y Hedges, 1972
<i>E. coli</i> Tn2	Integrón tipo 2	Marquez et al., 2008
<i>E. coli</i> DH5 α pSMB731	Integrón tipo 3	Arakawa et al., 1995
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> ATCC 33913	Patrón complejo de bandeo de casetes	Valverde et al., 2007

3.2 Medios de cultivo

La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se presenta en el Anexo 1.

Las condiciones de crecimiento fueron siempre las mismas. Sin importar el medio de cultivo, los aislamientos de *Delftia* sp., *S. meliloti* y *X. campestris* se crecieron a 30 °C y agitación constante (200 rpm). Para *E. coli* se creció a 37 °C y agitación constante de 200 rpm.

3.3 Curvas de crecimiento: resistencia a metales pesados

3.3.1 Resistencia a Cr(VI)

Con el fin de confirmar la resistencia a Cr(VI) de JD2 y determinar la posible resistencia en 3C y 6C, se estudió la capacidad de los microorganismos de crecer en medio TY con concentraciones crecientes de Cr(VI). Para ello, se utilizó una solución madre de $K_2Cr_2O_7$ con una concentración de 50 mM.

Se realizó un precultivo de cada microorganismo en estudio inoculando tubos conteniendo 5 mL de medio rico TY con una colonia fresca, y se creció por 24 h. Se inocularon nuevos tubos con 5 mL de medio TY, los cuales contenían concentraciones crecientes de Cr(VI), con 50 μ L de precultivos para los aislamientos 3C, 6C, JD2 y 100 μ L para la cepa control U143. Se utilizaron concentraciones de Cr(VI) en el rango de 1 a 4 mM.

Se determinó la turbidez de los crecimientos a 620 nm a distintos tiempos en colorímetro (Erma AE-22) y se graficó la DO (Densidad Óptica) en función del tiempo. Los ensayos se realizaron tres veces y cada condición por triplicado.

3.3.2 Resistencia a Pb(II)

Con el fin de confirmar la resistencia a Pb(II) de 3C y 6C y determinar la posible resistencia de JD2 a este metal, se estudió la capacidad de los microorganismos de crecer en medio PYT400 con concentraciones crecientes de Pb(II). Para ello, se utilizó una solución madre de acetato de plomo a una concentración de 100 mM.

Se siguió el siguiente protocolo de precultivos:

- primer precultivo - se inocularon tubos conteniendo 5 mL de medio rico TY con una colonia fresca, se crecieron por 24 h tal como se indicó anteriormente.

- segundo precultivo - se inocularon tubos de 5 mL de medio mínimo PYT400, sin Pb(II), con 50 μ L del cultivo anterior, y se crecieron por 24 h.

Este paso intermedio se realizó para adaptar las células al nuevo medio y para evitar la precipitación del Pb, ya que éste precipita en medio TY.

- cultivo final - se inocularon tubos con 5 mL de PYT400, los cuales contenían concentraciones crecientes de Pb(II), con 500 μ L del segundo precultivo. Se utilizaron concentraciones de Pb(II) en el rango de 0,1 a 0,3 mM.

Se determinó la turbidez de los tubos a 620 nm a distintos tiempos en el colorímetro (Erma AE-22) y se graficó la DO en función del tiempo.

Los ensayos se realizaron tres veces y cada condición por triplicado.

3.3.3 Cálculo de tiempos de generación:

Se realizó el gráfico de logaritmo en base 10 de la DO en función del tiempo para los aislamientos de *Delftia sp.* 3C, 6C y JD2. A partir del cual se hicieron los cálculos de tiempos de generación, según la siguiente ecuación:

$$N_t = N_0 + 2^n$$

Donde N_0 representa la población bacteriana inicial, N_t representa la población bacteriana a tiempo t y n representa el número de generaciones en el tiempo t .

$$\text{Log } N_t = \text{Log } N_0 + n \cdot \text{Log } 2$$

$$n = \frac{\text{Log } N_t - \text{Log } N_0}{\text{Log } 2}$$

La tasa de crecimiento durante la fase exponencial en un cultivo en "batch" se puede expresar en términos de la constante de la tasa de crecimiento media (k).

$$k = \frac{n}{t} = \frac{\text{Log } N_t - \text{Log } N_0}{\text{Log } 2 \cdot \Delta t}$$

El tiempo medio de generación (T_g) es el recíproco de la tasa de crecimiento media (k).

$$T_g = \frac{1}{k}$$

La ecuación final para el cálculo del tiempo de generación (T_g), es entonces:

$$T_g = \text{Log } 2 / m$$

Donde m es la pendiente de la recta en fase exponencial.

3.4 Preparación de ADN

3.4.1 Purificación de ADN genómico

Se purificó el ADN genómico a partir de cultivos en medio líquido TY de los aislamientos de *Delftia sp.* y cepas control. Se extrajo el ADN según las instrucciones del fabricante utilizando el kit "Vivo ADN Genómico" de Vivo Science (Cat ADG), partiendo de 3 mL de cultivos frescos. El ADN genómico se almacenó a -20 °C. La

integridad del mismo se controló por electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 0,5% (Anexo 3). La electroforesis en gel se realizó a 100 V, durante 30 min. Los fragmentos de ADN se visualizaron por tinción con Goldview (SBS) y exposición a luz UV. El Goldview se incluyó en el gel, agregando 2 μ L del mismo cada 100 mL de agarosa.

3.4.2 Lisados celulares

Los lisados celulares se realizaron suspendiendo una cantidad abundante de bacterias (cuarta placa de un cultivo fresco) en 1 mL de NaCl 1M estéril (para la remoción de los exopolisacáridos bacterianos débilmente unidos a la célula). Se centrifugó durante 7 min a 10000 rpm y se lavó con agua destilada estéril (1 mL). El "pellet" celular se resuspendió en 100 μ L de agua destilada y se incubó en un baño de agua a ebullición durante 15 min. Inmediatamente después se congeló a -20 °C. Luego de una noche, se centrifugó y el sobrenadante se guardó a -20 °C y se utilizó como templado de ADN.

3.5 Búsqueda de integrones

La búsqueda de integrones de las distintas clases (1, 2 y 3) se realizó mediante la técnica de PCR y posterior secuenciación del amplicón correspondiente. Para ello, se clonaron los fragmentos de amplificación en vectores con extremos T (pTZ57R/T) y se transformaron a células competentes de *E. coli* DH5 α . Luego de verificar la presencia del inserto en los clones, se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico y se enviaron para su secuenciación al servicio de Macrogen (Corea). El procedimiento completo se describe a continuación.

3.5.1 Mezcla de PCR

La mezcla de reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: para un volumen final de 20 μ L, se agregaron 2 μ L de buffer 10X con MgCl₂ (concentración final 2 mM), 2 μ L de dNTP's 2 mM (concentración final 0.2 mM de cada deoxiribonucleótido), 2 μ L de cada cebador (en agua destilada estéril apirógena, solución madre de 10 μ M cada uno), 0.2 μ L de U-Taq DNA polimerasa (5 U/ μ L, SBS) y agua estéril apirógena hasta completar el volumen. Se utilizó 1 μ L de ADN genómico purificado como molde de ADN, 0.5 μ L de lisado para los controles positivos y 1 μ L de agua estéril apirógena para los controles negativos.

La temperatura de hibridación de los cebadores durante la PCR (teóricamente 5 °C debajo de la T_m) se determinó considerando la temperatura de fusión o "annealing" (T_m) de cada cebador. La misma se calculó con la herramienta informática de análisis de cebadores disponible en la página web <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>. Se utilizaron como parámetros las concentraciones usualmente utilizadas en las reacciones de PCR en nuestro laboratorio, concentración de cebador 1 μ M, concentración de Mg de 2 mM y concentración de dNTPs de 0,2 mM.

El tiempo de extensión de la PCR se calculó teniendo en cuenta el tamaño del fragmento a ser amplificado (1 min por 1000 pb).

3.5.2 Integrones de clase 1

La presencia de integrones de clase 1 se analizó utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 3.2. El tamaño esperado del fragmento para el control positivo de *E. coli* R388 (U12441) fue de 500 pb, correspondiente al producto de amplificación del gen de la integrasa de tipo 1.

El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 30 seg a 94 °C, hibridación de los cebadores a 55 °C y 60 °C (se analizaron dos temperaturas) durante 30 seg, y un tiempo de extensión de 30 seg a 72 °C. Finalizando con una extensión de 3 min a 72 °C.

Tabla 3.2 Cebadores utilizados para amplificar la secuencia de integrasas de tipo 1, 2, 3 y casetes. En el Anexo 3 se adjunta una tabla donde se indica a que corresponde cada letra en los cebadores degenerados.

Tipo de integrón	Nombre del cebador	Secuencia (5´-3´)	Tm (°C)			Referencia
			Min	Media	Máx	
Cromosómico	HS298(F)	TGG ATC CCA CRT GNG TRT ADA TCA TNG T	54,7	59,8	64,4	Nield et al., 2001
Cromosómico	HS286(R)	GGG ATC CTC SGC TKG ARC GAM TTG TTA GVC	62	65,3	67,9	Nield et al., 2001
Tipo 1	HS464(F)	ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC G	55,7			Barlow et al., 2004
Tipo 1	HS463(R)	CTG GAT TTC GAT CAC GGC ACG	58,6			Barlow et al., 2004
Tipo 2	HS501	CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T	55,8			Marquez et al., 2008
Tipo 2	HS502	GTA GCA ACC GAG TGA CGA AAT G	56,1			Marquez et al., 2008
Tipo 3	HS503(F)	GCC TCC GGC AGC GAC TTT CAG	63,2			Marquez et al., 2008
Tipo 3	HS504(R)	ACG GAT CTG CCA AAC CTG ACT	58,8			Marquez et al., 2008
Casete	AJH60(R)	CRR SKT CGG CTT GAA YGA RTT G	52,9	57,8	63,1	Gillings et al., 2005
Casete	AJH72(F)	GGA TGM CGT TTN CCG TTG GC	56,5	59,5	62,7	Gillings et al., 2005

3.5.3 Integrones de clase 2

La presencia de integrones de clase 2 se analizó utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 3.2. El tamaño del fragmento de amplificación esperado según el control positivo de *E. coli* Tn2 fue de aproximadamente 700 pb, correspondiente al producto de amplificación del gen de la integrasa de tipo 2.

El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 30 seg a 94 °C, hibridación de los cebadores a 59 °C durante 30 seg, y un tiempo de extensión de 1 min a 72 °C. Finalizando con una extensión de 10 min a 72 °C.

3.5.4 Integrones de clase 3

La presencia de integrones de clase 3 se analizó utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 3.2. El tamaño del fragmento de amplificación esperado según el control positivo de *E. coli* DH5 α pSMB731 fue de 1023 pb, correspondiente al producto de amplificación del gen de la integrasa de tipo 3.

El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 30 seg a 94 °C, hibridación de los cebadores a 59 °C durante 30 seg, y un tiempo de extensión de 1 min a 72 °C. Finalizando con una extensión de 10 min a 72 °C.

3.5.5 Integrones cromosómico

La presencia de integrones cromosómicos se analizó utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 3.2. El control positivo utilizado fue *E. coli* R388. En este caso, dado que el cebador HS298(F) hibrida con la secuencia del *Int11* y el HS286(R) con el AttC o 59-be, es esperable observar múltiples fragmentos de amplificación.

El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 30 seg a 94 °C, hibridación de los cebadores a 59 °C durante 30 seg, y un tiempo de extensión de 1 min a 72 °C. Finalizando con una extensión de 1 min a 72 °C.

3.5.6 Casetes asociados a integrones

La presencia de casetes asociados a integrones se analizó utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 3.2. El cebador AJH72(F) hibrida con el

promotor del *Int1* y el AJH60(R) con el 59-be o AttC de *Xanthomonas campestris* ATCC 33913. En presencia de casetes de genes es esperable observar múltiples fragmentos de amplificación (Fig. 3.1).

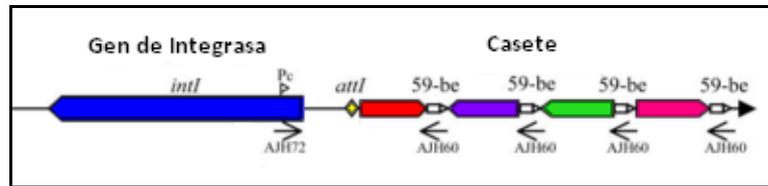


Figura 3.1. Estructura de integrones cromosómicos. Sitio de hibridación de los cebadores utilizados en este trabajo. Adaptado de Gillings et al. (2005)

El ciclado utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94 °C, hibridación de los cebadores a 55 °C durante 1 min, y un tiempo de extensión de 5 min a 72 °C. Finalizando con una extensión de 5 min a 72 °C.

3.5.7 Purificación de bandas de amplificación

Todos los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa 1% como se describió anteriormente en 3.4.1.

Las bandas de amplificación se purificaron con el kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen (número de catálogo 28704), según las instrucciones del fabricante. Los productos purificados se controlaron en geles de agarosa al 1%.

3.5.8 Clonación de los fragmentos de amplificación

La clonación de los productos de amplificación se realizó con el kit InsT/Aclone de Fermentas (número de catálogo K1214), con pequeñas modificaciones realizadas a las indicaciones del fabricante.

El plásmido pTZ57R/T (Fig. 3.2) posee en sus extremos hebras simples de repeticiones de ddT, que se superponen a los extremos 3'dA generados por la U-Taq polimerasa. Estos extremos T permiten así clonar fácilmente productos de PCR en este vector. El vector posee un gen de resistencia a ampicilina (Amp), lo que permite seleccionar aquellas transformantes que han adquirido el plásmido pTZ57R/T. El vector posee además otras características que permiten la detección de los clones recombinantes que contienen el inserto de interés. El vector contiene una copia del

gen *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, la cual cataliza la reacción de hidrólisis de lactosa en glucosa más galactosa. En el medio de cultivo, en presencia de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, sustrato alternativo para la β -galactosidasa) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido, inductor artificial del operón Lac) se observan colonias azules para aquellas células que contienen el plásmido con el gen *lacZ* intacto (hidrólisis de Xgal para dar el producto, 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, que se oxida para dar el producto de color azul insoluble, 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo). Si el producto de PCR se inserta, el gen *lacZ* se interrumpe y se vuelve no funcional. De esta manera pueden identificarse aquellas transformantes que han adquirido el inserto por ser blancas.

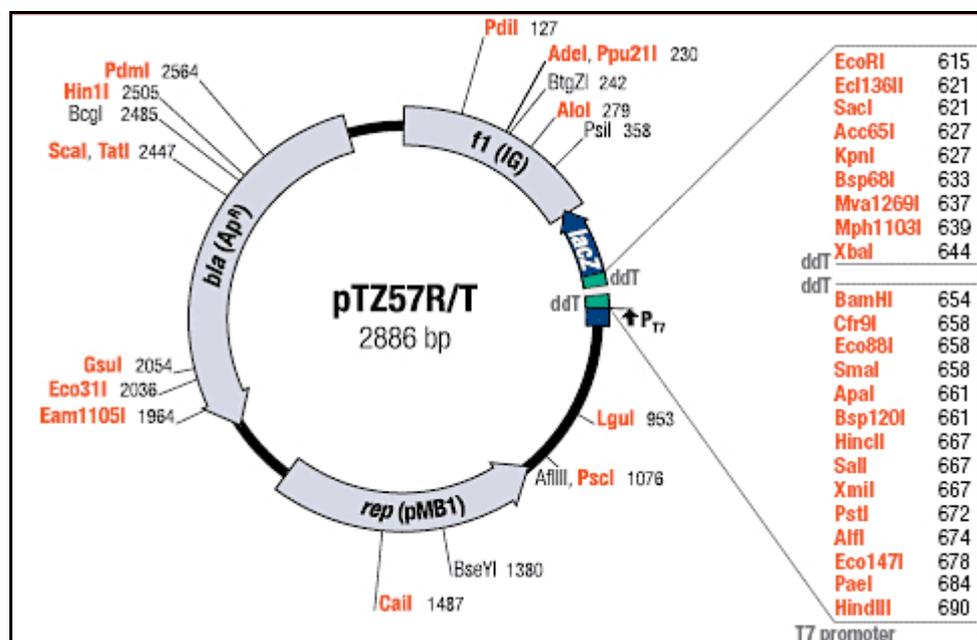


Figura 3.2 Ilustración del plásmido pTZ57R/T, tomado del manual del kit QIAquick Gel Extraction de Qiagen.

Una vez que la secuencia de interés se ha insertado en el plásmido pTZ57R/T, no es necesaria la utilización de cebadores específicos para la secuenciación del inserto, ya que el mismo quedará flanqueado por secuencias conocidas para el fago T4 y secuencias M13. Los servicios de secuenciación proveen estos cebadores facilitando el trabajo del investigador al momento de enviar el plásmido para la secuenciación del inserto.

Como algunos de los fragmentos de amplificación estuvieron almacenados por semanas, lo que podría llevar a la posible pérdida de adeninas en los extremos, se procedió a la reposición de las mismas según el siguiente protocolo: se incubaron 20 μL de cada uno de los productos de PCR durante 1 h a 72 °C con 0,25 μL de U-Taq polimerasa (SBS) y 3 μL de dATP 2 mM.

El clonado se realizó según el siguiente protocolo (volumen de reacción final de 15 μL): 7,5 μL de agua, 3 μL de buffer, 1 μL de vector, 3 μL de producto de PCR y 0,5 μL de T4 Ligasa. Se dejó ligar por 1 h a temperatura ambiente y luego a 4 °C durante toda la noche.

3.5.9 Transformación

3.5.9.1 Preparación de células competentes

La preparación de las células *E. coli* DH5 α competentes se realizó por tratamiento con CaCl_2 frío, según se describe en Sambrook et al. (1989). El protocolo se detalla a continuación;

Se picó una colonia fresca a medio líquido LB y se incubó a 37 °C (200 rpm) por 16 h. Se tomó 1 mL de cultivo y se inocularon 150 mL de LB. Se incubó durante 3-4 horas a 37 °C en agitación constante a 200 rpm, hasta que la DO del cultivo fue cercana a 0.4, pero no mayor. Se transfirieron asépticamente las células a tubos Falcon de 50 mL estériles fríos y se enfrió por 30 min en hielo. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se resuspendió el "pellet" en 20 mL de CaCl_2 0,1 M, y se mantuvo en hielo durante 10 min. Tras su centrifugación, el "pellet" se resuspendió en 10 mL de CaCl_2 0,1 M frío, se centrifugó y, finalmente el "pellet" se resuspendió en 2 mL de CaCl_2 0,1 M con 20% de glicerol estéril por cada 50 mL de cultivo original. Las células competentes se fraccionaron en tubos conteniendo 100 μL y se congelaron a –80 °C.

3.5.9.2 Transformación

La transformación se realizó por shock térmico, utilizando 50 μL de células competentes y 15 μL de producto de ligación.

La mezcla se incubó en hielo durante 15 min. Luego se realizó un shock térmico colocando la mezcla por 1 min a 42 °C y 2 min en hielo (esto se repitió dos veces). Se agregó entonces 1 mL de medio líquido LB, y se incubó durante 90 min en agitación a 37 °C, para que las células se recuperaran del shock térmico. Luego se

rastrillaron 50 μL y 100 μL de transformación en placas conteniendo LB-Amp-X-Gal-IPTG en las siguientes concentraciones: i) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Amp (solución madre de 100 mg/mL en agua; la esterilización se realizó por filtración con filtros millipore de 0,45 μm); ii) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Xgal (solución madre de 20 mg/mL); iii) 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IPTG (solución madre 200 mg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h.

3.5.9.3 Selección de clones y verificación de la presencia del inserto

La selección de clones transformados se realizó siguiendo el sistema de selección de colonias blancas y azules.

Para verificar la presencia del inserto en las clonas que presentaron un fenotipo blanco, se procedió a la réplica de las mismas en nuevas placas de LB-Amp-Xgal-IPTG. Luego se hicieron lisados de las colonias que presentaron el fenotipo esperado y se realizaron ensayos de PCR sobre los mismos, con cebadores específicos para la secuencia de la integrasa o del casete génico. Los PCR se realizaron como se indicó más arriba.

3.5.10 Minipreparaciones de ADN plasmídico

Se inocularon 5 mL de LB-Amp 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con el clon que posee el inserto de interés, y se creció durante toda la noche. Se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min, y se descartó el sobrenadante. La preparación de plásmidos se realizó sobre el "pellet" de células mediante el kit "Plasmid Mini Prep Kit de Bioron (n° de catálogo: 806942), según las indicaciones del fabricante. Se almacenó a -20 °C.

Las minipreparaciones se enviaron al servicio de Macrogen, en Corea, para ser secuenciadas utilizando cebadores específicos para secuencias flanqueantes al inserto (secuencias M13). El servicio de secuenciación proveyó estos cebadores y se secuenció en ambos sentidos.

3.5.10 Análisis de secuencia

Los cromatogramas provistos por el servicio de secuenciación se analizaron visualmente para eliminar las porciones de secuencias con señales de fluorescencia bajas o con superposición de picos.

Se reconstruyó cada secuencia teniendo en cuenta los fragmentos de ADN obtenidos secuenciando en ambos sentidos. Para ello, se utilizó la herramienta informática que permite obtener una secuencia reversa y complementaria (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html) para obtener ambas secuencias en el mismo sentido de lectura. Las mismas se alinearon para verificar su fidelidad utilizando el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Una vez alineadas, se eliminaron los segmentos correspondientes al plásmido donde el fragmento fue clonado. La secuencia definitiva se identificó por comparación con las bases de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando los programas BLASTn (BLAST de nucleótidos) o BLASTx (BLAST de secuencia traducida).

También se alinearon las secuencias correspondientes a las integrasas de los distintos aislamientos para identificar el grado de similitud entre las mismas, utilizando el programa ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>), y luego se editó el alineamiento con el programa GeneDoc (Nicholas et al., 1997).

4. Resultados

4.1 Curvas de crecimiento: resistencia a metales pesados

4.1.1 Resistencia a Cr(VI)

En la Fig. 4.1 se muestran las curvas de crecimiento para cada uno de los microorganismos en estudio, en concentraciones crecientes de Cr(VI).

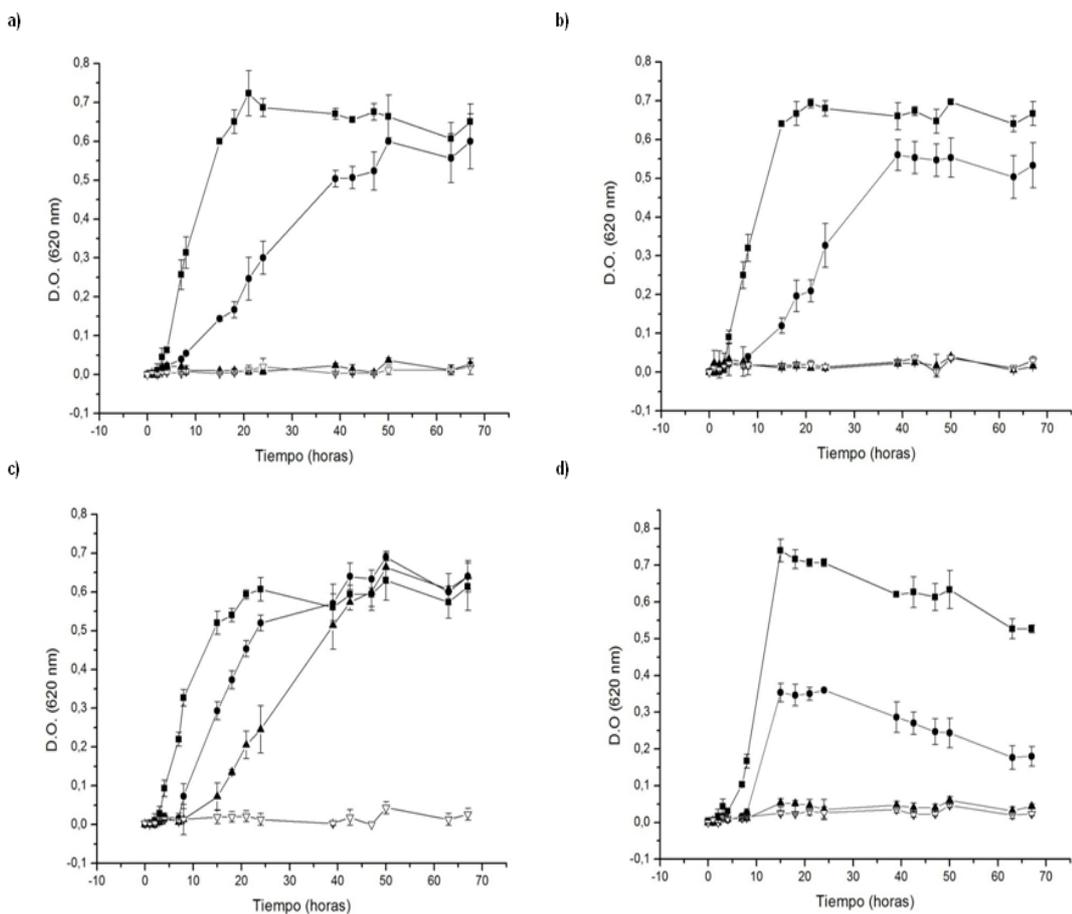


Figura 4.1. Curvas de crecimiento para los aislamientos de *Delftia* sp. y *Sinorhizobium meliloti* U143 (control negativo). a) *Delftia* sp. 3C; b) *Delftia* sp. 6C; c) *Delftia* sp. JD2; d) *S. meliloti* U143. En algunos casos las barras de error fueron menores a los tamaños de los símbolos. (■) sin Cr(VI), (●) 1 mM Cr(VI), (▲) 2 mM Cr(VI), (▼) 4 mM Cr(VI).

Los tres aislamientos de *Delftia* sp. presentaron perfiles de crecimiento similares, en presencia y ausencia de Cr(VI), observándose que JD2 es capaz de crecer hasta una concentración 2 mM de Cr(VI), mientras que 3C y 6C crecieron hasta 1 mM. Comparado con el control negativo (U143), los tres aislamientos son resistentes a Cr(VI), siendo JD2 quien presentó la mayor resistencia. Todos presentan una fase lag de aproximadamente 5 h, y al aumentar las concentraciones de Cr(VI) presentaron mayores tiempos de generación (Tabla 4.1).

Al momento de la fase estacionaria, *Delftia* sp. 3C, *Delftia* sp. 6C y *Delftia* sp. JD2 lograron alcanzar entre un 80%, 80% y 90% de la DO obtenida en ausencia de Cr(VI) respectivamente.

Cabe resaltar, que el perfil de crecimiento de U143 a una concentración de Cr(VI) de 1 mM mostró que este microorganismo sólo alcanzó al momento de la fase estacionaria el 50% de la DO alcanzada en ausencia de Cr(VI), demostrando que U143 es efectivamente sensible a Cr(VI).

Tabla 4.1. Tiempos de generación en presencia y ausencia de Cr(VI) para todos los aislamientos ensayados. Donde se indica (-) se debe a que los aislamientos no crecieron a estas concentraciones de Cr(VI).

Aislamiento	Tiempos de Generación		
	Sin Cromo	Cr(VI) 1 mM	Cr(VI) 2 mM
U143	2 h 30 min	3 h 10 min	-
3C	3 h 15 min	6 h 30 min	-
6C	4 h 15 min	8 h 40 min	-
JD2	3 h 20 min	5 h 40 min	7 h 30 min

4.1.2 Resistencia a Pb(II)

En la Fig. 4.2 se muestran las curvas de crecimiento para cada uno de los microorganismos en estudio, en concentraciones crecientes de Pb(II).

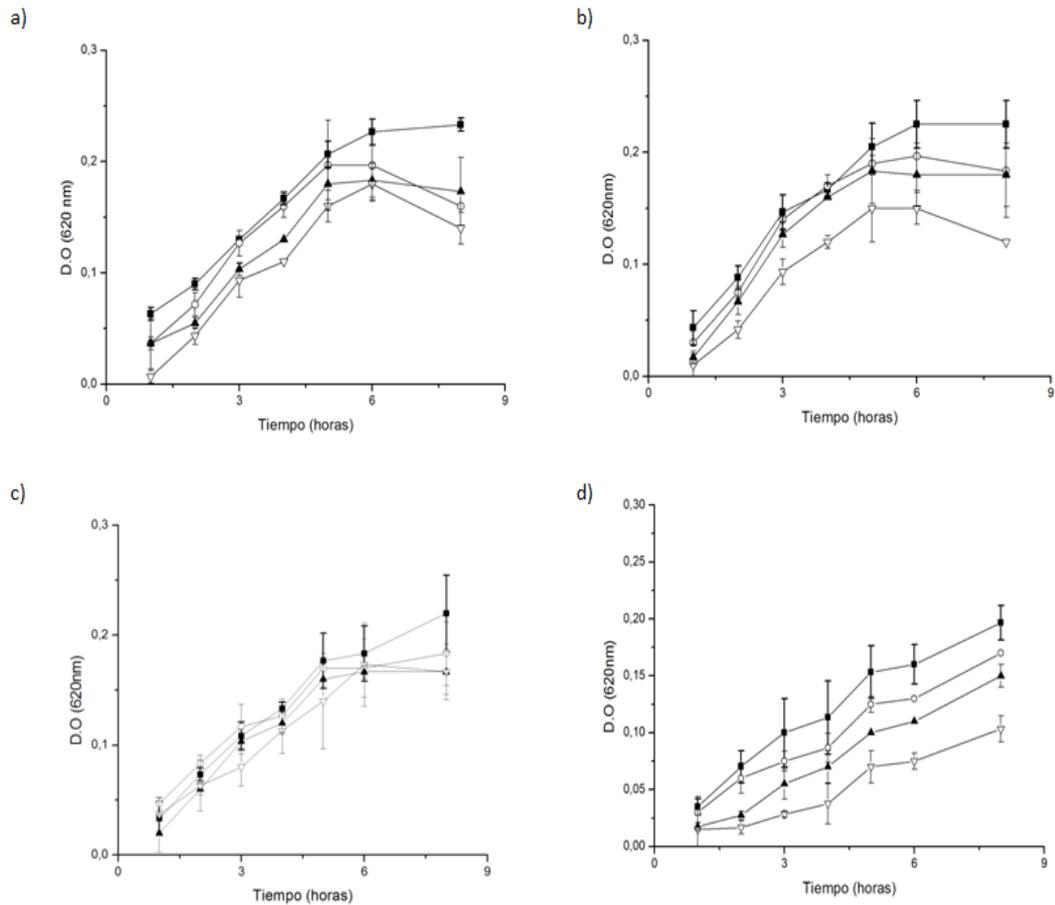


Figura 4.2. Curvas de crecimiento para los aislamientos de *Delftia* sp. y *Sinorhizobium meliloti* 1021 (control negativo). a) *Delftia* sp. 3C; b) *Delftia* sp. 6C; c) *Delftia* sp. JD2; d) *S. meliloti* 1021. En algunos casos las barras de error fueron menores a los tamaños de los símbolos. (■) Sin Pb(II), (○) 0,1 mM, (▲) 0,2 mM, (▽) 0,3 mM.

Los tres aislamientos de *Delftia* sp. presentaron perfiles de crecimiento similares, en presencia y ausencia de Pb(II), observándose que todos son capaces de crecer hasta una concentración 0,3 mM de Pb(II). No se observó fase lag en las condiciones ensayadas, probablemente debido a que el ensayo se realizó utilizando como precultivo microorganismos crecidos en el mismo medio de cultivo PYT400. Para todos los aislamientos se observaron mayores tiempos de generación al aumentar la concentración de Pb(II) (Tabla 4.2).

Al momento de la fase estacionaria, *Delftia* sp. 3C, *Delftia* sp. 6C y *Delftia* sp. JD2 lograron alcanzar aproximadamente un 80%, 90% y 95% de la DO obtenida en ausencia de Pb(II) respectivamente.

S. meliloti 1021 a una concentración de Pb(II) de 0,3 mM sólo alcanzó al momento de la fase estacionaria el 50 % de la DO obtenida en ausencia de Pb(II), sugiriendo que *S. meliloti* 1021 es efectivamente sensible a Pb(II).

Tabla 4.2. Tiempos de generación en presencia de Pb(II) para todos los aislamientos ensayados.

Aislamiento	Tiempos de Generación			
	Sin Pb(II)	0,1 mM	0,2 mM	0,3 mM
1021	2 h	2h 30 min	2 h 40 min	3 h
3C	2 h 10 min	2 h 10 min	2 h 30 min	2 h 40 min
6C	1 h 30 min	1 h 40 min	1 h 50 min	2 h 50 min
JD2	1 h 45 min	2 h 50 min	2 h 50 min	3 h 45 min

4.2 Búsqueda de integrones

4.2.1 Presencia de integrones por PCR

En la Fig. 4.3 (a) se muestra que utilizando el ADN de los aislamientos de *Delftia* se producen fragmentos de amplificación del tamaño esperado (500 pb; según el control

positivo *E. coli* R388) cuando se usan los cebadores correspondientes a integrones del tipo 1, sugiriendo que los tres aislamientos de *Delftia* poseen integrones del tipo 1. Por otro lado, no se pudo detectar la presencia de integrones del tipo 2 y 3 (Fig. 3.3 b y c).

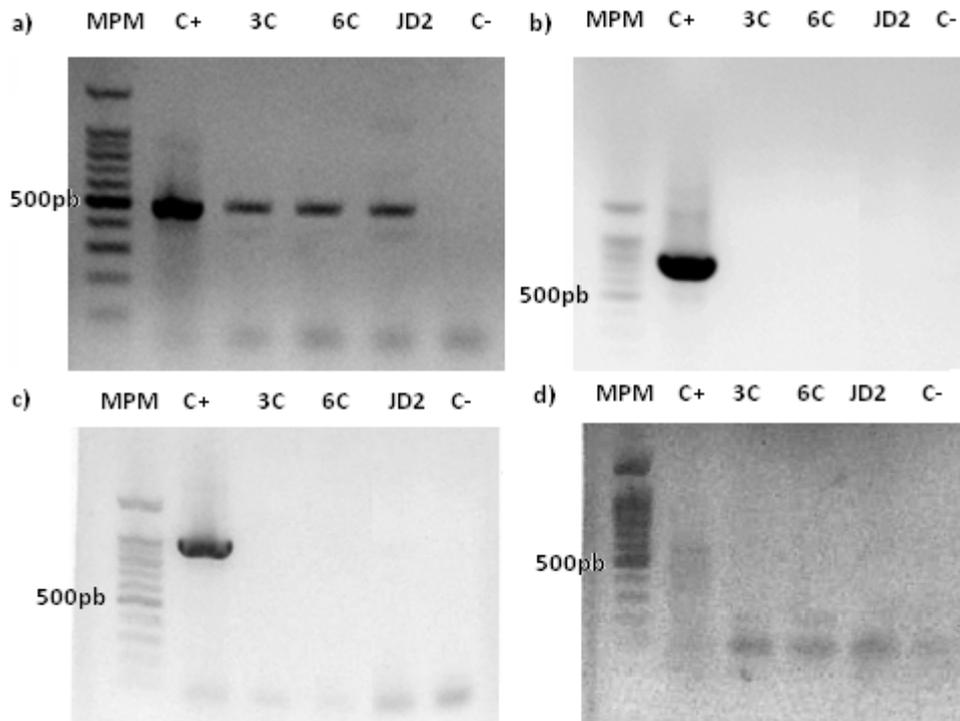


Figura 4.3. Búsqueda de integrones. a) Int11, b) Int1 2, c) Int1 3, d) Integrasa cromosomal. Sobre cada carril se indica el aislamiento analizado: *Delftia* spp. 3C, 6C, JD2, el control negativo (sin ADN) (C-) y el control positivo (C+). La sigla MPM corresponde a marcador de peso molecular de 100 pb de Promega. Se sembraron 5 μ L de cada uno de los productos de amplificación y 3 μ L del MPM.

Para confirmar la identidad de los fragmentos de 500 pb observados en la Fig. 3.3 (a), se procedió a su secuenciación siguiendo el protocolo indicado en Materiales y Métodos.

Se seleccionaron 64, 68 y 46 clones blancos con el inserto de integrones tipo 1 correspondiente a los aislamientos 6C, 3C y JD2, respectivamente.

Para confirmar la presencia del inserto por ensayos de PCR, se partió de lisados celulares, para los cuales se hicieron "pooles" de cinco clones. El resultado se observa en la Fig. 4.4.

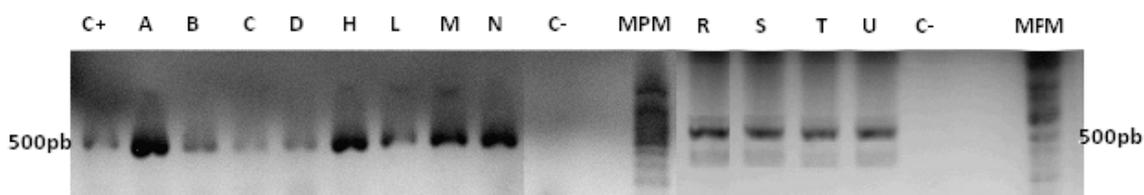


Figura 4.4. Búsqueda de clones transformantes que poseen el inserto Intl1 (500 pb) por PCR. Cada una de las letras corresponde a un "pool". A, B, C, D; H, L, M, N y R, S, T, U contienen insertos correspondientes a los aislamientos 3C, 6C y JD2, respectivamente.

A partir de aquellos "pooles" que mostraron la presencia del inserto (fragmento de amplificación del tamaño esperado), se hicieron nuevas PCR individuales (con cada integrante del "pool"). Los resultados se muestran en la Fig. 4.5.

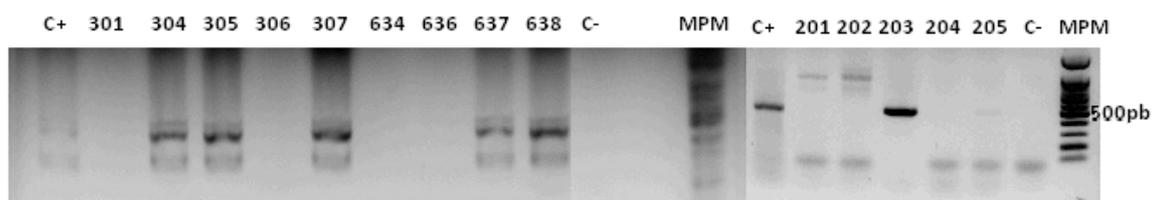
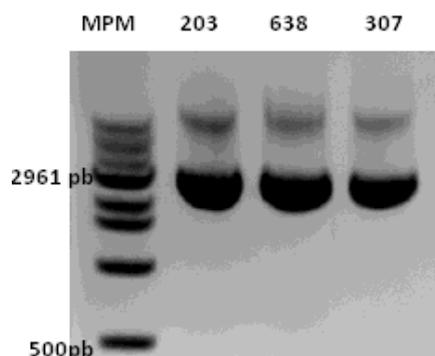


Figura 4.5. Búsqueda de clones transformantes que poseen el inserto Intl1 (500 pb) por PCR. Los carriles 301, 304, 305, 306, 307 corresponden a insertos provenientes del aislamiento *Delftia* sp. 3C. Los carriles 634, 636, 637, 638 corresponden a los insertos provenientes del aislamiento *Delftia* sp. 6C. Los carriles 201, 202, 203, 204 y 205 corresponden a insertos provenientes del aislamiento *Delftia* sp. JD2.

Se seleccionaron entonces los clones: 307 (para el aislamiento 3C), 638 (para el aislamiento 6C), y 203 (para el aislamiento JD2), y se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico tal cual se describió en Materiales y Métodos. Las mismas se controlaron en geles de agarosa (Fig. 4.6). Los plásmidos obtenidos se enviaron para la secuenciación del inserto al servicio de Macrogen (Corea).

Figura 4.6. Control de las minipreparaciones. Los carriles 203, 638 y 307 corresponden al número del clon seleccionado para hacer la minipreparación.



4.2.2 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas para los aislamientos de *Delftia sp.* 3C, 6C y JD2 se analizaron por comparación con la base de datos de la NCBI. Los resultados del BLASTn se detallan a continuación (Tablas 4.3, 4.4 y 4.5).

Tabla 4.3. Resultados del BLASTn, para la secuencia de la integrasa de 3C.

Número de Acceso	Descripción	Valor E	Identidad (%)
FM866490.1	Bacteria no cultivable, gen parcial de la integrasa de un integrón, Clon del cóntigo 0063.	0.0	99
JQ407409.1	<i>Klebsiella oxytoca</i> cepa 11005, secuencia parcial de integrón de clase 1.	0.0	99
JQ639792.1	<i>Acinetobacter baumannii</i> , secuencia del plásmido pAB154, gen de integrasa de un integrón de clase 1 (Intl 1).	0.0	99
JN870912.1	<i>Serratia sp.</i> cepa 7AN1, gen de la integrasa de un integrón de clase 1 (Intl 1).	0.0	99
JN870911.1	<i>Aeromonas sp.</i> cepa 1AC2, gen de la integrasa de un integrón de clase 1 (Intl 1).	0.0	99

Tabla 4.4. Resultados del BLASTn, para la secuencia de la integrasa de 6C.

Número de Acceso	Descripción	Valor E	Identidad (%)
FM866490.1	Bacteria no cultivable, gen parcial de la integrasa de un integrón, Clon del cóntigo 0063.	0.0	99
JQ407409.1	<i>Klebsiella oxytoca</i> cepa 11005, secuencia parcial del integrón de clase 1.	0.0	99
JQ639792.1	<i>Acinetobacter baumannii</i> , secuencia del plásmido pAB154, gen de la integrasa de un integrón de clase 1 (Intl 1).	0.0	99
JN870912.1	<i>Serratia sp.</i> cepa 7AN1, gen de la integrasa de un integrón de clase 1 (Intl 1).	0.0	99
JN870911.1	<i>Aeromonas sp.</i> cepa 1AC2, gen de la integrasa de un integrón de clase 1 (Intl 1).	0.0	99

Tabla 4.5. Resultados del BLASTn, para las secuencias correspondientes a la Intl1 correspondientes a JD2.

Número de Acceso	Descripción	Valor E	Identidad (%)
<u>FM866487.1</u>	Bacteria no cultivable, gen parcial parcial de integrasa de un integrón, Clon del cóntigo 0063.	0.0	99
<u>JQ407409.1</u>	<i>Klebsiella oxytoca</i> cepa 11005, secuencia parcial de integrón de clase 1.	0.0	99
<u>JQ639792.1</u>	<i>Acinetobacter baumannii</i> , secuencia del plásmido pAB154, gen de integrasa de un integrón de clase 1 (Intl 1).	0.0	99
<u>JN870912.1</u>	<i>Serratia sp.</i> Cepa 7AN1 gen de integrasa de un integrón de clase 1 (Intl 1).	0.0	99
<u>JN870911.1</u>	<i>Aeromonas sp.</i> cepa 1AC2 gen de integrasa de un integrón de clase 1 (Intl 1).	0.0	99

Los resultados presentados en las Tablas 4.3, 4.4 y 4.5 sugieren que los fragmentos enviados a secuenciar corresponden con secuencias de integrasas del tipo 1.

Se observó que las secuencias de los fragmentos correspondientes a la Intl1 son idénticas para los tres aislamientos *Delftia sp.* 3C , 6C y JD2 (Fig.4.7).

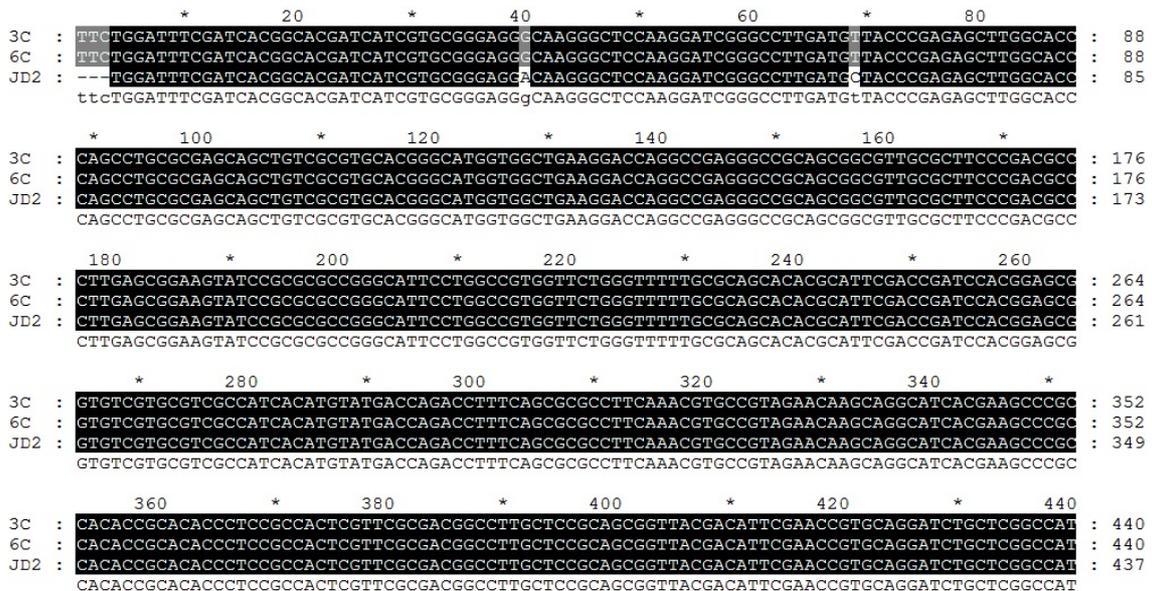


Figura 4.7. Alineamiento de las secuencias de Intl1 de los aislamientos de *Delftia sp.* 3C, 6C y JD2.

4.2.4 Búsqueda de casetes asociados a integrones

4.2.4.1 Amplificación por PCR

La búsqueda de casetes asociados a integrones se realizó mediante la técnica de PCR. Se observaron fragmentos de amplificación en el rango de 300 pb a 3000 pb (Fig. 4.6). Este resultado sugiere que los integrones poseen varios casetes de genes asociados al mismo.

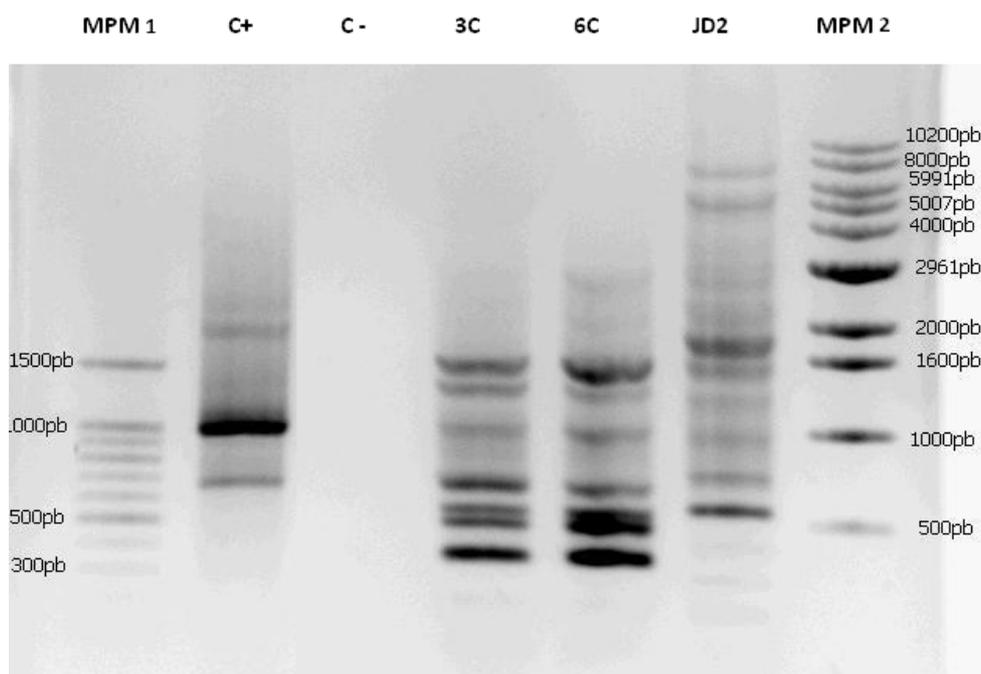


Figura 4.6. Búsqueda de casetes asociados a integrones. En la Figura se indican: los aislamientos de *Delftia sp.* 3C, 6C y JD2, control positivo (C+, *Xanthomonas campestris* ATCC 33913), y el control negativo (C-, sin ADN). La sigla MPM corresponde a marcador de peso molecular. Se sembraron 3 μ L del marcador de peso molecular MPM-1 de 100 pb de Promega, 3 μ L del marcador de peso molecular MPM-2 de 1kb de Bioneer, 5 μ L de producto de amplificación de C+ y 15 μ L de cada uno de los productos de amplificación restantes.

4.2.4.2 Identificación de casetes génicos

Para conocer la identidad de los genes en los casetes génicos, fue necesaria su secuenciación. Se seleccionó sólo el fragmento de 300 pb para el aislamiento de *Delftia sp.* 3C para su identificación (Fig.4.6).

El fragmento de amplificación se purificó y clonó en vectores con extremos T (pTZ57R/T), se transformó a células competentes de *E. coli* DH5 α , se seleccionaron los clones blancos y se controló la presencia del inserto, para finalmente realizar la minipreparación de ADN plasmídico que se envió a secuenciar a Macrogen.

Se obtuvieron 20 colonias blancas con el inserto de interés. Estas se lisaron individualmente y se analizaron mediante ensayos de PCR (Fig. 4.7).

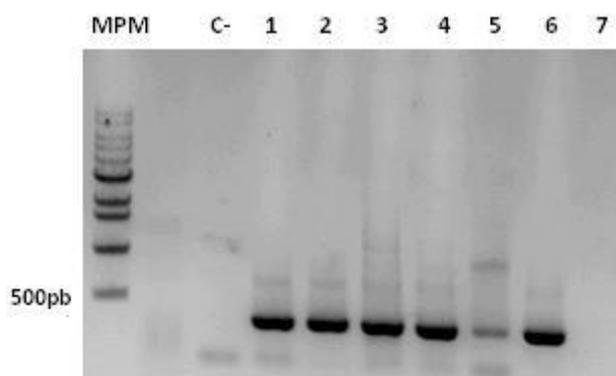


Figura 4.7. Búsqueda de clones que tienen inserto el casete génico de 300 pb por PCR.

Se seleccionó el clon 1, a partir del cual se hicieron minipreparaciones de ADN, que luego fueron enviadas a secuenciar al servicio de secuenciación de Macrogen (Corea).

4.2.4.3 Análisis de secuencias

Se secuenció el fragmento de amplificación que correspondería al primer casete génico del integrón de tipo 1 del aislamiento de *Delftia* sp. 3C. Los resultados del análisis por BLASTx se detallan en la Tabla 4.6. Se observó que el fragmento corresponde a una proteína de ensamblaje de fimbria, con un dominio GspH (Fig.4.8).

Tabla 4.6 Resultados del BLASTx para la secuencia correspondiente al primer casete génico.

Número de Acceso	Descripción	Valor E	Identidad (%)
ZP_08871767.1	Proteína de ensamblaje de pili Tfp. Proteína del tipo FimT [<i>Verminophrobacter aporrectodeae</i> subespecie <i>tuberculatae</i> At4]	5e-41	60
YP_995302.1	Proteína de ensamblaje de pili del tipo FimT [<i>Verminophrobacter eiseniae</i> EF01-2]	1e-30	51
ZP_08873598.1	Proteína de ensamblaje de pili del tipo FimT [<i>Verminophrobacter aporrectodeae</i> subespecie <i>tuberculatae</i> At4]	3e-28	57
YP_998556.1	Proteína de ensamblaje de pili del tipo FimT [<i>Verminophrobacter eiseniae</i> EF01-2]	1e-26	53
YP_004693475.1	Ruta de secreción general GspH [<i>Nitrosomonas</i> sp. I79A3]	5e-08	32

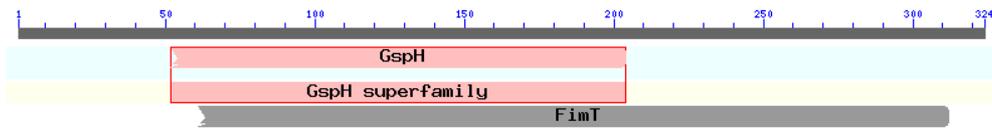


Figura 4.8. Dominios conservados encontrados en las proteínas que surgen durante el análisis por BLASTx del fragmento secuenciado. Se muestra un dominio del tipo GspH y un dominio FimT. La barra superior indica entre cuales nucleótidos se encuentran codificados los dominios detectados.

6. Discusión

En este trabajo se utilizaron tres aislamientos resistentes a MP: dos aislamientos de *Delftia sp.* aislados de suelos contaminados con Pb, denominados 3C y 6C; y un aislamiento de *Delftia sp.* aislado de un suelo contaminado con Cr, denominado JD2. En un trabajo anterior a esta tesis, JD2 fue parcialmente caracterizado como un microorganismo resistente a Cr(VI), potencial reductor de Cr(VI) a Cr(III), y agente promotor del crecimiento vegetal (Morel et al., 2011). Por otro lado, 3C y 6C fueron caracterizados como microorganismos resistentes a Pb(II) y a varios antibióticos (Ubalde M.; comunicación personal).

Los resultados obtenidos durante esta tesis muestran que los aislamientos de *Delftia sp.* poseen resistencia cruzada a Cr(VI) y Pb(II). Este no es el primer reporte de una bacteria del género *Delftia* resistente a Cr(VI). Ya había sido previamente reportada una *Delftia acidovorans* AR resistente a Cr(VI) (Garavaglia et al., 2010). Esta bacteria resiste concentraciones de 2,5 mg/L de Cr(VI), una concentración mucho menor a la reportada para los aislamientos analizados durante esta tesis: aprox. 50 mg/L (1 mM) para 3C y 6C, y 100 mg/L (2mM) para JD2. En el caso de Pb(II), se reportó que la cepa *P. aeruginosa* MCCB-102 resiste concentraciones de 1,5 mM de Pb(II) (Zolgharnein et al. 2010), alcanzando un crecimiento del 40% respecto al alcanzado en ausencia de Pb. Durante esta tesis sólo se analizaron concentraciones de Pb(II) de hasta 0,3 mM [80-95% de la turbidez alcanzada en ausencia de Pb(II)], ya que a mayores concentraciones la precipitación del metal interfería en las medidas de crecimiento en medio PYT400 a 620nm.

En un trabajo previo llevado a cabo por una estudiante de nuestro laboratorio (Ubalde et al., 2012), se determinó que los aislamientos de *Delftia sp.* 3C, 6C y JD2, son también resistentes a varios antibióticos: cloranfenicol, kanamicina, neomicina, ampicilina, ácido nalidíxico y rifampicina. En conjunto, los resultados muestran que los aislamientos de *Delftia sp.* son resistentes a MP (al menos Cr y Pb) y poseen múltiple resistencia a antibióticos.

Aunque no se ha indicado directamente que la exposición a MP sea co-seleccionada con la resistencia a antibióticos (Baker-Austin et al., 2006), se conoce desde hace varias décadas, que los genes de resistencia a antibióticos y MP están localizados juntos, dentro del mismo elemento genético (transposones, plásmidos o integrones) (Baker-Austin et al., 2006). Por ejemplo, en el año 2011, Petrova et al., reportaron la estructura del transposon Tn5045, encontrando un integrón de clase 1 que poseía el casete génico de resistencia a antibióticos *aadA2* (resistencia a estreptomicina), que contenía curiosamente dentro de su módulo de

transposición tni, en su extremo 3' conservado, algunos determinantes para la resistencia a Cr(VI) (*chrA*, *chrB*, *chrC* y *chrF*). Este es un ejemplo de co-resistencia determinada por elementos que se encuentran localizados dentro del mismo elemento genético, un integrón.

Durante esta tesina se analizó también la presencia de integrones de las clases 1, 2 y 3 en los tres aislamientos de *Delftia* resistentes a MP y antibióticos, lográndose detectar solamente integrones de clase 1. El análisis de las tres secuencias nucleotídicas en la base de datos de la NCBI mostró en la totalidad de los casos un 99% de identidad con integrasas de clase 1 de los microorganismos *Klebsiella oxytoca* (origen clínico, patógeno oportunista), *Acinetobacter baumannii* (origen clínico, infecciones nosocomiales), *Aeromonas* sp. (origen ambiental, degradadores de xenobióticos), *Serratia* sp. (origen ambiental, degradadores de xenobióticos), entre otras. Algunas de estas integrasas de clase 1 provienen de ambientes clínicos y otras de ambientes naturales. Esto indica que los integrones encontrados están presentes tanto en ambientes clínicos como naturales, apoyando la afirmación de que los integrones de clase 1 son predominantes en ambientes naturales y son los que están mayormente representados en sitios contaminados con MP, tal cual reportan Rosewarne et al., (2010).

Este no es el primer reporte de integrones en cepas de *Delftia* sp., ya que habían sido reportados previamente la presencia de integrones de clase 3 (Xu et al., 2007), pero es el primer reporte de integrones de clase 1 en aislamientos de este género. Si bien los integrones de las clases 1 y 3 fueron previamente encontrados en aislamientos ambientales, no se les asignó función conocida a sus casetes génicos (Cambray et al., 2010).

Al analizar el primer casete génico del integrón de clase 1 del aislamiento 3C, se determinó que se trataba de una proteína de ensamblaje de fimbria de tipo 4, con un dominio del tipo GspH (que consiste en una hélice alfa, seguida por nueve cadenas beta, que se pliegan formando dos láminas beta, una de cuatro y otra de cinco cadenas beta antiparalelas). Las fimbrias de tipo 4 son organelos polares que se presentan en la superficie de bacterias patógenas y que usualmente están implicadas en la unión y la colonización de superficies epiteliales. Estas fimbrias también pueden estar implicadas en una forma de movimiento celular, flagelo-independiente, en superficies sólidas o semisólidas (fenómeno conocido en inglés como swarming o twitching) (Alm et al., 1996). Este tipo de movimiento podría darle una ventaja selectiva al aislamiento 3C debido que le permitiría acceder a nuevas fuentes de energía para su mantenimiento o alejarse de un posible tóxico, entre otras.

7. Conclusiones y Perspectivas

Durante esta tesina se determinó que los aislamientos de *Delftia* sp. 3C, 6C y JD2 presentan resistencia a los MP Cr(VI) y Pb(II). Además, se logró determinar la presencia de integrones de clase 1 para todos los aislamientos, y se caracterizó el primer gen del casete génico del aislamiento 3C, que codifica para una proteína de ensamblaje de fimbria de tipo 4.

Este trabajo se podría continuar secuenciando en toda su extensión los integrones de tipo 1 de los tres aislamientos, y determinando qué funciones están asociadas a los casetes génicos, poniendo énfasis en la codificación de funciones de resistencia a metales pesados. Esto permitiría tener una mejor idea del parentesco de este integrón de clase 1 con integrones de ambientes clínicos o naturales, se debería determinar su asociación con transposones u otros elementos genéticos móviles.

Paralelamente, se debería determinar la resistencia a otros metales pesados en estos tres aislamientos.

Algunos de los resultados de este trabajo se publicaron en Ubalde et al., (2012) Curr Microbiol 64:597-603. Se adjunta al final de esta tesina.

8. Anexos

Anexo 1: Medios de cultivo

Medio de cultivo TY:

	Cantidad
Triptona	5 g
Extracto de Levadura	3 g
CaCl ₂	0,09 g
Agua destilada csp	1000 mL

Medio de cultivo PYT 400:

	Cantidad
Peptona	400 mg
Extracto de Levadura	400 mg
Triptona	400 mg
KNO ₃	1 g
Glucosa (1M) esterilizada aparte y agregada luego de haber esterilizado el resto de los componentes del medio.	10 mL
Agua destilada csp	1000 mL

Medio de cultivo LB:

	Cantidad
Triptona	10 g
Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada csp	1000 mL

Anexo 2: Buffers

Buffer TAE 0.5%:

	Cantidad
Tris	4,84 g
Ácido Acético glacial	1.14 mL
EDTA 0,5M PH=8	2 mL
Agua destilada csp	1000 mL

Anexo 3: Equivalencias de bases degeneradas empleadas en los cebadores.

	T	C	A	G
R			•	•
Y	•	•		
M		•	•	
K	•			•
S		•		•
W	•		•	
H	•	•	•	
B	•	•		•
V		•	•	•
D	•		•	•
N	•	•	•	•

9. Referencias

- Agrawal, J., Sherameti, I. & Varma, A. Detoxification of Heavy Metals: State of Art. *Detoxification of Heavy Metals* 30, 1-34 (2011).
- Aguilar-Barajas, E., Ramírez-Díaz, M.I., Riveros-Rosas, H. & Cervantes, C. Heavy Metal Resistance in *Pseudomonas*. *Pseudomonas*. 6,255-282 (2010)
- Alm, R. a & Mattick, J.S. Identification of two genes with prepilin-like leader sequences involved in type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 178, 3809-17 (1996).
- Arakawa, Y. et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 39, 1612-5 (1995).
- Baker-Austin, C., Wright, M.S., Stepanauskas, R. & McArthur, J.V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in microbiology* 14, 176-82 (2006).
- Barceloux, D.G. Chromium. *Clinical toxicology* . 37, 173-94 (1999).
- Barlow, R.S., Pemberton, J.M., Desmarchelier, P.M. & Gobius, K.S. Isolation and Characterization of Integron-Containing Bacteria without Antibiotic Selection. *Society* 48, 838-842 (2004).
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J.E. & Stokes, H.W. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends in microbiology* 15, 301-9 (2007).
- Branco, R. et al. The chromate-inducible *chrBACF* operon from the transposable element *TnOtChr* confers resistance to chromium(VI) and superoxide. *Journal of bacteriology* 190, 6996-7003 (2008).
- Bridges, C.C. & Zalups, R.K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicology and applied pharmacology* 204, 274-308 (2005).
- Cambray, G., Guerout, A.-M. & Mazel, D. Integrons. *Annual review of genetics* 44, 141-66 (2010).
- Castro-Sowinski, S., Martinez-Drets, G. & Okon, Y. Laccase activity in melanin-producing strains of *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS microbiology letters* 209, 119-25 (2002).
- Cervantes, C. et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS microbiology reviews* 25, 335-47 (2001).
- Cervantes, C. Reduction and Efflux of Chromate by Bacteria. *Molecular Microbiology* (2007).doi:10.1007/7171

- Cheung, K. & Gu, J. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59, 8-15 (2007).
- Conza, J.A.D.I. & Gutkind, G.O. Integrones : los coleccionistas de genes. 63-78 (2010).
- Duffus , J.H. (IUPAC T.R. "Heavy metals"—a meaningless term? *Pure Appl. Chem* Vol. 74, 793-807 (2002).
- Gagneten, A.M., Gervasio, S. & Paggi, J.C. Heavy Metal Pollution and Eutrophication in the Lower Salado River Basin (Argentina). *Water* 178, 335-349 (2007).
- Garavaglia, L., Cerdeira, S.B. & Vullo, D.L. Chromium (VI) biotransformation by beta- and gamma-Proteobacteria from natural polluted environments: a combined biological and chemical treatment for industrial wastes. *Journal of hazardous materials* 175, 104-110 (2010).
- Gillings, M. et al. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of bacteriology* 190, 5095-1100 (2008).
- Gillings, M. et al. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of bacteriology* 190, 5095-1100 (2008).
- Gillings, M.R., Holley, M.P., Stokes, H.W. & Holmes, A.J. Integrons in *Xanthomonas*: a source of species genome diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4419-24 (2005).
- Goering, P.L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *NeuroToxicology* 14, 45-60 (1993).
- Grupo Ambiental de Montevideo www.gam.org.uy. (2007). <<http://www.gam.org.uy>>
- Hall, R.M. & Collis, C.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Molecular Microbiology* 15, 593-600 (1995).
- Hynninen, A., Touzé, T., Pitkänen, L., Mengin-Lecreulx, D. & Virta, M. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. *Molecular microbiology* 74, 384-94 (2009).
- Levinson, H.S. & Mahler, I. Phosphatase activity and lead resistance in *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* 161, 135-8 (1998).
- Márquez, C. et al. Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *Journal of clinical microbiology* 46, 3417-25 (2008).
- Mazel, D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature reviews. Microbiology* 4, 608-20 (2006).

Mergeay, M. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends in biotechnology* 9, 17-24 (1991).

Morel, M. a et al. Cellular and biochemical response to Cr(VI) in *Stenotrophomonas* sp. *FEMS microbiology letters* 291, 162-8 (2009).

Morel, M. a, Ubalde, M.C., Braña, V. & Castro-Sowinski, S. *Delftia* sp. JD2: a potential Cr(VI)-reducing agent with plant growth-promoting activity. *Archives of microbiology* 193, 63-8 (2011).

Morel, M.A. Mecanismos implicados en la tolerancia a cromo en bacterias: potenciales aplicaciones biotecnológicas. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Nield, B.S. et al. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiology Letters* 195, 59-65 (2001).

Peacock, a D. et al. Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation. *Microbial ecology* 47, 284-92 (2004).

Ramírez, M.S., Bello, H., González Rocha, G., Márquez, C. & Centrón, D. Tn7::In2-8 dispersion in multidrug resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* from Chile. *Revista Argentina de microbiología* 42, 138-40 (2010).

Recchia, G.D. & Hall, R.M. Gene cassettes: class of mobile element. *Microbiology* 141, 3015–3027 (1995).

Roane, T.M. Lead Resistance in Two Bacterial Isolates from Heavy Metal–Contaminated Soils. *Microbial Ecology* 37, 218-224 (1999).

Rosewarne, C.P., Pettigrove, V., Stokes, H.W. & Parsons, Y.M. Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS microbiology ecology* 72, 35-46 (2010).

Rouch, D.A., Lee, B.T. & Morby, A.P. Understanding cellular responses to toxic agents: a model for mechanism-choice in bacterial metal resistance. *Journal Of Industrial Microbiology* 14, 132-141 (1995).

Silver, S. & Phung, L.T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annual Review of Microbiology* 50, 753-789 (1996).

Stearns, D.M., Courtney, K.D., Giangrande, P.H., Phieffer, L.S. & Wetterhahn, K.E. Chromium(VI) reduction by ascorbate: role of reactive intermediates in DNA damage in vitro. *Environmental health perspectives* 102, 21-5 (1994).

Stewart, P.S. & Costerton, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135-8 (2001).

Valverde, a. et al. Assessment of genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolates from Israel by various DNA fingerprinting techniques. *Plant Pathology* 56, 17-25 (2007).

Wireman, J.O.Y., Liebert, C.A., Smith, T. & Summers, A.O. Association of Mercury Resistance with Antibiotic Resistance in the Gram-Negative Fecal Bacteria of Primates. 63, 4494-4503 (1997).

Xu, H., Davies, J. & Miao, V. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *Journal of bacteriology* 189, 6276-83 (2007).

Zolgharnein, H. et al. Investigation of Heavy Metals Biosorption on *Pseudomonas aeruginosa* Strain MCCB 102 Isolated from Persian Gulf. *Asian Journal of Biotechnology* 2, 99-109 (2010).