



Universidad de la República
Facultad de Ciencias
PEDECIBA Biología
Sub-área Microbiología

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MECANISMOS DE TRANSFERENCIA HORIZONTAL GENÉTICA
ASOCIADOS A LA DEGRADACIÓN DE GASOIL Y DE RESISTENCIA A
ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS HETERÓTROFAS DE SUELOS DE LA
ANTÁRTIDA

Verónica Beatriz Antelo Gutiérrez

Orientador: Dra. Silvia Batista

Tribunal

Dra. Lilián Frioni (Presidente)

Q.F. Alicia Arias (Vocal)

Dra. María Julia Pianzola (Vocal)

Unidad de Microbiología Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo

Uruguay

2012

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en la identificación de mecanismos de transferencia horizontal genética asociados con la degradación de gasoil y resistencia a antibióticos en bacterias heterótrofas provenientes de suelos de la Antártida.

Una colección de aislamientos bacterianos cultivados a partir muestras de suelo/sedimento y agua de cañadas de deshielo de diferentes sitios de la península Fildes (Isla Rey Jorge), incluyendo áreas bajo evidente influencia humana y animal y zonas presuntamente prístinas fue analizada por su capacidad de crecimiento a distintas temperaturas.

Se obtuvo una colección de organismos psicotolerantes que exhibieron altos niveles de resistencia a antibióticos del grupo de los aminoglucósidos, β -lactámicos, quinolonas y trimetoprim. De esta colección, se seleccionaron también aquellos aislamientos capaces de metabolizar hidrocarburos presentes en el gasoil antártico, con el objetivo de identificar los genes asociados.

Se obtuvieron consorcios microbianos capaces de utilizar el gasoil antártico como fuente de carbono y energía y se determinó la presencia de parte del gen *ndo* responsable de la metabolización del naftaleno. El resultado de este análisis indicó que el gen *ndo* amplificado tenía alta similitud (99%) con genes *ndo* descritos en miembros del género *Pseudomonas* sp. asociados a elementos móviles como NAH7 e IncP-9. Estos consorcios podrían ser potencialmente útiles para el diseño de técnicas de biorremediación en el continente Antártico.

Se investigó la presencia de integrones clase 1 y genes *cassette* asociados, con el objetivo de estudiar estos elementos genéticos comúnmente encontrados en el ambiente hospitalario, en un ecosistema considerado extremo y relativamente alejado de la influencia humana. Para ello se seleccionaron 32 aislamientos resistentes a trimetoprim y se determinó la presencia de genes integrasa *intI1*. En seis aislamientos, el gen integrasa *intI1* se localizó en un plásmido conjugativo con una organización genética similar a la descrita en los plásmidos pKOX105 de *Klebsiella oxytoca*, pHCM1 de *Salmonella typhi* CT18 y p12 de *Klebsiella pneumoniae* 12, todas cepas de origen clínico. Próximo al sitio *attI* del integrón, se encontró el gen *dfrA14*, conservado, que codificaría para la enzima dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia a trimetoprim.

Este es el primer estudio donde se describe la presencia de genes integrasa de clase 1 (*intI1*) localizados en plásmidos con la capacidad de transferir el fenotipo antibiótico resistente en enterobacterias psicotolerantes aisladas de suelos antárticos.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Silvia Batista, por abrirme las puertas del laboratorio, por enseñarme, por su confianza y por su apoyo constante.

A todos mis compañeros del laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE por los buenos momentos compartidos durante todos estos años.

A Dani Senatore por su compañerismo, su buena disposición siempre y por su buena onda.

A Ceci Taule por sus consejos y comentarios en el análisis filogenético y por darme ánimo.

A Nati Bajsa por las fotos de la Antártida que son parte de este trabajo.

A todos los integrantes de la Unidad de Plasticidad del Genoma Bacteriano del Instituto Pasteur de París. Gracias por su amabilidad y por hacerme sentir como en casa desde el primer momento.

A Didier Mazel por recibirme en su laboratorio, por su gentileza y generosidad, y sobre todo por haberme permitido vivir una experiencia maravillosa.

A Anne-Marie Güerot por su simpatía y su buena disposición para guiarme en el laboratorio.

Al Instituto Antártico Uruguayo por su apoyo en la realización de este proyecto.

Gracias a mi familia: A mi madre por su amor y su apoyo incondicional y a mi abuela por enseñarme el valor del estudio, a pesar de su ausencia física siempre estarán conmigo.

A Lany, mi esposo, quien me apoyó desde siempre y en todo momento. Sin él nada hubiera sido posible.

A mis hijos Adrián y Marcel, por su amor y por haberme esperado todo este tiempo.

A Adrián que diseñó la portada.

A mi padre y a mi hermano Rober por su cariño.

A mi tío Hugo por su interés y curiosidad en la ciencia y por haber estado presente en los momentos difíciles.

A todas mis amigas que me apoyaron y acompañaron: Alba, Ana, Gaby, Grace, Laura, Estela, las Sil y mi prima Paty.

A Carmen por sus sabios consejos y sobre todo por escucharme.

A todos Gracias!!!

ÍNDICE

Capítulo I: INTRODUCCIÓN

1- Ecosistema Antártico	2
1.1- Antártida marítima	3
2- ORGANISMOS METABOLIZADORES DE HIDROCARBUROS	
2.1- Composición del petróleo	5
2.2 - Presencia de hidrocarburos en el ecosistema antártico	6
2.3 - Aplicaciones biotecnológicas: Biorremediación	7
3 - ORGANISMOS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS. ELEMENTOS GENÉTICOS INVOLUCRADOS. INTEGRONES.	
3.1- Origen y evolución de la resistencia antibiótica	9
3.2- Antibióticos: Mecanismos de acción y resistencia bacteriana	11
3.3-Trimetoprim: Modo de acción y mecanismos de resistencia	13
3.4-.Integrones: Antecedentes	15
3.5- Estructura de un integrón	16
3.6- Clasificación	19
3.7- Integrones de clase 1: Estructura	21
3.8- Hipótesis evolutiva de integrones clase 1	22

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo	24
Objetivos	25

Capitulo II: MATERIALES Y MÉTODOS

1- Colecta y almacenamiento de muestras en la BCAA	27
2- Medios de cultivo	28
3- Aislamiento de microorganismos cultivables	28
4 - Cultivo y selección de aislamientos bacterianos en medio H1-gasoil	28
5- Cepas bacterianas utilizadas	29

6- Perfil de crecimiento	29
7- Ensayos de conjugación	31
8- Técnicas moleculares	32
8.1- Oligonucleótidos utilizados	32
8.2- Lisados de células	33
8.3 - Purificación de ADN	33
8.4- Productos de PCR	33
8.5- Electroforesis en geles de agarosa	34
8.6- Clonado de productos de PCR	34
8.7- Transformación de células competentes	34
8.8- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
9 - Genes integrasa	34
10 - Genes naftaleno dioxigenasa	35
11 - ERIC-PCR	35
12- Genes 16S ARNr	35
13- Análisis bioinformático de secuencias de ADN	36

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1- Obtención de microorganismos capaces de metabolizar hidrocarburos	38
1.2.- Perfil de crecimiento en presencia de gasoil	39
1.3 - Detección de genes naftaleno dioxigenasa	41
1.4 - Identidad de los aislamientos degradadores de hidrocarburos	43
2 - Organismos resistentes a antibióticos	46
2.1- Identidad de los aislamientos	49
2.2 - Integrones clase 1 (<i>int1</i>) asociados a fenotipo Trim ^r	52
2.3- Localización del gen integrasa	56
2.4- Identificación del gen <i>cassette</i> asociado a <i>int1</i>	56
2.5 - Análisis de secuencia del ORF ubicado corriente arriba de <i>dfrA14</i>	59

2.6- Fenotipo Trim ^f transferible	61
2.7 -Genes <i>qac</i> y <i>sul</i>	64
2.8- Identidad de los aislamientos integrasa positivos	66
2.9- Estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento	70
2.10- Análisis de genotipos (rep-ERIC PCR)	73
2.11 Análisis filogenético basado en la secuencia 16S ARNr	75
2.12 Análisis filogenético basado en la secuencia del gen <i>dfrA14</i>	78
3.1- Integrones clase 2 (<i>intl2</i>)	80
3.2- Integrones clase 3 (<i>intl3</i>)	80
3.3- Análisis metagenómico genes integrasa clase 1, 2 y 3, genes <i>qac</i> y <i>sul</i>	80
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	113

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1- ECOSISTEMA ANTÁRTICO

El continente antártico se define como el territorio ubicado al sur del paralelo 60°. Posee un área de 12,3 millones de Km² incluyendo las barreras de hielo, lo que representa aproximadamente el 10% del área terrestre mundial. Se encuentra circunscrito por el Círculo Polar Antártico, en el paralelo 66°33' de latitud Sur (Campbell y col., 2009) (figura 1).

El 99% de su superficie se encuentra con cobertura permanente de hielo (Elliot, 1985) y representa la mayor reserva de agua dulce del planeta. Las escasas áreas que carecen de hielo permanente (2%) se encuentran generalmente en las costas (Peck y col., 2006).

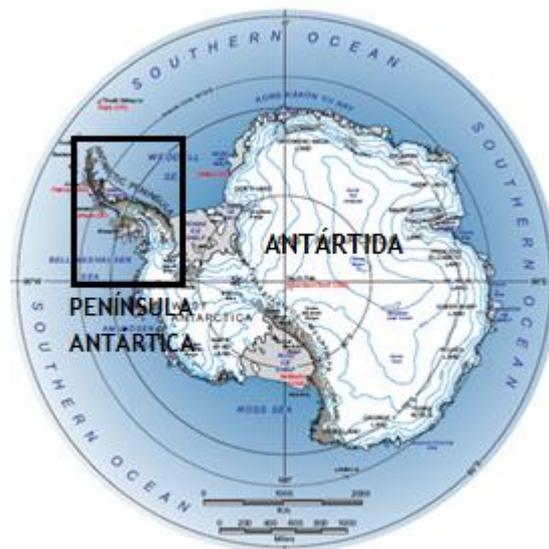


Figura 1: Continente antártico. Península Antártica.

(<http://paseocontinentes.wikispaces.com/Continente++Antartida>)

Actualmente se reconocen tres zonas biogeográficas que se diferencian tanto desde el punto de vista biológico como climático: la región sub-antártica, la Antártida marítima y la Antártida continental (figura 2).

Estas tres regiones se diferencian principalmente por las temperaturas medias estivales y anuales y por las precipitaciones y vientos. Las mayores precipitaciones se registran en la Antártida marítima (400-600 mm por año), con temperaturas medias anuales que van desde 1°C hasta -21°C (Serrano, 2001).



Figura 2: Zonas biogeográficas de la Antártida

1.2- Antártida marítima

La isla Rey Jorge se ubica en la zona denominada Antártida marítima y es la más grande del archipiélago de las Islas Shetland del Sur. La Península Fildes ubicada al suroeste de la isla Rey Jorge, es la región sin cobertura de hielo permanente más extensa de la isla, con suelos erosionados que derivan principalmente de rocas volcánicas y también rocas sedimentarias (Zhao y col., 1995) (figura 3).

Los suelos antárticos son considerados pobres debido a la escasez de nutrientes. Sin embargo, el retroceso de los glaciares provocado por el calentamiento global, ha permitido la colonización de especies vegetales y la subsecuente formación de suelo (Bölter, 2011). En las zonas costeras principalmente, se puede observar el desarrollo de especies vegetales como *Deschampsia antarctica* y *Colobantus quitensis* y algunas especies de líquenes algas, claros indicadores de un suelo en incipiente desarrollo (Zhao y col., 1995, Bölter, 2011).

Durante la estación estival, el paisaje de la isla adquiere un aspecto particular que contrasta con las áreas adyacentes cubiertas por el Glaciar Collins. El paisaje rocoso con algunos lagos, se cubre de pequeños arroyos y cañadas de deshielo que se forman con agua proveniente del glaciar y nieve fundida (Vincent, 2000) (Anexo 5 figura 1).

A medida que avanza el verano se van formando alfombras de briofitas, líquenes y tapetes microbianos, que generan un paisaje con aspecto emparchado (Anexo 5 figura 2).

Los tapetes microbianos son considerados ecosistemas a micro-escala que se caracterizan por un fluctuante gradiente físico-químico donde el flujo de luz, oxígeno y sulfuro juegan un rol preponderante (Stal, 1995). Los microorganismos que constituyen estos tapetes se disponen siguiendo un patrón de estratificación vertical con colores característicos, que se ve reflejado por los distintos pigmentos producidos. Las cianobacterias (productores primarios) se disponen en las capas superiores y las bacterias heterótrofas que se ubican por debajo, utilizan la materia orgánica producida por éstas para su crecimiento (Camacho y col., 2005).

Las comunidades microbianas son los principales componentes de la biomasa en la Antártida, participando en el reciclaje de nutrientes y en el flujo de carbono y energía (Vincent, 2000).

Actualmente 26 naciones se encuentran representadas en la Antártida con 50 bases establecidas. La mayoría de ellas se ubican en la Península Antártica, algunas con carácter permanente y otras activas únicamente durante el verano.

La Base Científica Artigas (BCAA) localizada en la Península Fildes ($62^{\circ}11'4''S$ $58^{\circ}51'7''W$), se encuentra activa durante todo el año y proporciona el apoyo logístico necesario para la realización de las actividades científicas del Programa Antártico Nacional (www.antarkos.org.uy).

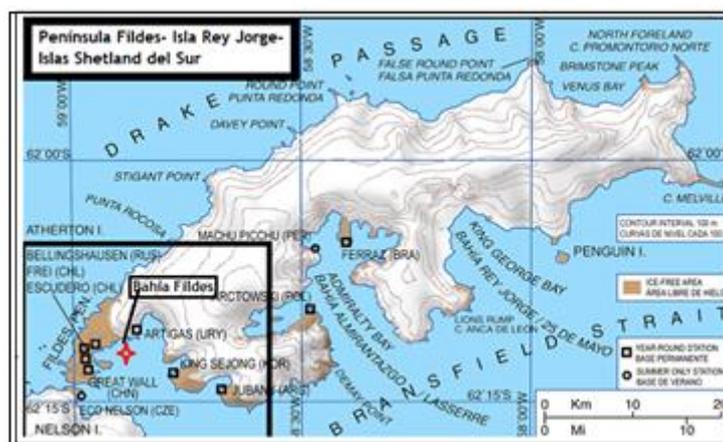


Figura 3: Isla Rey Jorge-Península Fildes

Las actividades que se desarrollan en la Antártida están regidas por el Protocolo al Tratado Antártico sobre la Protección del Medio Ambiente (1998) firmado en Madrid en 1991. Este Protocolo tiene como objetivo “la protección global del medio ambiente antártico y los ecosistemas dependientes y asociados” y designa

a la Antártida “*como reserva natural, consagrada a la paz y a la ciencia*” (Art.2) (<http://www.ats.aq>).

De esta forma, el Tratado establece normas claras que regulan la actividad humana en este continente, intentando reducir al mínimo el impacto humano en la flora y fauna nativas para la preservación del ecosistema antártico.

2-ORGANISMOS METABOLIZADORES DE HIDROCARBUROS

2.1 - Composición del petróleo.

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos y de heterocompuestos que contienen átomos de nitrógeno, azufre y oxígeno así como algunos metales como vanadio y níquel (Van Hamme, 2003). Los hidrocarburos del petróleo están constituidos principalmente por alcanos de cadena lineal (*n*-alcanos o *n*-parafinas), alcanos ramificados, cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos (Fernández y col., 1992).

El proceso de refinado del crudo de petróleo genera compuestos derivados que son potencialmente peligrosos para el medio ambiente. Este proceso de destilación ocurre a temperaturas crecientes dando lugar a distintas fracciones que constituyen los principales componentes del petróleo (Viñas, 2005).

El gasoil pertenece a la fracción intermedia del destilado (185°C y 345°C). Está compuesto por un 30% de parafinas (*n*-alcanos e isoprenoides, mayormente de 15-17C), 45% de naftenos (cicloalcanos) y 25% de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs). Dentro de los aromáticos los más abundantes son el naftaleno, derivados alquilados y los alquilbencenos y en menor proporción el fenantreno y el fluoreno (Viñas, 2005).

Los HPAs son una clase importante de xenobióticos que persisten en el suelo y sedimentos, siendo por lo tanto un motivo de preocupación debido a sus propiedades carcinogénicas, mutagénicas y su elevada toxicidad (Cerniglia, 1993).

La biodegradación de hidrocarburos por poblaciones naturales de microorganismos tales como bacterias, levaduras, hongos y algas, representa uno de los primeros mecanismos por los cuales el petróleo y sus derivados pueden ser removidos del ambiente (Leahy y Colwell, 1990, Van Hamme, 2003).

La biodegradación es el proceso por el cual los microorganismos transforman o alteran, mediante la acción enzimática u otros mecanismos fisiológicos, la estructura de compuestos químicos que han sido introducidos en el medio ambiente (U.S. Environmental Protection Agency, 2009). La biodegradación de estos compuestos es un proceso complejo cuya eficiencia dependerá de la naturaleza y cantidad de los

hidrocarburos que componen el sustrato, de las condiciones físicas, químicas y biológicas del ecosistema afectado, así como de la composición y características de la población microbiana presente. La disponibilidad de nutrientes, especialmente el nitrógeno y el fósforo, son los factores limitantes más comunes (Leahy y Colwell, 1990, Atlas, 1991, Van Hamme, 2003).

La composición del gasoil, rica en *n*-alcanos de cadena media (C₁₀-C₂₅) y pobre en fracciones más recalcitrantes como resinas y asfaltenos, permite un consumo significativo de los componentes del gasoil por parte de ciertos microorganismos (Eriksson y col., 1998).

La ruta metabólica principal para la degradación de compuestos aromáticos es iniciada por un sistema multienzimático denominado naftaleno dioxigenasa (NDO) que cataliza el primer paso de la ruta catabólica del naftaleno (Kauppi y col., 1998).

2.2. Presencia de hidrocarburos en el ecosistema antártico

La Antártida es considerada una de las últimas regiones prístinas que aún quedan sobre la Tierra. Sin embargo, desde el siglo pasado el hombre ha alterado de forma creciente el ambiente antártico (Ma y col., 2006).

El uso de combustible para la generación de energía, electricidad, calefacción y operación de vehículos conlleva una contaminación por hidrocarburos en sitios cercanos a las bases (Aislabie y col., 1999, 2004). Los combustibles fósiles y en particular el diesel han sido la principal fuente de energía utilizada. Las estaciones antárticas utilizan un promedio de 90 millones de litros de combustible por año, 75% del cual es combustible diesel (Cripps y col., 1997).

Durante el verano existe un tráfico considerable de vehículos, botes zodiaco y barcos de gran porte que usan nafta y gasoil. Las zonas cercanas a la costa, donde se encuentran la mayoría de las instalaciones son consideradas vulnerables por estar constantemente expuestas (Cripps y col., 1991, Aislabie y col., 1999, Martins y col., 2004).

La Base Científica Artigas (BCAA) posee generadores de energía que funcionan con combustible diesel especialmente diseñado y provisto por ANCAP para su uso en la Antártida. Este gasoil antártico es una mezcla del gasoil común que posee un 10% de JP1, aditivo utilizado en la aviación y que funciona como anticongelante.

Estudios previos en suelos contaminados de la Península Antártica indicaron que el nivel de HPA's aumenta con la profundidad del suelo y se concentra principalmente en la capa de *permafrost* (suelo permanentemente helado) donde se

acumulan las partículas más finas, debido a que los HPAs tienen preferencia por las partículas de menor tamaño (Curtosi y col. 2009). Un calentamiento gradual en esta zona provoca un aumento de las precipitaciones de lluvia y nieve, así como de los períodos de deshielo, promoviendo el drenaje de agua a través de los suelos altamente porosos. La capa de *permafrost* también se ve afectada por este calentamiento que reduce su espesor y aumenta la lixiviación y por lo tanto la migración de los HPAs hacia los ecosistemas marinos (Curtosi y col. 2009).

2.3-Aplicaciones biotecnológicas: biorremediación

La biorremediación es el uso de las capacidades metabólicas de ciertos microorganismos para remover y/o detoxificar sustancias orgánicas contaminantes que se encuentran generalmente en el suelo, agua o sedimentos y que representan una amenaza para la salud pública (Atlas 1991, Alexander 1999).

Para la remediación de un ambiente contaminado no existe una única estrategia, la elección de la más adecuada dependerá del ecosistema afectado y de la naturaleza de los contaminantes, así como de su viabilidad económica.

Entre las distintas tecnologías disponibles para la descontaminación de un suelo se encuentran las técnicas *ex situ*, que consisten en el traslado del contaminante a otro compartimiento ambiental para su tratamiento, con el consiguiente costo económico que ello implica. En las técnicas *in situ*, el sustrato es procesado mediante, por ejemplo, la utilización de microorganismos (Alexander 1999).

La biorremediación es una herramienta eficiente, económica y versátil, para el tratamiento de ecosistemas contaminados con hidrocarburos (Atlas 1991, Margesin y col. 2001b). Además tiene la ventaja de ser más económica, comparada con otros métodos como la excavación, extracción química e incineración de ambientes.

La mayoría de las moléculas del crudo, así como sus refinados son biodegradables y los microorganismos degradadores están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Si bien la pérdida abiótica por evaporación, dispersión y foto-oxidación también juega un rol importante en la descontaminación, estos procesos son muy lentos (Van Hamme 2003).

Una de las limitaciones que presentan las técnicas biológicas respecto a las técnicas fisicoquímicas es el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación completa. Durante los procesos de biorremediación se produce una ralentización, ya

sea por un enriquecimiento de componentes recalcitrantes o por una disminución de la biodisponibilidad de los contaminantes (Alexander 1999 y 2000, Van Hamme 2003).

La bioremediación *in situ* de sitios contaminados por petróleo y sus derivados ha sido propuesta como una herramienta apropiada para la limpieza y recuperación de suelos y zonas costeras en la Antártida. Esta técnica puede ser implementada sin afectar en mayor medida el ecosistema tratado, siendo éste requisito fundamental para el tratamiento de áreas naturalmente protegidas (Aislabie y col. 2004 y 2006).

Considerando que no se permite la introducción de organismos foráneos, la biodegradación por comunidades microbianas nativas (psicrófilas y psicrotolerantes) parece ser el medio de elección en estos casos, dado que además estas bacterias están adaptadas al frío, a la sequedad y a la escasez de nutrientes (Campbell y col. 1998). De los tipos de contaminación reportada hasta el momento en la Antártida, los productos derivados del petróleo constituyen el problema más significativo a tratar (Snape y col.2005).

Es de esperar que un sitio contaminado con gasoil resulte en un rápido enriquecimiento de microorganismos heterótrofos nativos degradadores de algunos de sus compuestos (Delille y col. 2000, Aislabie y col. 2001).

Estudios previos en la Antártida han mostrado que en sitios contaminados, las bacterias degradadoras de hidrocarburos pertenecen típicamente a los géneros *Pseudomonas* o *Sphingomonas*. Estos organismos son principalmente heterótrofos psicrotolerantes, dado que si bien crecen a temperaturas menores a los 10°C, tienen una temperatura óptima de crecimiento por encima de los 15°C (Margesin y col. 1997 y 2000, Aislabie y col. 1998 y 2006, Delille y col. 1998 y 2000, Ruberto y col. 2003 y 2008). Sin embargo, la actividad de microorganismos nativos es limitada y la persistencia de hidrocarburos en la sub-capa de suelos fríos donde no pueden ser foto-oxidados o evaporados indica que la degradación *in situ* es muy lenta (Aislabie y col. 2006).

La biodegradación se ve afectada por las temperaturas extremadamente bajas y fluctuantes, la escasa disponibilidad de nutrientes, la humedad, alcalinidad y pH del suelo (Aislabie y col. 2006). La temperatura modifica la naturaleza física del sustrato. La viscosidad de los hidrocarburos aumenta a bajas temperaturas, disminuyendo la volatilización de los alcanos de cadena corta que son especialmente tóxicos para los microorganismos. De esta forma, la actividad enzimática se inhibe enlenteciendo el metabolismo microbiano (Leahy y Colwell 1990).

Uno de los procedimientos de biorremediación más ampliamente utilizado es la bioestimulación de los microorganismos nativos mediante la adición de nutrientes.

La entrada de una gran cantidad de fuente de carbono (en el caso de un derrame) altera la relación C:N:P, resultando en un rápido agotamiento de compuestos inorgánicos como el nitrógeno y el fósforo. Como se ha descrito en numerosos trabajos, la bioestimulación mediante la adición de sales de nitrógeno, fósforo y potasio tiene efectos positivos en la descontaminación de ecosistemas fríos (Margesin y col. 2001).

Otra estrategia de biorremediación *ex situ* es el uso de biopilas, en la cual el suelo contaminado es extraído y dispuesto en un área de tratamiento. Esta técnica fue aplicada con éxito en un gran número de sitios contaminados en las regiones sub-polares, incluidos los suelos sub-antárticos (Delille 2002 y 2008, Pelletier y col.2004).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, los consorcios microbianos nativos recuperados de sitios contaminados pueden tener una potencial aplicación en técnicas de biorremediación en el ecosistema antártico (Delille y col. 2000, Aislabie y col. 2001, 2004 y 2006).

3. ORGANISMOS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS. ELEMENTOS GENÉTICOS INVOLUCRADOS. INTEGRONES

3.1 Origen y evolución de la resistencia antibiótica

Los antibióticos son considerados una de las herramientas más exitosas para el tratamiento de infecciones bacterianas en la historia de la medicina. Sin embargo, la emergencia y rápida diseminación de bacterias patógenas multi-resistentes durante las últimas décadas han dejado en evidencia el desconocimiento de los procesos evolutivos en los sistemas microbianos (Aminov, 2009, Wright, 2010). Comprender la función que juegan estos compuestos en el ambiente podría ayudar a dilucidar los procesos que llevan a la emergencia de la resistencia antibiótica en las bacterias patógenas (Aminov, 2009).

Una explicación posible al origen de la resistencia antibiótica está relacionada con los microorganismos del suelo productores de antibióticos. Estos organismos producen antibióticos a muy bajas concentraciones influyendo en el metabolismo y la fisiología de sus vecinos (Yim y col., 2006). Muchos productos microbianos actúan como “feromonas” bacterianas y desempeñan un rol importante en la regulación de la expresión génica microbiana. Estas pequeñas moléculas actúan como antibióticos cuando son producidos a concentraciones suficientemente altas y en condiciones específicas (Yim y col., 2006).

Asimismo, los microorganismos ambientales productores de metabolitos

secundarios, desarrollan mecanismos de auto-protección contra la toxicidad de las moléculas que ellos mismos producen y son por lo tanto, considerados como puntos críticos (*hot spot*) para la evolución de determinantes de resistencia antibiótica (D'costa y col., 2006).

La presencia de estos antibióticos en el ambiente constituye una presión para la adquisición, por parte de los otros organismos del suelo, de genes de resistencia altamente específicos dejando en evidencia que el suelo puede actuar como reservorio de genes de defensa (D'Costa y col., 2011). Se han identificado genes ortólogos de estos determinantes de resistencia en elementos genéticos móviles en patógenos resistentes, provenientes de aislamientos hospitalarios (D'Costa y col., 2006). Esto indicaría que un gen que originalmente evolucionó para fines de detoxificación en el organismo productor, puede servir a su vez para evitar la acción de un antibiótico exógeno.

La identificación de una gran diversidad de genes que codifican para la resistencia a antibióticos β -lactámicos, tetraciclina y glicopéptidos, provenientes de sedimentos de *permafrost* con una antigüedad de 30.000 años, pone en evidencia que la resistencia antibiótica es un fenómeno natural, ampliamente extendido en ambientes naturales (D'Costa y col., 2011). Este fenómeno debe de haberse desarrollado durante millones de años, precediendo al uso de antibióticos en el ambiente hospitalario y por lo tanto independientemente de la presión selectiva que ello implica (D'costa y col., 2011).

Uno de los ejemplos mejor documentados de evolución de genes ancestrales es el caso de las β -lactamasas. Los genes que codifican para estas enzimas están presentes en plásmidos y se originaron hace más de dos millones de años, antes de la "era antibiótica" (D'Costa y col., 2011). El trabajo de Fevre y colaboradores (2005) sobre la historia evolutiva de los genes que codifican para el grupo OXY de β -lactamasas en *Klebsiella oxytoca* sugiere que la diversificación de los grupos OXY ocurrió mucho tiempo antes del uso extendido de antibióticos en la clínica. El patrón de diversificación de la familia OXY muestra un escenario evolutivo neutral a largo plazo, igual al descrito para las variantes de las familias AmpC o SHV de β -lactamasas (Fevre y col., 2005).

Por lo tanto, se podría hablar de dos "Eras" en la evolución de la resistencia antibiótica. En la primera, las bacterias evolucionaron bajo diferentes presiones selectivas impuestas por el ambiente, las cuales incluyen la presencia de antibióticos naturales u otros tipos de compuestos tóxicos que, como resultado final, confirieron un fenotipo resistente intrínseco a las especies bacterianas (Baquero y col., 2009). La

segunda Era comprende la “Era antibiótica”, cuando los antibióticos de origen sintético comenzaron a ser usados en concentraciones mucho más altas de aquellas comúnmente encontradas en el ambiente. Esta se caracteriza por una rápida diseminación de determinantes de resistencia que han estado circulando en el pangenoma microbiano durante años y por lo tanto generando una evolución acelerada hacia la resistencia por parte de bacterias previamente susceptibles (resistencia adquirida) (Baquero y col., 2009, D’Costa y col., 2011).

La rápida aparición y dispersión de fenotipos de resistencia a antibióticos en cepas bacterianas ha generado interés por comprender los mecanismos genéticos básicos que operan en estos procesos.

La adquisición de resistencia antibiótica puede ocurrir por dos vías principales, por mutaciones en el genoma bacteriano y a través de la transferencia horizontal de genes (THG). Los mecanismos de transferencia horizontal en bacterias pueden ocurrir por transformación, transducción o conjugación. Una vez incorporados en la célula receptora, los genes de resistencia pueden ser diseminados mediante eventos de recombinación sitio-específica o de transposición.

Es más probable que las bacterias adquieran resistencia mediante mecanismos de THG a partir de una fuente exógena que por mutación genética (Davies, 1994, Rowe-Magnus y col., 2002). Muchos genes de resistencia antibiótica adquiridos por THG son diseminados mediante elementos genéticos móviles como integrones, transposones, islas genómicas de resistencia, secuencias de inserción y plásmidos o mediante bacteriófagos con la incorporación de ADN desnudo por recombinación homóloga o ilegítima (Norman y col., 2009).

3.2 Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana

Los principales mecanismos de acción de los antibióticos incluyen la inhibición de la síntesis de pared celular, proteínas y ácidos nucleicos, así como la producción de análogos metabólicos y alteración de la membrana celular. Las principales clases de antibióticos y sus sitios de acción en la célula bacteriana se muestran en la figura 4 y en la Tabla 3.

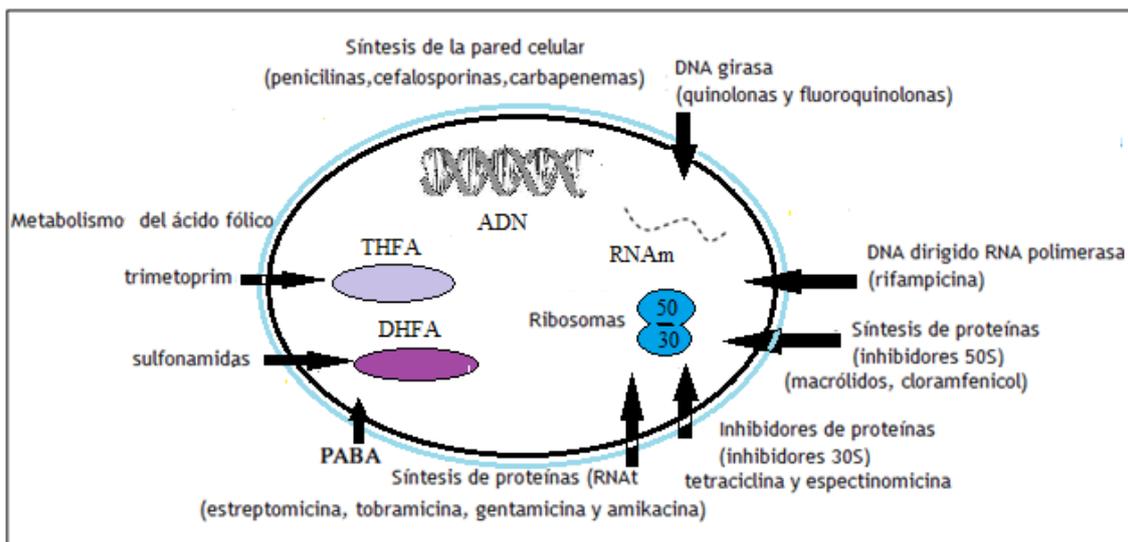


Figura 4: Se muestran los sitios blanco de acción de los antibióticos en una célula bacteriana. Las sulfonamidas reducen el PABA (ácido para-amino benzoico) a dihidrofolato (DHFA). El trimetoprim actúa reduciendo el DHFA a THFA (tetrahidrofolato) (Adaptado de Neu 1992).

Las diferentes estrategias de resistencia se resumen en la Tabla 1.3.

ANTIBIÓTICOS	MECANISMOS DE ACCIÓN	MECANISMOS DE RESISTENCIA
B-lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos	Inhibición de la síntesis o daño de la pared celular	Alteración de las proteínas de unión a la penicilina. Reducción de la permeabilidad. B-lactamasas.
Quinolonas	Inhibición de la síntesis y/o metabolismo de ácidos nucleicos.	Alteración de ADN-girasas.
Rifampicina	Inhibición de la síntesis y/o metabolismo de ácidos nucleicos	Reducción de la unión a DNA-polimerasa.
Aminoglicósidos (gentamicina, amikacina, tobramicina)	Biosíntesis de proteínas (inhibidores).	Disminución de la unión de las proteínas al ribosoma. Modificación de enzimas.
Espectinomicina		
Tetraciclina	Biosíntesis de proteínas (inhibidores)	Bombas de eflujo.
Cloramfenicol	Biosíntesis de proteínas (inhibidores)	Acetil transferasas, exportadores
Fluoroquinolonas (ácido nalidíxico, ciprofloxacina)		Alteración de ADN girasas. Reducción de la permeabilidad.

Inhibidores del metabolismo del folato (sulfonamidas y trimetoprim)	Modificación del metabolismo energético.	Alteración del blanco, enzimas alternativas.
---	--	--

Tabla 3: Principales mecanismos de resistencia a antibióticos descritos en bacterias. (Adaptado de Neu 1992)

3.3 Trimetoprim: modos de acción y mecanismos de resistencia

El trimetoprim (TMP) es una droga de origen sintético que pertenece al grupo de las diaminopirimidinas. Se lo agrupa, junto con otras drogas (metotrexato y aminopterina), en los denominados antifolatos. Su mecanismo de acción implica la inhibición selectiva de una enzima denominada dihidrofoloreductasa (DHFR), necesaria para la síntesis bacteriana de ácido fólico (Fleming y col., 1972).

La DHFR cataliza la reducción de 7,8-dihidrofolato a 5,6,7,8-tetrahidrofolato, un paso esencial en la síntesis de purinas, pirimidinas y otros aminoácidos. Seguramente por este motivo, tanto su estructura general como su núcleo se encuentran altamente conservados en organismos procariotas y eucariotas (Hecht, y col. 2011).

El TMP actúa impidiendo la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato, paso esencial para la biosíntesis de deoxitimidina fosfato (Houvinen, 2001). La inhibición de la síntesis de DHFR interrumpe la síntesis de timidina y la replicación del ADN. Las sulfonamidas y el TMP han sido usados durante décadas en humanos y animales como eficaces agentes antimicrobianos de bajo costo. En la figura 5 se muestra la estructura química de las sulfonamidas y TMP.

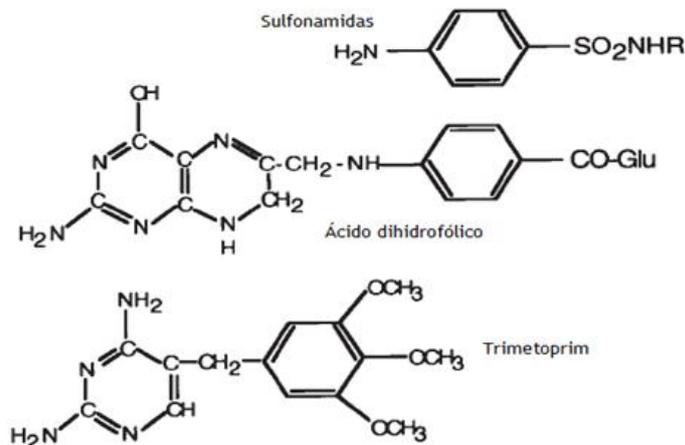


Figura 5: Estructura química de sulfonamidas, TMP y ácido dihidrofólico que muestra las similitudes estructurales entre sí (Adaptado de Sköld 2001).

El uso de estos compuestos antimicrobianos ha estado ampliamente extendido contra patógenos como *E. coli* y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae, generando una rápida evolución en el desarrollo de mecanismos de resistencia en estos microorganismos (Hecht y col., 2011).

Dado que el TMP es de origen sintético, no sería de esperar que se generen resistencias a partir de enzimas degradadoras o modificadoras de su estructura química. Uno de los mecanismos de resistencia a TMP involucra a los genes *dfr*, que codifican para variantes de DHFR insensibles a la droga y que se encuentran generalmente como genes *cassette* en integrones asociados a plásmidos y/o transposones (Sköld, 2001). Aunque el origen exacto de los genes *dfr* es aún desconocido, análisis filogenéticos muestran que estos genes se han originado a partir de una amplia variedad de organismos y han sido movilizados dentro de bacterias patógenas mediante transferencia horizontal (Sköld, 2001). Hasta el momento se han descrito 30 tipos de genes *dfr* diferentes, que se clasifican según el tamaño del polipéptido sintetizado en dos grandes grupos: *dfrA* y *dfrB* y numerados en forma consecutiva, por ejemplo *dfrA1*, que corresponde al primer gen identificado (White y col., 2001). Este mecanismo de resistencia es comúnmente encontrado en miembros de la familia Enterobacteriaceae (Young y col., 1994).

3.4 Integrones: antecedentes

Los primeros integrones descritos fueron descubiertos en 1989 a partir de una colección de aislamientos bacterianos de origen clínico. Estos integrones poseían arreglos de genes que codificaban para la resistencia a antibióticos y se encontraban asociados a elementos genéticos móviles como transposones (Stokes y Hall, 1989). Cuando fueron descritos por primera vez, la definición de integrón sugería que se trataba de elementos móviles en sí mismos. Sin embargo, con el descubrimiento de nuevos tipos de integrones localizados tanto en transposones como en otros componentes inmóviles del cromosoma bacteriano, la definición de integrón ha ido cambiando (Mazel, 2006).

DEFINICIÓN: Los integrones son plataformas de ensamblaje que incorporan marcos de lectura abierta exógenos (ORFs) mediante recombinación específica de sitio y los convierten en genes funcionales, asegurando su correcta expresión (Mazel, 2006). Los ORFs, denominados genes *cassette*, codifican para funciones accesorias y pueden existir transitoriamente libres en el citoplasma en forma circular (Hall y col., 1995).

Los integrones son comunes dentro de las poblaciones bacterianas y no están confinados únicamente a bacterias patógenas y/o multi-resistentes. Las bacterias que poseen estos elementos tienen la capacidad de integrar genes que se encuentran en el citoplasma bacteriano en forma circular (Boucher y col., 2007). De esta forma, los integrones pueden adquirir nuevos determinantes de resistencia, virulencia o nuevas funciones metabólicas que le brindan a la bacteria hospedera una amplia versatilidad para adaptarse a nuevas condiciones de supervivencia (Di Conza y col., 2010). En bacterias Gram-negativas muchos genes de resistencia están asociados a elementos genéticos móviles, lo que les permite ser transferidos entre bacterias de diferentes especies e incluso de diferente género (Partridge y col., 2009).

Si bien los integrones juegan un papel preponderante en el fenómeno de la multi-resistencia antibiótica, con la incorporación de nuevas estrategias de trabajo en ecología microbiana y el desarrollo de la secuenciación en gran escala, fue posible establecer que los integrones están ampliamente distribuidos en la naturaleza, habiendo sido descritos en diferentes nichos ecológicos (Stokes y col., 2006, Xu y col., 2007).

Su distribución es amplia dentro de las bacterias y no han sido descritos en el dominio Archaea y Eukarya (Nemergut y col., 2008). Los estudios de genomas *in silico* sugieren que este tipo de estructuras parecería estar presente en aproximadamente un 10% de los genomas disponibles hasta el momento (Boucher y col., 2007).

Existen, sin embargo, algunos hechos no comprendidos completamente, tanto en lo que refiere a la distribución no uniforme de los integrones en los distintos grupos bacterianos, así como el hecho de que más allá de la transferencia horizontal de estos elementos comprobada por su asociación con plásmidos y transposones, existe también una clara evolución vertical de estos sistemas genéticos dentro de cada grupo bacteriano.

3.5 Estructura de un Integrón

Todos los integrones que han sido caracterizados hasta el presente están compuestos por tres elementos funcionales necesarios para la captura, escisión y expresión de genes exógenos:

- a) un gen integrasa *intl*, que codifica para *IntI*, una enzima de la familia de las tirosin-recombinasas sitio específica (Y-recombinasa) que cataliza la inserción de los genes *cassette*. El gen *intl* contiene su propio promotor (*pint*) y en general está orientado de forma divergente al promotor *Pc* (Hall y Collis, 1995).
- b) un sitio de recombinación primario *attI*, adyacente a *intl1*, donde ocurre la inserción de los genes *cassette*. (Hall y Collis, 1995).
- c) un promotor *Pc*, que en algunos casos puede estar combinado con un segundo promotor *P2*, localizado tanto dentro del gen *intl* como del sitio *attI* (Jove y col. 2010). *Pc* se orienta de forma divergente respecto al gen de la integrasa y dirige la transcripción de los genes incorporados (Hall y Collis, 1995).

El arreglo de genes *cassette* constituye la parte variable del integrón. Todos los genes *cassette* comparten características estructurales. En general son secuencias codificantes, carentes de promotor y poseen un sitio de recombinación denominado sitio *attC* (inicialmente conocido como elemento 59-b)(figuras 6 y 7).

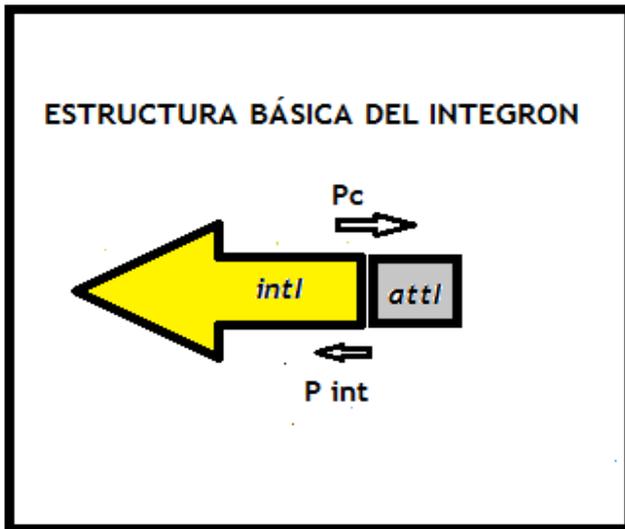


Figura 6: El gen *intI* codifica para la enzima integrasa IntI. *attI* es el sitio de recombinación donde se insertan los genes *cassettes*. El promotor Pc controla la expresión de los genes insertados. P int es el promotor de la integrasa IntI (Antelo 2012).

Este sitio de recombinación difiere en tamaño (57 pb-141 pb) y secuencia entre los distintos integrones, pero comparte regiones conservadas en los extremos. Poseen repetidos invertidos imperfectos en el extremo 3', que forman estructuras con forma de bucles (Recchia y col., 1995).

Los sitios *attC* son una familia diversa de secuencias nucleotídicas que funcionan como sitio de reconocimiento para la integrasa específica de sitio (IntI). (Stokes y col., 1997). Las regiones conservadas se conocen como secuencias R'' (RYYYAAC, donde R es una purina e Y una pirimidina) y R' (GTTRRRY) (Recchia y col., 2002). El punto de recombinación ocurre entre las bases G y T (Mazel, 2006).

Dado que los genes *cassette* carecen de promotor, su expresión está condicionada a la proximidad de un promotor externo, esencialmente Pc.

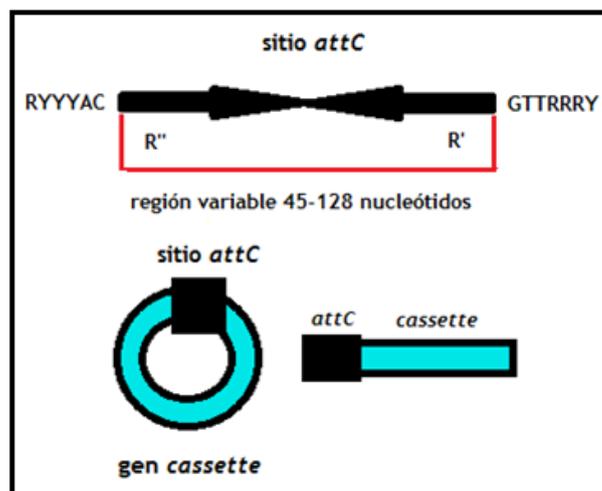


Figura 7: Se muestra la estructura de un gen *cassette* y su sitio *attC* (Antelo 2012).

La enzima integrasa *IntI* cataliza la escisión e integración del *cassette* mediante eventos de recombinación entre *attI* y *attC* o dos sitios *attC*. La recombinación entre *attC* x *attI*, resulta en la integración de los genes *cassette* en el sitio *attI* adyacente al promotor *Pc* (Collis y col., 1992). La recombinación entre los sitios *attC* x *attC*, resulta en la eliminación de los genes *cassette*, mediada por intermediarios circulares (Collis y col., 1992).

Los genes *cassette* pueden ser insertados en el integrón en la misma orientación, adoptando un ordenamiento en tándem y separados por los sitios *attC*. La incorporación de cada gen *cassette* se produce siempre en el sitio *attI*, ubicado adyacente al promotor *Pc*. (Stokes y col., 1989, Collis y col., 1992, Lévesque y col., 1995, Collis y col., 1995) (figura 8).

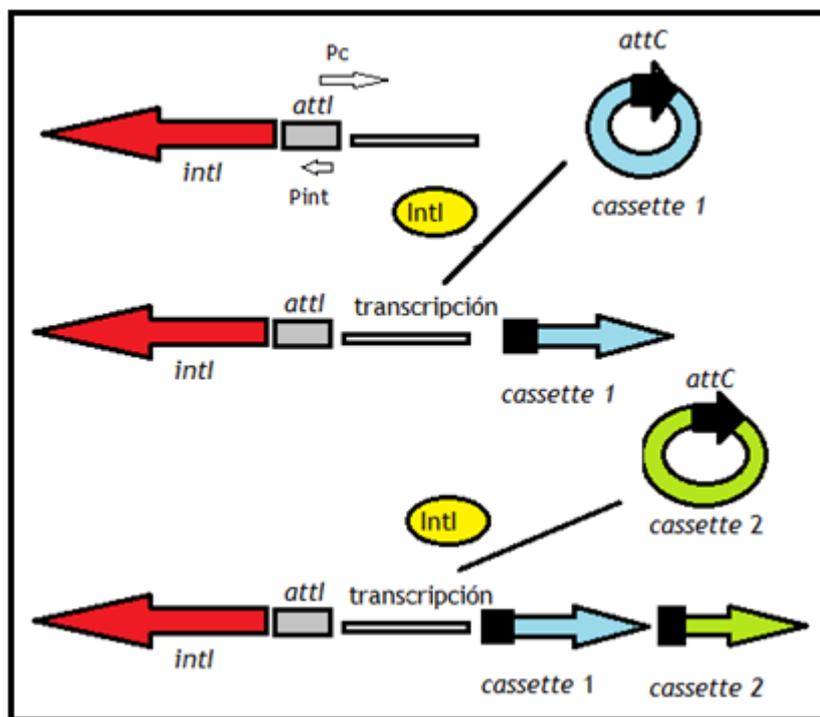


Figura 8: Modelo de incorporación de genes mediante recombinación específica de sitio. Los *cassettes* son sucesivamente insertados en el sitio *attI* del integrón “río abajo” del promotor *Pc*. La enzima *IntI* cataliza la recombinación entre el sitio *attI* y/o *attC* (Antelo 2012).

3.6 Clasificación

Actualmente, los integrones se clasifican en dos grupos principales: a) integrones móviles (IM) o multi-resistentes y b) integrones localizados en el cromosoma bacteriano (IC) que eventualmente puede estar asociados a determinantes de resistencia (Fluit y col., 2004, Mazel, 2006, Boucher y col., 2007).

Estos dos grupos, si bien presentan una organización similar, poseen características distintivas que muestran orígenes evolutivos diversos (Cambray y col., 2010).

3.6.i) Integrones Móviles (Ims):

Los Ims son plataformas funcionales que están físicamente asociadas a elementos de ADN móviles tales como secuencias de inserción (SIs), transposones y plásmidos conjugativos, que sirven como vehículos de intercambio de material genético intra o inter especie. Se encuentran principalmente en Proteobacterias, pero también han sido identificados en algunas bacterias Gram-positivas (Mazel, 2006, Cambray y col., 2010). Juegan un rol preponderante en la diseminación de resistencia antibiótica entre las bacterias Gram-negativas (Mazel, 2006).

La mayoría de los genes *cassette* que portan los Ims son determinantes de resistencia antibiótica (Cambray y col., 2010). Si bien los IM contienen pocos *cassettes* (hasta ocho genes que codifican para la resistencia antibiótica), hasta el presente han sido descritos más de 130 arreglos diferentes que confieren resistencia a prácticamente todas las clases de antibióticos, tales como β -lactamasas, todos los aminoglicósidos, cloramfenicol, trimetoprim, quinolonas, rifampicina y antisépticos derivados del amonio cuaternario (Partridge y col., 2009, Cambray y col., 2010).

Los Ims se dividen convencionalmente en cinco clases, definidas en base a la secuencia de la enzima integrasa (IntI): clase 1 para IntI1, clase 2 para IntI2, clase 3 para IntI3, clase 4 para IntI SXT y clase 5 para IntI HS. Los diferentes tipos de integrasas comparten entre un 40% a 58% de identidad aminoacídica (Mazel, 2006, Cambray y col. 2010). Si bien sólo las clases 1, 2 y 3 han estado históricamente asociadas a un fenotipo antibiótico resistente, los integrones de clase 1 son los más extendidos y de mayor relevancia clínica dado que se detectan en un 22% a un 59% de los aislamientos clínicos y ocasionalmente se han identificado en bacterias Gram-positivas (Cambray y col., 2010). Están asociados con transposones derivados de Tn402, los cuales a su vez pueden estar embebidos en transposones más grandes como Tn21 (Cambray y col., 2010).

La mayoría de los integrones de clase 1 contienen un gen *aadA* que confiere resistencia a estreptomicina-espectomicina, así como determinantes de resistencia a

trimetroprim y β -lactamasas (Fluit y col., 2004).

Los integrones de clase 2 se encuentran asociados a la familia de los transposones Tn7 (Radström y col., 1994). La secuencia aminoacídica de Int2 posee un 40% de identidad con la enzima Int11 (Recchia y col., 1995).

El gen integrasa de clase 2 (*intI2*) generalmente se encuentra interrumpido por una mutación sin sentido en el codón 179 que convierte a la integrasa en una enzima no funcional. Sin embargo, se han encontrado genes integrasa clase 2 funcionales en *E. coli* (Márquez y col., 2008) y *Providencia stuartii* (Barlow y col., 2004). Los integrones de clase 2 han sido descritos también en *Acinetobacter*, *Shigella* y *Salmonella* (Fluit y col., 2004).

Los integrones clase 3 se cree que están también localizados en transposones, siendo los menos frecuentes de las tres clases, habiéndose encontrado en especies de *Delfia* sp. (Xu y col., 2007).

Las clases 4 y 5 fueron identificadas debido a su rol en el desarrollo de la resistencia a trimetroprim en especies de *Vibrio*. Los de clase 4 se encuentran dentro de elementos conjugativos SXT de *V. cholerae* y los de clase 5 se localizan en un transposón compuesto pRSV1 de *Alivibrio salmonicida* (Cambray y col., 2010).

Sin embargo, se han descrito Ims que no portan genes de resistencia en integrones de clase 1 y clase 3, aislados a partir de bacterias de origen ambiental. Estos integrones portan genes *cassette* de función desconocida (Stokes y col., 2006, Xu y col., 2007). También se encontraron integrones de clase 2 asociados con genes *cassette* que no confieren resistencia antibiótica (Barlow y col., 2004).

3.6.ii) Integrones Cromosómicos (Ics):

A fines de la década del 90' fue descubierto en el genoma de *V. cholerae* un tipo de integrón desconocido hasta ese momento. Este integrón identificado en la cepa N16961 (serotipo O1 biotipo El Tor) de *V. cholerae*, poseía una integrasa específica (VchIntIA) relacionada con las integrasas de los Ims, pero que no estaba asociada a ningún elemento móvil sino que se localizaba en el cromosoma 2 de esta bacteria (Mazel y col., 1998). A diferencia de los integrones móviles (Ims), los integrones cromosómicos (Ics) poseen una gran diversidad de genes *cassette*, la mayoría de ellos de función aún desconocida (Cambray y col., 2010). Los Ics han sido descritos en especies del género *Vibrio* y otras especies como *Pseudomonas alcaligenes*, *Treponema denticola* y en *Xantomonas* sp. (Cambray y col., 2010).

Estudios realizados en el genoma de miembros del Orden Vibrionales, permitieron identificar 1677 genes *cassette*, la mayoría de los cuales eran genes accesorios con función desconocida (Cambray y col., 2010). Aquellos genes cuyas

funciones pudieron ser identificadas codificaban para proteínas del sistema toxina-antitoxina, proteínas involucradas en la modificación del ADN como acetiltransferasas y otras relacionadas a fagos y factores de virulencia, así como también proteínas con dominio transmembrana y con señales de exportación celular (Cambray y col., 2010).

Dentro de los lcs se encuentra un sub-grupo denominado super-integrones (SI), definido en base a su localización cromosómica, presencia de muchos genes *cassette* y un alto grado de identidad en las secuencias *attC* (Cambray y col., 2010).

Por último, si bien existen algunas incongruencias filogenéticas que sugieren eventos de THG en los lcs, el estudio evolutivo de las integrasas muestra un patrón de distribución filogenéticamente coherente que indica que los lcs son estructuras genómicas ancestrales y estables en el genoma bacteriano (Cambray y col., 2010).

3.7 Integrones de Clase 1: Estructura

La estructura típica de un integrón de clase 1 incluye dos segmentos conservados 5'CS y 3'CS que flanquean una región variable. En la región variable se insertan los genes *cassette* que codifican para los determinantes de resistencia a antibióticos (figura 9). El extremo 5' (5'CS) contiene el gen de la integrasa 1 (*intI1*), el sitio de recombinación *attI* (ubicado adyacente a *intI1*) que es reconocido por la integrasa IntI1 y el promotor Pc que dirige la expresión de los genes insertados. En los integrones de clase 1 el promotor Pc se localiza en la secuencia codificante del gen *intI1* (Jove y col., 2010). El límite externo del segmento 5'CS está definido por una secuencia de 25 pb (Rli), que es la inversa de otra secuencia (IRt) localizada adyacente al sitio *attI* donde se insertan los genes *cassette* (Stokes y col., 2006). Estas secuencias son sitios de reconocimiento necesarios que facilitan el movimiento de los integrones de clase 1 mediante transposición (Kamali-Moghaddam, y col. 2001).

La estructura del extremo 3' (3'CS) es variable. Algunos integrones de clase 1 pueden incluso carecer de este segmento. Esta región posee el gen *qacEΔ1* que confiere resistencia a los compuestos derivados del amonio cuaternario, un gen *sull*, de resistencia a sulfonamidas y un marco de lectura abierta (*orf5*) de función desconocida.

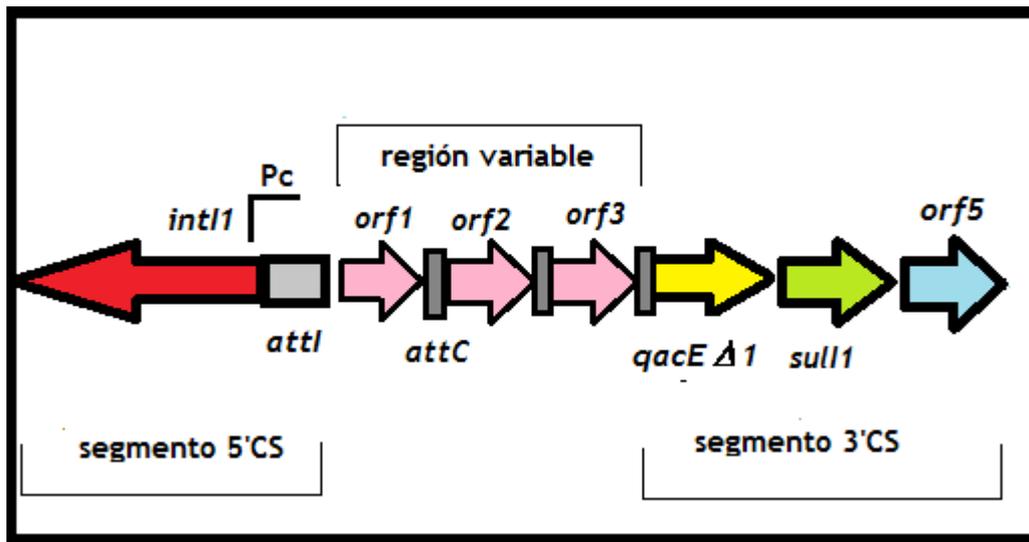


Figura 9: Estructura típica de un integrón de clase 1. Las regiones conservadas corresponden a los segmentos 5'CS y 3'CS. La región variable contiene los genes *cassette* insertados (Antelo 2012).

3.8 Hipótesis evolutiva de integrones clase 1

El desarrollo de la multi-resistencia antibiótica se aceleró con el inicio de la terapia antibiótica para el tratamiento de infecciones en humanos (Davies, 1998). En esa época se verificó que la resistencia antibiótica estaba asociada a elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción. La era antibiótica coincidió también con la rápida identificación de integrones de clase 1 en aislamientos clínicos que portaban determinantes de resistencia antibiótica y que estaban ubicados en distintos tipos de plásmidos y transposones (Stokes y col., 1989, Liebert y col., 1999). Si estos integrones estaban localizados originalmente en el cromosoma bacteriano, la asociación con genes de transposición facilitó su movimiento y dispersión, ocurrida probablemente en la era pre-antibiótica o a comienzos de la misma (Stokes y col., 2006, Gillings y col., 2008).

El modelo que explica el origen y posterior diseminación de integrones clase 1 entre distintas especies de Proteobacterias se basa en la analogía existente entre el transposón Tn402 y los integrones que carecen de la estructura típica del segmento 3'CS (Stokes y col., 2006 y Gillings y col., 2008) (Ver figura 10).

Esta clase de integrones se habría originado a partir de un ancestro que carecía de genes de resistencia y que estaba localizado en el cromosoma bacteriano. Posteriormente habrían sido incluidos en un transposón funcional por la adición de

genes de transposición localizados en el módulo *tni* (ilustración I.3.h), (Stokes y col., 2006, Gillings y col., 2008). Esta estructura adquirió el gen *cassette qacE*, conduciendo entonces al ancestro de Tn402 (Stokes y col., 2006). Posteriormente, este transposón adquirió el gen *sulI*, mediante un mecanismo que resultó en la delección o eliminación del extremo 5' de *qacE* y su sitio *attC*, dando lugar a una forma truncada del gen *qacE* (*qacEΔ1*) (Stokes y col., 2006).

La adquisición de *sulI* probablemente facilitó la diseminación de Tn402, lo que derivó en que los integrones móviles (Ims) tuvieran acceso a un vasto repertorio de genes *cassette*. Diversas alteraciones estructurales y asociaciones con secuencias de inserción (Iss) acompañaron esta diseminación que condujo a la variante de integrones de clase 1, existente en la actualidad.

Algunos integrones de este tipo fueron descritos en el cromosoma de bacterias ambientales como *Azoarcus communis* MUL2G9 y *Acidovorax* sp. MUL2G8A (Stokes y col., 2006, Gillings y col., 2008^a).

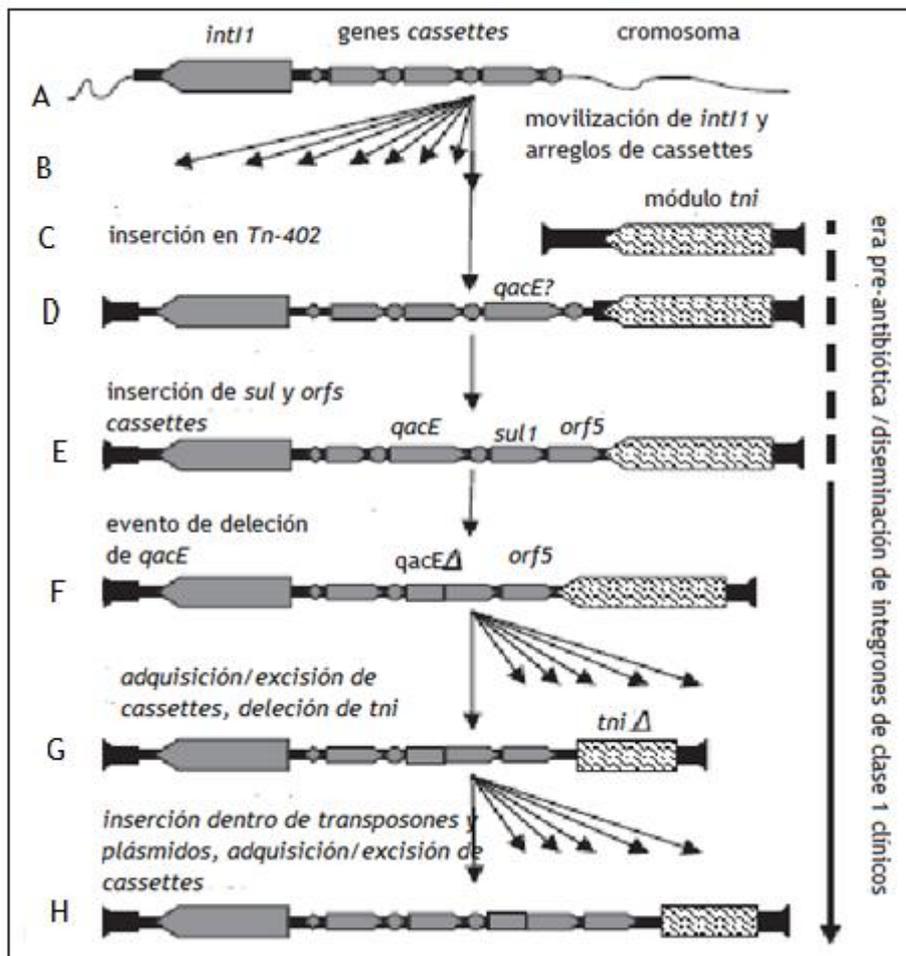


Figura 10: Modelo representativo del origen y divergencia de integrones clase 1. (Adaptado de Gillings 2008^a).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Como método de selección de elementos de transferencia genética horizontal (TGH) tales como integrones, analizaremos la presencia de funciones fisiológicas que pueden estar asociadas a los mismos.

Establecemos como hipótesis que la biodegradación de componentes de gasoil y la resistencia a antibióticos pueden estar asociadas a estos elementos de THG en los organismos antárticos.

De este modo, se pueden aislar bacterias capaces de metabolizar algunos de los hidrocarburos presentes en el gasoil antártico empleado como única fuente de carbono y algunos de los genes involucrados deben estar asociados a elementos de TGH.

También consideramos que es posible seleccionar un conjunto de bacterias resistentes a antibióticos y algunos de los genes responsables de esa resistencia podrían estar asociados a elementos de THG.

II.2 OBJETIVOS

Objetivo General

Selección y estudio de bacterias heterótrofas aisladas de suelo/sedimento y cañadas de la Isla Rey Jorge (Antártida marítima), que contengan elementos de transferencia horizontal de genes. Estos elementos deben estar asociados a genes involucrados en el metabolismo de gasoil y en la resistencia a antibióticos.

Objetivos específicos

- 1) Generar una colección de aislamientos bacterianos a partir muestras de suelo/sedimento de la península Fildes (Isla Rey Jorge), incluyendo áreas bajo evidente influencia humana y animal y zonas presuntamente prístinas.
- 2) Estudiar el fenotipo de los aislamientos y los genes asociados a la resistencia a dos condiciones ambientales definidas: contaminación por hidrocarburos y presencia de antibióticos.
- 3) Identificar sistemas de transferencia horizontal de genes involucrados en el mecanismo de resistencia ambiental, con especial énfasis en la presencia de integrones.
- 4) Identificar y caracterizar a nivel bioquímico y genético los aislamientos bacterianos capaces de metabolizar gasoil antártico como única fuente de carbono, a los efectos de un uso potencial en técnicas de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Colecta de muestras en la BCAA y almacenamiento

Las muestras fueron colectadas en distintos sitios de la Península Fildes (Isla Rey Jorge, Antártida marítima) durante las campañas estivales organizadas por el Instituto Antártico Uruguayo (IAU) en los meses de marzo, abril y diciembre de 2008, enero, febrero y diciembre de 2010.

Los sitios fueron seleccionados tomando como criterio la presumible influencia ambiental a la que hubiesen estado expuestos previo a la colecta. Se seleccionaron así sitios bajo evidente influencia antrópica (zonas cercanas a las bases, tanques de depósito de combustible), sitios bajo influencia animal (sitios cercanos a “loberas”, nidos de aves, etc.) y sitios alejados de las bases, los cuales podrían considerarse como presuntamente “prístinos”.

Las muestras consistieron en fracciones de suelo, sedimento, agua de deshielo y matas microbianas. La descripción de cada muestra se detalla en los Anexos 1, 2 y 3. Las coordenadas geográficas de cada sitio fueron determinadas mediante GPS. Al momento de la colecta se determinó pH, conductividad y temperatura del agua en las muestras de tapetes microbianos sumergidos en las cañadas de deshielo.

Las muestras fueron colectadas en tubos Falcon® estériles de 50 ml y mantenidas en hielo hasta su transporte al laboratorio de Ecología Microbiana del IIBCE en Montevideo, donde fueron almacenadas a -20°C, previo a su procesamiento.

2-Medios de Cultivo

Se emplearon los medios de cultivo cuya composición se detalla a continuación:

a) Luria-Bertani modificado (LBm):

Triptona 1%, Extracto de Levadura 0,5% y NaCl 0,5%.

b) Medio Mínimo H1 (g/l):

K_2HPO_4 : 11,2 ; KH_2PO_4 : 4,8 ; $(NH_4)_2SO_4$: 2 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,246 ; $FeSO_4$: $5 \cdot 10^{-4}$.

c) Medio Mueller- Hinton (MH) de Sigma-Aldrich®: Extracto de carne: 2; hidrosilato ácido de caseína 17,5; Almidón.1,5; Agar:17, preparado según las instrucciones del fabricante.

Para preparar los medios sólidos se agregó agar a una concentración final de 15% y el medio estéril por autoclavado se transfirió a placas de petri estériles.

3 - Aislamiento de microorganismos cultivables en medio LBm

Se prepararon suspensiones-diluciones a partir de cada una de las muestras ambientales mezclando 1 gramo de cada una con 1 ml de solución salina PBS (*Buffer* fosfato salino) 1X. Se realizaron diluciones seriadas en PBS 1X a partir de cada suspensión y se sembraron 500 µl de cada una por rastrillado en placas de petri conteniendo medio rico LBm agar.

Las placas se incubaron en aerobiosis a 5°C y 25°C hasta observar la formación de colonias aisladas. Las colonias que presentaban distintas morfologías fueron transferidas con un ansa a placas de petri con medio LBm. Este proceso se repitió hasta visualizar colonias uniformes sobre el medio de cultivo. Estos aislamientos, presuntamente puros, fueron almacenados a -80°C en placas de microtitulación en forma de suspensión, en LBm y glicerol 20%.

4 - Cultivo y selección de aislamientos bacterianos en medio H1-gasoil

Se analizaron muestras de sedimento-suelo antártico presuntamente contaminado con gasoil, con el objetivo de aislar y caracterizar bacterias degradadoras de hidrocarburos. Las muestras de sedimento-suelo fueron colectadas en áreas cercanas a la costa frente a la Bahía Fildes, en la Península Fildes, Isla Rey Jorge. En esta zona se encuentran los tanques de almacenamiento de combustible pertenecientes a Rusia. Uno de estos tanques también ha sido utilizado por Uruguay.

Las muestras TR1₄, TR2₄, TR3₄, TR4₄, TR5₄, TR6₁₂, TR1₁₀, TR2₁₀, TR3₁₀ y TR4₁₀ fueron utilizadas para obtener cultivos enriquecidos con microorganismos capaces de metabolizar gasoil.

Para el cultivo se utilizó entre uno y dos gramos de muestra de suelo/sedimento. Esta muestra fue suspendida en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio salino H1 (Lanfranconi y col. 2003) suplementado con gasoil antártico a una concentración final del 0,2% (v/v) como única fuente de carbono y energía.

El gasoil antártico fue suministrado gentilmente por el Instituto Antártico Uruguayo (IAU). Este gasoil posee un 10% de JP-1 (*Jet Propulsion* por sus siglas en inglés). El JP-1 es un combustible de aviación que posee un punto de congelación de -60°C y se utiliza como anticongelante.

Los matraces se incubaron a 5°C en agitador de vaivén y a 25°C en agitador orbital a 200 r.p.m durante 5 días. Posteriormente se transfirió una alícuota de 500 µl de estas suspensiones a un volumen de 50 ml de medio fresco H1 con gasoil al 0,2% y luego de cinco pasajes sucesivos se obtuvo un cultivo enriquecido, el cual fue mantenido por transferencias continuas a medio fresco cada 10 días.

Se realizaron diluciones seriadas en PBS 1X a partir de 200 µl de cultivo. Se sembraron 100 µl de cada dilución por rastrillado en placas con medio H1-gasoil-0,2% agar. Las placas se incubaron a 5°C y 25°C hasta observar la formación de colonias aisladas. Estas colonias, fueron repicadas sucesivamente a los efectos de asegurar su pureza.

5 - Cepas bacterianas

Las características de las cepas de colección empleadas en este trabajo se indican en la tabla II.1:

Tabla II.1: Características fenotípicas y genotípicas de las cepas empleadas

Cepa	Características
<i>E.coli</i> JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+lacIqlacZΔM15] hsdR17(rK-mK+) Nal^r.</i>
<i>E.coli</i> Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^r) endA1 λ-</i>
<i>E.coli</i> JM83	<i>rpsL ara Δ(lac-proAB) Φ80dlacZΔM15 Km^r Strp^r contenedon el vector pAT674.</i>
<i>E.coli</i> K12	<i>F'proA⁺ B⁺ lacIq Δ(lacZ)M15 zff^rTn10(Tet^r)fhuA2 glnVΔ(lac-proAB)thi-1Δ(hsdS-mcrB)5, conteniendo el vector pVC2554</i>
<i>E.coli</i> HB101	<i>F⁻ mcrB mrr hsdS20(r_B⁻ m_B⁻) recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5mtl-1rpsL20 glnV44 λ⁻, Km^r conteniendo el vector pSMB731</i>

6 - Perfil de crecimiento de aislamientos autóctonos

6.i) Ensayos con antibióticos

Para los ensayos de crecimiento en presencia de antibióticos, los aislamientos se sembraron con ansa en placas con medio LBm agar suplementado con el antibiótico correspondiente. Para analizar el crecimiento en presencia de trimetoprim, los microorganismos fueron sembrados en placas con medio Mueller-

Hinton agar. Las placas fueron incubadas a 5 °C y 25 °C.

Para determinar el perfil de crecimiento, los aislamientos seleccionados se sembraron en LBM suplementado con antibiótico. Para ello, se partió de un cultivo inicial en medio líquido LBM sin antibiótico. Una vez crecido, se sembraron alícuotas de 50 µl en tubos con 5 ml de medio rico LB en presencia de antibiótico. Los tubos fueron incubados en un agitador orbital a 200 r.p.m. para los cultivos incubados a 25 °C y en agitador de vaivén para los cultivos a 5 °C. Los ensayos se efectuaron por triplicado. El crecimiento se monitoreó por medidas de D.O._{620nm} en un colorímetro fotoeléctrico modelo AE-22 Erma Optical Woks Ltd. (Japón).

Los antibióticos y concentraciones utilizadas se detallan en la Tabla II.q2

Tabla II.2 Antibióticos y concentraciones ensayadas

Antibiótico	Abreviatura	Concentración en µg/ml
Ampicilina	Amp	50- 100-1000
Kanamicina	Km	50- 100
Ácido Nalidíxico	Nal	50- 100
Cloramfenicol	Cm	20- 50
Gentamicina	Gm	50
Tetraciclina	Tc	20- 50
Estreptomina	Strp	50 -100
Espectinomicina	Spc	50 - 100
Trimetoprim	Tm	20- 50-100

6.ii) Ensayos de crecimiento en medio H1-gasoil-0,2%

Se analizó el perfil de crecimiento de los aislamientos TR_{4H1}, TR_{5H1} y TR_{6H1} en medio H1-gasoil 0,2% a 5 °C y 22 °C y en medio H1-gasoil 0,2%, 0,4% y 1% a 5 °C para TR_{4H1}. En todos los casos los correspondientes pre-inóculos fueron incubados a la misma temperatura a la cual fueron ensayados los cultivos, de esta forma se evita la expresión de proteínas *cold-shock*, que alargarían la fase lag.

Las colonias aisladas a partir de los cultivos en H1-gasoil-0,2% agar, se transfirieron con ansa a tubos con 5 ml de medio H1-gasoil 0,2%. Estos tubos fueron incubados a 5 °C y 25 °C durante toda la noche con agitación orbital. Un volumen de 50 µl de este cultivo fue utilizado como inóculo en tubos conteniendo 5 ml de medio H1-gasoil-0,2%. Estos tubos fueron incubados con agitación a 200 r.p.m a 5 °C y 25 °C.

Los ensayos se efectuaron por triplicado y el crecimiento se monitoreó por medidas de D.O._{620nm} en un colorímetro fotoeléctrico, modelo AE-22.

6.iii) Ensayos a diferentes temperaturas

Con el objetivo de investigar la temperatura óptima de crecimiento se realizó un análisis comparativo a 5°C, 25°C y 37°C de los aislamientos CA4₁₀, GC4₁₂, CDTR5₁₂ e IA19, cada uno representativo de distintas zonas de la isla (ver Anexos N° 1, N° 2 y N° 3) y previamente identificados como pertenecientes al género *Enterobacterias*. Se incluyó como control la cepa JM109 de *Escherichia coli*.

Los aislamientos seleccionados CA4₁₀, GC4₁₂, CDTR5₁₂ e IA19 fueron sembrados en tubos con 5 ml de LBm a 5°C, 25°C y 37°C. Los pre-inóculos de cada cultivo fueron incubados a la misma temperatura a la cual fueron ensayados. Se sembraron alícuotas de 50 µl del pre-inóculo en tubos con 5 ml de LBm. Los tubos fueron incubados en un agitador orbital a 200 r.p.m. para los cultivos incubados a 25°C y en agitador de vaivén para los cultivos a 5°C y 37°C. Los ensayos se efectuaron por triplicado. El crecimiento se monitoreó por medidas de D.O._{620nm}.

7 - Ensayos de conjugación

A efectos de establecer si los plásmidos que contenían el gen de resistencia a trimetoprim (*dfrA14*) poseían la capacidad de transferir el fenotipo Trim^r entre enterobacterias, se efectuaron una serie de ensayos de conjugación empleando una cepa de *E. coli* como receptora. Para ello se utilizaron células de *E. coli* JM109 con fenotipo NaI^rTrim^sAmp^s. Como cepas donadoras se usaron los aislamientos CA4₁₀, GC4₁₂, CDTR5₁₂, CN11₁₂, IA12₄ y IA19₄, todos con fenotipo NaI^sTrim^rAmp^r. Se trabajó en placas con medio selectivo Mueller-Hinton, trimetoprim (50µg/ml) y ácido nalidíxico (50µg/ml).

Las cepas donadoras fueron cultivadas durante toda la noche a 25°C con agitación en 5 ml de medio MH suplementado con trimetoprim (50 µg/ml). Las cepas receptoras fueron cultivadas toda la noche a 30°C en 5 ml de LBm conteniendo ácido nalidíxico (50 µg/ml) con agitación. Al día siguiente, las cepas donadoras y la receptora fueron sembradas en tubos con 5 ml de LBm e incubadas a 25°C hasta alcanzar una D.O._{620nm} de aproximadamente 0,5.

Volúmenes variables de cada cepa se mezclaron y centrifugaron en tubos EppendorfTM. Las células centrifugadas y lavadas fueron re-suspendidas en 50 µl de LBm y se aplicó este volumen sobre filtros de acetato MilliporeTM 0,45 µm de tamaño

de poro, en placas con LBm agar e incubados toda la noche a 25°C. Al otro día, cada filtro fue transferido a tubos con 1 ml de LBm. Los tubos fueron agitados con vortex por un minuto a máxima velocidad para re-suspender las células adheridas a los filtros.

Se prepararon diluciones seriadas en PBS 1X a partir de estas suspensiones. Se sembraron por rastrillado volúmenes de 100 µl y 200 µl en placas con medio Mueller-Hinton agar suplementado con trimetoprim 50 µg/ml y ácido nalidíxico 50 µg/ml para la selección de transconjugantes. Las placas se incubaron a 30°C hasta observar el crecimiento de colonias aisladas. Los transconjugantes se transfirieron con ansa a nuevas placas con medio LBm agar ampicilina 50 µg/ml y se incubaron a 30°C por 48h.

8 - Técnicas moleculares

8.1 - Oligonucleótidos utilizados

Las secuencias de los cebadores empleados en las reacciones de PCR y secuenciación de ADN se detallan a continuación:

Tabla II.3: Set de cebadores utilizados en este trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia	Gen blanco	Tamaño amplicón (pb)
Int11_fwd	5'-GGG TCA AGG ATC TGG ATT TCG-3'	<i>int11</i>	500
Int11_rev	5'-ACA TGC GTG TAA ATC ATCGTC G-3'	<i>int11</i>	500
Int12_fwd	5'-CAC GGA TAT GCG ACA AAA AGG T-3'	<i>int12</i>	750
Int12_rev	5'-GTA GCA AAC GAG TGA CGA AAT G -3'	<i>int12</i>	750
Int13_fwd-	5-' GCC TCC GGC AGC GAC TTT CAG- 3'	<i>int13</i>	1000
Int3_rev	5'-ACG GAT CTG CCA AAC CTG ACT-3'	<i>Inti3</i>	1000
att2v	5'- GTT GGA CAT CAA ATG ATG ACA ATG TAG TTG- 3'	<i>attC site</i>	480
qac_fwd	5'-GGC TGG CTT TTT CTT GTT ATC G-3'	<i>qacEΔ1</i>	400
qac_rev	5'- TGA GCC CCA TAC CTA CAA AGC-3'	<i>qacEΔ1</i>	400
sul_fwd		<i>sul1</i>	500
sul_rev	5'-GCG AAG GTT TCC GAG AAG GTG-3'	<i>sul1</i>	500
355_fwd	5'-TTYGAAAAAGAGYTGTACGG-3'	<i>ndo</i>	569
924_rev	5'-TTCGGGAAAACSGTGCAAGT-3'	<i>ndo</i>	569

ERIC_fwd	5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC3'		126
ERIC_rev	5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG'3'		126
dfr_fwd	5'GATGTTTTCTCCCGAGTATTCC3'	Región contigua al sitio <i>attC 2v</i>	480
dfr_rev	5'CGTCATCGTTCGGTCCGTCCAATC3'		
27f	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'	16S ARNr	1500
1492r	5-'GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	16S ARNr	1500

8.2 - Lisados de células

Para la preparación de los lisados celulares se picaron con palillos estériles colonias aisladas crecidas en placas con medio H1-gasoil- 0,2% agar o en placas con medio rico LBm agar, según se indique en cada caso. Estas placas se incubaron a 25°C la noche previa a la preparación de los lisados.

Cada colonia fue suspendida en tubos de microfuga de 1,5 ml con 100 µl de agua ultrapura estéril. Los tubos fueron incubados a 95°C por 10 minutos, luego transferidos a un baño de agua con hielo durante 5 minutos y finalmente se centrifugaron a 10.000 r.p.m por 5 minutos. El sobrenadante obtenido fue utilizado como molde en reacciones de PCR.

8.3 - Purificación de ADN

ADN Genómico

Para la purificación de ADN genómico a partir de cultivos crecidos en tubos con 5 ml de LBm, incubados toda la noche a 22°C empleando un agitador orbital, se utilizó el Kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen, USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

El ADN total ambiental fue purificado a partir de muestras ambientales siguiendo el protocolo descrito por Griffiths y colaboradores (2000) modificado y Callejas y colaboradores (2011).

ADN Plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico se empleó el Kit comercial de extracción Gen Elute® HP Plasmid Midprep (Sigma, USA). Para ello se utilizaron cultivos crecidos en tubos con 5 ml de Mueller-Hinton suplementado con 50 µg/ml de trimetoprim. Estos tubos fueron incubados toda la noche a 22°C con agitación.

8.4 - Productos de PCR

Para la purificación de los fragmentos de ADN se utilizó el Kit de extracción QIAquick Gel (Qiagen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

8.5 - Electroforesis en geles de agarosa

La separación para el análisis y/o purificación de fragmentos obtenidos de ADN fue realizada mediante electroforesis en geles de agarosa 0,7 o 1,5 % (p/v) en buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) (Sambrook y col., 1989), conteniendo 2 µl de colorante GoodView® (China) cada 100 ml de solución. En el caso del análisis electroforético del ensayo ERIC-PCR, se utilizó *buffer* TBE (Tris-Borato-EDTA) (Sambrook y col., 1989) en geles de agarosa 1,5% (p/v). El perfil de bandas obtenido fue visualizado y fotografiado en un sistema digital de adquisición de imágenes Kodak® (USA).

8.6 - Clonado de productos de PCR

Para el clonado de los productos de PCR se utilizó el Kit de clonado TOPO TA Cloning® (Invitrogen, USA) de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. Para la clonación se utilizaron células competentes de *E.coli* OneShot®. Los productos fueron ligados con el vector pCR®2.1-TOPO® de Invitrogen.

8.7 - Transformación de células competentes

Células químicamente competentes One Shot® *E. coli* Top10 (Invitrogen, E.E.U.U.) fueron transformadas con ADN plasmídico previamente purificado, siguiendo el protocolo de transformación química provisto por el fabricante.

8.8 - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los cebadores empleados en cada reacción se detallan en las secciones

correspondientes de resultados y su listado completo se encuentra en la Tabla II.3. Para las amplificaciones se utilizaron dos tipos de termocicladores: *Thermal Cycler Biorad*[®] modelo C1000 y *Thermo*[®] modelo PX2R. A continuación se indican las distintas condiciones y los programas empleados para cada reacción dependiendo en cada caso del gen a amplificar. Las mezclas de reacción que se describen fueron preparadas para un volumen final de 25 µl.

9 - Genes integrasa

Para amplificación de genes integrasa se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 5 µl de Buffer de reacción 5X GoTaq[®], 2,5 µl de cada cebador (10 µM), 2,5 µl de dNTPs (2 mM cada uno), 0,5 µl de GoTaq[®] DNA polimerasa de Promega (USA) y 1 µl de ADN molde. El programa fue el siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por cinco minutos, seguido de treinta ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por un minuto, con una extensión final de diez minutos a 72°C.

10 - Genes naftaleno dioxigenasa

Para amplificar el gen responsable de la metabolización del naftaleno (*ndo*) se empleó la siguiente mezcla de reacción: 2,5 µl de Buffer de reacción SBS[®] 10X, 2,5 µl de cada cebador (10 µM), 2,5 µl de dNTPs (2 mM cada uno), 0,4 µl de Taq DNA polimerasa SBS[®] (Genetech Co. Ltd., China), 1µl de BSA (seroalbúmina bovina acetilada) y 2 µl de templado. El programa incluyó: un ciclo inicial de desnaturalización de 4 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 48°C y 1 minuto a 72°C y un ciclo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

11 - ERIC-PCR

Para el análisis genotípico empleando cebadores ERIC, se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 2,5 µl de buffer de reacción SBS[®] (Genetech Co. Ltd., China) 10X, 2,5 µl de dNTPs (2 mM de cada uno), 2 µl de cada cebador 25 µM, 1 µl de BSA 0,1%, 0,1 µl de Taq DNA polimerasa SBS[®] (Genetech Co. Ltd., China) y 2 µl de ADN molde. El programa incluyó: un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 52°C y seis minutos a 65°C, con una extensión final de 16 minutos a 65°C.

12 - Genes 16S ARNr

Para amplificar el gen 16S ARNr se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 2,5 µl de Buffer de reacción SBS® (Genetech Co. Ltd., China) 10X, 2,5 µl de cada cebador (10 µM), 2,5 µl de dNTPs 2mM, 0,4 µl de Taq DNA polimerasa SBS® (Genetech Co. Ltd, China) y 1 µl de ADN molde. El programa incluyó: un ciclo de desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto y 30 segundos a 70°C, con una extensión final de 5 minutos a 70°C.

13 - Análisis bioinformático de secuencias de ADN

La secuenciación de ADN fue realizada en el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de París y en MACROGEN Inc. (Corea). Para el análisis de las secuencias se usaron los programas BLASTn para determinar la secuencia nucleotídica y BLASTx para determinar la secuencia aminoacídica deducida (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zhang y col., 2000).

El análisis filogenético y evolutivo se realizó utilizando el programa MEGA 5.05 (Tamura y col., 2007). La historia evolutiva fue inferida usando el método de *Neighbour-Joining* (Saitou y Nei, 1987) con un test de *bootstrap* (1000 réplicas) (Felsenstein, 1985).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectaron un total de 37 muestras de suelo-sedimento, tapetes microbianos y agua de deshielo proveniente del glaciar. Se obtuvo una colección de 250 aislamientos de microorganismos heterótrofos. Posteriormente se generó una sub-colección de 69 aislamientos de interés seleccionados por presentar resistencia a antibióticos en las condiciones ensayadas. Asimismo, a partir de esta sub-colección se obtuvieron aislamientos capaces de crecer en un medio definido en presencia de gasoil como única fuente de carbono.

1- Obtención de microorganismos capaces de metabolizar hidrocarburos

A partir de las muestras de suelo/sedimento TR1₄, TR2₄, TR3₄, TR4₄, TR5₄, TR6₁₂, TR1₁₀, TR2₁₀, TR3₁₀ y TR4₁₀ (ver Anexos N° 1,2 3 para referencia) se obtuvieron cultivos enriquecidos con microorganismos capaces de metabolizar gasoil antártico como única fuente de carbono y energía.

Se dispone de seis cultivos correspondientes a las muestras TR4₄, TR5₄ y TR6₁₂ denominados TR4_{H1}, TR5_{H1} y TR6_{H1} respectivamente, incubados con agitación a 5 °C y 25 °C. Estos cultivos se mantienen por transferencia cada 20 días, a medio mínimo H1 gasoil- 0,2% fresco (Figura III.1).



Figura 1: Cultivos microbianos TR5_{H1} y TR6_{H1} en medio H1-gasoil-0,2%, incubados a 25 °C (A) y 5 °C (B).

1.2-Perfil de crecimiento

En la figura 2 se presentan los perfiles de crecimiento de TR4_{H1}, TR5_{H1} y TR6_{H1} cultivados en medio H1-gasoil- 0,2% e incubados a 22 °C de temperatura.

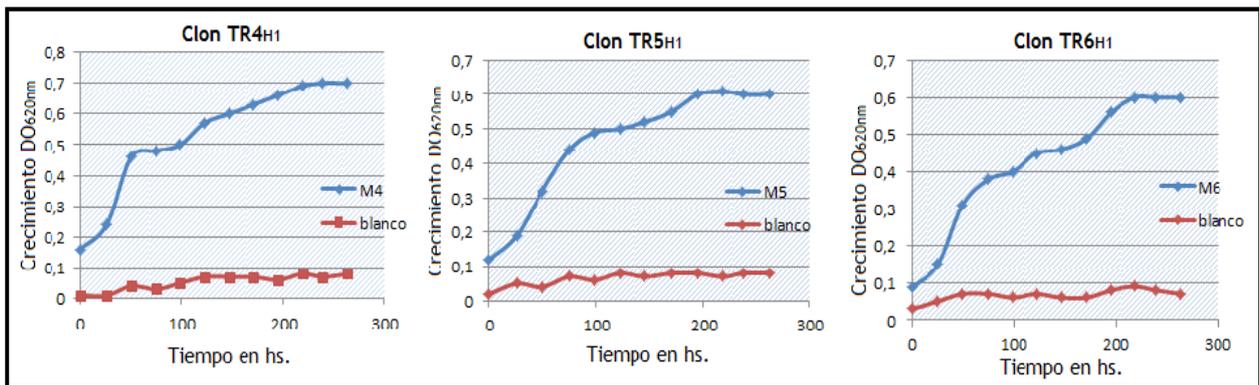


Figura 2: Perfil de crecimiento a 22 °C de TR4_{H1}, TR5_{H1} TR6_{H1} cultivadas en medio H1-gasoil 0,2%.

Las curvas de crecimiento para TR4_{H1}, TR5_{H1} y TR6_{H1} exhibieron un comportamiento similar entre sí, pudiéndose observar que a las 200 h de incubación los tres clones ya habían alcanzado la fase estacionaria. Asimismo, se pudo observar que el valor máximo de crecimiento correspondió a una D.O. entre 0,6 y 0,7.

En la figura 3 se muestra el perfil de crecimiento de los tres aislamientos mencionados previamente, los cuales fueron cultivados en las mismas condiciones ya descritas pero incubados a una temperatura de 5 °C. Del mismo modo que el comportamiento mostrado para una temperatura de incubación de 22 °C, la curva de crecimiento a 5 °C fue muy similar entre los tres aislamientos TR4_{H1}, TR5_{H1} y TR6_{H1}. Sin embargo, el valor máximo de crecimiento alcanzado para TR4_{H1} correspondió a un valor de D.O.= 1, mientras que para TR5_{H1} y TR6_{H1} el valor de D.O. fue 0,6 y 0,63 respectivamente.

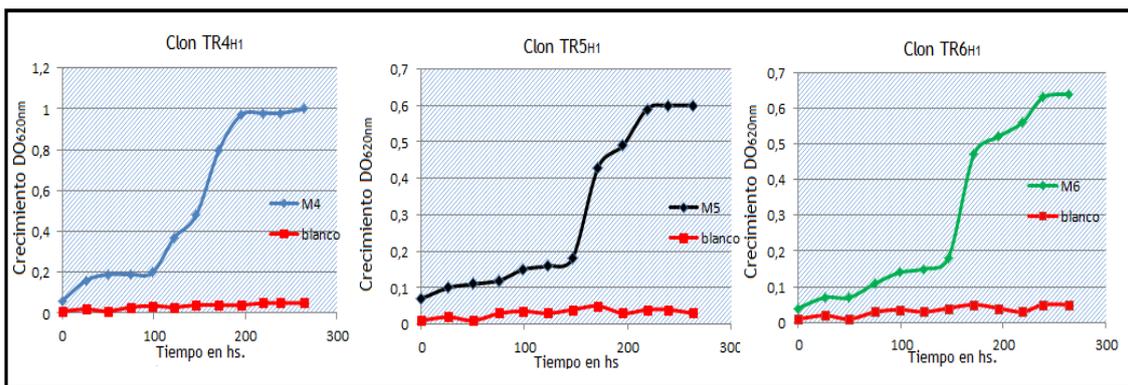


Figura 3: Perfil de crecimiento a 5 °C de TR4_{H1}, TR5_{H1} y TR6_{H1} cultivados en medio H1-gasoil 0,2%.

La gráfica de la figura 4 muestra el perfil de crecimiento de los tres cultivos a 5 °C. Tal como puede observarse, la curva es prácticamente la misma para TR5_{H1} y

TR6_{H1}. Ambos presentaron el mismo comportamiento en la fase inicial y en la fase exponencial, habiendo alcanzado un valor máximo de crecimiento muy similar entre sí, correspondiendo a valores cercanos de D.O. de 0,60. Por otra parte, la velocidad y el valor máximo de crecimiento de TR4_{H1} fue mayor que los de TR5_{H1} y TR6_{H1}, llegando a un valor de D.O. = 1.

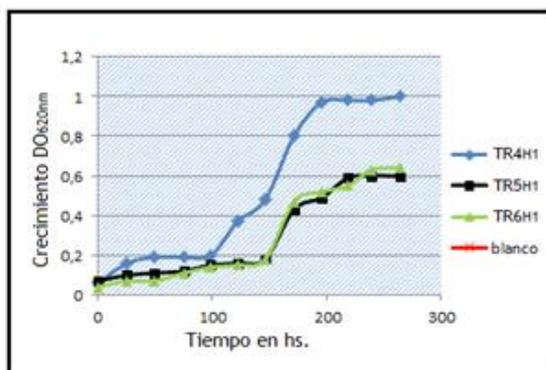


Figura 4: Comparación del perfil de crecimiento a 5°C de TR4_{H1}, TR5_{H1} y TR6_{H1} en medio H1-gasoil 0,2%.

Analizando el comportamiento mostrado por los cultivos cuando fueron cultivados en las mismas condiciones pero a diferentes temperaturas (5°C y 22°C), vemos que exhibieron una típica curva de crecimiento. En ninguno de los casos ensayados la temperatura de incubación resultó ser un factor de inhibición. Este comportamiento sugiere que se trataría de organismos psicotolerantes que pueden crecer tanto a 5°C como a 22°C en un medio mínimo utilizando gasoil como única fuente de carbono y energía.

Con la finalidad de estudiar el comportamiento de estos aislamientos frente a distintas concentraciones de gasoil en medio de cultivo H1, se seleccionó al azar el aislamiento TR4H1. Para ello se analizó su perfil de crecimiento a concentraciones de 0,2%, 0,4% y 1% y la temperatura de incubación fue de 5°C.

No se observó una diferencia significativa en el comportamiento de este aislamiento a las distintas concentraciones ensayadas. Los perfiles de crecimiento en presencia de 0,4% y 1% de gasoil fueron similares entre sí. En presencia de una concentración menor de gasoil (0,2%) la velocidad de crecimiento fue levemente más baja. Sin embargo en todos los casos el crecimiento máximo alcanzado correspondió a una D.O.=1.

En función de la respuesta observada, podríamos inferir que a concentraciones mayores de gasoil no se observó inhibición del crecimiento

bacteriano y que cuanto menor fue la concentración de gasoil en el medio, más lenta fue su velocidad de crecimiento.

La capacidad de estos clones de crecer a 5 °C utilizando gasoil como única fuente de carbono sugiere que pueden metabolizar este compuesto a bajas temperaturas.

1.3 - Detección de genes naftaleno dioxigenasa

Detectamos la presencia de genes involucrados en el metabolismo de algunos componentes del gasoil mediante PCR. Para ello empleamos lisados de células y ADN genómico de los aislamientos TR4_{H1}, TR5_{H1}, TR6_{H1}, TR110, TR210, TR310 y TR410 cultivados a 5 °C en medio H1-gasoil-0,2%.

Empleando el par de cebadores 355 “*forward*” y 924 “*reverse*” diseñados para amplificar parte del gen *ndo* que codifica para la sub-unidad alfa de la enzima naftaleno dioxigenasa (Ma y col., 2006) fue posible amplificar un fragmento de ADN del tamaño esperado (569 pb) para TR5_{H1} TR1₁₀, TR3₁₀ y TR4₁₀. A partir de los aislamientos TR4_{H1}, TR6_{H1} y TR2₁₀ se amplificaron fragmentos de ADN de diferentes tamaños que no coincidían con el estimado de acuerdo con las secuencias *ndo* disponibles en la bibliografía.

Las secuencias nucleotídicas de los fragmentos amplificados a partir de los aislamientos TR5_{H1} y TR4₁₀ fueron analizadas mediante el programa Blastn y Blastx (www.ncbi.nlm.nih.gov). Este análisis confirmó la presencia de parte del gen *ndo* en el primer aislamiento. En las Tablas III.1 y III.2 (Anexo 6) se muestran los resultados obtenidos para TR5_{H1}. No se muestran los resultados del análisis de las secuencias de TR4₁₀ debido a la baja calidad de la secuencia obtenida.

Este análisis confirmó la presencia del gen *ndo* en TR5_{H1}, el cual exhibió un 99% de identidad aminoacídica con el gen naftaleno dioxigenasa (*nahAC*) de la cepa S1-1 de *Pseudomonas aeruginosa*, degradadora de naftaleno (NCBI: AAL46982) y de la cepa SCD-14b (NCBI: AAL 46985) de *Pseudomonas* sp. Ambas cepas fueron aisladas de suelos de pradera contaminados con hidrocarburos.

Tabla III.1: Mejores *hits* obtenidos para la secuencia del gen *ndo* correspondiente a TR5_{H1} utilizando el programa Blastx.

Descripción	N° ID		Clon M5	Origen
aftaleno dioxigenasa	ABA29805	Score	250	<i>Pseudomonas</i> sp. LZT1 (Ma y col. 2006)
		% cobertura	99	
		% de identidad	99	
Naftaleno dioxigenasa	AAV33335	Score	250	<i>Pseudomonas</i> sp. CY13 (Ma y col. 2006)
		% cobertura	99	
		% de identidad	99	
Naftaleno dioxigenasa	AAV33333	Score	250	<i>Rahnella</i> sp. CY14 (Ma y col. 2006)
		% cobertura	99	
		% de identidad	99	
Naftaleno dioxigenasa	AAV33334	Score	250	<i>Pseudomonas</i> sp. LCY14 (Ma y col. 2006)
		% cobertura	99	
		% identidad	99	
Naftaleno dioxigenasa	AAL46985	Score	250	<i>Pseudomonas</i> sp. SCD-14b
		% cobertura	99	
		% identidad	99	
Naftaleno dioxigenasa	AAL46982	Score	250	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> S1-1 (aislamiento de suelo de pradera contaminado con hidrocarburos)
		% cobertura	99	
		% de identidad	99	

Asimismo, la secuencia aminoacídica deducida de parte del gen *ndo* identificado en TR5_{H1} mostró un 99% de identidad con la del gen naftaleno dioxigenasa de la cepa CY14 perteneciente al género *Rahnella* sp. (NCBI: AAV33333) y LCY14 del género *Pseudomonas* sp. (NCBI: AAV33334). Ambas bacterias psicrotolerantes fueron aisladas de suelo antártico contaminado con hidrocarburos, y son capaces de degradar naftaleno a bajas temperaturas (Ma y col., 2006). Estas cepas poseen plásmidos conjugativos de gran tamaño, donde se encuentra localizado el gen (*ndo*) responsable del metabolismo del naftaleno. Este gen, aparentemente de origen mesófilo, habría sido adquirido mediante transferencia horizontal entre bacterias degradadoras de HPAs de diferentes especies (Ma y col., 2006). La similitud existente entre genes *ndo* de organismos psicrotolerantes y organismos mesófilos sugiere que sus secuencias se encuentran altamente conservadas (Ma y col., 2006, Flocco y col., 2009).

Analizando la secuencia del gen *ndo* obtenida para TR5_{H1} con el programa Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Anexo 6, Tabla III.2), encontramos

resultados muy similares a los descriptos en la Tabla III.1. Este análisis mostró que la secuencia de TR5_{H1} exhibía un 99% de identidad con la secuencia correspondiente al gen *ndo* contenido en el plásmido NAH7 de la cepa **G7** de *Pseudomonas putida* (AB237655) (Tsuda y col., 1999, Sota y col., 2006). Este plásmido es auto-transmisible y pertenece al grupo de incompatibilidad P-9. En esta cepa, los genes responsables del catabolismo aeróbico de compuestos aromáticos como el naftaleno, se encuentran en el transposón defectivo Tn4655 (Tsuda y col., 1999, Sota y col., 2006).

La secuencia nucleotídica del fragmento amplificado de TR5_{H1} también exhibió una identidad del 99% con la cepa **MC1** de *Pseudomonas* sp. psicrotolerante, que porta el plásmido KOPRI126573 (JN248563). Esta cepa fue aislada de muestras de aguas residuales en la Isla Rey Jorge (Antártida marítima) (JN248563).

Por último, el fragmento amplificado de TR5_{H1} tuvo también una identidad del 99% con las secuencias de las cepas **CY23**, **LZT1** de *Pseudomonas* sp., así como **CY12** y **CY14** de *Rahnella* sp., descritas en el trabajo de Ma y col. (2006) previamente mencionado.

1.4 - Identidad de los aislamientos degradadores de hidrocarburos

La identidad de los aislamientos TR5_{H1} y TR6_{H1} fue confirmada mediante análisis de secuencia de parte del gen *16S ARNr*. Para dicho análisis se empleó el programa Blastn, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se utilizó la base de datos de secuencias nucleotídicas no redundantes del NCBI. Ambos aislamientos exhibieron alta identidad con cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* sp. El resultado de este análisis se resume en las Tablas III.3 y III.4 (Anexo 6).

El resto de los aislamientos (TR1₁₀, TR3₁₀ y TR4₁₀), no pudieron ser identificados debido a la baja calidad de sus secuencias.

Tal como se desprende de la Tabla III.3, TR5_{H1} presentó un 98% de identidad con la cepa C14 de *Pseudomonas putida* (JN228297) y con diversas cepas del género *Pseudomonas* sp. que se describen a continuación:

HC2-25, **HAT5** y **DM2** fueron descritas en estudios sobre diversidad de comunidades microbianas procedentes de zonas con clima polar. La primera correspondió a un estudio realizado en matas de cianobacterias del Ártico (JF312964). La segunda fue aislada de la capa activa de *permafrost* en la meseta de Qinghai-Tibet (JF799932), mientras que **DM2** (FJ517635) fue aislada de suelo antártico, proveniente del “Crater Lake” en Isla Decepción (Península Antártica).

Las cepas **Nap42**(GQ345341) y **Cb3** (AF351240) de *Pseudomonas* sp. fueron

caracterizadas como organismos degradadores de naftaleno. La primera fue aislada a partir de un microcosmos de agua de mar del estuario del río Sena (Francia) suplementado con hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs). Este estudio tenía como propósito la caracterización de microorganismos capaces de metabolizar HPAs (Niepceron y col. 2009). La segunda cepa correspondió a un aislamiento obtenido a partir de un acuífero contaminado con alquitrán en una mina de carbón (EE.UU) (Bakermans y col., 2002).

Tabla III.3: Mejores *hits* obtenidos para TR5_{H1}

Organismo	N° ID		TR5 _{H1}	Origen
<i>Pseudomonas</i> sp. HC2-25	JF312964	Score	2429	Matas de cianobacterias del Ártico.
		% cobertura	98	
		% de identidad	98	
<i>Pseudomonas putida</i> C14	JN228297	Score	2429	ADN genómico cepa C14
		% cobertura	98	
		% de identidad	98	
<i>Pseudomonas</i> sp. Nap422	GQ345341	Score	2429	Microcosmos de agua de mar enriquecido con naftaleno (Niepceron y col. 2009).
		% cobertura	98	
		% de identidad	98	
<i>Pseudomonas</i> sp. HAT5	JF799932	Score	2427	<i>Permafrost</i> . Diversidad bacteriana de la capa activa de <i>permafrost</i> en la meseta de Qinghai-Tibet.
		% cobertura	98	
		% de identidad	98	
<i>Pseudomonas</i> sp. DM2	FJ517635	Score	2423	Suelo. Análisis filogenético de bacterias en “Crater Lake” o Lago Escondido. Islas Shetland del Sur. Península Antártica.
		% cobertura	98	
		% de identidad	98	
<i>Pseudomonas</i> sp. Cb3	AF351240	Score	2420	Aislamiento degradador de naftaleno obtenido en acuíferos contaminados en una mina de carbón (Bakermans y col. 2002).
		% cobertura	98	
		% de identidad	98	

En la Tabla III.4 (Anexo 6) se resumen los resultados obtenidos para TR6_{H1}, cuya identidad (99%) correspondió a cepas del género *Pseudomonas* sp. **W6** (FJ424508) y **AW6** (FJ539108) corresponden a aislamientos de agua de mar, procedentes de la Bahía Fildes, donde se encuentra situada la estación científica

Great Wall de China (Península Fildes-Isla Rey Jorge). HC6-6, al igual que HC2-25 con el cual exhibió similitud TR5_{H1}, es una bacteria que proviene de matas microbianas de cianobacterias del Ártico (JF313016).

TSX15-3 y RKS6-8 son cepas de *Pseudomonas* sp. aisladas de suelo. La primera corresponde a un aislamiento identificado en un estudio sobre diversidad bacteriana en suelos que quedan expuestos como consecuencia de la retracción del frente de un glaciar en China (HM156147). La segunda, proviene de una muestra de suelo del glaciar Roopkund en el Himalaya (India)

(GQ477175). Por último TR6_{H1} exhibió un 99% de similitud con la cepa Cam-1 de *Pseudomonas* sp. (DQ777728), una bacteria psicrotolerante, aislada de suelos del Ártico (Canadá), que degrada policlorinato de bifenilo a bajas temperaturas (Master y Mohn, 1998, Witzig y col., 2007).

El resultado obtenido en la identificación de los aislamientos TR5_{H1} y TR6_{H1} indica alta similitud (98% y 99% respectivamente), con organismos procedentes de muestras de suelo y agua de mar de regiones polares como la Antártida y el Ártico, o zonas muy frías como el Tibet. La excepción correspondió a la cepa de *Pseudomonas* Nap42, proveniente de muestras de agua del estuario del Sena en Francia.

Por otra parte, el análisis de identidad mostró también que estos aislamientos están estrechamente relacionados con cepas de *Pseudomonas* descritas en estudios de comunidades microbianas capaces de metabolizar hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) como naftaleno y fenantreno y otros compuestos tóxicos como PCB (policlorinato de bifenilo).

2- Organismos resistentes a antibióticos

Se determinó el perfil de resistencia a antibióticos de los aislamientos que se describen en el Anexo N° 4. Los antibióticos ensayados fueron seleccionados con la finalidad de que estuvieran representados los distintos grupos de antibióticos y en base a la disponibilidad de los mismos. Éstos incluyeron el grupo de β -lactámicos (ampicilina), aminoglucósidos (kanamicina, gentamicina, estreptomina), quinolonas (ácido nalidíxico), así como cloramfenicol, trimetoprim, tetracilina y espectinomicina. Considerando el nivel de resistencia que exhibieron algunos de los aislamientos y tomando en cuenta el origen de los mismos, fueron seleccionados para estudios posteriores los aislamientos: CA4₁₀, GC4₁₂, TR5₄, CDTR512, BA104, CN1112, IA124, PD154, IA194.

Perfil de resistencia a ampicilina

Se ensayó el perfil de crecimiento en presencia de ampicilina (Amp) de los clones TR5₄, BA10₄ y PD15₄. El aislamiento TR5₄ proviene de muestras de suelo colectadas en una cañada de deshielo a 30 m de la costa de la Bahía Fildes donde se ubican los tanques de almacenamiento de combustible pertenecientes a Rusia. Debido a los derrames accidentales que ocurren durante el almacenamiento y transporte de combustible, esta zona está constantemente expuesta a la contaminación por hidrocarburos.

El aislamiento BA10₄ corresponde a muestras de suelo colectadas cerca de la cámara séptica de la BCAA, con evidente influencia antropogénica, mientras que PD15₄ fue aislado de una muestra de tapete microbiano que se formó junto a una alfombra de musgos en el Pasaje Drake. En este sitio reside una población variada de mamíferos marinos y varias especies de aves.

Las curvas de crecimiento de TR5₄, BA10₄ y PD15₄ en ausencia de antibiótico y en presencia de ampicilina, incubados a 25 °C se muestran en la figura 4.

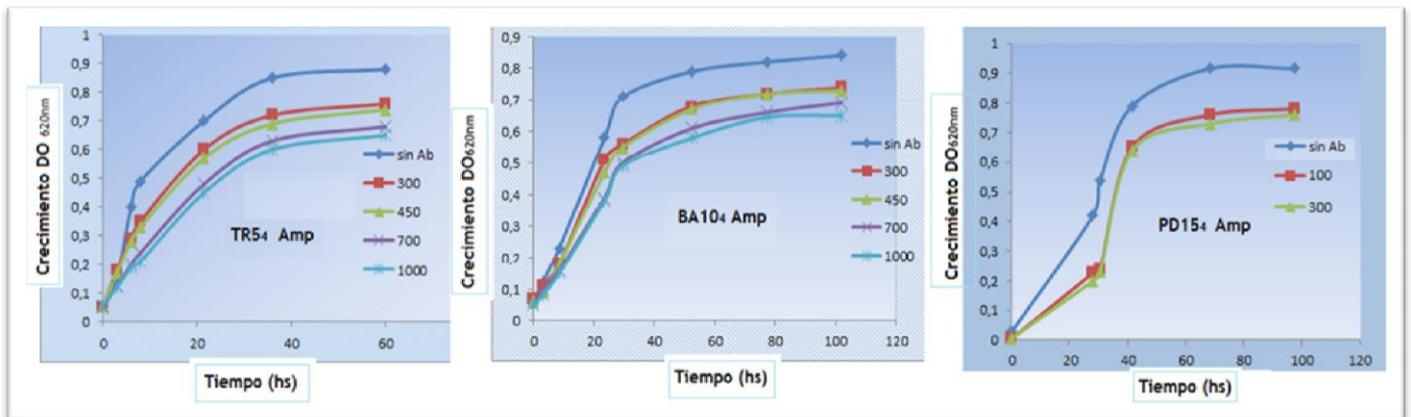


Figura 4: Perfil de crecimiento a 25°C de TR5₄, BA10₄ y PD15₄ en presencia de ampicilina.

Los tres aislamientos exhibieron una típica curva de crecimiento bacteriano, con una fase exponencial de extensión más o menos variable. En todos los casos se ingresó a la fase estacionaria luego de 40 horas de incubación. Si bien los tres aislamientos exhibieron distintas velocidades de crecimiento, todos mostraron un crecimiento sostenido a lo largo del ensayo y alcanzaron valores máximos similares de D.O._{620nm}. En resumen, TR5₄, BA10₄ y PD15₄ exhibieron resistencia a ampicilina al ser cultivados en medio LBm a las concentraciones ensayadas.

Perfil de resistencia a kanamicina

Las concentraciones de kanamicina (Km) ensayadas fueron diferentes para cada uno de los aislamientos. En la figura 5 se muestra las curvas de crecimiento obtenidas al cultivar TR5₄, BA10₄ y PD15₄ en LBm conteniendo el antibiótico.

Los tres aislamientos fueron capaces de crecer en presencia de este antibiótico. El crecimiento de TR5₄ no varió sustancialmente en presencia de kanamicina, comparado con el obtenido en ausencia del mismo. En el caso de BA10₄, el crecimiento en presencia de Km (50 y 200 µg/ml) fue sensiblemente inferior al obtenido en ausencia de antibiótico. En el caso de PD15₄ se ensayaron concentraciones de Km mayores que las empleadas para TR5₄ y BA10₄. Los perfiles de crecimiento de PD15₄ fueron similares en presencia de 700 y 1000 µg/ml de Km, alcanzando una D.O._{620nm} máxima menor que la del control sin antibiótico.

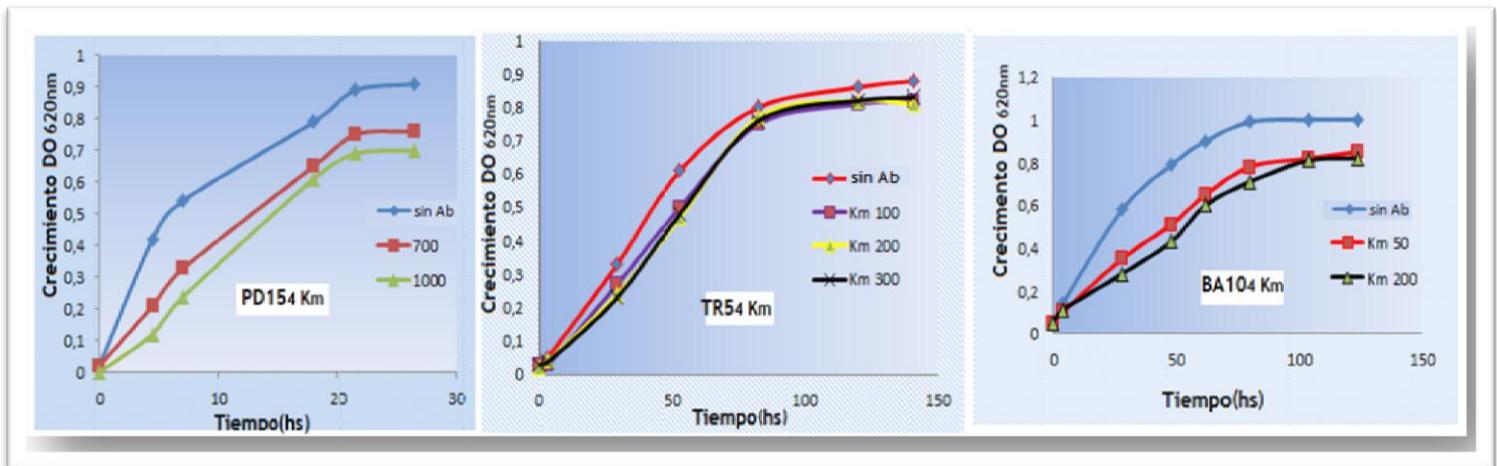


Figura 5: Perfil de crecimiento de TR5₄, BA10₄ y PD15₄ A 25° c en presencia de Km.

En resumen, estos aislamientos también fueron resistentes a la kanamicina que pertenece al grupo de aminoglucósidos. Las concentraciones ensayadas fueron 100, 200 y 300 µg/ml para TR5₄, 50 y 200 µg/ml para BA10₄ y 700 y 1000 µg/ml para PD15₄.

Perfil de resistencia a estreptomicina y otros antibióticos

En presencia de todas las concentraciones ensayadas de estreptomicina, el crecimiento de PD15₄ fue ligeramente menor que el determinado en ausencia de antibiótico (figura 6). Si bien el crecimiento disminuyó a medida que se incrementó la concentración de estreptomicina, los valores máximos de D.O_{620nm} no mostraron una diferencia significativa con el del control sin antibiótico.

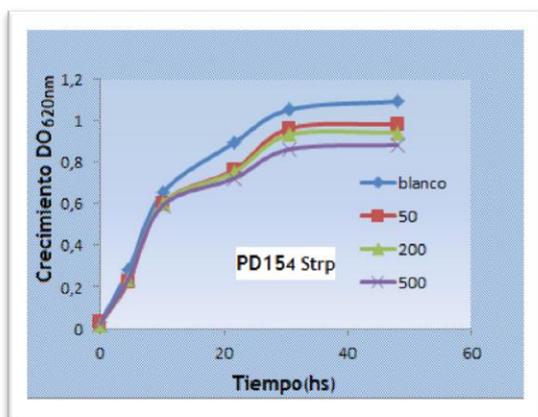


Figura 6: Perfil de crecimiento de PD15₄ a 25° C en presencia de Strp

TR5₄ y PD15₄ también exhibieron resistencia a una droga del grupo de las quinolonas (ácido nalidíxico, 50µg/ml), mientras que BA10₄ resultó ser sensible a ambos antibióticos (Nal y Strp). Finalmente, TR5₄ y BA10₄ fueron resistentes a tetraciclina (10 µg/ml y 50 µg/ml), a diferencia de PD15₄ que resultó ser sensible a este antimicrobiano.

2.1- Identidad de los aislamientos

La identidad de los aislamientos TR5₄, BA10₄ y PD15₄ fue establecida mediante el análisis de secuencia de parte del gen 16S ARNr. En todos los casos, las secuencias de ADN fueron analizadas mediante Blastn usando nr/nt (colección de nucleótidos *non redundant*) como base de datos. Los resultados se resumen en la Tabla III.5.

Tabla III.5

	N° ID	Score	% Cobertura	% identidad	Organismo	origen
TR5 ₄	AJ748270	907	95	97	<i>Psicrobacter psychophilus</i> cepa CMS32	Matas microbianas (Antártida continental) Shivaji y col. 2005 ^a
	EU 636051	907	95	97	<i>Antarctic bacterium</i> cepa GAOG	Sedimento del Glaciar Collins (Antártida marítima) García-Echauri 2011
BA10 ₄	JN999844	1031	100	98	<i>Bacillus mycoides</i> cepa GZJJC6	Muestra ambiental (suelos agrícolas)
	HE662657	1026	100	98	<i>Bacillus</i> sp. cepa S43	Tejido vegetal de <i>Rumex acetosa</i> sp
PD15 ₄	JX 262392 y 262398	544	92	99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KS46 y KW98	Bacteria cultivable psicrotolerante (sedimento marino del Ártico)
	JQ917791	544	92	99	<i>Stenotrophomonas maltophilial_27_J6N</i> NFB4B1	Bacterias reductoras de nitratos/desnitrificantes en suelos de praderas

El análisis de secuencia de TR5₄ mostró un porcentaje de identidad relativamente bajo (97%) con la de la cepa CMS32 (AJ748270) de *Psicrobacter psychophilus* y la cepa GAOG de una bacteria antártica. La primera fue aislada a partir de matas de cianobacterias colectadas en cuerpos de agua en el *Wright Valley* en la región de McMurdo (Antártida continental). Sin embargo, a diferencia de TR5₄,

esa cepa fue sensible a una amplia gama de antibióticos, incluyendo ampicilina y estreptomicina (Shivaji y col., 2005). El aislamiento GAOG (EU 636051) proviene de muestras de sedimento del Glaciar Collins en la Isla Rey Jorge (Antártida marítima) (García-Echauri y col., 2011). Este trabajo reporta la identificación y clasificación filogenética mediante técnicas dependientes de cultivo (ARDRA) de bacterias psicrófilas cultivadas a 4°C. La identificación de TR5₄ resulta dudosa debido al bajo porcentaje de similitud obtenido en el análisis de secuencia del gen 16S ARNr.

BA10₄ exhibió un 98% de identidad con cepas del género *Bacillus*. Dentro de este género se encuentran representadas especies de bacterias comúnmente encontradas en suelos. La cepa GZJJC6 de *Bacillus mycoides*, aislada de suelos agrícola, fue caracterizada como endófito de plantas de tabaco y considerada para su potencial uso como biocontroladora de fitopatógenos como *Ralstonia solanacearum* causante de la marchitez del tabaco, entre otros (JN999844). Mientras que la cepa S43 de *Bacillus* sp. fue identificada en un trabajo sobre caracterización de comunidades de bacterias endófitas y de la rizósfera de suelos alcalinos (HE662657).

La secuencia del aislamiento PD15₄ reveló similitud con miembros del género *Stenotrophomonas*. Bacterias pertenecientes a este género han sido previamente identificadas en el ecosistema antártico (Bowman y col., 1997, Xiao y col., 2005, Gilichinsky y col., 2008). PD15₄ exhibió un 99% de identidad nucleotídica con las cepas KW98 (NCBI JX262398) y KS46 (NCBI JX262392) de *Stenotrophomonas maltophilia*, aisladas de sedimentos marinos en el fiordo de Kongsfjord (Océano Ártico), en un estudio sobre diversidad y caracterización de bacterias cultivables psicrotolerantes. PD15₄ también mostró alta identidad (99%) con la cepa I_27_J6NNFB4B1 de *Stenotrophomonas*. Esta cepa fue identificada en un estudio sobre organismos cultivables desnitrificantes, aislados a partir de muestras de suelos contaminados y no contaminados en praderas de pastos altos (NCBI JQ917791).

Las especies de *Stenotrophomonas* son ubicuas en la naturaleza, y son comúnmente encontradas en muestras ambientales así como también en el ambiente hospitalario. Debido a su condición de patógeno oportunista, *Stenotrophomonas maltophilia* es aislada frecuentemente de muestras clínicas (Svensson-Staddler y col., 2012), exhibiendo además resistencia a diversos agentes antimicrobianos.

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar el perfil de resistencia antibiótica en una colección de microorganismos heterótrofos psicrotolerantes. El estudio se basó en el análisis de organismos provenientes de ambientes

presuntamente libres de influencia antropogénica y otros aislados de ambientes influenciados por la actividad humana y/o la fauna antártica. En los últimos años, la presencia del hombre en la Antártida se ha incrementado considerablemente. En estudios recientes dirigidos a detectar determinantes de resistencia en el ecosistema antártico se describieron enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), particularmente cepas de *E. coli* portadoras de genes *bla*_{CTX-M}, en muestras de agua colectadas en las proximidades de las Bases chilenas Bernardo O'Higgins (Isla Rey Jorge) y Arturo Prat (Isla Greenwich) (Hernández y col., 2012). Asimismo, se han descrito bacterias con fenotipo multiresistente (Amp, Km, Nal, Tc, Strp) provenientes de fecas de pingüino colectadas en la Isla Torgensen y en muestras de agua cerca de la Estación norteamericana Palmer (Isla Anvers) (Miller y col., 2009).

Estudios previos en la Antártida indican la existencia de organismos resistentes a antibióticos tanto en zonas presuntamente contaminadas por la presencia humana como en sitios considerados prístinos. La interrogante planteada refiere a si la resistencia antibiótica encontrada en estos microorganismos se generó por THG surgida a partir de fuentes antropogénicas o bien es una característica intrínseca presente en estos organismos. Otra posibilidad sería que estos aislamientos sean bacterias originalmente mesófilas que fueron diseminadas por el hombre y que posteriormente se adaptaron a vivir en el ecosistema antártico.

Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que todos los ambientes analizados contenían organismos resistentes a por lo menos uno de los antibióticos ensayados (ver Anexo N°4). La interrogante que se plantea entonces refiere a si la resistencia antibiótica encontrada en estos aislamientos se generó por THG surgida a partir de fuentes antropogénicas o bien es una característica intrínseca presente en estos organismos. Otra posibilidad sería que estos aislamientos sean bacterias originalmente mesófilas que fueron diseminadas por el hombre y que posteriormente se adaptaron a vivir en el ecosistema antártico.

Otra posible explicación podría ser que las comunidades bacterianas están expuestas a microorganismos productores de antibióticos presentes naturalmente en el suelo (D'Costa y col., 2011). Probablemente esta condición haya conducido al desarrollo de mecanismos de resistencia como forma de protección. De hecho, en suelos de zonas remotas como Alaska fueron identificados genes *bla-TEM* filogenéticamente distantes de los genes *bla-TEM* encontrados habitualmente en

entornos clínicos (Allen y col., 2008).

Estudios realizados por D'Costa y col. (2011) indicaron que la resistencia antibiótica tendría un origen y evolución muy antiguo y la movilización como un *pool* de genes, denominado resistoma, sería un hecho reciente.

La flora comensal en humanos que viven en áreas remotas del planeta con una mínima exposición a antibióticos como droga, contiene usualmente genes de resistencia a antibióticos. En comunidades indígenas de la selva del Amazonas fueron identificadas cepas de *E. coli* con altos niveles de resistencia a ampicilina, tetraciclina, trimetoprim-sulfametoxazol, estreptomina y cloramfenicol (Bartoloni y col., 2009). Por lo tanto, la idea de que los genes de resistencia encontrados en organismos comensales y/o patógenos evolucionaron por el uso inadecuado de antibióticos a nivel clínico, es actualmente cuestionado (Allen y col., 2008). Podría considerarse entonces, que la mayoría de los genes de resistencia existen naturalmente en el ambiente y que pueden surgir de diversas fuentes y dispersarse en toda la comunidad microbiana. Es así que el suelo funciona como reservorio de determinantes de resistencia que potencialmente pueden emerger en bacterias de relevancia clínica.

Parte de este trabajo y de los resultados que se describen a continuación, fue desarrollado en el Instituto Pasteur de París, en el Departamento de Genomas y Genética (Unidad de Plasticidad del Genoma Bacteriano) bajo la dirección del Dr. Didier Mazel. Esta pasantía fue desarrollada en el marco de una beca de post-grado obtenida a través del Programa AMSUD-Pasteur.

2.3 - Integrones clase 1 (*int11*) asociados a fenotipo Trim^r

Considerando que generalmente integrones de clase 1 portan genes *cassette* de resistencia antibiótica y en particular determinantes de resistencia a trimetoprim, se seleccionaron aquellos aislamientos que presentaron esta característica con el fin de investigar la presencia de integrones de esta clase. A tales efectos, los genomas de 32 aislamientos cultivados en medio MH (Muller-Hinton) conteniendo trimetoprim, fueron empleados como plantillas en reacciones de PCR con cebadores diseñados para amplificar parte del gen *int11* (Mazel y col., 2000).

La secuencia del par de cebadores *int11F/int11R* se indica en la Tabla III.3 de Materiales y Métodos. La ubicación de los cebadores en el gen *int11* corresponde a la posición 786-766 para *int11F* (dirección +) y 303-324 para *int11R* (dirección -).

Como control positivo se utilizó la cepa de *E. coli* JM83 (Km^r), conteniendo el

plásmido pAT674. Este plásmido deriva de pIP833, aislado a partir de la cepa BM2688 de *E. aerogenes*, de origen clínico. Posee un integrón clase 1 del tipo In40 con 4 genes *cassette* asociados: *aac(6')-lb* (confiere resistencia a aminoglicósidos), *qacF* (resistencia a compuestos de amonio cuaternario), *cmlA2* (resistencia a cloramfenicol) y *oxa-9* (resistencia a oxacilinas-carbecinilasa) (Ploy y col., 1998).

En la figura 7 se muestra la organización genética del fragmento *Bam*HI de 6,5 Kb de pAT674.

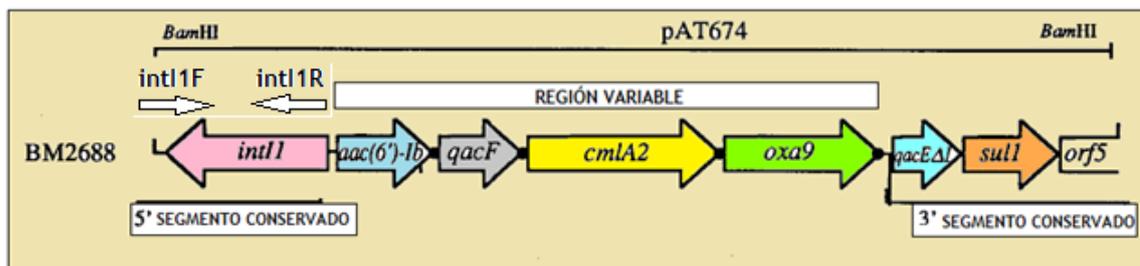


Figura 7: Fragmento *Bam*HI de 6,5 Kb del plásmido pAT674
(Adaptado de Ploy y col., 1998).

A partir de 13 de los aislamientos ensayados se logró amplificar un único producto de PCR (500 pb), de tamaño similar al obtenido a partir del control positivo. Los productos de PCR fueron clonados y se determinó la secuencia nucleotídica. El análisis de secuencia de ADN de los productos confirmó la presencia de integrones clase 1 en los aislamientos TR3₄, CA4₁₀, GC4₁₂, CDTR5₁₂, CN11₁₂, IA12₄ e IA19₄. Tanto a nivel nucleotídico como a nivel aminoacídico deducido, todas las secuencias obtenidas mostraron un perfil de similitud muy similar entre ellas. El resultado del análisis aminoacídico de estos aislamientos se describe en la Tabla III.6 y del aislamiento IA19₄ en la Tabla III.7 (Anexo 6).

Las secuencias aminoacídicas deducidas de los clones TR3₄, CA4₁₀, GC4₁₂, CDTR5₁₂, CN11₁₂, IA12₄ exhibieron 99% de similitud con las secuencias de integrasas de bacterias no cultivadas procedentes de muestras ambientales de diverso origen, tales como plantas de tratamientos de aguas residuales, sedimento de lagos de agua dulce y zonas costeras próximas a centros urbanos (Elsaied y col., 2007, Gillings y col., 2008, Koenig y col., 2009). Estas secuencias asimismo, mostraron similitud con las de genes integrasa de cepas patógenas de *Vibrio cholerae* y *A. baumannii*, provenientes de aislamientos de origen clínico.

Tabla III.6: Mejores *hits* obtenidos a partir del análisis de secuencias aminoacídicas empleando Blastx.

Producto	N° ID		TR3 ₄	CA4 ₁₀	GC4 ₁₂	CDTR5 ₁₂	CN11 ₁ 2	IA12 ₄	Fuente de aislamiento
Integrasa de bacteria no cultivada	ABD62534	Score	334	333	333	334	334	331	Muestra ambiental de compost (Rodríguez-Minguela y col. 2009)
		% cobertura	89	95	95	66	66	70	
		% identidad	99	99	99	99	99	99	
<i>intI1</i> integrasa	ZP07241546	Score	335	334	334	335	335	332	<i>Acinetobacter baumannii</i> cepa AB059
		% cobertura	89	95	95	66	66	70	
		% de identidad	100	100	100	100	100	99	
Proteína de la familia de las integrasas	EGS66892	Score	335	334	334	335	335	332	Cepa HC02A1 de <i>Vibrio cholerae</i>
		% cobertura	89	95	95	66	66	70	
		% identidad	100	100	100	100	100	99	
Integron, integrasa de bacteria no cultivada	CAS02331	Score	331	330	331	331	331	328	Muestra ambiental estanque contaminado (alquitrán) (Koenig y col. 2008)
		% identidad	88	94	94	65	65	69	
		% cobertura	99	100	99	99	99	99	
Integrasa	ZP04398375	Score	335	334	-	331	335	332	Cepa B33 de <i>Vibrio cholerae</i>
		% cobertura	89	95		66	66	70	
		% de identidad	100	100		100	100	99	
Integrasa de bacteria no cultivada	ABS57017	Score	330	330	330	-	-	327	Biofilms en Planta de tratamiento de aguas subterráneas (Gillings y col. 2008)
		% cobertura	87	94	94	-	-	69	
		% de identidad	100	100	100	-	-	99	
Integron, integrasa de bacteria no cultivada	BAF 75918	Score	-	-	330	331	331	-	Sedimento Bahía de Tokio (Elsaied y col. 2007)
		% cobertura			94	66	66		
		% identidad			99	99	99		

La secuencia nucleotídica del gen amplificado a partir del aislamiento IA19₄ (Anexo 6

Tabla III.7) exhibió un 100% de identidad con el gen que codificaría para una proteína hipotética, localizado en el plásmido incP R751 de *E. aerogenes*. Este plásmido pertenece al grupo de incompatibilidad IncP, tiene un amplio rango de hospederos, y por lo tanto facilitaría la propagación de determinantes de resistencia entre bacterias de distintas especies (Thorsted,1998). Esta proteína hipotética tiene similitud con una integrasa de la familia de las tirosin recombinasas, que participaría en la integración de genes *cassette* mediante recombinación específica de sitio entre *attI* (sitio de recombinación primario) y el sitio *attC*.

También mostró un 99% de homología con genes integrasa localizados en plásmidos de cepas de *Shigella flexneri* y genes *intl1* de cepas de *Salmonella entérica*, *A.baumannii* y *P. aeruginosa*. Estas especies contienen organismos patógenos de humanos, incluyendo patógenos oportunistas.

2.4- Localización del gen integrasa

Los integrones pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o bien formar parte de transposones o plásmidos pertenecientes a variados grupos de incompatibilidad. Su ubicación en elementos genéticos móviles facilita la dispersión de determinantes de resistencia mediante THG.

Cuando se empleó el ADN plasmídico de TR3₄, CA4₁₀, GC4₁₂, CDTR5₁₂, CN11₁₂, IA12₄ y IA19₄ como templado en reacciones de PCR para amplificar parte del gen *intl1*, se obtuvo un amplicón del tamaño esperado igual al control positivo (500 pb) (Tabla II.3), sugiriendo que el gen integrasa estaba localizado en estos típicos elementos móviles. Posteriormente el análisis nucleotídico de las secuencias confirmó la presencia de integrones clase 1 en estos vectores.

2.5 - Identificación del gen *cassette* asociado a *intl1*

Teniendo en cuenta el fenotipo Trim^F de los aislamientos positivos para el gen integrasa clase 1 y con el fin de caracterizar el contexto genético del integrón, se investigó la presencia de genes *cassette* asociados a éstos. Se tomó como referencia el trabajo de Adrian y col. (1995) y se utilizaron cebadores específicos para el gen *dfr* que codifica para la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). Considerando que se desconocía la región de interés, se empleó el método de secuenciación “*primer walking*” directamente con el ADN plasmídico de los aislamientos CA4₁₀, GC4₁₂, CDTR5₁₂, CN11₁₂, IA12₄ y IA19₄ como templado. Esta estrategia de secuenciación es empleada para fragmentos de ADN de gran tamaño (2-10 kb) de regiones desconocidas sin ninguna referencia de secuencia (Strauss y col. 1986).

Todos los aislamientos exhibieron, a nivel de secuencia nucleotídica y aminoacídica deducida, más de 98% de identidad con la secuencia del gen *dfrA14* previamente descrito en cepas de bacterias patógenas humanas y otros patógenos oportunistas (Tablas III.8 y III.9 (Anexo 6). A nivel nucleotídico, las secuencias exhibieron más del 98% de similitud con el gen de la enzima DhfrA14 del plásmido pKOX105 de *K. oxytoca*. A nivel de secuencia aminoacídica deducida, mostraron una identidad mayor del 98% con la proteína dihidrofolato reductasa DhfrA14 de un aislamiento de *S. entérica* de origen clínico. También mostraron alta similitud con genes *dfrA14* de *V. cholerae* (Pan y col., 2008), *Salmonella entérica* (Parkhill y col.,

2001), *E. coli* (Fricke y col., 2008) y *Laribacter hongkongensis* (Feng y col., 2011).

Todos los aislamientos contuvieron un gen que codificaba para la enzima Dhfr14, que confiere resistencia a trimetoprim. En la mayoría de los organismos con los cuales presentaron similitud estos aislamientos (descritos en la Tabla III.8), el gen *dfr* se localiza en plásmidos conjugativos multi-resistentes, pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad. El plásmido pKOX105 de *K. oxytoca* y p12 de *K. pneumoniae*, pertenecen al grupo de incompatibilidad IncN (Carattoli y col., 2010, Gootz y col., 2009).

El gen *dfrA14* del plásmido pSMS35_130 de *E. coli* SMS-3-5 (CP000971) se encuentra en una región que abarca 42 Kb junto con otros determinantes de resistencia a cefalosporinas, tetraciclina, cloramfenicol y sulfonamidas (Fricke y col., 2008). En *V. cholerae* (cepa 0017), el plásmido conjugativo multi-resistente pMRV150 confiere resistencia a seis tipos de antibióticos como ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, gentamicina, cloramfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol (Pan y col., 2008).

Tabla III.8: Mejores *hits* obtenidos utilizando el programa Blastn

Descripción	N°ID		CA4 ₁₀	GC4 ₁₂	CDTR5 ₁₂	CN11 ₁₂	IA12 ₄	IA19 ₄	Origen
plásmido IncN <i>pKOX105</i>	HM1260 16	Score	1094	780	776	1138	806	776	<i>Klebsiella oxytoca</i>
		% cobertura	99	98	100	100	100	100	
		% identidad	98	100	99	100	98	99	
plásmido IncN <i>p12</i>	FJ2236 05	Score	1094	780	776	1138	806	776	Cepa 12 <i>Klebsiella pneumoniae</i>
		% cobertura	99	98	100	100	100	100	
		% identidad	98	100	99	99	98	99	
Integrón clase 1 <i>dfrA14</i> <i>pMRV150</i>	EU1164 41	Score	1094	780	776	1138	806	776	Cepa 0017 de <i>Vibrio cholerae</i>
		% cobertura	99	98	100	100	100	100	
		% de identidad	98	100	99	99	98	99	
Integrón clase 1 <i>IS6100</i> <i>dfrA14</i>	HQ7301 19	Score	1094	780	776	1138	806	776	<i>E.coli</i> cepa WM98a10
		% de cobertura	99	98	100	100	100	100	
		% de identidad	98	100	99	99	98	99	
dihidrofolato reductasa <i>dfrA14</i>	GU7269 17	Score	1094	780	776	1138	806	776	Cepa LHW64 <i>Laribacter hongkongensis</i>
		% de cobertura	99	98	100	100	100	100	
		% de identidad	98	100	99	99	98	99	
secuencia de inserción <i>IS986/IS6110tr</i> <i>ansposase</i> (<i>insF1</i>)	GU1895 77	Score	1094	780	776	1138	806	776	Cepa C994 <i>Klebsiella oxytoca</i>
		% cobertura	99	98	100	100	100	100	
		% identidad	98	100	99	99	98	99	
Plásmido <i>IncA/C</i> integrón clase 1	JN1935 67	Score	1094	780	776	1138	806	776	Cepa PsB/3 <i>Providencia stuartii</i>
		% cobertura	99	98	100	100	100	100	
		% identidad	98	100	99	99	98	99	
plásmido <i>pSMS35_130</i>	CP0009 71	Score	1094	780	776	1138	806	776	cepa SMS-3-5 de <i>E.coli</i>
		% cobertura	99	98	100	100	100	100	
		% identidad	98	100	99	99	98	99	

2.6- Análisis de secuencia del ORFa ubicado corriente arriba de *dfrA14*.

Dado que las secuencias nucleotídicas obtenidas exhibieron alta similitud con la del gen *dfrA14* del plásmido pKOX105 de *K.oxytoca* (N° Acceso HM126016), se piensa que el integrón identificado en los plásmidos aislados podría tener una organización genética similar al descrito previamente en ese vector de origen clínico. Con la finalidad de investigar la organización genética contigua al ORF *dfrA14* de estos aislamientos, se diseñaron cebadores en base a la secuencia del plásmido pKOX105 (Carattoli y col., 2010) (figura III.8). La secuencia de este par de cebadores, denominados *dfr_forward*/*dfr_reverse*, se indica en la Tabla III.3 de la sección Materiales y Métodos.

El cebador *forward* (indicado con una flecha naranja “F” en la figura 8 corresponde a las secuencias finales de la región codificante del gen *dfrA14* y el cebador reverso (flecha naranja “R”) se diseñó de modo de reconocer una región de la secuencia de inserción *IS6100* de un transposón, ubicada corriente arriba respecto a *dfrA14* en pKOX105. Los plásmidos de CA₄₁₀, GC₄₁₂, CDTR₅₁₂, CN11₁₂, IA12₄ y IA19₄ se emplearon como templados en reacciones de secuenciación “*primer walking*” empleando estos cebadores.

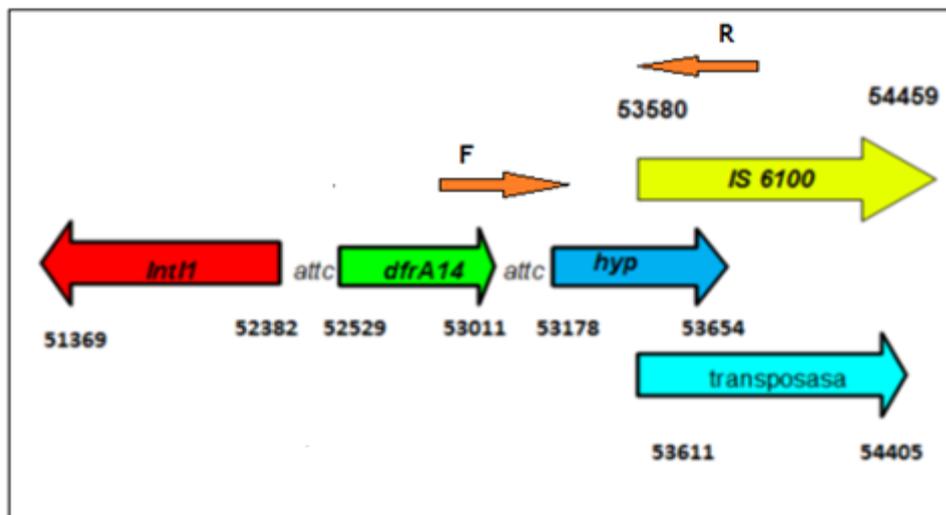


Figura 8: En la imagen se indica la posición de los cebadores diseñados en este trabajo y la región de lectura correspondiente a cada uno (flechas naranjas F y R).

Las secuencias aminoacídicas deducidas obtenidas a partir de los seis aislamientos analizados exhibieron un 100% de identidad con la de una proteína hipotética de *S.entérica typhi* cepa CT18 y *K. pneumoniae* cepa 12. Además, las secuencias traducidas de GC4₁₂, IA12₄ y IA19₄ fueron 100% idénticas a la de la proteína hipotética del vector de *K. oxytoca*, pKOX105. El resultado se describe en la Tabla III.10.

Tabla III.10: Mejores hits obtenidos con el programa Blastx

Descripción	N° ID		CA4 ₁₀	GC4 ₁₂	CDTR 5 ₁₂	IA12 ₄	IA19 ₄	Origen
Proteína hipotética <i>K. oxytoca</i>	HM126016	Score	286	310	283	313	310	<i>Klebsiella oxytoca</i> pKOX105
		% cobertura	64	64	60	65	64	
		% identidad	94	100	97	100	100	
Proteína hipotética <i>S. enterica</i>	CAD 09755	Score	196	196	196	196	196	Cepa CT18 de <i>S. entérica typhi</i>
		% cobertura	41	41	40	41	40	
		% identidad	100	100	100	100	100	
Proteína de movilidad (bacteria no cultivable)	CAH 64758	Score	195	195	195	195	195	pRSB107 Planta de tratamiento de aguas residuales
		% cobertura	41	41	40	41	41	
		% identidad	98	98	98	98	98	
Proteína putativa de movilidad <i>K. pneumoniae</i>	YP002286928	Score	185	185	185	185	185	Cepa 12 de <i>K. pneumoniae</i>
		% cobertura	38	38	38	38	38	
		% identidad	100	100	100	100	100	

2.7- Fenotipo Trim^r transferible

A efectos de establecer si los plásmidos que contenían el gen de resistencia a trimetoprim (*dfrA14*) poseían la capacidad de transferir el fenotipo Trim^r entre enterobacterias, se efectuaron una serie de ensayos de conjugación empleando una cepa de *E. coli* como receptora. Fue posible obtener clones transconjugantes a partir de los aislamientos IA4₁₂, CDTR5₄, CN11₁₂ y IA19₄, los cuales fueron seleccionados en virtud de su fenotipo Trim^r Na^r. El fenotipo Trim^r pudo ser transferido a células de *E. coli* JM109 sensibles a este antibiótico. Los transconjugantes exhibieron también resistencia a ampicilina (50 µg/ml), lo que sugiere que el gen que codifica para esta resistencia está contenido también en el plásmido conjugativo.

Estos resultados primarios sugieren que el gen *dfrA14* se encuentra localizado en plásmidos del tipo conjugativo. Asimismo la resistencia a trimetoprim estaría asociada a determinantes de resistencia a ampicilina, tal como ha sido descrito en trabajos previos (Adrian y col., 1995 y 2000).

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que 22% del total de los aislamientos Trim^r analizados, seleccionados originalmente en medio LBm, contenían integrones clase 1 en sus genomas. La región del integrón identificada contiene un gen *intl1* que codifica para una recombinasa sitio específica Intl1. El análisis de secuencia de la región nucleotídica próxima al gen *intl1* indicó que estos aislamientos (n=7) poseen el mismo gen *cassette dfrA14*. Contiguo al gen *dfrA14* se encontró un ORF que codificaría para una proteína hipotética de función desconocida. La organización genética parcial del integrón caracterizada hasta el momento es muy similar a la encontrada en el plásmido pKOX105 de *K. oxytoca* y p12 de *K. pneumoniae* (Carattoli y col., 2010 y Gootz y col., 2009, respectivamente).

En la figura 9 se muestra parte del mapa físico de pKOX105 y p12, donde se indica la región genética con la cual exhibieron máxima similitud estos aislamientos. Esta zona incluye los genes *intl1*, *dfrA14* e *hyp* que codificaría para la proteína hipotética de función desconocida.

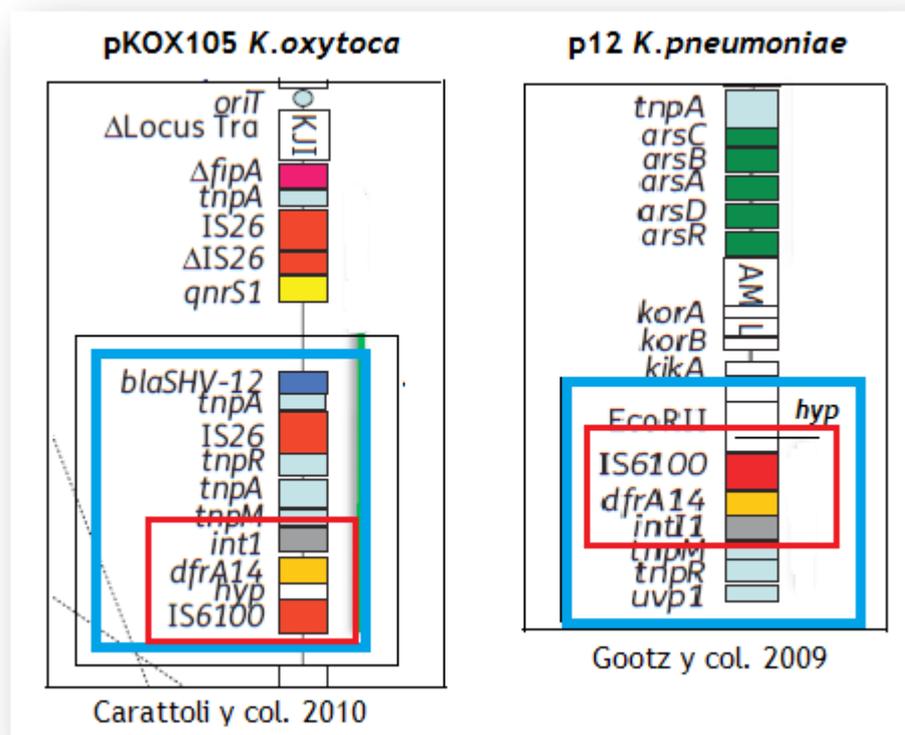


Figura 9: Región parcial del mapa físico de p12 de *K. pneumoniae* y pKOX105 de *K. oxytoca*. Dentro del recuadro rojo se indican los genes *int1*, *dfrA14* y el gen que codifica para la proteína hipotética (*hyp*) truncada por la secuencia de inserción IS6100 (Adaptado de Carattoli y col., 2010).

Todos los aislamientos positivos para el gen integrasa clase 1 mostraron un único integrón con la misma organización genética y ubicación plasmídica. Resulta sorprendente la similitud de esta estructura con la descrita en plásmidos provenientes de organismos patógenos como *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*, aislados del ambiente hospitalario.

Los genes integrasa clase 1 aquí identificados provienen de aislamientos con diversos orígenes. Algunas de las muestras fueron colectadas en sitios con evidente influencia antropogénica, próximos a las Bases de operaciones (CA4₁₀ y TR3₄), o presencia animal (IA12₄ y IA19₄), mientras que otras provienen de sitios más alejados (CN11₁₂ y CDTR5₁₂). Por lo tanto, para poder entender el origen de esta estructura es necesario investigar las vías de dispersión de los plásmidos que lo portan.

Los plásmidos transmisibles o movilizables actúan como vectores que median el intercambio de genes entre bacterias de distintas especies (Frost y col., 2005). En particular, los plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncN, como

pKOX105 y p12 son considerados de relevancia clínica debido a que facilitan la diseminación de una gran variedad de determinantes de resistencia mediante la incorporación de transposones, secuencias de inserción y genes *cassette* (Eikmeyer y col., 2012). Un ejemplo de ello son los elementos de inserción IS26 ampliamente distribuidos en γ -proteobacterias, asociados con diferentes genes *cassette* de resistencia. (Fricke y col., 2008). Estas secuencias de inserción, así como las IS6100, pueden estar insertadas dentro del integrón o localizadas próximas a él (Betteridge y col., 2011).

En pKOX105 de *K. oxytoca* y p12 de *K. pneumoniae* se encontró que el gen que codificaría para una proteína hipotética estaba truncado por una secuencia de inserción IS6100 y por un gen *tnpM* que codifica para una transposasa del transposón Tn21 (Carattoli y col., 2010). Ambos plásmidos portan integrones muy similares entre sí que se ubican en la misma posición, localizado “río abajo” del sistema de restricción/antirestricción *EcoRII* y se encuentran flanqueados por el gen *tnpM* del transposón Tn21 y el elemento de inserción IS6100 (Carattoli y col., 2010) (figura III.9).

Los plásmidos pKOX105 y p12 poseen regiones IncN muy conservadas y un 100% de identidad aminoacídica entre las proteínas que componen su genoma *core*. En la región variable se encuentran los genes de resistencia así como secuencias de inserción y transposones. Si bien estos plásmidos no poseen los mismos determinantes de resistencia, sus enzimas Dhfr14, Int11 y proteína hipotética son idénticas en un 100%. Esta analogía sugiere que tanto pKOX105 como p12 se habrían originado a partir de un ancestro común que posteriormente, mediante eventos de adquisición, eliminación e inversión, fueron generando las distintas variantes que existen actualmente (Carattoli y col., 2010).

Los genes *dfr* suelen estar asociados a elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones, facilitando la diseminación del fenotipo Trim^r (Sündstrom y col., 1995, Houvinen ,1995, Ojo y col., 2002). Muchos de estos genes *dfr* son genes *cassette* que se encuentran insertados en integrones de clase 1 y 2 (Houvinen y col., 1995). Debido al gran número y diversidad de plásmidos que portan genes que codifican para enzimas de tipo Dhfr14, se cree que el gen *dfrA14* podría haber sido diseminado vía transposasas o integrasas (Adrian y col., 1995). De hecho, el gen *dfrA14* fue descrito inicialmente en el transposón Tn4132 que deriva de Tn7. Ambos transposones poseen el mismo mapa de restricción, con excepción de la región codificante del gen *dfr* (Young y col., 1994).

Por otra parte, los resultados obtenidos en los ensayos de conjugación

sugieren que los genes que confieren resistencia a ampicilina se encontrarían también localizados en el plásmido. La presencia de genes *dfr* asociados al fenotipo Amp^r que exhibieron los transconjugantes resulta consistente con lo descrito por Adrian y col. (2000), donde se señala que la presencia de determinantes de resistencia a ampicilina localizados en plásmidos está generalmente asociada al gen *dfrA14* y en algunos casos también a la presencia de determinantes de resistencia a estreptomicina (Strp).

2.8. Genes *qac* y *sul*

Con el propósito de conocer la estructura del integrón identificado, se intentó determinar si portaban la región conservada del extremo 3' (3'-CS). En los integrones de clase 1, el fragmento 3'-CS contiene el gen *qacEΔ1*, (una mutación por eliminación de un fragmento, pero gen aún funcional), el gen *sul-1* y dos ORFs (*orf5*) y (*orf6*) de función desconocida (Partridge y col., 2009).

Como control positivo se empleó la cepa de *E. coli* JM83 (Km^r), conteniendo el plásmido pAT674. Este plásmido porta los genes *qacEΔ1* y *sul-1* (Ploy y col., 1998). Todas las combinaciones de cebadores ensayadas y las regiones que corresponden a cada gen se describen en la figura 10. Para investigar la presencia de los genes *qac* y *sul-1* se empleó la combinación de cebadores *qacF/R* y *sul1 F/R* en los clones: TR1₄, GC4₁₂, CDTR5₁₂, CN11₂, IA12₄, BA13₁₂, IA19₄. La combinación *int1F/qacR* fue empleada en los clones ya mencionados y también en TR3₄ y CA4₁₀.

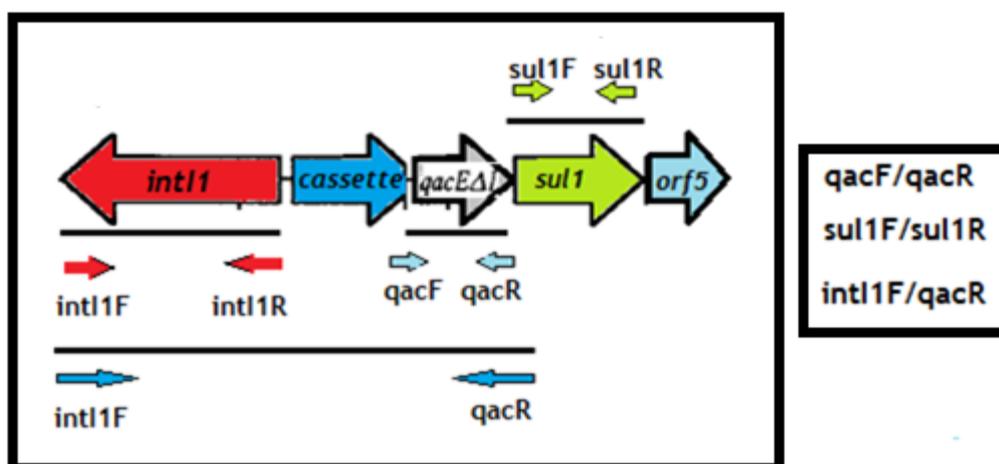


Figura 10: Esquema representativo donde se indican las regiones del integrón que amplifican las distintas combinaciones de cebadores utilizadas.

Cuando se empleó la combinación de cebadores *qacF/qacR* y *sul-1F/sul-1R*, todos los aislamientos ensayados resultaron negativos para la presencia de genes *qacEΔ1* y *sul-1*, con excepción de BA13₁₂. A partir de BA13₁₂, se obtuvieron dos amplicones del tamaño esperado, 300-400 pb para el gen *qacEΔ1* y 700 pb para el gen *sul-1*.

Para la combinación de oligos *intl1F/qacR*, no se obtuvieron resultados positivos, excepto para TR3₄ y CA4₁₀. A partir de TR3₄ y CA4₁₀ se obtuvieron dos productos de amplificación de aproximadamente 3000 y 1500 pb respectivamente.

Al emplear el par de cebadores *intl1 F/qacR*, se intentó caracterizar e identificar los genes *cassette* que pudieran estar asociados al integrón. Los *cassettes* se ensamblan en el integrón en arreglos en tándem, los cuales pueden tener un tamaño variable entre 500 y 1500 pb (Recchia y col, 1995).

Estos aislamientos (TR3₄ y CA4₁₀) exhibieron además del fenotipo Trim^r y Amp^r, resistencia a cloramfenicol y estreptomicina. Los genes *cassette* que confieren resistencia a estos antibióticos están comúnmente asociados a integrones. En particular, los determinantes de resistencia a ampicilina y cloramfenicol están usualmente localizados en plásmidos conjugativos y asociados a transposones (White, 2001). Tomando en consideración los resultados obtenidos, cabría entonces determinar si los amplicones obtenidos a partir de TR3₄ y CA4₁₀ con la combinación de cebadores *intl1F/qacR*, incluían los genes de resistencia a Amp, Cm y Strp como *cassettes* asociados al integrón. Asimismo, deberá confirmarse la identidad de los amplicones obtenidos para BA13₁₂ con el par de cebadores *qacF/R* y *sul1F/R*.

Como ya fue mencionado, el modelo que explica el origen y subsecuente divergencia de integrones de clase 1 (figura I.3.h) propone que los ancestros de los integrones clínicos provienen de un *pool* de integrones localizados en el cromosoma de β -Proteobacterias. Estos elementos habrían sido insertados mediante recombinación dentro de un transposón Tn-402, facilitando su posterior diseminación entre patógenos y comensales humanos (Gillings y col., 2006 y 2008^a). Este evento probablemente ocurrió en la era pre-antibiótica o concomitante a ella. Los ancestros carecían del extremo conservado 3'-CS. Posteriormente, la captura de genes *qacE*, *sul-1* y *orf5*, eliminaciones de regiones, inserciones y otros arreglos, podrían haber generado el extremo conservado 3'-CS, presente actualmente en integrones clase 1 de origen clínico (Gillings y col., 2008^a).

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que diez de los doce

clones positivos para el gen integrasa (*intI1*) no poseían el extremo conservado 3'-CS. La ausencia de 3'-CS en los integrones descritos en este trabajo podría explicarse por la presión selectiva. Los genes *qacEΔ1* y *sul-1* que confieren resistencia a los compuestos derivados del amonio cuaternario y a sulfonamidas son característicos de integrones clase 1 encontrados habitualmente en aislamientos clínicos. El creciente uso de estos compuestos y otros biocidas generaría una presión selectiva que probablemente promueva la fijación de este fenotipo (Gillings y col., 2008). Esta situación no estaría presente en los aislamientos ambientales. La ausencia de genes *qacEΔ1* en estos aislamientos provenientes de un hábitat remoto a centros urbanos y hospitales, donde no existe una presión selectiva impuesta por el ambiente, resulta consistente con esta teoría.

Coincidente con esto, es el hecho de que los únicos integrones que presentan al menos parte del extremo conservado 3'-CS, son los encontrados en TR3₄ y CA4₁₀, provenientes de muestras de sitios próximos a zonas de influencia antrópica (ver Anexo N° 1 y N° 2, TR3₄: Tanques Rusos/CA4₁₀: CAÑADA Base Artigas). Podría pensarse entonces que la existencia de genes *qacEΔ1* en estas cepas esté relacionada con la presencia humana.

Otra explicación posible involucra elementos genéticos móviles, como las secuencias de inserción (IS). Algunos integrones contienen el extremo 5-CS' y un arreglo de genes *cassette*, pero carecen del extremo 3-CS' (Sunde, 2005, Partridge y col., 2009, Seputiene y col., 2010). Las IS6100 se encuentran "río abajo" del extremo 3'-CS y en los integrones de tipo In-4, estas IS pueden producir eliminaciones de fragmentos nucleotídicos en la región variable del integrón, donde están insertados los genes *cassette*. En otros casos, los *cassettes* están truncados por IS26 o IS1 (Partridge y col. 2001). Tal como fue mencionado previamente, la estructura genética de los integrones aquí descritos es muy similar a la del integrón encontrado en el plásmido pKOX105 de *K. oxytoca* y el plásmido p12 de *K. pneumoniae*. Coincidentemente, en ambos, el integrón se encuentra flanqueado por secuencias de inserción IS26 y su extremo 3'-CS está truncado por las secuencias IS6100 e IS26 (Gootz y col., 2009 y Carattoli y col., 2010).

2.9- Identidad de los aislamientos positivos para el gen integrasa *intI1*

La identidad de los aislamientos TR3₄, GC4₁₂, CA4₁₀, CDTR5₄, CN11₁₂, IA12₄, BA13₁₂ y IA19₄ fue efectuada mediante análisis de secuencia de parte del gen 16S

ARNr. El resultado de la comparación de estas secuencias con las depositadas en la Base de Datos del nr/nt se muestra en las Tablas III.11, III.12, III.13, III.14, III.15 (Anexo 6).

Este resultado primario indica que todos los aislamientos con fenotipo Trim^r pertenecen al género *Enterobacter*. Los aislamientos TR1₄, CA4₁₀, GC4₁₂, BA13₁₂ y IA19₄ exhibieron un 99% de identidad con la cepa **JJDP1** de *Enterobacter* sp. Esta bacteria, aislada de una muestra de suelo, fue descrita en un estudio sobre decoloración microbiana de colorantes azoicos (NCBI JQ726698). Estos aislamientos presentaron también similitud (99%) con cepas del género *Enterobacter* sp. que han sido caracterizadas como bacterias endófitas, biocontroladoras y promotoras del crecimiento vegetal (PGPRLa **cepa S60** (HE662664) ha sido descrita como endófitas de *Rumex acetosa*, una planta con propiedades medicinales conocida comúnmente como “acedera”. Las cepas **341** y **344** de *E. cloacae* fueron descritas como endófitas de árboles de cacao (*Teobroma cacao* L.) (JQ435861) y (JQ435862).

El clon **B901-2** (AB114268) representa un organismo que integra un consorcio con la capacidad de fijar nitrógeno, aislado de plantas no leguminosas. Además, todos los aislamientos presentaron una gran similitud con cepas de *E. hormaechei* de diverso origen, como la bacteria halotolerante **WW2** (JN993998) aislada de agua de mar y una nueva cepa **Ni-1** (HM446004) tolerante al ión Níquel, proveniente de muestras de suelo.

S6-255(Q660204) y **R2-206** (JQ659598) son cepas de *E. hormaechei*, aisladas como endófitas de cultivares de *Jatropha curcas*, mientras que **M.D.NA5-9** (JF690889) fue aislada de la flora intestinal del ciervo almizclero que habita los Bosques de la Siberia (Tablas III.11, III.12 y III.14).

El perfil de identidad del clon CDTR5₁₂ mostró algunas diferencias con el resto de los aislamientos, probablemente debido a que la comparación con la Base de Datos se realizó únicamente con la secuencia obtenida a partir del cebador 1492 “reverse”. Dado que la secuencia obtenida que corresponde al fragmento amplificado a partir del cebador 27 “forward” resultó ser de baja calidad, no fue posible ensamblarla con la secuencia desde el sitio 1492 “reverse”. Los mejores *hits* obtenidos para este aislamiento fueron con las secuencias de bacterias endófitas de cultivares de *Jatropha* pertenecientes a distintas especies del género *Enterobacter* (Tabla IV.12).

CDTR5₁₂ presentó una similitud del 99% con la cepa **R5-318** de *Enterobacter*

ludwigii (JQ659725), la cepa MS2 de *E. cloacae* (HQ179578) y con la cepa S6-255 de *E. hormaechei* (JQ660204) mencionada previamente. También exhibió un 99% de identidad con la cepa S6-233-1 de *Cellulomonas hominis* (JQ660195).

Por último, el análisis de los aislamientos CN11₂ y IA12₄ exhibió similitud con la secuencia de la cepa de origen clínico EN-562T de la sub-especie *steigerwaltii* de *E. hormaechei* (AJ853890), perteneciente al complejo *Enterobacter cloacae* (Hoffman, 2005).

Tabla III.11: Mejores *hits* obtenidos en el GenBank correspondientes a los aislamientos TR1₄, CO4₁₂, CA4₁₀, BA13₁₂ e IA19₄.

Organismo	N° ID		TR3 ₄	CA4 ₁₀	CO4 ₁₂	BA13 ₁₂	IA19 ₄	origen
<i>Enterobacter</i> sp. cepa CIFRI D-TSB-9-ZMA	JF799886	Score	-	2580	-	2564	-	Agua de mar (bacteria halotolerante)
		% cobertura	-	100	-	100	-	
		% identidad	-	99	-	99	-	
<i>Enterobacter</i> sp. cepa JJDP1	JQ726698	Score	2521	2575	2549	2558	2503	Suelo (decolorización microbiana de colorantes azoicos)
		% cobertura	100	99	98	100	100	
		% identidad	99	99	99	99	99	
<i>Enterobacter</i> sp. cepa S60	HE662664	Score	2521	2575	2549	-	2503	Bacteria endófito rizósfera de <i>Rumex acetosa</i>
		% cobertura	100	99	98	-	100	
		% identidad	99	99	99	-	99	
<i>Enterobacter</i> <i>hormaechei</i> cepa WW2	JN993998	Score	2521	2573	2549	2558	2503	Bacteria halotolerante aislada de agua de mar
		% cobertura	100	99	98	99	100	
		% identidad	99	99	99	99	99	
<i>Enterobacter</i> <i>hormaechei</i> cepa M.D.NA5-9	JF690889	Score	2521	2573	2549	2564	2503	Intestino de ciervo almizclero del bosque
		% cobertura	100	99	98	100	100	
		% identidad	99	99	99	99	99	
<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i> cepa 344	JQ435862	Score	2521	2573	-	2562	2503	Endófito de <i>Teobroma cacao</i> L. (PGPR)
		% cobertura	100	99	-	100	100	
		% identidad	99	99	-	99	99	
<i>Enterobacter</i> sp. cepa B901-2	AB114268	Score	2521	2571	2549	-	2503	Consortio fijador de N ₂ aislado de tallo de Gramíneas (Minamisawa y col. 2004)
		% cobertura	100	99	98	-	100	
		% identidad	99	99	99	-	99	
<i>Enterobacter</i> <i>hormaechei</i> cepa Ni-1	HM44600 4	Score	-	-	2549	2558	2503	Bacteria tolerante al Níquel aislada de suelo
		% cobertura	-	-	98	100	100	
		% identidad	-	-	99	99	99	

2.10- Estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento de enterobacterias antárticas

En la figura 11 se muestra el resultado del análisis comparativo de crecimiento a 5°C, 25°C y 37°C obtenidas para CA4₁₀, GC4₁₂, CDTR5₁₂ e IA19₄. Los aislamientos seleccionados para este estudio fueron previamente identificados como pertenecientes al género *Enterobacter* y son representativos de distintos sitios de la isla (ver Anexos N° 1, N° 2 y N° 3).

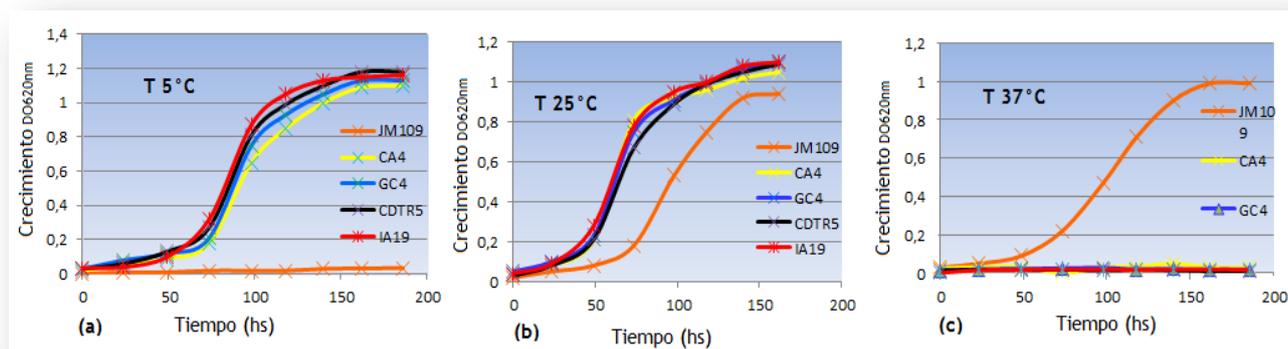


Figura 11: Efecto de la temperatura en el crecimiento de CA4₁₀, GC4₁₂, CDTR5₁₂ e IA19₄. Como control se utilizó la cepa JM109 de *E. coli*. Cada cepa fue cultivada en LBm a 5°C, 25°C y 37°C. El crecimiento fue determinado por medidas la DO_{620nm} a distintos tiempos.

Todos los aislamientos antárticos mostraron un crecimiento sostenido a lo largo del tiempo, excepto cuando fueron incubados a 37°C, donde no se observó crecimiento a excepción de la cepa control. Los valores máximos de DO_{620nm} alcanzados a 5 y 25°C fueron similares para todos los aislamientos. El efecto de la temperatura en la velocidad de crecimiento se vio reflejada en el comienzo de la fase exponencial para los cultivos de 5°C y 25°C. Si bien no es posible determinar con exactitud el comienzo de la misma, se observó que las cepas cultivadas a 25°C estaban en plena fase exponencial cuando habían transcurrido 50 horas de incubación, mientras que para los cultivos mantenidos a 5°C el tiempo fue de aproximadamente 75 horas.

Los resultados obtenidos mostraron un crecimiento sostenido y valores máximos de D.O. superiores a 1 cuando fueron incubados a 5°C y 25°C. Su velocidad

de crecimiento aumentó cuando fueron incubadas a 25°C, pero ninguno fue capaz de crecer a 37°C.

El género *Enterobacter* fue propuesto y descrito por primera vez en 1960 por E. Hormaeche (microbiólogo uruguayo) y P. Edwards (Grimont & Grimont, 2006). Actualmente hay descritas catorce especies dentro de este género. Su diversidad es tan alta que resulta difícil establecer una clasificación sistemática. Existen además dificultades en la designación de algunas especies, tal es el caso de *E. aerogenes*, que se encuentra más cercana a *K. pneumoniae* que a *E. cloacae* (Grimont & Grimont, 2006).

Las bacterias de las especies de *Enterobacter* han sido aisladas del ambiente a partir de hábitats naturales como agua, suelo, plantas y también de aguas residuales. Antes del uso extendido de antibióticos era poco frecuente encontrarlas como patógenos. Sin embargo, en la actualidad estos organismos revisten importancia sanitaria por ser causantes de infecciones nosocomiales, incluyendo bacteremias, infecciones del tracto urinario y respiratorio (Grimont & Grimont, 2006). No obstante ello, muchas especies del género *Enterobacter* pueden resultar beneficiosas para el hombre, como ciertas cepas de *E. cloacae*, *E. absuriae* y *E. agglomerans*, que son empleadas para el control biológico de fitopatógenos (Nelson, 1988, Roberts, 1999, Moutaouakkil, 2004).

En este trabajo se han caracterizado enterobacterias que exhibieron similitud con organismos de las especies de *E. hormaechei*, *E. cloacae*, *E. absuriae* y también con diversas cepas del género *Enterobacter* sp., aunque sin lograr identificarlas a nivel de especie.

Las secuencias exhibieron similitud con algunas cepas halotolerantes y también resistentes a metales pesados como níquel (Ni) y cobre (Cu) de la especie *Enterobacter hormaechei*. Particularmente, en Isla Galíndez (Archipiélago Wilhelm, Antártida marítima), donde se encuentra la Base *Akademik Vernadsky* perteneciente a Ucrania, se aislaron bacterias de *E. hormaechei* a partir de suelos ornitogénicos capaces de resistir altas concentraciones de ión Cu^{+2} (100-1100 mg/l), así como también capaces de extraer grandes cantidades de cobre del suelo (11-75%) (Tashireva y col., 2009). Este constituiría el primer trabajo donde se informa de la existencia de organismos de *E. hormaechei* en la Antártida. Desafortunadamente, la secuencia 16S ARNr de esta cepa de *E. hormaechei* no se encuentra disponible en la Base de Datos, por lo que no fue posible realizar un análisis comparativo con las

secuencias correspondientes a nuestros aislamientos.

A su vez, las secuencias de TR1₄, GC4₁₂, CA4₁₀ e IA19₄ presentaron similitud (99%) con una cepa de *Enterobacter* sp., integrante de un consorcio constituido por algunas bacterias fijadoras de N₂ (Minamisawa y col., 2004).

Otras de las cepas *Enterobacter* sp. con las cuales exhibieron identidad los aislamientos TR1₄, GC4₁₂, CA4₁₀, BA13₁₂ e IA19₄, poseen la habilidad de degradar compuestos xenobióticos, como los colorantes azoicos que son potencialmente peligrosos para la salud y el medio ambiente (NCBI JQ726698). Dentro de los organismos que son capaces de resistir y degradar estos compuestos se encuentran algunas cepas del género *Klebsiella* (Franciscon y col. 2009) y cepas del género *Enterobacter*, entre ellas la especie *E. agglomerans* (Moutaouakkil, 2004).

Por último, CN11₁₂ y IA12₄ exhibieron 96% y 99% de identidad, respectivamente, con una cepa de origen clínico de la sub-especie *steigerwaltii* de *E. hormaechei* (Hoffman y col., 2005).

En resumen, la identidad de los aislamientos obtenidos en este trabajo mostró similitud con cepas ambientales pertenecientes al género *Enterobacter* sp. Se podría preguntar sobre el origen y la función de estas enterobacterias en el ecosistema antártico.

En general, la Antártida está habitada por microorganismos adaptados a vivir bajo condiciones de estrés, como las condiciones climáticas, radiación UV y escasa disponibilidad de nutrientes. Un ejemplo de adaptación al frío es la producción de proteínas con actividad anticongelante. En lagos hipersalinos de la región Este del continente se aislaron bacterias con actividad inhibitoria de la recristalización. Uno de estos aislamientos pertenecía al género *Enterobacter* sp. (Gilbert y col., 2004). También, se han descrito cepas de *Brevibacterium antarcticum* y *Enterobacter hormaechei* resistentes a altas concentraciones de iones Cu⁺² y con capacidad de extraer grandes cantidades de este metal del ambiente (Tashireva y col., 2009).

El análisis comparativo de crecimiento a distintas temperaturas mostró que las enterobacterias descritas en este trabajo se comportan como organismos psicrotolerantes que crecen a 5°C y a diferencia de otras enterobacterias, no fueron capaces de crecer a 37°C. La temperatura óptima de crecimiento se ubicó por encima de los 15°C, mostrando una clara adaptación a este clima extremadamente frío. Para poder entender que rol estarían cumpliendo estos microorganismos en el ambiente sería necesario conocer más en profundidad las características fisiológicas y fenotípicas que le han permitido sobrevivir en el ecosistema antártico.

2.11- Análisis de genotipos (rep-ERIC PCR)

El análisis de secuencia del gen 16S ARNr de los aislamientos TR3₄, CA4₁₀, CO4₁₂, CDTR5₁₂, CN11₁₂, IA12₄ e IA19₄ mostró que los mismos eran muy similares entre sí. A efectos de determinar si estos aislamientos correspondían todos a una misma cepa, se los analizó mediante el método de rep-PCR, empleando los cebadores ERIC descriptos en el trabajo de Hulton y col., 1991 (Tabla II.3). Los fragmentos ERIC (*Enterobacteria Repetitive Intergenic Consensus* por sus siglas en inglés) son secuencias palindrómicas imperfectas de 126-pb que aparecen en múltiples copias en el genoma de enterobacterias y vibrios (Versalovic, 1991, Hulton y col., 1991). Dado que la posición de estos elementos en el genoma de enterobacterias varía entre las diferentes especies y cepas dentro de las especies, es una técnica útil para la tipificación de cepas bacterianas (Versalovic, 1991, Hulton y col., 1991).

Como templado se empleó el ADN genómico de TR3₄, CA4₁₀, CO4₁₂, CDTR5₁₂, CN11₁₂, IA12₄ y IA19₄. El perfil electroforético fue muy similar entre todos los aislamientos analizados. El resultado se muestra en la figura 12.

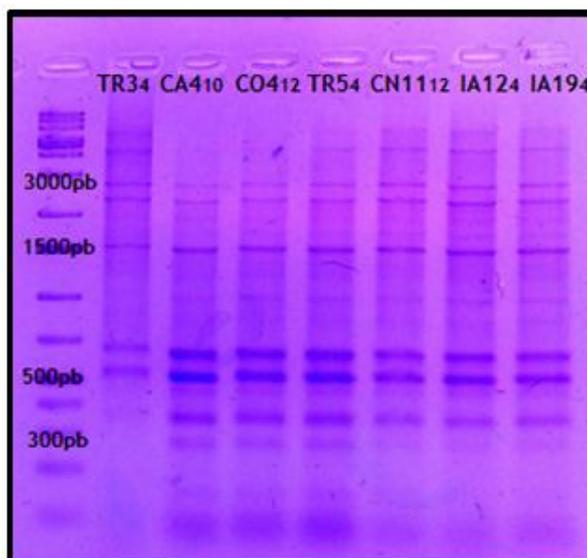


Figura 12 : Patrón de bandas representativo de ERIC-PCR. Electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.

Los perfiles de ERIC-PCR sugieren que podría tratarse de una misma cepa de *Enterobacter* sp., que se encontraría distribuida en toda la isla. Cabría preguntarse entonces si estas enterobacterias son endémicas del lugar y si existe un componente

externo que estaría operando como factor de dispersión. Las distintas especies de aves marinas que habitan esta zona, así como las aves migratorias que llegan durante el verano austral a la isla para reproducirse y alimentarse, podrían jugar un rol importante como factor de diseminación de bacterias. Es sabido que muchas especies de aves son reservorios de parásitos y patógenos (Leotta y col., 2006), y una de las rutas posibles de introducción de bacterias exógenas en la Antártida involucra las aves migratorias (Bonnedahl, 2011). Muchas de las aves de la Antártida tienen extensas rutas de migración y a lo largo de esas rutas pasan por vertederos de basura, ríos y lagos contaminados, así como por campos abonados con desechos de animales. Durante los meses de primavera y en el verano austral, especies de pingüinos, skúas, petreles, otras aves y mamíferos marinos se alimentan en las costas de la península Antártica y establecen sus sitios de cría (Vigo y col., 2011). Estudios previos realizados en la Antártida sobre resistencia antibiótica en bacterias asociadas a fecas de pingüinos, skúas y otras aves marinas arrojan resultados diversos (Saikia y col. 2008, Miller y col. 2009, Vigo y col., 2011).

Vigo y col. (2011) describieron la presencia de *S. enteritidis* (patógeno causante de la salmonelosis en humanos) en fecas de pingüinos Adélie, skúas, gaviotas cocineras, petreles gigantes y focas de *Wedell*. Sin embargo, a diferencia de otras cepas que circulan alrededor del mundo, las cepas de *Salmonella* encontradas en la fauna antártica eran sensibles a antimicrobianos, indicando que esos aislamientos no están expuestos directamente a la presión selectiva por la presencia de antimicrobianos (Vigo y col., 2011).

Otros estudios realizados en pingüinos *gentoo* en la península Antártica, indicaron que la mayoría de los aislamientos pertenecían al género *Edwardsiella* y eran susceptibles a todos los antibióticos ensayados (Bonnedahl y col., 2008). Mientras tanto, en la Isla Torgersen (Islas Anvers, Península Antártica) poblada por una variada fauna, la población microbiana aislada exhibió resistencia a una variada gama de antibióticos (Miller y col., 2009). La mayoría de estos aislamientos pertenecían a los géneros *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas* y *Bacillus*, comúnmente encontrados en ambientes marinos (Miller y col., 2009). Asimismo Saikia y col. (2008) encontraron que un 59% de las bacterias aisladas de fecas de skúas (*Catharacta* sp.) colectadas en las costas de *Queen Maud Land* (Schirmacher Oasis, continente antártico) eran resistentes a más de un antibiótico. Todos los aislamientos eran miembros de la familia Enterobacteriaceae, mayoritariamente representados por *E. coli* (77,5%) seguidos por los géneros *Citrobacter*, *Providencia* y *Klebsiella*. Si bien los miembros de la familia Enterobacteriaceae son notorios colectores de resistencia

antimicrobiana, no siempre la presencia de resistencia antibiótica está directamente relacionada al uso de antibióticos por humanos. La resistencia puede ser intrínseca o endémica de especies particulares de bacterias o seleccionada debido a antibióticos que existen naturalmente en la naturaleza. Podríamos concluir entonces que una misma cepa de *Enterobacter* sp. resistente a antibióticos estaría circulando en el área. Se necesitan estudios más exhaustivos para poder determinar si esta bacteria es endémica en la región o ha sido introducida recientemente por vía antrópica o animal.

Por último, otra explicación posible refiere al método de análisis. Podría ser que la técnica de rep-PCR utilizada no sea suficientemente sensible para discriminar los diferentes aislamientos. En un futuro podrían ensayarse otras técnicas moleculares con mayor poder discriminatorio y complementarias con utilizada en este trabajo.

2.12- Análisis filogenético basado en la secuencia 16S ARNr

Las siete cepas con el mismo perfil de ERIC-PCR fueron analizadas filogenéticamente utilizando sus secuencias 16S ARNr e incorporando en el estudio comparativo las secuencias de los organismos depositados en el Genbank con los que exhibieron mayor similitud y otros seleccionados. Para la construcción del árbol filogenético se emplearon secuencias parciales del gen 16S ARNr de cepas del género *Enterobacter*, seleccionadas a partir de los resultados del BLASTn y la secuencia de *Pantoea agglomerans* NCTC 9381-T (AJ251466), seleccionada a partir de un trabajo comparativo de especies del género *Enterobacter* (Boye y col., 2003).

Se utilizó el método *Neighbour-Joining* (NJ) (Saitou y Nei 1987) y se empleó la secuencia correspondiente de la cianobacteria *Synechococcus* PCC7009 (AF216945) como grupo externo. En la figura 13 se muestra el árbol obtenido a partir de este análisis.

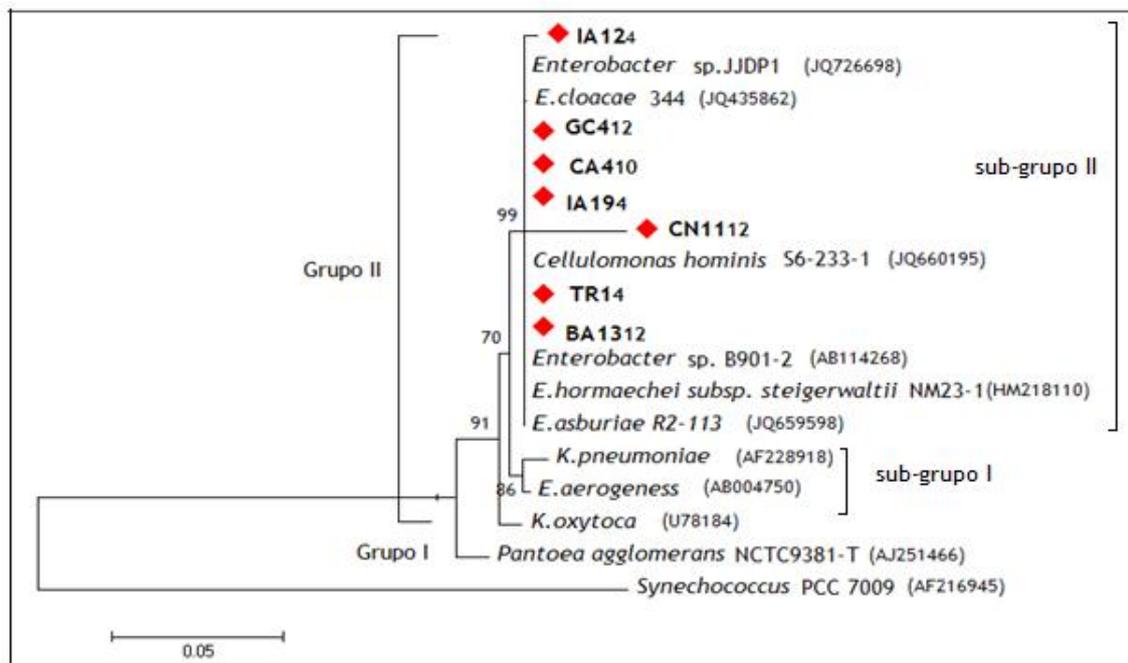


Figura 13: Árbol filogenético construido en base a las secuencias parciales del gen 16S ARNr utilizando el método de *Neighbour-Joining*.

El número en los nodos de las ramas indican el porcentaje de soporte de *bootstrap* para los clados basados en 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). La historia evolutiva fue computarizada utilizando el modelo de corrección de distancia de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980). Solamente se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 50%. Los números entre paréntesis indican los números de acceso al NCBI para cada cepa. El análisis filogenético permitió establecer que todos los aislamientos estudiados y los del banco de datos eran muy similares entre sí, presentando valores de similitud entre un 96% y un 100% con secuencias 16S ARNr de cepas de *Enterobacter* sp.

El árbol filogenético mostró una división en dos grupos principales: el grupo I, el mayor, con un valor de *bootstrap* de 91, que se subdividió a su vez en dos ramas. La menor de éstas incluyó a *K. oxytoca* como único taxón, la cual proviene de un aislamiento de origen clínico y la rama mayor, formada por dos sub-grupos. En el sub-grupo menor (sub-grupo I), con un valor de *bootstrap* de 86, agruparon secuencias de organismos de *E. aerogenes* y *K. pneumoniae*. Como se mencionó, *E. aerogenes* se encuentra filogenéticamente más cercana al género *Klebsiella* que al género

Enterobacter (Grimont & Grimont, 2006). Esta cepa de *E. aerogenes* fue aislada como bacteria simbiote del intestino del áfido *Buchnera* (Harada, 1996), mientras que la de *K. pneumoniae* es origen clínico.

En la rama mayor (*bootstrap* de 99) se agruparon TR1₄, GC4₁₂, CA4₁₀ CN11₁₂, IA12₄, BA13₁₂ e IA19₄. En este sub-grupo se encontraron secuencias de organismos de la especie *E. hormaechei* sub-especie *steigerwaltii*, así como de *E. absuriae*, *E. cloacae*, *C. hominis* y cepas de *Enterobacter* sp., todas de origen ambiental.

Las cepas **344** de *E. cloacae* (JQ435862), **R2-113** de *E. absuriae* (JQ659598), **S6-233-1** de *C. hominis* (JQ660195), así como **JJDP1** (JQ726698) y **B901-2** (AB114268) de *Enterobacter* sp. fueron descritas, en algunos casos como endófitas de plantas de relevancia económica y agrícola y en otros como organismos de importancia por su rol en la preservación del medio ambiente. Por otra parte, **NM23-1** (HM218110) de *E. hormaechei* sub-sp. *steigerwaltii*, fue aislada a partir de productos de la fermentación diaria de bacterias lácticas.

Por último, el grupo II estaba formado por la cepa **NCTC 9381-T** de *P. agglomerans* como único taxón, género previamente conocido como *E. agglomerans*. Cepas de esta especie pueden ser patógenos oportunistas tanto de humanos como de plantas. Sin embargo, también han sido descritas cepas de *E. agglomerans* que producen y excretan proteínas con actividad quitinolítica, que les confieren la capacidad de actuar como antagonista de hongos fitopatógenos (Velusamy y col., 2011).

Si bien los aislamientos identificados en este trabajo integran todos un mismo grupo monofilético, parecería existir cierta diferencia en las secuencias de CN11₁₂ e IA12₄ comparadas con las del resto, siendo la de CN11₁₂ la más significativa. El porcentaje de identidad que mostró CN11₁₂ con las secuencias de cepas del género *Enterobacter* depositadas en la base de datos fue solo 96%, mientras que los otros exhibieron todos identidades de 99%. Podría pensarse entonces que no existe hasta el momento, depositada en la Base de Datos empleada, ninguna secuencia parcial del gen 16S ARNr con la cual CN11₁₂ exhiba una identidad mayor al 96%. El aislamiento CN11₁₂ fue obtenido de una muestra de suelo proveniente de Caleta Norma, mientras que IA12₄ provino de suelos ornitogénicos de la Isla Ardley. En esta Isla se encuentra la llamada “Pingüinera Ardley”, sitio de cría de especies de pingüinos *Pygoscelis* 77Invasión77t, *P. adeliae* y *P. papua*.

Caleta Norma es una zona geográfica de la Isla Rey Jorge que se encuentra alejada de la Base Científica Artigas (BCAA). En este sitio no existe, aparentemente, una fuerte influencia de origen antropogénico, pudiendo considerarla como una

región relativamente prístina. Teniendo en cuenta las características de esta zona, resultaría de interés realizar estudios bioquímicos y/o técnicas moleculares adicionales que permitan una caracterización más detallada de los aislamientos obtenidos a partir de muestras tomadas en este sitio.

Si bien el análisis de secuencia de parte del gen 16S ARNr no permitió una discriminación a nivel de especie, sí podemos afirmar que todos los aislamientos identificados pertenecen al género *Enterobacter* sp. Además, cabe destacar que las cepas con las cuales presentaron alto grado de similitud provienen en su gran mayoría de muestras de origen ambiental. Estos resultados nos permitirían descartar un origen clínico de nuestros clones, hecho que debería confirmarse con pruebas moleculares que permitan caracterizar detalladamente los extremos del integrón, tal como se describe en el trabajo de Stokes y col., 2006. Los resultados obtenidos hasta el momento confirman el hecho de que los integrones de clase 1 pueden ser encontrados en organismos que se desarrollan en diferentes contextos y ambientes. Integrones de este tipo han sido descritos en bacterias patógenas de humanos, animales y plantas. También están presentes en la biota intestinal de animales silvestres y animales de criadero, así como en aislamientos de origen ambiental procedentes tanto de sitios contaminados por fuentes antropogénicas (Tennstedt y col., 2005, Elsaied y col., 2007, Gillings y col., 2008, Koenig y col., 2009, Rodríguez-Minguela y col., 2009) como de hábitats naturales aún considerados prístinos, como el continente antártico (Stokes y col., 2001 y este trabajo).

2.13- Análisis filogenético basado en la secuencia del gen *dfrA14*

Para la construcción del árbol filogenético se emplearon secuencias parciales del gen *dfrA14* de los aislamientos GC₄, CA₄, CDTR₅, CN₁₁, IA1₂ e IA1₉ y de las cepas seleccionadas de la Base de Datos a partir de los mejores *hits* obtenidos del BLASTn (Tabla 8).

Se utilizó el método *Neighbour-Joining (NJ)* (Saitou y col., 1987) y se emplearon las secuencias correspondientes de las cepas H16-244 de *Salmonella* sp. (AB186122) y de *Morganella morganii* (DQ522239).

En la figura III.14 se muestra el árbol obtenido a partir de este análisis. El número en los nodos de las ramas indican el porcentaje de soporte de *bootstrap* para los clados basados en 1000 réplicas (Felsenstein y col., 1985).

La historia evolutiva fue computarizada utilizando el modelo de corrección

de distancia de Kimura 2-parámetros (Kimura M., 1980). Solamente se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 50%. Los números entre paréntesis indican los números de acceso al NCBI para cada cepa. El análisis evolutivo fue realizado con el programa MEGA versión 5.0 (Tamura, 2011).

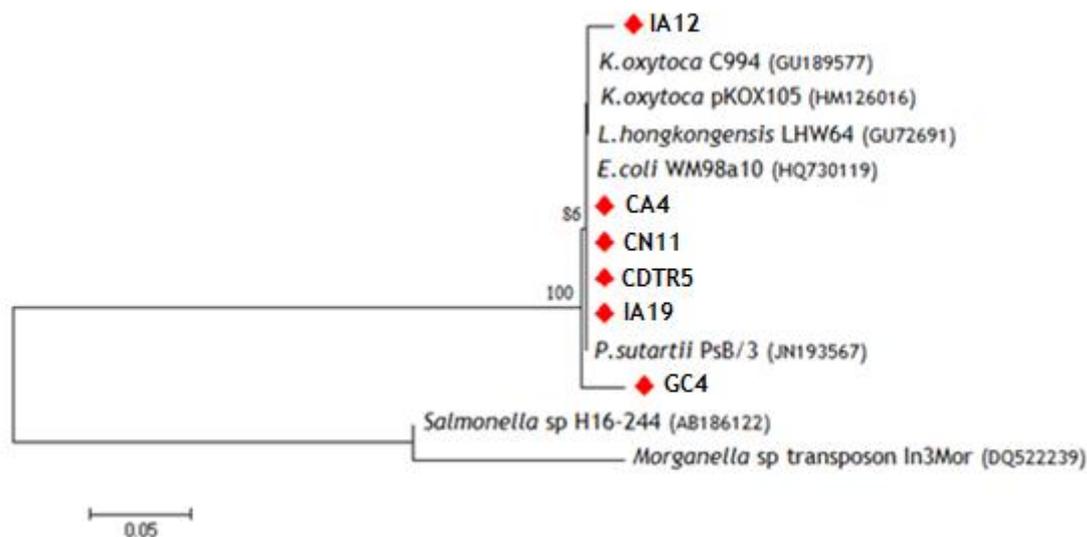


Figura 14: Árbol filogenético construido en base a las secuencias parciales del gen 16S ARNr utilizando el método de *Neighbour-Joining*.

El análisis a nivel de secuencia nucleotídica permitió establecer que el gen *dfrA14* de todos los aislamientos estudiados y los del banco de datos eran muy similares entre sí, presentando valores de similitud entre un 98% y un 100% con secuencias *dfrA14* de cepas de *E. coli*, *L. hongkongensis*, *P. stuartii* y *K. oxytoca* (Tabla III.8).

El análisis filogenético mostró un árbol con dos ramas principales. La rama mayor está integrada por nuestros clones (con excepción de GC4) y las cepas de *E. coli*, *L. hongkongensis*, *P. stuartii* y *Klebsiella oxytoca*.

El gen *dfrA14* de los integrantes de esta rama sería en apariencia, muy similar entre todos, mostrando cierta diferencia la secuencia de IA1₂ que se encuentra levemente más alejada del resto.

Por otra parte, en la rama menor del árbol agrupa solamente GC₄, sugiriendo que existe cierta diferencia con la secuencia correspondiente a los otros aislamientos.

El gen *dfrA14* analizado en este estudio se encuentra generalmente como gen *cassette* asociado a integrones de clase 1 y localizado en plásmidos conjugativos

pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad (Carattoli, 2010, Ruiz, 2011, Feng, 2011) que provienen tanto de cepas patógenas de origen clínico (Carattoli y col., 2010, Ruiz, 2011) y ambiental (Feng, 2011) como de aislamientos procedentes de sedimentos de zonas costeras contaminadas con metales (Fricke, 2008).

3- Integrones clase 2 (*intI2*)

A efectos de investigar la presencia de integrones clase 2, empleando el par de cebadores descritos en la Tabla III.3, se analizaron los aislamientos IA144, TR4a4, TR5a4, TR612, PD712, PD8a12, BC9a12, CDCN1012, CN1112, CA12a12 y TR210. Como control positivo se empleó la cepa K12 (Tet^r) de *E. coli*, conteniendo el plásmido pVC2554 (Cordano y col., 1996).

Todos los aislamientos fueron negativos para la presencia del gen integrasa clase 2 (*intI2*). Este resultado es esperable, dado que integrones de esta clase se encuentran en menor frecuencia que lo evidenciado para integrones de clase 1. Han sido hallados principalmente en aislamientos clínicos (Cordano y col., 1996) así como también en aislamientos provenientes de la flora comensal de ganado vacuno (Barlow y col., 2004).

4- Integrones clase 3 (*intI3*)

Para investigar la presencia de integrones clase 3 se utilizó como templado el ADN genómico de GC212, TR612, PD712, PD8a12, PIN910, BC9a12, CN1112, CA12a12, BA1312, TR110, TR2a10, TR3b10 y TR4a10. El control positivo empleado fue la cepa MB101 (Km^r) de *E. coli* con el plásmido pSMB731 (Arakawa y col., 1995).

Todos los aislamientos resultaron negativos para el gen integrasa clase 3. Los integrones clase 3 son menos frecuentes que los de clase 2, por lo que existen pocos trabajos que reporten la presencia de este tipo de integrones (Arakawa y col., 1995, Xu y col., 2007).

5- Análisis metagenómico de genes integrasa clase 1, 2 y 3, genes *qac* y *sul*

Una vez confirmada la presencia de integrones clase 1 en los aislamientos con fenotipo Trim^r, decidimos realizar un análisis metagenómico de genes integrasa clase 1, 2 y 3, genes *qac* y *sul*. Para ello empleamos el ADN total purificado directamente de las muestras ambientales. En la Tabla IV.15 se detallan las muestras analizadas en cada caso, así como los resultados obtenidos para cada una de ellas. Los controles

positivos que empleamos fueron los mismos utilizados en el análisis de genes integrasa de los aislamientos analizados previamente. Para genes *qac* y *sul*, el control positivo fue el mismo que empleamos para genes integrasa clase 1.

Tabla III.15: Análisis metagenómico para genes integrasa clase 1,2 y 3, genes *qac* y genes *sul*.

Muestras	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	<i>Int3</i>	<i>Int1 Fc + qac</i>	<i>qac</i>	<i>sul</i>
CO4 ₁₂	n/d	-	-	-	-	-
CDTR5 ₁₂	+	-	-	-	-	-
PD7 ₁₂	-		-	n/d		
PD8 ₁₂	-		-	n/d		
BC9 ₁₂	-		-	n/d		
CDCN10 ₁₂	-		-	n/d		
CN11 ₁₂	-	-	-	-		
IA12 ₄	+	-	-	-		
BA13 ₁₂	n/d		-	-	-	-
IA14 ₄	-		-	n/d		
PD16 ₄	-		-	n/d		
IA19 ₄	+	-	-	-	-	-
TR4 ₁₀				-	-	-

Para genes integrasa clase 1 se analizaron las muestras TR5₁₂, PD7₁₂, PD8₁₂, BC9₁₂, CDCN10₁₂, CN11₁₂, IA12₄, IA14₄, PD16₄ y IA19₄, obteniéndose amplicones de igual tamaño al del control positivo en TR5₁₂, IA12₄ e IA19₄. La clonación, construcción de bibliotecas y secuenciación de los amplicones obtenidos deberán analizarse en un futuro trabajo. Para integrasa de clase 2 se empleó como templado el ADN total de las muestras CO4₁₂, TR5₁₂, CN11₁₂, IA12₄ e IA19₄. En todos los casos los resultados fueron negativos.

Se analizó la presencia de genes integrasa de clase 3 en las muestras CO4₁₂, CDTR5₁₂, PD7₁₂, PD8₁₂, BC9₁₂, CDCN10₁₂, CN11₁₂, IA12₄, BA13₁₂, IA14₄, PD16₄, IA19₄. Todas las muestras analizadas fueron negativas para integrones de esta clase, excepto en el caso de TR5₄ y IA12₄, a partir de las cuales se logró amplificar bandas de tamaño similar al control positivo. Este resultado deberá ser verificado en

estudios posteriores.

Con respecto a genes *qac* y *sul*, las muestras analizadas correspondieron a CO412, CDTR512, BA1312, IA194, TR410, quienes también resultaron negativas para la presencia de estos genes.

El resultado negativo obtenido para el análisis metagenómico podría deberse a diferentes razones. Una posibilidad es la no existencia o baja abundancia de genes integrasa en este ambiente. Otra razón es la presencia de sustancias inhibidoras en las muestras ambientales, como los ácidos húmicos y sales minerales del suelo, que podrían haber afectado la calidad del ADN ambiental que se empleó como templado. De esta forma, los ensayos de PCR podrían arrojar falsos negativos, por lo que este hecho deberá considerarse para la realización de futuros ensayos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

- Los aislamientos TR4_{H1}, TR5_{H1} y TR6_{H1} serían organismos psicrotolerantes pertenecientes al género *Pseudomonas* sp., capaces de crecer a 5°C utilizando gasoil como única fuente de carbono y energía.
- La secuencia aminoacídica deducida de la sub-unidad alfa de parte del gen *ndo* de TR5_{H1} mostró alta similitud (99%) con genes *ndo* descritos en miembros del género *Pseudomonas* sp. y *Rahnella* sp., asociados a elementos móviles como NAH7 e IncP-9.
- Considerando que estos aislamientos pueden crecer tanto a 5°C como a 22°C y portan al menos parte del gen *ndo* responsable de la metabolización del naftaleno, podrían ser potencialmente útiles para el diseño de técnicas de biorremediación en zonas climáticas templadas y también en ambientes de climas extremos como el continente antártico.
- A partir de muestras de sedimento-suelo, matas microbianas y agua de deshielo de glaciar, se obtuvo una colección de organismos psicrotolerantes resistentes a distintos antimicrobianos.
- Los aislamientos que exhibieron altos niveles de resistencia al grupo de los aminoglucósidos (kanamicina y estreptomycin) y β-lactámicos (ampicilina), pertenecen a los géneros *Psychrobacter*, *Bacillus* y *Stenotrophomonas*.
- Se identificaron integrones clase 1 en aislamientos asociados a un fenotipo Trim^r. Todos ellos presentaron el gen integrasa *inti1* localizado en un plásmido con una organización genética similar a la encontrada en cepas de origen clínico.
- Próximo al sitio *attI* del integrón, se encontró asociado el gen *cassette dfrA14*, altamente conservado. Contiguo a *dfrA14* se encontró un ORF que codificaría para una proteína hipotética de función desconocida.
- El análisis filogenético de *dfrA14* no mostró diferencias evolutivas para este gen entre los aislamientos analizados.
- La mayoría de los integrones identificados en este trabajo carecerían de los genes de resistencia a compuestos derivados del amonio cuaternario (*qacEΔ1*) y sulfonamidas (*sul-1*), diferenciándose de integrones clase 1 de origen clínico.
- El análisis del gen 16s ARNr indicó que todos ellos pertenecen al género *Enterobacter*, con alta identidad con cepas de especies de *E. hormaechei*, *E. cloacae*, *E. absuriae* y *E. ludwigii*, siendo en su mayoría bacterias de origen

ambiental.

- El análisis de tipificación bacteriana (rep-PCR) mostró un único perfil ERIC para todos los aislamientos positivos para el gen integrasa *intI1*, sugiriendo que podría tratarse de un mismo organismo distribuido en la isla. Las especies de aves presentes en esta zona podrían estar desempeñando un rol como factor de dispersión de estos organismos.
- El perfil de crecimiento mostró que estas enterobacterias pueden crecer bien a 5°C y 25°C y no crecen a 37°C, a diferencia del resto de las enterobacterias.
- Los determinantes de resistencia a trimetoprim y ampicilina pudieron ser transferidos y expresados en células de *E. coli* JM109, indicando que se trataría de plásmidos de tipo conjugativo, cuyos determinantes de resistencia se expresan tanto a 5°C como a 37°C.
- El presente trabajo constituye el primer estudio en el ecosistema antártico donde se describe la presencia de genes integrasa de clase 1 (*intI1*) localizados en plásmidos con la capacidad de transferir el fenotipo antibiótico resistente.
- No resultó posible amplificar genes integrasa de clase 2 y clase 3 tanto en organismos cultivables como al emplear el ADN total ambiental.

CONCLUSIÓN GENERAL: Se evidenció la presencia de integrones asociados a determinantes de resistencia a antibióticos y localizados en plásmidos conjugativos en enterobacterias psicrotolerantes aisladas de suelos antárticos.

PERSPECTIVAS

Este trabajo deberá continuar con el estudio del perfil de consumo de gasoil, identificando las fracciones consumidas por cada aislamiento microbiano y el total de la comunidad.

Tomando en cuenta datos de la bibliografía resultaría de interés determinar el contexto genético en el cual se ubican los genes *ndo* identificados en este trabajo, así como también la posible presencia de genes *alk* en estos aislamientos.

Para la caracterización completa del plásmido que alberga los integrones identificados en esta tesis y describir de forma más completa estos elementos genéticos, se propone:

- 1) Determinar la presencia de otros genes *cassettes* asociados al integrón.
- 2) Establecer si la ausencia del extremo 3'CS es debida a la presencia de secuencias de inserción que dan lugar a genes no funcionales.
- 3) Identificar elementos móviles que podrían resultar de interés para establecer el posible origen y evolución de estas estructuras genéticas.
- 4) Identificar el grupo de incompatibilidad al cual pertenecen los plásmidos, para realizar un análisis comparativo con vectores derivados de organismos patógenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrian P.V., Klugman K.P., Amyes G.B. (1995). Prevalence of trimethoprim resistant dihydrofolate reductase genes identified with oligonucleotide probes in plasmids from isolates of commensal faecal flora. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 35: 497-508.

Aislabie J., Balks M., Astori N., Stevenson G., Symons R. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbons in fuel-oil contaminated soils, Antarctica. *Chemosphere* 39(13): 2201-2207.

Aislabie J., Fraser R., Duncan S., Farrell R.L. (2001). Effects of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross dependency, Antarctica. *Polar Biology* 24: 308-313.

Aislabie J., Balks J.M., Foght J.M., Waterhouse E.J., (2004). Hydrocarbon spills on Antarctic soil: effect and management. *Environmental Science Technology* 38: 1265-1274.

Aislabie J., Saul D.J., Foght J.M. (2006) Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles* 10: 171-179.

Alexander M. (1999). Biodegradation and Bioremediation. Environmental effects. In: Alexander M. (ed). *Academic Press, San Diego* 13: 226-247.

Alexander M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science Technology* 34 : 4259-4265.

Allen H.K., Donato J., Huimi Wang H., Cloud-Hansen K.A., Davies J., Handelsman J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews*. 8: 251-259.

Aminov R.I (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in

- nature. Minireview. *Environmental Microbiology* 11 (12): 2970-2988.
- Arakawa Y. Murakami M., Suzuki K. Ito H., Wacharotayankun R., Ohsuka S., Kato N., Ohta M. (1995). A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gen *bla*_{IMP}. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(7): 1612-1615.
- Atlas R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial Review* 45: 180-209.
- Atlas R.M. (1991). Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 52(2): 149-156.
- Atlas R.M, Cerniglia C.E. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *BioScience* 45: 332-338.
- Atlas R.M., Bartha R. (2008). *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4ta. Edición. PEARSON Addison Wesley. Madrid.*
- Bakermans C., Madsen E.L (2002). Diversity of 16S rDNA and naphthalene dioxygenase genes from coal-tar-waste contaminated aquifer waters. *Microbial Ecology* 44: 95-106.
- Baquero F., Blázquez J. (1997). Evolution of antibiotic resistance. *Trends in Ecology and Evolution* 12 (12): 482-486.
- Baquero F., Álvarez-Ortega C., Martínez J.L. (2009). Ecology and evolution of antibiotic resistance. *Environmental Microbiology Reports. Minireview.* 1(16): 469-476.
- Barlow R.S., Pemberton J.M., Desmarchelier P.M., Gobius K.S. (2004). Isolation and characterization of integron-containing bacteria without

antibiotic selection. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 48 (3): 838-842.

Bartoloni A., Pallecchi L., Rodríguez H., Fernández C., Mantella A., Bartalesi F., Strohmeyer M., Kristiansson C., Gotuzzo E., Paradisi F., Rossolini G.M. (2009). **Antibiotic resistance in a very remote Amazonas community.** *International Journal of antimicrobial agents* 33(2): 125-129.

Betteridge T., Partridge S., Iredell J.R., Stokes H.W. (2011). **Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit.** *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 55(8): 3939-3943.

Bonnedahl J., Olsen B., Waldenström J., Broman T., Jalava J., Houvinen P., Österblad M. (2008). **Antibiotic susceptibility of faecal bacteria in Antarctic penguins.** *Polar Biology* 31: 759-763.

Bonnedahl J. (2011). **Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae isolated from wild birds.** *Doctoral Thesis. Faculty of Medicine, Uppsala University. Sweden.*

Bölter M. (2011). **Soil development and soil biology on King George Island, Maritime Antarctic.** *Polish Polar Research* 32 (2): 105-116.

Boucher Y., Labbate M., Koenig J.E., Stokes H.W. (2007). **Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria.** *Trends in Microbiology* 15: 301-309.

Bowman J.P., McCammon S., Brown M.V., Nichols D.S., McMeekin T.A. (1997). **Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice.** *Applied and Environmental Microbiology* 63(8): 3068-3078.

Boye K., Hansen D.S (2003). Sequencing of 16S rRNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other Enterobacteriaceae. *IJMM* 292 (7-8): 495-503.

Camacho A., Fernández-Valiente E. (2005). Un mundo dominado por los microorganismos: Ecología microbiana de los Lagos antárticos. *Ecosistemas* 14(2): 66-78.

Cambray G., Guerout A.M., Mazel D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics* 44: 141-166.

Campbell I.B., Claridge G.C., Campbell D.I, Balks M.R (1998). The soil environment. In: *Prsicu JC (Ed). Ecosystem processes in a Polar Desert: The Mc Murdo Dry Valleys, Antartctica. Antarctic Research Series 72. American Geophysical Union. Washington D.C.: 97-322.*

Campbell I.B., Claridge G.C., Campbell D.I (2009). Antarctic permafrost soils. *R.Margesin (ed.) Permafrost soil* 16 (2): 17-31. DOI: 1007/978-3-540-69371-0. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Callejas C., Gill P.R., Catalán A.I., Azziz G., Castro-Sowinski S., Batista S. (2011). Phylotype diversity in a benthic cyanobacterial mat community on King George Island, maritime Antarctica. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(6): 1507-1512. DOI 10.1007/s11274-010-0578-1.

Carattoli A., Aschbacher R., March A., Larcher C., Livermore D.M., Woodford N. (2010). Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA. *Journal Antimicrobial and Chemotherapy* 65 (10): 2070-2075.

Casellas M., Fernández P., Bayona J.M., Solanas A.M. (1995). Bioassay-

directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). *Chemosphere* 30: 725-740.

Cerniglia C.E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 4 (3): 331-338.

Chen C. Wu K., Chang Y., Chang C., Tsai H., Liao T., Liu Y., Shen A., Li J., Su T., Shao C., Lee C., Hor L., Tsai S. (2003). Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Res.* 13 (12): 2577-2587.

Collis C.M., Hall R.M (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Molecular Microbiology* 6: 2875-2885.

Collis C.M., Grammaticopoulos G., Briton J., Stokes H.W., Hall R.M. (1993). Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol. Microbiology* 9: 41-52.

Collis C.M., Hall R.M. (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(1): 155-162.

Convey P. (2006). Antarctic terrestrial ecosystems: Responses to environmental change. *Polarforschung* 75 (2): 101-111.

Cordano A.M., Virgilio R. (1996). Evolution of drug resistance in *Salmonella* 92nvasi isolates in Chile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40(2): 336-341.

Cripps G.C, Priddle J. (1991). Review: hydrocarbons in the Antarctic marine environment. *Antarctic Science* 3: 233-250.

Cripps G.C., Shears J. (1997). The fate in the marine environment of a minor diesel fuel spill from an Antarctic research station. *Environmental Monitoring and Assessment* 46(3): 221-232.

Curtosi A., Pelletier E., Vodopivec C.L., Mac Cormack W. P. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and surface marine sediment near Jubany Station (Antarctica). Role of permafrost as a low-permeability barrier. *Science of the Total Environment* 383: 193-204.

Curtosi A., Mac Cormack W., (2009). Distribution of PAHs in the water column, sediments and biota of Potter Cove South Shetland Islands Antarctica. *Antarctic Science* 21(4): 329-339.

Davies J. (1994). Inactivation of antibiotic resistance. *Science* 264:375-382.

Davies J. (2009). Darwin and microbiomes. *EMBO Reports*.10(8): 805.

Davies J., Davies D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology Molecular Biology Review* 74(3): 417-433.

D'Costa V., Mc Grann K., Hughes D.W., Wright G. (2006). Sampling the antibiotic resistoma. *Science* 311: 374-377.

D'Costa V.M., King C.E., Kajan L., Morar M., Sung W.W., Scharz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R. Golding G.B., Poinar H.N., Wright G.D. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477(7365): 457-61.

Delille, D. (2000). Response of Antarctic soil bacterial assemblages to contamination by diesel fuel and crude oil. *Microbial Ecology* 40: 159-168.

Delille, D. Pelletier, E. (2002) Natural attenuation of diesel-oil contamination in a subantarctic soil (Crozet Island). *Polar Biology* 25: 682-687.

Delille, D. Delille, B. Pelletier, E. (2002). Effectiveness of bioremediation of crude oil contaminated sub-Antarctic intertidal sediment: the microbial response. *Microbial Ecology* 44: 118-126.

Delille D., Coulon F. (2008). Comparative mesocosm study of biostimulation efficiency in two different oil-amended sub-Antarctic soils. *Microbial Ecology* 56: 243-252.

Di Conza J.A, Gutkind G.O (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 63-78.

Eikmeyer F., Hadjati A., Szczepanowski R., Wibberg D., Schenker-Bekel S., Roger L.M., Brown C.J., Top E.M., Pühler A., Schlüter A. (2012). The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. *Plasmid* 68(1): 13-24.

Elliot D.H (1985). Geological evolution. In: *Key Environments, Antarctica*. Ed. Bonner W.N, Walton W.H, Pergamon Press, Oxford 39-61.

Elsaied H., Stokes H.W., Nakamura T., Kitamura K., Fuse H., Maruyama A. (2007). Novel and diverse integron integrase genes and integron-like gene cassettes are prevalent in deep-sea hydrothermal vents. *Environmental Microbiology* 9(9): 2298-2312.

Eriksson M., Wartling A., Dalhammar G., (1998). Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid-phase micro-extraction and GC-MS. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 (1): 129-134.

Felsenstein J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist*. Volume 125 (1): 1-15.

Feng, J.L., Yan, H., Chowdhury, N., Neogi, S.B., Yamasaki, S., Shi, L., Hu, J. and Chen, Q. (2011). Identification and characterization of integron-associated antibiotic resistant *Laribacter hongkongensis* isolated from aquatic products in China. *International Journal Food Microbiology* 144 (3): 337-341 (2011)

Fernández P., Grifoll M., Solanas A.M., Bayona J.M., Albaigés J. (1992). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environmental Science Technology* 26: 817-829.

Fevre C., Jbel M., Passet V., Weill F-X., Grimont P. Brisse S. (2005). Six groups of the OXY β -lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(8): 3453-3462.

Fleming, M.P., Datta, N., Gruneberg, R.N. (1972). Trimethoprim resistance determined by R factors. *British Medical Journal* 1: 726-728.

Flocco C.G., Gómez N., Mac Cormack W., Smalla K. (2009). Occurrence and diversity of naphthalene dioxygenase genes in soil microbial communities from the maritime Antarctic. *Environmental Microbiology* 11(3): 700-714.

Fluit A.C, Schmitz F.J. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology Infections* 10: 272-288.

Franciscon E., Zille A., Fantinatti-Garboggini F., Serrano Silva I., Cavaco-Paulo A., Durrant L. (2009). Microaerophilic-aerobic sequential decolourization/biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Klebsiella* sp. Strain VN-31. *Process biochemistry* 44: 446-462.

Fricke W.F. Wright M.S., Lindell A.H., Harkins D.M., Baker-Austin C, Ravel J., Stepanauskas R. (2008). Insights into the environmental resistance gene pool from the genome sequence of the multidrug-resistant environmental

isolate *Escherichia coli* SMS-3-5. *Journal of Bacteriology* 190(20): 6779-6794.

Frost L., Leplae R., Summers A.O., Toussaint (2005). **Mobile genetic elements: The agents of open source evolution.** *Nature* 3: 723-732.

García-Echauri S.A., Gidekel M., Gutiérrez-Moraga A., Santos L., De León-Rodríguez A. (2011). Isolation and phylogenetic classification of culturable psychrophilic prokaryotes from the Collins glacier in the Antarctica. *Folia Microbiology* 56: 209-214.

Gilbert J.A., Philip J.H., Dodd C., Laybourn-Parry J. (2004). Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology* 150: 151-180.

Gilichinsky D., Vishnivetskaya T., Petrova M., Spirina E., Mamykin V., Rivkina E. (2008). **Bacteria in Permafrost Chapter 6 : 83-102.** *R. Margesin et al. (eds). Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology. Springer- Verlag Berlin Heidelberg.*

Gillings M., Holley M. (1997). **Repetitive elements PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacteria repetitive intergenic consensus (ERIC) is not necessarily directed at ERIC elements.** *Letters in Applied Microbiology* 25 (1): 17-21.

Gillings M., Boucher Y., Labbate M., Holmes A. Krishnan S. (2008a). The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology* 190:5095-100.

Gillings M.R., Xuejun d., Hardwick S., Holley M.P, Stokes H.W. (2008b). **Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons?.** *The ISME Journal* 1-7.

Doi:10.1038/ismej.2008.98.

Gootz T.D., Lescoe M.K., Dib-Hajj F., Dougherty B.A., He W., Della-Latta P., Huard R.C. (2009). Genetic organization of transposase regions surrounding *blaKPC* carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy* 53 (5): 1998-2004.

Griffiths R.I., Whiteley A.S., O'Donnell A.G., Bailey M.J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. *Applied Environmental Microbiology* 66 (12): 5488-5491.

Grimont F., Grimont P. (2006). The Genus *Enterobacter*. *Prokaryotes* 6: 197-214.

Haerberli W., Hallet B., Arenson L., Elconin R., Humhum O., Käab A., Kaufmann V., Ladanyi B., Matsuoka N., Sprigman S., Mühl D. (2006). Permafrost creep and rock Glacier dynamics. *Permafrost and Periglacial Processes* 17: 189-214.

Hall R.M, Collis C.M. (1995). Mobile gene cassette and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *MicroReview. Molecular Microbiology* 15(4): 593-600.

Hall R.M (1997). Mobile gene cassette and integrons: moving antibiotic resistance genes in Gram-negative bacteria. *Ciba Found. Symposium* 207: 192-202.

Hall R.M., Collis C.M (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistant Updates* 1:109-119.

Harada H., Oyaizu H., Ishikawa H. (1996). A consideration about the origin of aphid intracellular symbiont in connection with gut bacterial flora. *Journal Genetic Applied Microbiology* 42: 17-26.

Harvey R. (1991) Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity. In *Cambridge Monographs on Cancer Research*. Coombs, M.M., Ashby, J., Hicks, M., and Baxter, H. (eds). Cambridge, UK: Cambridge University Press : 1-96.

Harvey A.N. (2011). Toxicity of petroleum hydrocarbons in polar soils. *Tesis de doctorado*. University of Saskatchewan.

Hecht D., Tran J., Fogel G.B. (2011). Structural-based analysis of dihydrofolate reductase evolution. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 61: 212-230.

Hernández J., Stedt J., Bonnedahl J., Molin Yiva, Drobni M., Calisto-Ulloa N., Gómez-Fuentes C., Astorga-España M.S., González-Acuña D., Waldenström J., Blomqvist M., Olsen B. (2012). Human-associated extenden-spectrum β -lactamase in the Antarctic. *Applied and Environmental Microbiology* 78(6): 2056-2058.

Hoffman H. (2005). *Enterobacter hormaechei* subsp. *Oharae* subsp. Nov., *E. hormaechei* subsp. *Hormaechei* comb. Nov., and *E. hormaechei* subsp. *Steigerwaltii* subsp. Nov., three new subspecies of clinical importance. *Journal of Clinical Microbiology* 43(7): 3297-3303.

Holmes A.J, Gillings M.R, Nield B.S, Mabbutt B.C, Nevalainen K.M, Stokes HW (2003). The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environmental Microbiology* 5: 383-94.

Houvinen, P., Sundström, L., Swedberg, G., Sköld, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 39 (2): 279-289.

Houvinen, P. (2001). Resistance of trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical infectious diseases* 32: 1608-1614.

Hulton C., Higgins C., Sharp P. (1991). Eric sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Echerichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology* 5: 825-834.

Kamali-Moghaddam M., Sundström L. (2001). Arrayed transposase-binding sequences on the ends of transposon Tn5090/Tn402. *Nucleic Acids Research* 29(4): 1005-1011.

Kauppi B., Lee K., Carredano E. Parales R.E., Gibson D.T, Eklund H. y Ramaswamy S. (1998). Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxigenase-naphthalene 1,2-dioxigenase. *Structure* 6: 571-586.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

Koenig J.E., Sharp Ch., Dlutek M., Curtis B., Joss M., Boucher Y., Doolittle W.F (2009). Integron gene cassette and degradation of compounds associated with industrial waste: the case of the Sydney Tar Ponds. *PlosOne* 4(4): e5276.

Kobori H., Sullivan C.W., Shizuya H. (1984). Bacterial plasmids in Antarctic Natural Microbial Assemblages. *Applied and Environmental Microbiology* 48(3): 515-518.

Lanfranconi M., Álvarez H.M, Studdert C.A. (2003). A strain isolated from gasoil contaminated soil display chemotaxis toward gas oil and hexadecane. *Environmental Microbiology* 5(10): 1002-1008.

Leahy J., Colwell R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the

environment. *Microbiological Review* 54(3): 305-315.

Leotta G.A., Chinen I., Vigo G.B., Pecoraro M., Rivas M. (2006). **Outbreaks of avian cholera in Hope Bay, Antarctica.** *Journal of Wildlife Diseases* 42(2): 259-270.

Levésque C., Piché L., Larose Ch., Roy P.H (1995). **PCR Mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes.** *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 39(1): 185-191.

Levy S.B (1997). **Antibiotic resistance: an ecological imbalance.** *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread.* Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 207: 1-14.

Li, X.Z., Nikaido H. (2004). **Efflux-mediated drug resistance in bacteria.** *Drugs* 64 (2): 159-204.

Liebert C., Hall R.M., Summers A.O. (1999). **Transposon Tn21, flagship of the floating genome.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(3): 507-522.

Lim L.W., Okouchi Y., Takeuchi T. (2008). **On-line preconcentration of trace carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in microcolumn liquid chromatography via large volume injection.** *Talanta* 72(5): 1600-1608.

Ma Y., Wang L., Shao Z. (2006). ***Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer.** *Environmental Microbiology* 8(3): 455-465.

Margesin R., Schinner F., (1997). **Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine**

soils. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2660-2664.

Margesin R., Schinner F. (1997b). **Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures.** *Applied Microbial Biotechnology* 47: 462-468.

Margesin R., Schinner F. (2001a). **Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area.** *Applied and Environmental Microbiology* 67: 127-3133.

Margesin R., Schinner F. (2001b) **Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments.***Applied and Environmental Microbiology* 56: 650-663.

Márquez C., Labbate M., Raymondo C. Fernández J., Gestal A.M. Holley M., Borthagaray G., Stokes W. **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(10): 3417-3425.

Martins C.C., Bicego M.C., Taniguchi S., Montone R.C. (2004). **Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica.** *Antarctic Science* 16 (2): 117-122.

Master E. & Mohn W. (1998). **Psychrotolerant bacteria isolated from Arctic soil that degrade polychlorinated biphenils at low temperatures.** *Applied and Environmental Microbiology* 64(12): 4823-4829.

Mazzera D., Hayes T., Lowenthal D, Zielinska B. (1999). **Quantification of polycyclic hydrocarbons in soil at McMurdo Station, Antarctica.** *The Science of the Total Environment* 229: 65-71.

Mazel, D. Dychinco, B. Webb, V.A. Davies, J. (1998). **A distinctive class of**

integron in the *Vibrio 102nvasi* genome. *Science* 280: 605-608.

Mazel D., Dychincho B., Webb V., Davies J. (2000). Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene.

Mazel D. (2006). Integrons: Agent of bacterial evolution. *Nature* 4: 608-620.

Miller R.V., Gammon K., Day M.J. (2009). Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin faecal samples collected near Palmer Station, Antarctica. *Canadian Journal of Microbiology* 55:37-45.

Minamisawa K., Nishioka K., Miyahi T., Ye B., Miyamoto T., You M., Saito A., Saito M., Barraquio W.L., Teaumroong N., Sein T., Sato T. (2004). Anaerobic nitrogen-fixing consortia consisting of clostridia isolated from gramineous plants. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5): 3096-3102.

Mohn W., Radziminski C., Fortin M.C., Reimer K. (2001). On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Applied and Microbial Biotechnology* 57: 242-247.

Moutaouakkil A, Zeroual Y, Dzayri FZ, Talbi M, Lee K, Blaghen M. (2004). Decolorization of azo dyes with *Enterobacter agglomerans* immobilized in different supports by using fluidized bed bioreactor. *Current Microbiology* 48(2): 124-9.

Nelson E.B (1988). Biological control of Pythium seed rot and preemergence damping-off of cotton with *Enterobacter cloacae* and *Erwinia herbicola* applied as seed treatments. *Plant Diseases* 72: 140-142.

Nemergut D.R., Martin A.P., Schmidts S.K. (2004). Integron diversity in heavy-metal-contaminated mine tailings and inference about integron evolution. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1160-1168.

Nemergut D., Robeson M.S., Kysela R.F., Martin A.P., Schmidt S.K., Knight R. (2008). Insights and inferences about integron evolution from genomic data. *BMC Genomics* 9(261): 1-12.

Neu H.C (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257 : 1064-1073.

Nikaido H. (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 78 (2): 119-146.

Niepceron M., Portet-Koltalo F., Merlin Ch., Motelay-Massei A., Barray S., Bodilis J.(2009). Both *Cycloclasticus* spp. And *Pseudomonas* spp. As PAH-degrading bacteria in the Seine estuary (France). *FEMS Microbiology Ecology* 71 (1): 137-147.

Norman A., Hansen L., Sorensen S. (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transaction of the Royal Society* 364: 2275-2289.

Jove T., Da Re S., Denis F., Mazel D., Ploy M.C. (2010). Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genetic* 6(1): e1000793.doi:10.1371/journal.pgen.1000793.

Ojo K.K. (2002). Identification of a complete *dfrA14* gene cassette integrate at a secondary site in a resistance plasmid fo uropathogenic *Escherichia coli* from Nigeria. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 46(6): 2054-2055.

Pan J.C., Ye R., Wang H., Xiang H., Zhang W., Yu X., Meng D., He Z. (2008). *Vibrio cholera* O139 multiple-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy* 52(11): 3829-3836.

Parkhill J., Dougan G., James K.D., Thomson N.R., Pickard D., Wain, J., Churcher C., Mungall K.L., Bentley S.D., Holden M.T.G., Sebaihia M., Baker S., Basham D., Brooks K., Chillingworth T., Connor P., Cronin A., Davis P., Davies R.M., Dowd L., White N., Farrar J., Feltwell T., Hamlin N., Haque A., Hien T.T., Holroyd S., Jagels K., Krogh A., Larsen T.S., Leather S., Moule S., O'Gaora P., Parry C., Quail M., Rutherford K., Simmonds M., Skelton J., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G. (2001). **Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella 104nvasió* serovar *Typhi CT18***. *Nature* 413 (6858): 848-852.

Partridge S.R., Recchia G.D., Scaramuzzi C., Collis C.M., Stokes H.W., Hall R.M. (2001). **Definition of the *attI1* site of class 1 integrons**. *Microbiology* 146: 2855-2864.

Partridge S.R., Tsafnat G., Coiera E., Iredell J., Hall R. (2009). **Gene cassette and cassette arrays in mobile resistance integrons**. *FEMS Microbiology Review* 33: 757-784.

Peck L., Convey P., Barnes D. (2006). **Environmental constraints on life histories in Antarctic ecosystems: tempos, timings and predicatibility**. *Biological Reviews* 81(1): 75-109.

Pelletier E., Delille D., Delille B. (2004). **Crude oil bioremediation in sub-Antarctic intertidal sediments: chemistry and toxicity of oiled residues**. *Marine Environmental Research*. 57: 311-327.

Ploy M.C., Courvalin P., Lambert T. (1998). **Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688, a class 1 integron with two new gene cassettes, *cmlA2* and *qacF***. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 42(10): 2557-2563.

Radström P., Skold O., Swedberg G., Flensburg J., Roy P.H., Sundström L. (1994). **Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related**

to Tn7, Mu and the retro-elements. *Journal of Bacteriology* 176: 3257-3268.

Ramos M. (2007). Modelización y seguimiento térmico de la capa activa y del permafrost en las islas Livingston y Decepción, Antártida. *PERMAMODEL (ANTPAS Y TSP-IPA)*. POL2006-01918.

Ray M.K., Sheshu Kumar G., Shivaji S. (1991). Plasmids from the soil bacteria of Schirmacher Oasis, Antarctica. *Microbios* 67(272-273): 151-157.

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

Recchia G.D. & Sherratt D.J. (2002). In *Mobile DNA II* (eds. Craig N.L., Gellert M. & Lambowitz A.M) : 162-176 (ASM Press, Washington DC).

Roberts D.P., Dery P.D., Yucel I., Buyer J., Holtman M.A., Kobayashi D.Y. (1999). Role of *pfkA* and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology* 65(6): 2513-2519.

Rodríguez-Minguela C.M., Apajalahti J., Chai B., Cole J.R., Tiedje J.M. (2009). Worldwide prevalence of class 2 integrase outside the clinical setting is associated with human impact. *Applied and Environmental Microbiology* 75(15): 5100-5110.

Rowe-Magnus D.A., Mazel D. (2002). The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 115-125.

Ruberto L., Vázquez S., Mac Cormack W. (2003). Effectiveness of the natural bacteria flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of the hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 52(2): 115-125.

Ruberto L., Vázquez S., Mac Cormack W. (2008). **Bacteriology of extreme cold soils exposed to hydrocarbon pollution.** *Microbiology of extreme soils* 13(3): 247-274.

Ruiz E., Rezusta A., Sáenz Y., Rocha-Gracia R., Vinué L., Vindel A. (2011). **New genetic environments of aac(6')-Ib-cr gene in a multiresistant *Klebsiella oxytoca* strain causing an outbreak in a pediatric intensive care unit.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 69: 236-238.

Saikia S., Saikia D., Ramteke P.W. (2008). **Use of microbes from seabird faeces to evaluate heavy metal contamination in Antarctic region.** *Applied Ecology and Environmental Research* 6(3): 21-31.

Saitou N., Nei M. (1987). **The neighbour-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees.** *Molecular Biology Evolution* 4: 406-425.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.*

Seputiene V., Povilonis J., Ruzauskas M., Pavilonis A., Suziedeliene E. (2010). **Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania.** *Journal of Medical Microbiology* 59: 315-322.

Serrano E. (2001). **Espacios protegidos y política territorial en las Islas Shetland del Sur (Antártida).** *A G E* 31: 5-21.

Shivaji S., Reddy G., Suresh K., Gupta P., Chintalapati S., Schurmann P., Stackebrandt E., Matsumoto G. (2005). ***Psychrobacter vallis* sp. Nov., from Antarctica.** *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology 55: 757-762.

Shuttleworth K.L., Cerniglia C.E. (1995). Environmental aspects of PAH biodegradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 54: 291-302.

Sköld O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary Research* 32: 261-273.

Sjolund M., Bonnedahl J., Hernández J., Bengtsson S., Cederbrant G., Pinhassi J., Kahlmeter G., Olsen B. 2008 Dissemination of multidrug-resistant bacteria into the Arctic. *Emerging Infectious Diseases*. 14(1): 70-72.

Snape I., Harvey P., Ferguson S., Rayner J.L. Revill A.(2005). Investigation of evaporation and biodegradation of fuel spills in Antarctica - I. A chemical approach using GC-FID. *Chemosphere* 61: 1485-1494.

Snape I., Reynolds C., Walworth J., Ferguson S. (2008a). Treatability studies: microcosms, mesocosms and field trials. In D. M. Filler et al. (eds.) *Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Cold Regions*. Cambridge University Press, Cambridge UK. : 125-153.

Sota M., Yano H., Ono A., Miyazaki R., Ishii H., Genka H., Top E., Tsuda M. (2006). Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. *Journal of Bacteriology*. 188 (11): 4057-4067.

Stal L. (1995). Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytology* 131: 1-32.

Stokes, H.W, Hall R.M. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons.

Molecular Microbiology 3: 1669-1683.

Stokes H.W., O’Gorman D.B., Recchia G.D., Parsekhian M., Hall R.M. (1997). **Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes.** *Molecular Microbiology* 26: 731-745.

Stokes H.W., Holmes A.J., Nield B., Holley M.P., Nevalainen H. Mabbutt B.C., Gillings M. (2001). **Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA.** *Applied and Environmental Microbiology* 67(11): 5240-5246.

Stokes H.W., Nesbo C.L., Holley M., Bahl M., Gillings M.R, Boucher Y. (2006). **Class 1 Integrons potentially predating the association with Tn402-Like transposition genes are present in a sediment microbial community.** *Journal of Bacteriology*. 188(16): 5722-5730.

Strauss E.C., Kobori J.A., Siu G., Hood L.E. (1986). **Specific-primer direct DNA sequencing.** *Analytica Biochemistry* 154: 353-360.

Sunde M. (2005). **Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 1019-1024.

Sundström L., Roy P.H., Sköld O. (1991). **Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7.** *Journal of Bacteriology*. 173: 3025-3028.

Sundström L., Jansson C., Bremer K., Heikkila E., Olsson-Liljequist B., Sköld O. (1995). **A new *dhfrVIII* trimethoprim-resistance gene, flanked by IS26, whose product is remote from other dihydrofolate reductases in parsimony analysis.** *Gene* 154: 7-14.

Svensson-Stadler L.A, Mihaylova S.A, Moore E.R. (2012). *Stenotrophomonas* interspecies differentiation and identification by *gyrB* sequence analysis.

FEMS Microbiology 327(1): 15-24.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G. Nei M., Kumar S. (2011) **MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** *Molecular Biology and Evolution*.

Tashireva G.O., Iutynska G.O., Tashirev O.B. (2009). Effect of cultivation parameters of Antarctic strains *Enterobacter hormaechei* and *Brevibacterium antarcticum* on resistance to copper(II) ions. *Microbiology Chemistry* . 71(4): 3-8.

Tennstedt T., Szczepanowski R., Braun S. (2005). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbial Ecology* 45(3): 239-252.

Thorsted P.B., Macartney D.P., Akhtar P., Haines A.S., Ali N., Davidson P., Stafford T. (1998). Complete sequence of the IncPbeta plasmid R751: implications for evolution and organization of the IncP backbone. *Journal of Molecular Biology* 282(5): 969-90.

Tsuda M., Tan H., Nishi A., Furukawa K. (1999). Mobile catabolic genes in bacteria. Review *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87(4): 401-410.

Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (4): 503-549.

Van Beilen J.B., Wubbolts M.G., Witholt B. (1994). Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* 5: 161-174.

Velusamy P., Kim K.Y. (2011). Chitinolytic activity of *Enterobacter* sp. KB3 antagonistic to *Rhizoctonia solani* and its role in the degradation of living fungal hyphae. *International Research Journal of Microbiology* 2(6): 206-214.

Versalovic. J., Koeuth T., Lupski J. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19(24): 6823-6831.

Vigo, G.B.; Leotta, G.A.; Caffer, M.I.; Salve, A.; Binsztein, N.; Pichel, M. (2006). Isolation and characterization of *Salmonella* 110nvasió from Antarctic wildlife. *Polar Biology* 34(5): 675-681.

Viñas M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. *Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona.*

Vincent W.F (2000). Evolutionary origins of Antarctic microbiota: 110nvasión, selection and endemism. *Antarctic Science* 12(3): 374-385.

Williams P.J, Smith M.W. (1989). *The Frozen Earth. Fundamentals of geocryology.* Cambridge University Press, New York.

White P.A., Rawlinson W.D. (2001). Current status of the *aadA* and *dfp* gene cassette families. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 495-496.

Whyte L., Bourbonnière L., Greer C.W. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathways. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (9): 3719-3723.

Witzig R., Hamdy A.H., Strömpt C., Wray V., Junca H., Pieper D. (2007). Molecular detection and diversity of novel diterpenoid dioxygenase DitA1 genes from proteobacterial strains and soil samples. *Environmental*

Microbiology 9(5): 1202-1218.

Wright GD. (2007). **The antibiotic resistome: Nexus of chemical and genetic diversity.** *Nature Review Microbiology.* 5: 175-186.

Wright G.D.(2010). **Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?** *BMC Biology* 8:123.

Xiao X., Yin X., Lin J., Sung L., You Z., Wang P., Wang F. (2005). **Chitinase genes in lake sediments of Ardley island Antarctica.** *Applied and Environmental Microbiology* 71(12): 7904-7909.

Xu H., Davies J., Miao V. (2007). **Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp.** *Journal of Bacteriology* 189 (17): 6276-6283.

Yim G., Huimi Yang H., Davies J. (2006). **The truth about antibiotic.** *International Journal of Medical Microbiology* 296: 163-170.

Young H.K., Qumsich M.J., McIntosh L. (1994). **Nucleotide sequence and genetic analysis of the type Ib trimethoprim-resistant, Tn4132 dihydrofolate reductase.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 34: 715-725.

Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., & Miller W. (2000). **A greedy algorithm for aligning DNA sequences.** *Journal Computational Biology* 7(1-2): 203-14.

Zhao Y., Tianjie L. (1995). **The pedogenic groups and diagnostic characteristics in the Fildes Peninsula of King George Island, Antarctica.** *Antarctic Research* 7(1): 70-78.

Sitios web:

<http://www.antarkos.org.uy>: Asociación Civil Antarkos.

<http://www.ats.aq>: Secretaría del Tratado Antártico.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ANEXOS

Anexo N° 1

Muestras colectadas en la campaña marzo/abril de 2008

Muestra	Descripción	Posición	pH	Conductividad	T °C	Obs.
LCTR1 ₄	Suelo s/matas en lago congelado camino a los tanques rusos	S62° 11'15" W58° 55'06" h 59m	5,73	63	0,1	Suelo
TR2 ₄	Suelo s/matas, área de derrame de combustibles. Tanque 1	S 62° 11'38" W58° 56'16" h 18m	5	17	0,2	Suelo oleoso
TR3 ₄	Suelo tanques	S62° 11'37" w58° 56'15" h17m	4	-	0	Suelo oleoso
TR4 ₄	Suelo c/briofitas manguera de descarga de combustible	S62° 11'37" w58° 56'15"	5	-	0	Área tanques de combustible
CDTR5 ₄	Suelo corriente deshielo a 30 metros de la costa	S62° 11'63" W58° 56'12" h 16m	6,28	-	0,1	Sedimento
CS6 ₄	Mata microbiana marrón, costa <i>Suffield</i>	S62° 11'18" W58° 54'17" h 2m	8,51	-	0,1	Presencia de pingüinos
CS7 ₄	Mata verde-marrón Costa <i>Suffield</i>	S62° 11'17" W58° 54'17" h 3m	8,65	-	0,1	Presencia de pingüinos
BCAA8 ₄	Suelo cámara séptica, comedor de la BCAA	S62° 11'5" W58° 54'12"	s/m	n/d	0,1	suelo
BCAA9 ₄	Suelo cámara séptica, edificio Jefe base BCAA	S62° 11'16" W58° 54'16" h 13m	s/m	n/d	0,2	suelo

BCAA10 ₄	Suelo cámara séptica, edificio dotación BCAA	S62° 11' 4" W58° 54' 19" h 14m	s/m	s/m	0	suelo
---------------------	--	--------------------------------------	-----	-----	---	-------

Continuación Anexo 1: Muestras colectadas en campaña marzo/abril 2008

Muestra	Descripción	Posición	pH	Conductividad	Temperatura	Observaciones
BCAA11 ₄	Suelo cámara séptica, edificio meteorología BCAA	S62° 11' 3,5" W58° 54' 19" h 11m	s/m	s/m	0,2	Suelo
IA12 ₄	Suelo con nieve y fecas, Isla Ardley	S62° 12' 43" W58° 55' 14" h 8m	s/m	s/m	0	Suelo de cantos rodados
IA13 ₄	Isla Ardley, vecino al refugio	S62° 12' 43" W58° 54' 19" h 12m	s/m	s/m	0	Suelo/musgos
IA14 ₄	Suelo con líquenes	S62° 12' 43" W58° 54' 58" h9m	s/m	s/m	0	Suelo/líquenes
PD15 ₄	Drake	S62° 9' 39" W58° 55' 40" h14m				Matas vecinas a musgos
PD16 ₄	Drake, corriente de agua de deshielo	S62° 9' 30" W58° 56' 21" h2m	8,17	74,5	0,2	Mata roja, fecas animales cercanas
HTP17 ₄	Frente a Isla Ardley, rumbo a <i>Halfthree point</i>	S62° 13' 27" W58° 57' 9" h 14m	***	***	0	Suelo bajo musgo
HTP18 ₄	<i>Halfthree point</i>	S62° 13' 29" W58° 57' 9" h14m	5	50	0,1	Mata marrón, agua deshielo estancada,
HTP19 ₄	Mata marrón con presencia de plantas	S62° 13' 29" W58° 57' 9" h14m	5	50	0,1	Agua deshielo estancada, vecino a <i>Halfthree point</i> .
HTP20 ₄	Mata marrón,	S62° 13' 36"	5	98,7	1	A 50 metros de

	orilla cañada de deshielo	W58° 57'0,5'				Halfthree point
--	---------------------------	--------------	--	--	--	-----------------

Anexo N° 2

Muestras colectadas en la campaña diciembre de 2008

Muestra	Descripción	Posición	pH	Conductividad	T °C	Observaciones
GC1 ₁₂	Pie del Glaciar Collins	S 62° 10'58" W 58° 53'17"	9,6	75	0,2	Agua y suelo de deshielo
GC2 ₁₂	Pie del Glaciar Collins	S62° 10'58" W58° 53'17"	9,6	75	0,2	Agua y suelo de deshielo
GC3 ₁₂	Pie del Glaciar Collins	62° 10' 55'7" W58° 53'17"	8,63	64	0,2	Corriente agua de deshielo y suelo de deshielo
GC4 ₁₂	Suelo al pie del Glaciar Collins	62° 10'59" W58° 53'30"	s/m	s/m	s/m	Sedimento
CDTR5 ₁₂	Cañada de deshielo camino a los tanques rusos	S62° 11'16" W58° 55'30"	9,5	66	0,4	Agua
TR6 ₁₂	Tanques rusos	S62° 11'40" W58° 56'58,2"	9,3	63	0,3	Suelo y manguera de combustible
PD7 ₁₂	Pasaje Drake	S62° 9'11" W58° 56'21"	6,8	n/d	0,4	Cañada, matas y abundantes musgos
PD8 ₁₂	Pasaje Drake	S62° 09'10,8" W58° 56'20,9" h3m	6,5	n/d	1	Cruzando la cañada hacia el oeste, matas y musgos
BC9 ₁₂	Bahía Collins	S62° 11'3" W58° 54'23,4'	6,77	n/d	0,2	Matas rojas
CDCN10 ₁₂	Cañada de deshielo rumbo	S62° 11'27,6"	8,5	86	0,3	Abundantes matas rojas y negras

CN11 ₁₂	a Caleta Norma Caleta Norma	W58° 55'3,6'' S62° 11'18'' W58° 54'32''	s/m	n/d	0,6	Suelo bajo musgo
CA12 ₁₂	Cañada de la BCAA	S62° 10'58'' W58° 53'17''	8,3	63	0,5	Mata sobre sedimento
BCAA13 ₁₂	Edificio comedor de la BCAA	S62° 11'1,6'' W58° 54'21,9''	s/m		s/m	Cámara séptica suelo

Anexo 3

Muestras colectadas en la campaña enero de 2010

Muestra	Descripción	Posición	pH	Conductividad	T °C	observaciones
CA4 ₁₀	Cañada de la BCAA	S62° 10'58'' W58° 53'17' ,	n/d	n/d	n/d	Suelo-sedimento
TR1 ₁₀	Tanques rusos	S62° 11'37'' W58° 56'15' ,	-	-	-	Suelo oleoso debajo del pase.
TR2 ₁₀	Tanques rusos	S62° 11'63'' W58° 56'12' ,	-	-	-	Suelo corriente deshielo a 30 m de la costa.
TR3 ₁₀	Tanques rusos	S62° 11'38'' W58° 56'16' ,	-	-	-	Suelo s/matas, área derrame de combustible.
TR4 ₁₀	Tanques rusos	S62° 11'40'' W58° 56'8,2 ''	-	-	-	Suelo y manguera de combustible.

Anexo N° 4 Perfil de Resistencia a Antibióticos

Antibiótico	Abreviación	+	Resistente
Ampicilina	Amp	-	Sensible
Kanamicina	Km	En blanco	No determinado
Gentamicina	Gm		
Cloramfenicol	Cm		
Trimetoprim	Trim		
Ácido Nalidíxico	Nal		
Estreptomina	Strp		
Espectinomicina	Spc		

Sitio de colecta	Abreviatura
Bahía Collins	BC
Base Artigas	BCAA
Cañada de la Base Artigas	CA
Cañada de deshielo Caleta Norma	CDCN
Cañada de deshielo Tanques Rusos	CDTR
Caleta Norma	CN
Costa Suffield	CS
Half-Three-Point	HTP
Lago Congelado camino a los Tanques Rusos	LCTR
Isla Ardley	IS
Pasaje Drake	PD
Tanques Rusos	TR

Las iniciales corresponden al sitio de colecta (CDTR: Cañada deshielo Tanques Rusos), el número (5) a la muestra correspondiente. Los sub-índices (número y letras) identifican a cada cepa y el último número seguido de un punto indica a que campaña corresponde el aislamiento.

Ejemplo CDTR5a.12 = Cañada de deshielo Tanques Rusos, muestra N° 5, cepa a, 12 campaña diciembre 2008).

Las cepas señaladas con verde corresponden a los aislamientos positivos para el gen integrasa clase 1 (*intl1*).

Las cepas señaladas con celeste son las empleadas para el análisis del perfil de crecimiento con distintas concentraciones de antibióticos.

Cepa	Amp		Km		Tc		Gm	Cm	Trim	Ac.Nal		Strp		Spc
	50	100	50	100	10	50	20	50	50	50	100	50	100	50
LCTR1 _{a.4}	+	+	-	-	-	-		-	+	-	-	-	-	-
LCTR1 _{c.4}	+	+	+	+	-	-		-	+	-	-	+	+	+
CDTR5 _{a.8}	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		-
CDTR5 _{b.8}	+	+	+					+	+					
TR1 _{a.4}	-	-	+	+	-		-		-					
TR1 _{c.4}	+	+					-	-	+					
TR2 _{d2.4}	-	-					-	-	-	-	-	+	+	-
TR2 _{d3.4}	+	+						+	+	-	-	+	+	-
TR2 _{e2.4}	+	+						+	+	-	-			
TR3 _{a.4}					-	-		+						
TR3 _{b.4}	+	+			-	-		+				+	+	+
TR3 _{f1.4}					-	-	-	-	+	+	+			
TR3 _{f2.4}	+	+	-	-	-	-		+	-	-	-	+	+	
TR3 _{f3.4}	+	+	-	-	-	-		+	+	-	-	+	+	
TR3 _{f4.4}	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
TR3 _{f5.4}							-	-	+	+				-
TR3 _{f8.4}			-	-				-	+	+				+
TR4 _{b.4}	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+		
TR5 _{a.4}	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	
TR5 _{b.4}	+	+	+	+	-	-			+		+	+		-
TR5 _{c.4}	+	+	+	+	-	-			+				-	-
TR6 _{a.8}	+	+	-	-	+	+								
TR6 _{b.8}	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	-
TR6 _{c.8}	+	+	-	-	-	-	-		+					
TR6 _{d.8}	-	-	-	-	+	+	-		-					
TR6 _{e.8}	+	+	+	+	-	-	-		+					-

TR1 _{b.10}	+	+	+	+	-	-			+	+	-	-	+	+		
TR2 _{e7.10}	-	-						-	-	-	+	+			-	
TR2 _{a.10}	+	+		-						+					-	
TR2 _{b.10}	+	+		-						+	+	+	-			
TR3 _{4c.10}	+	+	-	-	-	-				+						
TR3 _{1b.10}	+	+						-		+						
TR4 _{e5.10}	+	+	+	+	+	+						+	+		+	-

Cepa	Amp		Km		Tc		Gm	Cm	Trim	Ac.Nal		Strp		Spc
	50	100	50	100	10	50	20	50	50	50	100	50	100	50
BC9 _{b2.12}	-	-	+	+			-	+	+					
BC9 _{c6.12}	+	+						+	+					+
BC9 _{d2.12}	+	+	-	-					+	-	-			
BC9 _{PING3.}	+	+						+	+			+		+
BA10 ₄	+	+	+	+	+	+				-	-	-	-	-
BA13 ₁₂	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
CA4a ₁₀	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
CA4b ₁₀	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
CA12 ₁₂	+	+	+		-					+	+			
CS10 _{5a4}			-		-		-				+	+	+	
CS10 _{5bP1.4}												+	+	
CDCN10 ₁₂									+					
CN11a ₁₂	+	+	-		-		-	-	+	-		-		-
CN11c ₁₂			-		-				+	+				
GC3c ₁₂	+	+	-		-		+	-	+	-	-	+	+	+
GC4a ₁₂	+	+					-	+	+	-	-			-
GC4b ₁₂		+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Cepa	Amp		Km		Tc		Gm	Cm	Trim	Ac.Nal		Strp		Spc
	50	100	50	100	10	50	20	50	50	50	100	50	100	50
IA12 _{5F4}	+	+							+					
IA12 _{6F4}							-	-		+	+			
IA13a ₄			-		-					+	+	+	+	
IA13b ₄			-		-		-	-	+			+	+	-
IA19 _{7F4}									+					
IA19 _{A4}	+	+	-		-		-	-	+			-	-	-
IA19 _{8A4}									+					
PD7b ₁₂	+	+					-		+					
PD7b _{3.12}				+			-	-			-	-	-	
PD8b _{5.12}			-		-					+	+	+	+	
PD8b _{6.12}									+					
PD8b _{7.12}				+			-	-	-					
PD8b _{8.12}			-				-	-	-			+	+	
PD8c _{1.12}	+	+			-				-			+	+	
PD8c _{3.12}	+	+	-		-							+	+	
PD8d _{3.12}	+	+					-		+					
PD8 _{7BP1.12}	+	+					-		-					
PD15a ₄	+	+	+	+								+	+	-
PD15b ₄	+	+	+	+	-	-					+	+	+	+

ANEXO N° 5



Figura 1: Lago en Caleta Norma (A y B)/Lago ionosférico (deshielo del glaciar. Península Fildes, Isla Rey Jorge.



**Figura 2: Tapetes microbianos y briofitas (Caleta Norma)
Península Fildes.**

IMÁGENES DE LOS SITIOS DE MUESTREO



CALETA NORMA



LAGO CONGELADO CAMINO A TANQUES RUSOS



TANQUES RUSOS



PASAJE DRAKE



CAÑADA DE LA BASE ARTIGAS

ANEXO N° 6

TABLA III.4: Mejores hits obtenidos para TR6_{H1}

Organismo	N° ID		TR6 _{H1}	Origen
<i>Pseudomonas</i> sp. AW6	FJ539108	Score	2060	Agua de océano. Identificación de microorganismos aislados de la Bahía Gran Muralla. Isla Rey Jorge. Antártida
		% cobertura	88	
		% identidad	99	
<i>Pseudomonas</i> sp. HC6-6	JF313016	Score	2060	Matas microbianas. Estudio de diversidad de matas de cianobacterias del Ártico.
		% cobertura	88	
		% identidad	99	
<i>Pseudomonas</i> sp. W6	FJ424508	Score	2060	Agua de océano. Análisis filogenético de bacterias aisladas del océano en la Antártida.
		% cobertura	88	
		% identidad	99	
<i>Pseudomonas</i> sp. Cam-1	DQ777728	Score	2060	Suelo del Ártico contaminado con PCB (Master y Mohn 1998) Diversidad del gen <i>ditA1</i> (diterpenoide-dioxigenasa (Witzig y col., 2007)).
		% cobertura	88	
		% identidad	99	
<i>Pseudomonas</i> sp. TSX15-3	HM156147	Score	2054	Suelo. Estudio de diversidad bacteriana y cambio en las características del suelo de un glaciar en retroceso (China).
		% cobertura	88	
		% identidad	99	
<i>Pseudomonas</i> sp. RKS6-8	GQ477175	Score	2054	Suelo. Diversidad microbiana en suelo del Glaciar Roopkund del Himalaya (India).
		% cobertura	88	
		% identidad	99	

ANEXO 6

Tabla III.2: Mejores *hits* obtenidos para TR5_{H1} utilizando el programa Blastn.

Descripción	N° ID		TR5 _{H1}	Origen
Plásmido NAH7	AB237655	Score	660	<i>Pseudomonas putida</i> cepa G7 (Tsuda y col., 1990, Sota y col., 2006).
		% cobertura	100	
		% identidad	99	
Plásmido KOPRI126573	JN248563	Score	660	<i>Pseudomonas</i> sp. MC1 (aislamiento proveniente de una instalación de tratamiento de aguas residuales, Isla Rey Jorge, Antártida).
		% cobertura	100	
		% identidad	99	
Naftaleno dioxigenasa	AY694160	Score	660	<i>Pseudomonas</i> sp. CY23 (Ma y col., 2006).
		% cobertura	100	
		% identidad	99	
Naftaleno dioxigenasa	ABA29805	Score	660	<i>Pseudomonas</i> sp LZT1 (Ma y col., 2006)
		% cobertura	100	
		% de identidad	99	
Naftaleno dioxigenasa	AAV33333	Score	660	<i>Rahnella</i> sp CY14 (Ma y col., 2006)
		% cobertura	100	
		% identidad	99	
Naftaleno dioxigenasa	AY694157	Score	660	<i>Rahnella</i> sp. CY12
		% cobertura	100	
		% identidad	99	

Tabla III.7: Mejores hits obtenidos a partir del análisis de secuencias aminoacídicas del aislamiento IA19₄ empleando Blastx.

Descripción	N° ID		IA19 ₄	Origen
Proteína hipotética integrasa (tirosina recombinasa)	NP044257	Score	650	<i>Enterobacter aerogenes</i> plásmido IncP RT51 p48 (Thorsted y col. 1998)
		% cobertura	99	
		% identidad	100	
Producto de proteína desconocida	CAA 33849	Score	649	Plásmido R1033
		% cobertura	99	
		% identidad	99	
Integrasa	NP052898	Score 648	648	Plásmido R100 de <i>Shigella flexneri</i>
		% cobertura	99	
		% identidad	99	
IntI1 integrasa	CAD 20932	Score	648	<i>Salmonella 127nvasión sp. 127nvasión serovar infantis</i>
		% cobertura	99	
		% identidad	99	
IntI clase 1	AF445082	Score	647	<i>Acinetobacter baumannii</i>
		% cobertura	99	
		% identidad	99	
IntI clase 1	ABQ65129	Score	647	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabla III.9: Mejores hits obtenidos utilizando el programa Blastx

Descripción	N° ID		CA410	GC412	CDTR512	CN1112	IA124	IA194	origen
Enzima potencial Dihidrofolato reductasa	NP569370	Score	323	252	230	333	267	230	<i>Salmonella</i> 128nvasión subsp. 128nvasión serovar typhimurium
		% cobertura	75	84	78	76	86	78	
		% identidad	98	99	100	100	98	100	
Dihidrofolato reductasa	CAM98046	Score	322	250	228	332	266	228	<i>Salmonella</i> 128nvasión subsp. 128nvasión serovar typhimurium
		% cobertura	75	84	78	76	86	78	
		% identidad	98	98	99	95	97	99	
Dihidrofolato reductasa	ABD46710	Score	319	247	225	329	263	225	<i>Salmonella</i> 128nvasión subsp. 128nvasión serovar typhimurium
		% cobertura	75	84	78	76	86	78	
		% identidad	97	97	98	95	96	98	
Dihidrofolato reductasa de bacteria no cultivada	CAH64759	Score	317	245	223	327	261	223	Lodo activado
		% cobertura	75	82	76	74	84	76	
		% identidad	98	98	99	94	97	99	

Tabla III.12: Mejores histis obtenidos para CDTR5₁₂

Organismo	N° ID		CDTR5 ₁₂	origen
<i>Enterobacter ludwigii</i> cepa R5-318	JQ659725	Score	1657	Bacteria endófitas asociada con cultivos de <i>Jatropha</i>
		% cobertura	98	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter hormaechei</i> cepa S6-255	JQ660204	Score	1655	Bacteria endófitas asociada con cultivos de <i>Jatropha</i>
		% cobertura	98	
		% identidad	99	
<i>Cellulomonas hominis</i> cepa S6-233-1	JQ660195	Score	1655	Bacteria endófitas asociada con cultivos de <i>Jatropha</i>
		% cobertura	98	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter</i> sp cepa CIFRI D-TSB-9-ZMA	JF799886	Score	1655	Bacteria halotolerante aislada de agua de mar
		% cobertura	98	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter</i> sp. M.D.NA5-6	JF690888	Score	1655	Bacteria aislada de intestino de ciervo almizclero
		% cobertura	98	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter cloacae</i> cepa MS2	HQ179578	Score	1655	Rizósfera de <i>Jatropha curcas</i> (bacteria PGPR)
		% cobertura	98	
		% identidad	99	

Tabla III.13: Mejores hits obtenidos para CN11₁₂

organismo	N° ID		CN11 ₁₂	origen
<i>Enterobacter cloacae</i> cepa 341	JQ435861	Score	2167	Bacteria endófitas de <i>Theobroma cacao</i> L.
		% cobertura	100	
		% identidad	96	
<i>Enterobacter hormaechei</i> cepa Ni-1	HM446004	Score	2167	Bacteria resistente a Níquel aislada de suelo
		% cobertura	99	
		% identidad	96	
<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	AJ853890	Score	2163	Muestra clínica (Hoffman y col. 2005)
		% cobertura	99	
		% identidad	96	
<i>Enterobacter hormaechei</i> cepa R2-206	JQ659614	Score	2161	Bacteria endófitas asociadas con cultivos de <i>Jatropha</i>
		% cobertura	99	
		% identidad	96	
<i>Enterobacter</i> sp cepa C18	EU 563339	Score	2161	Muestra ambiental agua de mar
		% cobertura	99	
		% identidad	96	
<i>Enterobacter asburiae</i> cepa KNUC5007	JQ682630	Score	2156	Rizósfera Control biológico de la enfermedad de la mancha gris en plantas de <i>Capsicum</i> (Pimienta)
		% cobertura	99	
		% identidad	96	

Tabla III.14: Mejors *hits* obtenidos para IA12₄

organismo	N° ID		Clon IA124	origen
<i>Enterobacter</i> sp. cepa A7B	HQ441562	Score	2462	Rizósfera
		% cobertura	95	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter cloacae</i> cepa 344	JQ435862	Score	2459	Bacteria endófito de planta de 131nvas <i>Theobroma 131nvas</i> L.
		% cobertura	95	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter hormaechei</i> subespecie <i>steigerwaltii</i>	AJ853890	Score	2455	Muestra clínica (Hoffman 005)
		% cobertura	95	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter hormaechei</i> cepa M.D.NA5-9	JF690889	Score	2453	Microorganismo intestino de ciervo almizclero de la Siberia
		% cobertura	95	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter hormaechei</i> cepa Ni-1	HM446004	Score	2451	Bacteria resistente al níquel, aislada de suelo
		% cobertura	95	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter absuriae</i> cepa KNUC5007	JQ682630	Score	2247	Control biológico en plantas de pimienta
		cobertura	95	
		identidad	99	
<i>Enterobacter absuriae</i> cepa R2-113	JQ659598	Score	2449	Bacteria endófito de cultivares de <i>Jatropha</i>
		% cobertura	95	
		% identidad	99	
<i>Enterobacter hormaechei</i> cepa Ni-1	HM446004	Score	2451	Bacteria tolerante al níquel aislada de suelo
		% cobertura	95	
		% identidad	99	