



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“ANÁLISIS DE LA TRANSPOSICIÓN DE LOS
DETERMINANTES DE RESISTENCIA A CROMATO Y
MERCURIO DEL PLÁSMIDO pUM505”**

TESIS

Para obtener el grado de:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

p.Q.F.B. Rosa Isela Reyes Gallegos

Asesora:

D.C. Martha Isela Ramírez Díaz

Co-asesora:

M.C. Amada Díaz Magaña

Agosto, 2013

INDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de los metales pesados-----	1
2. Características generales del cromo-----	1
2.1. Transporte y toxicidad del cromo-----	2
2.2. Mecanismos de resistencia bacteriana a cromato-----	4
a) Resistencia cromosómica-----	4
b) Resistencia plasmídica-----	6
2.3. Transposón de resistencia a cromato-----	6
3. Características generales del mercurio-----	10
3.1. Transporte y toxicidad del mercurio-----	10
3.2. Mecanismos de resistencia bacteriana a mercurio-----	11
3.3. Transposón de resistencia a mercurio-----	12
4. Transposición -----	16
4.1. Elementos transponibles-----	16
4.2. Mecanismo de transposición-----	17
II. ANTECEDENTES-----	21
III. JUSTIFICACIÓN-----	24
IV. HIPOTESIS-----	24
V. OBJETIVOS -----	24

VI. MATERIALES Y METODOS -----	25
1. Medios de cultivo-----	25
2. Cepas-----	25
3. Plásmidos-----	26
4. Determinación de la concentraciones mínima inhibitoria (MIC)-----	26
5. Mutagénesis-----	26
6. Aislamiento de DNA Plasmídico-----	29
a) Lisis alcalina-----	29
7. Electroforesis en geles de agarosa-----	30
8. Preparación de células competentes de <i>Escherichiacoli</i> -----	30
9. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> -----	31
10. Preparación de células competentes de <i>P. aeruginosa</i> -----	31
11. Transformación de células competentes de <i>P. aeruginosa</i> -----	32
12. Extracción del DNA en colonia-----	32
13. Reacción en cadena de la polimerasa-----	32
14. Pruebas de susceptibilidad a cromato y mercurio en medio líquido-----	33
VII. RESULTADOS -----	36
1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) -----	36
2. Selección de mutantes de <i>P. aeruginosa</i> sensibles a carbenicilina-----	36
3. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> --	38
4. Pruebas de susceptibilidad a mercurio de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> -	39
5. Amplificación de los genes <i>chrA</i> y <i>merA</i> de las mutantes de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> -----	39

6. Transferencia del plásmido pUCb::Tn <i>chr/mer</i> a <i>E. coli</i> JM101-----	44
7. Amplificación del gen <i>chrA</i> de las transformantes de <i>E. coli</i> JM101-----	46
8. Pruebas de susceptibilidad a mercurio-----	46
VIII. DISCUSIÓN -----	49
IX. CONCLUSIÓN -----	53
X. BIBLIOGRAFIA -----	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Toxicidad del cromo en bacterias-----	3
Figura 2. Mecanismos de resistencia a cromato codificados en cromosoma--	5
Figura 3. Expulsión de cromato por la proteína ChrA de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> -----	7
Figura 4. Transposones de resistencia a cromato-----	9
Figura 5. Mecanismos de resistencia a mercurio conferidos por el operón <i>mer</i> -----	13
Figura 6. Transposones de resistencia a mercurio-----	15
Figura 7. Estructuras de los elementos genéticos transponibles-----	18
Figura 8. Mecanismo de transposición-----	19
Figura 9. Organización genética de los transposones de resistencia a metales pesados-----	22
Figura 10. Mapa del plásmido pUM505-----	27
Figura 11. Mapa del vector pUCP20-----	28
Figura 12. Susceptibilidad a cromato de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> (pUCb::Tn <i>chr/mer</i>)-----	40
Figura 13. Susceptibilidad a mercurio de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> (pUCb::Tn <i>mer/chr</i>)-----	41
Figura 14. Esquemas de los sitios de amplificación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes <i>chrA</i> y <i>merA</i> -----	42
Figura 15. Fragmentos de <i>chrA</i> y <i>merA</i> de las mutantes de <i>P. aeruginosa</i> obtenidos por PCR-----	43

Figura 16. Plásmido de las transformantes de <i>E. coli</i> JM101-----	45
Figura 17. Fragmentos de <i>chrA</i> de las transformantes de <i>E. coli</i> JM101 obtenidos por PCR-----	47
Figura 18. Susceptibilidad a mercurio de las transformantes JM101 (pUCb::Tn <i>chr/mer</i>)-----	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de los fragmentos con el gen <i>chrA</i> o <i>merA</i> -----	34
Tabla 2. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR de los fragmentos que poseen el gen <i>chrA</i> o <i>merA</i> -----	35
Tabla 3. Resultados de la prueba de MIC para las cepas de <i>P. aeruginosa</i> --	37

RESUMEN

El plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* posee genes involucrados en la resistencia a cromato y mercurio dentro de una región denominada isla de resistencia a metales pesados que tiene un tamaño de ~31 kb. Estos determinantes se encuentran aledaños a elementos móviles que sugieren forman parte de transposones. Diversos transposones de resistencia a cromato y mercurio se han estudiado, sin embargo, no se ha comprobado su capacidad de translocarse a otras regiones de DNA. El objetivo de este trabajo fue determinar si los posibles transposones de resistencia a cromato (Tnchr) y mercurio (Tnmer) tienen la capacidad de translocarse. Para ello se utilizó una estrategia de mutagénesis empleando como presión selectiva concentraciones de cromato y mercurio, forzando al sistema para que el o los transposones pudieran translocarse dentro del gen de resistencia a carbenicilina, seleccionando mutantes con pérdida a resistencia al antibiótico. Para verificar el fenotipo de resistencia de las mutantes se emplearon curvas de susceptibilidad a concentraciones crecientes de dichos iones, obteniéndose la resistencia a ambos. Se transformaron células competentes de *E. coli* JM101 con el DNA plasmídico de las mutantes, obteniéndose una banda de tamaño superior a 23 kb. Para comprobar la presencia de los transposones de cromato y/o mercurio, se hizo un análisis por PCR para identificar el gen *chrA* y una curva de susceptibilidad a mercurio dando fenotipo de resistencia. Los resultados sugieren que los transposones Tnchr/mer forman parte de un elemento móvil que tiene la capacidad de translocarse.

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de los metales pesados

El término “metales pesados” se refiere a aquellos elementos químicos cuya densidad es mayor a 5 g/ml (Gadd y Griffiths, 1978; Nieboer y Richardson, 1980). Dentro de este grupo se encuentran los elementos de transición, lantánidos y actínidos (Nies, 1999). A bajas concentraciones algunos metales de transición como cobalto, cobre, níquel y zinc son esenciales para procesos celulares en las bacterias (Nies, 2004). Sin embargo, a altas concentraciones de estos metales frecuentemente son citotóxicos (Gadd y Griffiths, 1978; Nies, 2004). Otros metales pesados como plomo, cadmio, mercurio, plata y cromo no se conocen efectos benéficos para las células bacterianas y éstos son tóxicos incluso a bajas concentraciones (Nies, 2004).

2. Características generales del cromo

El cromo es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica, tiene un número atómico de 24 y peso atómico de 51.996 g/mol (McGrath y Smith, 1990). El cromo posee varios estados de oxidación que van de -2 a +6, siendo las formas más estable y comunes el cromo trivalente Cr (III) y el cromo hexavalente Cr (VI) (McGrath y Smith, 1990). La forma hexavalente del cromo es más tóxica que el cromo trivalente y usualmente se encuentra en aguas residuales asociado con el oxígeno formando iones cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (McGrath y Smith, 1990). El cromo se encuentra en rocas, plantas, suelos, animales y en los humos y gases volcánicos (McGrath y Smith, 1990). Sus

principales usos es en el cromado de una gran variedad de equipos, como piezas de automóvil y equipos electrónicos, así como aleaciones con hierro y níquel (Lepora, 2005).

2.1. Transporte y toxicidad del cromo

La toxicidad del cromo depende de su estado de oxidación (Katz y Salem, 1993). El Cr (III) es considerado un elemento traza esencial únicamente en mamíferos ya que participa en el metabolismo de lípidos y de la glucosa (Cervantes y col., 2001). En contraste, el Cr (VI) es tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y cancerígeno en humanos y mutagénico en bacterias y hongos (Losi y col., 1994; Cervantes y col., 2001), éste es transportado al citoplasma por medio de la vía de transporte de sulfato (**Figura 1A**) (Nies y Silver, 1989; Pardee y col., 1966), esta permeabilidad radica en la similitud química del cromato (CrO_4^{2-}) y el sulfato (SO_4^{2-}) ya que ambos oxianiones son moléculas tetrahédricas y poseen radios atómicos y distancias de enlace semejantes (**Figura 1A**) (Pardee y col., 1966). Entre los efectos tóxicos del cromato se encuentra la inhibición competitiva del transportador de sulfato (**Figura 1A**) (Ohtake y col., 1987; Nies y silver, 1989). En el interior de la célula, la toxicidad del cromo se relaciona principalmente con el proceso de reducción del Cr (VI) a estados de oxidación inferiores Cr (V) y Cr (III) (**Figura 1C**), con la formación de radicales libres que generan estrés oxidativo que afecta a proteínas, lípidos, RNA y DNA (**Figura 1D**) (Kawanishi y col., 1986; Cabisco y col., 2000). Por otra parte el Cr (III) tiene la capacidad de unirse a los grupos fosfato del DNA, generando aductos Cr-DNA principalmente de complejos ternarios generados por la formación de enlaces cruzados de cisteína e histidina

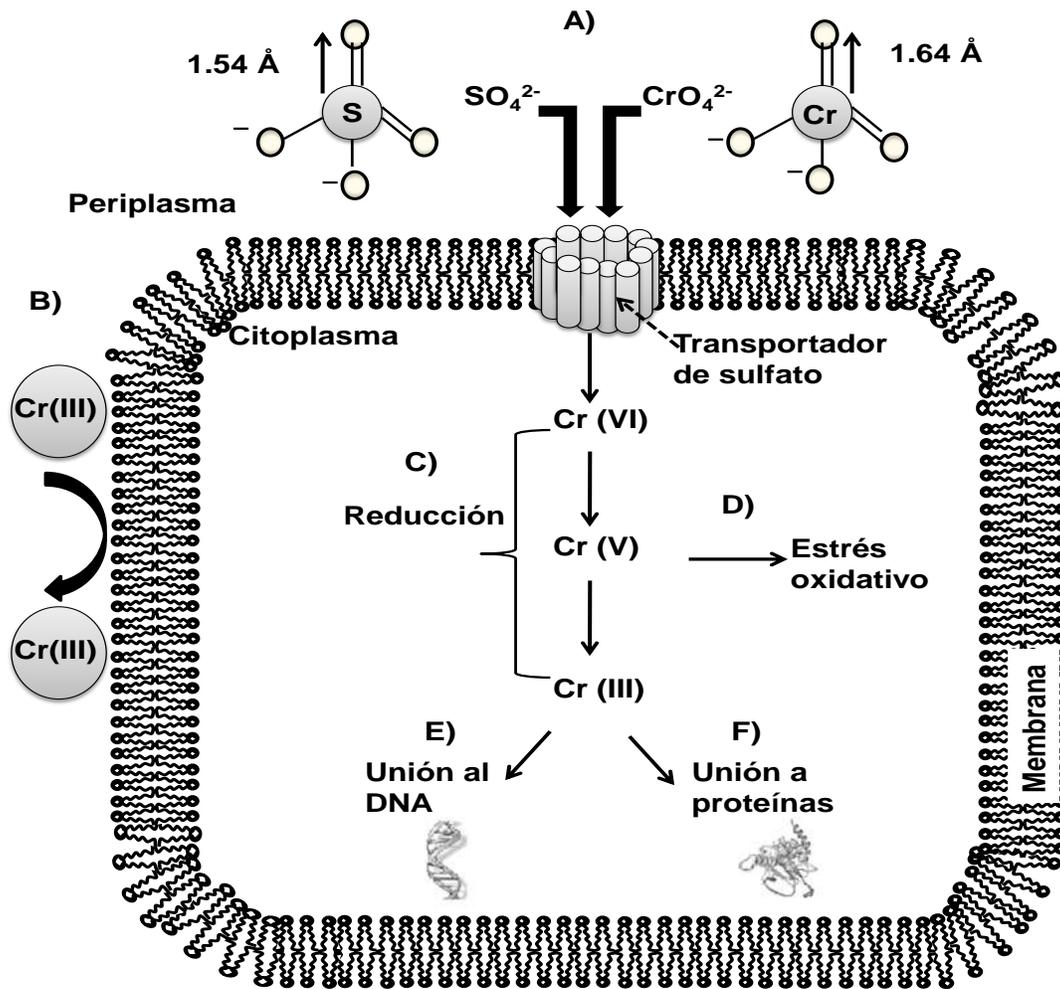


Figura 1. Toxicidad del cromo en bacterias. Ingreso del cromato a través del transporte de sulfato debido a la similitud química entre estos dos oxianiones (A). Las membranas biológicas son impermeables al Cr (III) por lo que éste resulta inocuo (B). Reducción intracelular del Cr (VI) a Cr (III) (C), con la producción de radicales libres que generan estrés oxidativo (D). El Cr (III) interactúa con el DNA produciendo daño (E) y con proteínas alterando su estructura y actividad (F). Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2008.

con Cr-DNA; también el Cr (III) puede unirse a los grupos carboxilos y sulfhidrilos de las proteínas afectando su estructura y función (**Figura 1E y 1F**) (Shi y Dalal, 1990; Kadiiska y col., 1994). Contrariamente el cromo Cr (III) es incapaz de atravesar las membranas biológicas debido a la baja solubilidad de sus compuestos por lo que éste es relativamente inocuo (**Figura 1B**) (Pardee y col., 1966).

2.2. Mecanismos de resistencia bacteriana a cromato

La presencia de metales pesados en el ambiente ejerce un efecto inhibitorio sobre los microorganismos (Cervantes y Silver, 1992). Sin embargo, esto posibilita la selección de variantes resistentes al efecto de dicho metal tóxico (Cervantes y Silver, 1992). Se han reportado bacterias resistentes a cromato, incluyendo cepas de origen clínico y ambiental (Cervantes y Silver, 1992). Los mecanismos de resistencia a cromato pueden ser codificados por genes cromosómicos o plasmídicos (Nies y col., 1998; Cervantes y col., 2001).

a) Resistencia cromosómica

Los genes localizados en cromosomas están relacionados con estrategias específicas o inespecíficas (Ramírez-Díaz y col., 2008). La resistencia bacteriana a cromato se debe a mutaciones cromosómicas, que afectan el sistema de transporte de sulfato, disminuyendo la entrada del cromato a la célula (**Figura 2A**) (Ohta y col., 1971). Otro sistema de resistencia a cromato es la reducción extracelular del Cr (VI) a Cr (III) (**Figura 2B**), por acción de enzimas específicas y no específicas (Ishibashi y col., 1990). La detoxificación de los radicales libres

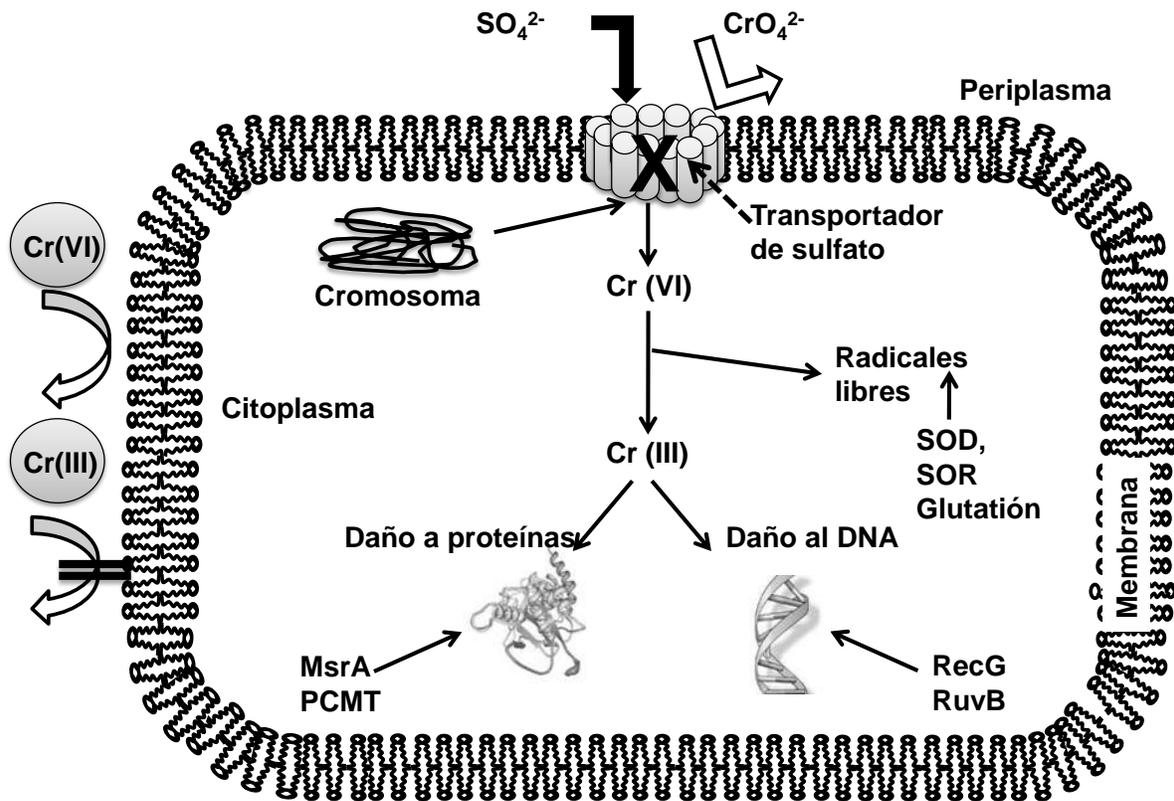


Figura 2. Mecanismos de resistencia a cromato codificados en cromosoma. Mutaciones en el transportador de sulfato (X) disminuyen la entrada del cromato(A). Reducción extracelular de Cr (VI) a Cr (III), que no ingresa a la célula (B). Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), superóxido reductasa (SOR) y el glutati3n inactivan los radicales libres para la disminuci3n del efecto t3xico (C). Las helicasas RecG y RuvB participan en procesos de reparaci3n de da3o al DNA causados por el Cr (III) (D). Sistemas enzimáticos que reparan el da3o a proteínas: reductasa sulfoxido metionina (MsrA) y L-isoaspartil metiltransferasa (PCMT) (E). Modificado de Ram3rez-D3az y col., 2008.

b) Resistencia plasmídica

Generalmente los genes localizados en plásmidos codifican transportadores de membrana, los cuales median la expulsión de cromato del citoplasma al periplasma (Ramírez-Díaz y col., 2008). Uno de los sistemas de resistencia a cromato mejor caracterizados es la expulsión de cromato conferida por la proteína ChrA (Cervantes y col., 1990). Los determinantes de resistencia a cromato mejor caracterizados a nivel molecular son ChrA codificado en el plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y ChrA codificado en el plásmido pMOL28 de *Cupriavidus metallidurans* (Nies y col., 1990). ChrA funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa el cromato del citoplasma de forma dependiente del potencial de membrana (**Figura 3**) (Álvarez y col., 1999; Pimentel y col., 2002). Además, se han caracterizado a nivel experimental otros determinantes bacterianos de resistencia a cromato también localizados en plásmidos: pB4 de *Pseudomonas sp.* B13 (Tauch y col., 2003), plásmido 1 de *Shewanella sp.* ANA-3 (Aguilar-Barajas y col., 2008) y plásmido 3 de *Arthrobacter sp.* FB24 (Henne y col., 2009).

2.3. Transposones de resistencia a cromato

Varios transposones con genes de resistencia a cromato han sido descritos, el primer transposón de resistencia a cromato identificado fue Tn5719 del plásmido pB4 de *Pseudomonas sp.* B13, que contiene 7 regiones codificantes, incluye los genes *tnpA* y *tnpR*, que codifican para una transposasa y una resolvasa, respectivamente; el resto de las regiones codificantes correspondientes a los determinantes de resistencia a cromato (**Figura 4A**) (Tauch y col., 2003).

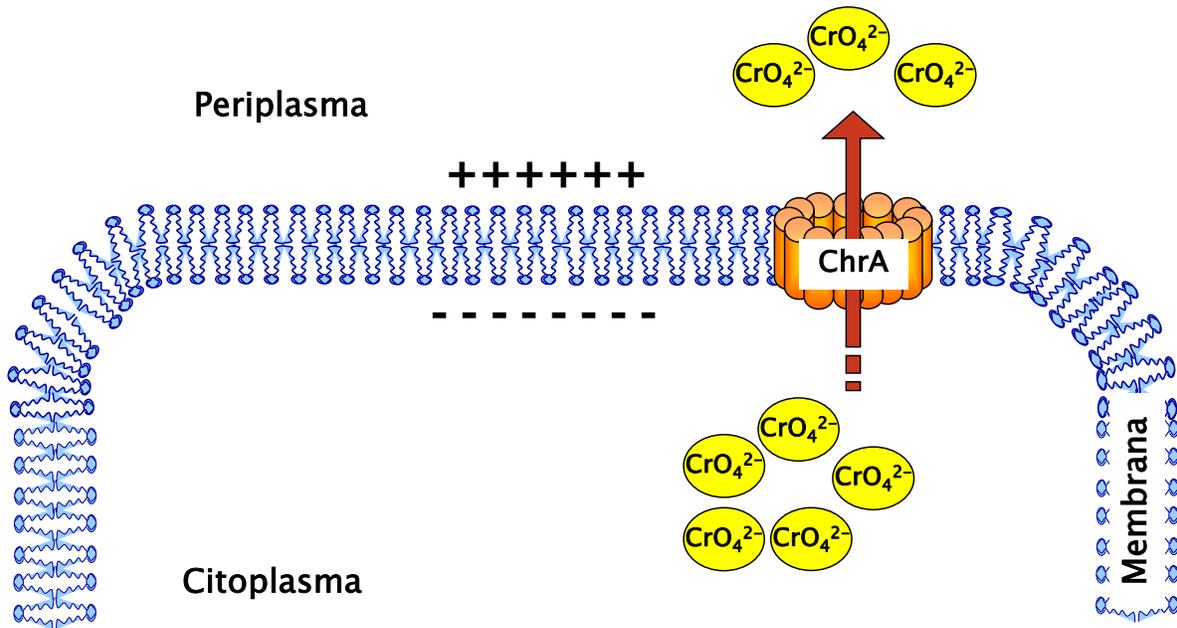
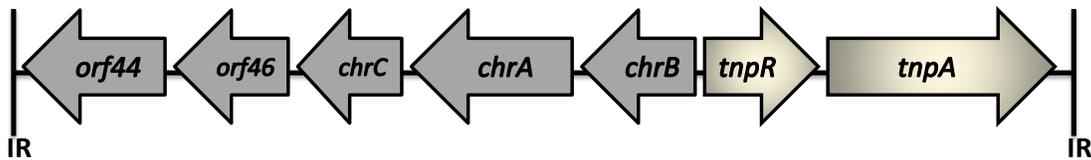


Figura 3. Expulsión de cromato por la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. La proteína de membrana ChrA expulsa los iones cromato (CrO_4^{2-}) del citoplasma hacia el periplasma empleando el potencial de membrana como fuente de energía (Modificado de Álvarez y col., 1999; Pimentel y col., 2002).

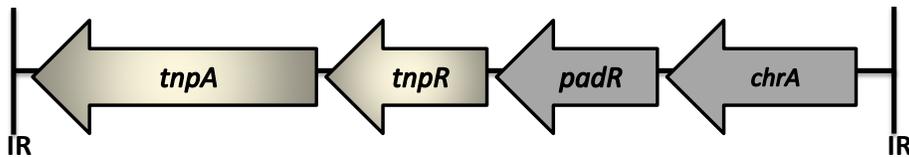
También se identificó el transposón del tipo Tn21 que se encuentra en el plásmido pCNB1 de *Comamonas testosteroni* CNB1 (**Figura 4B**), que confiere resistencia a cromato, éste incluye los genes *chrA* y *padR*, que codifican para el transportador de cromato y un posible regulador, respectivamente (Ma y col., 2007). Otro transposón es el TnOtChr de la bacteria *Ochrobactrum tritici* 5bv11, que contiene los genes *tnpR* y *tnpA* a los extremos de una región que contiene cuatro genes que codifican de resistencia a cromato: la proteína ChrA transportador de cromato, la proteína ChrB regulador, ambos esenciales para la resistencia a cromato; ChrF proteína de la cual aún se desconoce la función y ChrC, que presentó actividad de superóxido dismutasa contra restando los efectos del estrés oxidativo producidos por la reducción del cromato (**Figura 4C**) (Branco y col., 2008). Además, se encontró en el genoma de *Bacillus cereus* SJ1, el gen *chrA*, que codifica para la proteína transportadora y el gen *chrl*, un gen regulador, acompañados por un gen que codifica para una resolvasa, sugiriendo que estos forman parte de un transposón (**Figura 4D**) (He y col., 2010).

Recientemente se reportó que el gen *chrA* que codifica la proteína ChrA del plásmido conjugativo pUM505, se encuentra formando un posible operón *chrBAC*, este operón a su vez está acompañado por los genes *tnpA* y *tnpR*, que codifican una transposasa y una resolvasa, respectivamente lo que sugiere que pueden constituir un transposón (**Figura 4E**) (Ramírez-Díaz y col., 2011). Sin embargo, no se ha determinado si dicho transposón confiere resistencia a cromato.

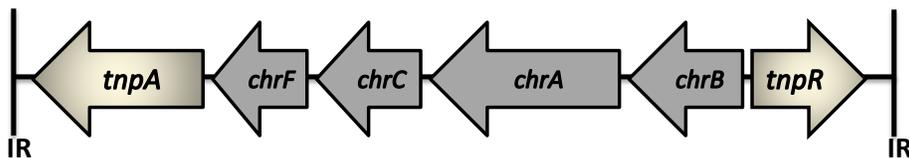
A) **Tn5719** (Plásmido pB4, *Pseudomonas* sp.)



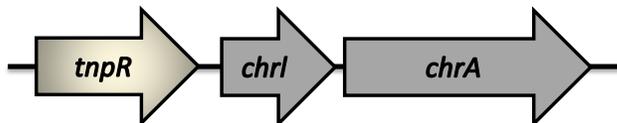
B) **TnCNB1** (Plásmido pCNB1, *Comamonas testosteroni* CNB1)



C) **TnOtChr** (Cromosoma, *Ochrobactrum tritici* 5bv11)



D) Cromosoma, *Bacillus cereus* ATCC10987



E) **Tn-Chr** (Plásmido pUM505, *P. aeruginosa*)

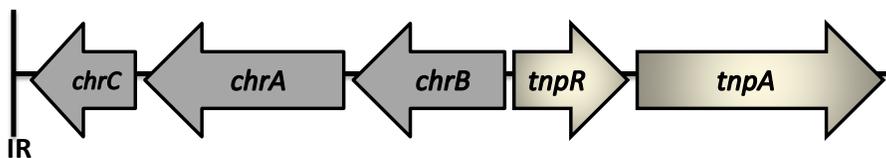


Figura 4. Transposones de resistencia a cromato. Las flechas representan regiones codificantes y su dirección de transcripción. Las líneas verticales representan secuencias repetidas invertidas (IR). Se indica el nombre del transposón (negritas), localización en el genoma y nombre del organismos donde se identificó (Modificado de Vasconcelos-Morais y col., 2011).

3. Característica generales del Mercurio

El mercurio se ubica en el grupo II-B de la tabla periódica, su número atómico es 80, peso atómico de 200.59 g/mol y actúa con valencias de 0, +1 y +2, la más común de ellas es Hg^{2+} (Gochfeld, 2003).

El Hg^{2+} se encuentra como sales inorgánicas, formando hidróxidos, cloruros, nitratos y sulfatos, también origina una clase importante de compuestos orgánicos, por ejemplo, metilmercurio, dimetilmercurio y cloruro metilmercurio (Morel y col., 1998). Entre las fuentes naturales del mercurio está la evaporación de minerales y aguas, erosión de la corteza terrestre y la actividad volcánica (Barkay y col., 2003). El mercurio tiene varios usos: en la agricultura como fungicida, en las industrias eléctricas y químicas como electrodo y catalizador, en medicina como diurético y en la profesión dental en forma de amalgama para empastes, lo que conlleva a un aumento de su abundancia en el medio ambiente (Gochfeld, 2003).

3.1. Transporte y toxicidad

El mercurio orgánico se asocia a los lípidos, por lo que es capaz de atravesar las biomembranas, mientras que el mercurio inorgánico es necesario transportarlo dentro de la célula donde éste es reducido a mercurio elemental (Hg^0) que es altamente difusible a través de las biomembranas (Barkay y col., 1989). El transporte de iones Hg^{2+} es principalmente por el transportador MerT (Brown y col., 2002) y en algunos casos también se lleva a cabo por los transportadores auxiliares MerC, MerE (Liebert y col., 2000) y MerF (Wilson y col., 2000).

Los compuestos inorgánicos y orgánicos del mercurio son altamente tóxicos, pero los orgánicos como por ejemplo el metilmercurio es 100 veces más tóxico que el

mercurio inorgánico (Broussard y col., 2002). La toxicidad del Hg^{+2} está determinada por su gran afinidad por los grupos sulfhidrilo (-SH) en donde reemplaza al hidrógeno (Mathews y van Holde, 1998). También, el mercurio es capaz de reaccionar con grupos amida (-CONH), carboxilo (-COOH) y fosforilo (P=O) (Mathews y van Holde, 1998). Esto produce graves alteraciones en las proteínas reduciendo su actividad enzimática, funciones de transporte y estructurales (Broussard y col., 2002).

3.2. Mecanismos de resistencia bacteriana a mercurio

Diferentes bacterias han desarrollado mecanismos para disminuir la toxicidad del mercurio, reduciendo el HgCl_2 y el CH_3Hg^+ , a Hg^0 que difunde a través de las membranas (Barkay y col., 1989).

Uno de los sistemas biológicos de resistencia a mercurio mejor caracterizados para desintoxicación de compuestos inorgánicos y orgánicos, es el operón (*mer*) (Nascimento y Chartone-Souza, 2003), que varía en el número de genes que codifican para proteínas funcionales de regulación (MerR), transporte (MerT, MerP y/o MerC, MerF), hidrolización (MerB) y reducción (MerA) (Osborn y col., 1997). Los determinantes de resistencia a mercurio se pueden encontrar en plásmidos (Brown y col., 1986) y cromosoma (Wang y col., 1984); formando parte de transposones (Misra y col., 1984) o integrones (Liebert y col., 1999). Los operones *mer* pueden ser: de espectro limitado, si solo permiten detoxificar el mercurio inorgánico o de espectro amplio, si además confieren resistencia a los diferentes compuestos de mercurio orgánicos (Misra, 1992).

El mecanismo de resistencia del operón *mer* (**Figura 5A**) requiere de la retención

de los iones de mercurio inorgánico (HgCl_2) por un par de cisteínas de la proteína transportadora MerP, que se encuentra en el periplasma, que los transfiere a los residuos de cisteína de MerT, proteína de membrana interna, mediante un mecanismo de intercambio redox (Osborn y col., 1997). Los iones Hg^{2+} se transfieren al par de cisteínas en la parte citoplasmática de MerT, para ser transferidos a un par de cisteínas del dominio terminal de la proteína MerA (una reductasa dependiente de FAD) que transforma el Hg^{2+} en Hg^0 , que es volátil (Osborn y col., 1997). Para la resistencia de compuestos orgánicos de mercurio se necesitan el gen adicional *merB* (**Figura 5B**) necesario para conferir resistencia a compuestos como metilmercurio y fenilmercurio, mediante la hidrólisis del enlace R-Hg para su posterior reducción de Hg^{+2} a Hg^0 por la proteína MerA (Osborn y col., 1997).

3.3. Transposición de resistencia a mercurio

Se han identificado una variedad de transposones que confieren resistencia a mercurio, entre estos, el Tn501, fue aislado del plásmido pVS1 de *P. aeruginosa* (**Figura 6A**) y confiere resistencia en *E. coli*, está formado por los genes *merRTPADE*, es un transposón de espectro reducido, es decir, confiere resistencia a compuestos inorgánicos de mercurio (Endo y col., 2002). Después de Tn501, se conoció el transposón Tn21 del plásmido NR1 de *Shigella flexneri*, contiene dos genes reguladores, *merRD*, y cuatro genes estructurales, *merTPAC*, de estos genes *merC* no es indispensable para la resistencia (**Figura 6B**) (Liebert y col., 1999). Un sistema similar, fue encontrado en el plásmido pdU1358 de *Serratia marcescens*, que contiene el gen *merB* que confiere resistencia

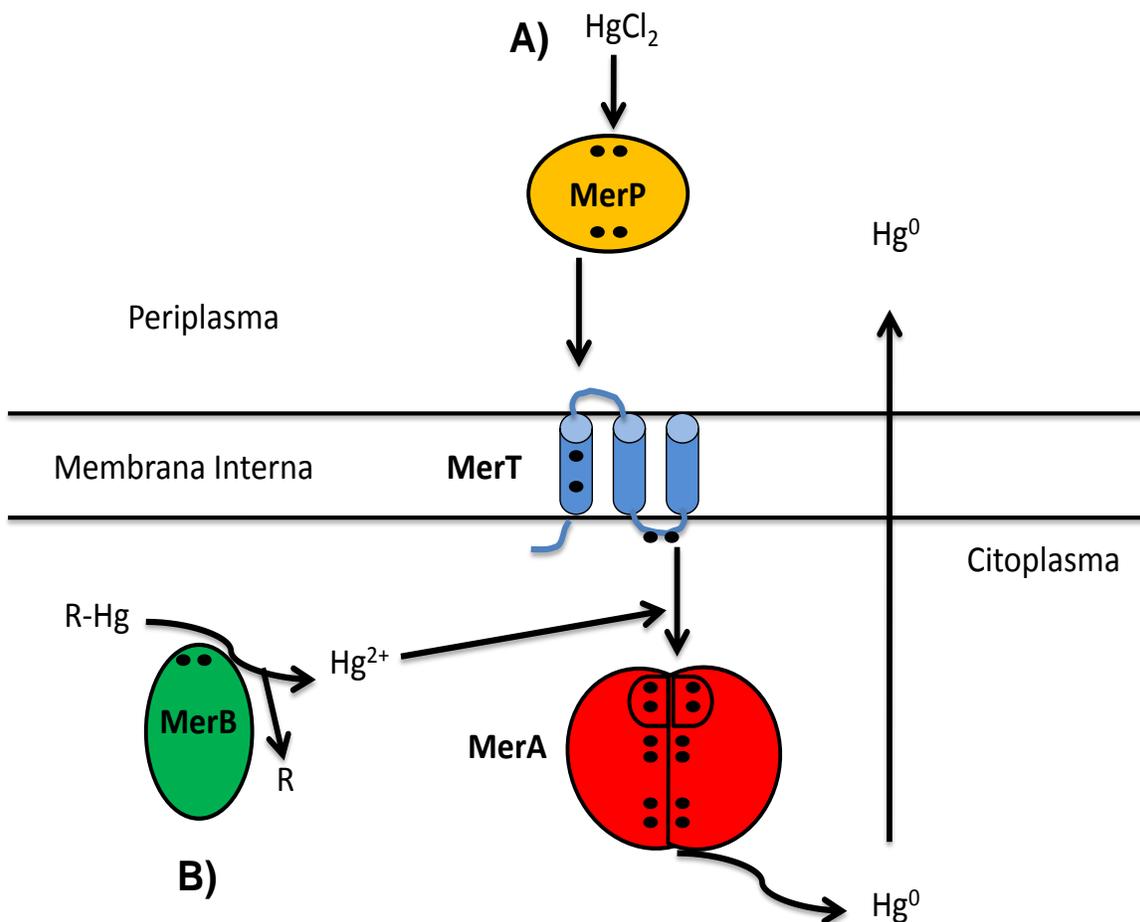


Figura 5. Mecanismos de resistencia a mercurio conferidos por el operón *mer*. **A)** El mecanismo implica la retención inicial de iones de mercurio inorgánico por un par de residuos de cisteína en la proteína MerP en el periplasma, después se pasa a un par de residuos de cisteína (:) en MerT. Los iones Hg^{2+} se transfieren al par de cisteínas en la cara citoplásmica de MerT, antes de ser entregado a un par de cisteínas del dominio amino terminal de la proteína MerA (mercurio reductasa). Los iones de mercurio se transfieren al par de cisteína terminales del carboxilo donde en asociación con las cisteínas del sitio activo donde se reduce a Hg^0 . **B)** La resistencia a compuestos orgánicos es realizada por la proteína MerB mediante la hidrólisis del enlace R-Hg para su posterior reducción a Hg^0 por la proteína MerA (Modificado de Osborn y col., 1997).

a compuestos de mercurio orgánico como el acetato fenil-mercúrico (**Figura 6D**) (Griffin y col., 1987). También, se identificó el transposón Tn5053, dentro del cromosoma de *Xanthomonas* sp. W17 formado por el operón *merRTPFAD*, la transposición se produce por cointegración de *tniABQ* seguido de la resolución del sitio catalizada por el producto del gen *tniR* una recombinasa de la familia resolvasa/invertasa (**Figura 6C**) (Kholodii y col., 1993).

El plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* posee un operón de resistencia a mercurio, *merRTPFADE*, entre genes que codifican elementos móviles, una resolvasa *bin* y una transposasa *tnpA* (**Figura 6E**), además, secuencias invertidas repetidas a los lados, características del transposón Tn3, por lo que se trata de un posible transposón (Ramírez-Díaz y col., 2011). La importancia de los transposones se debe a que son responsables de gran parte de la resistencia natural a los metales pesados y agentes antimicrobianos (Biel y Hartl, 1983).

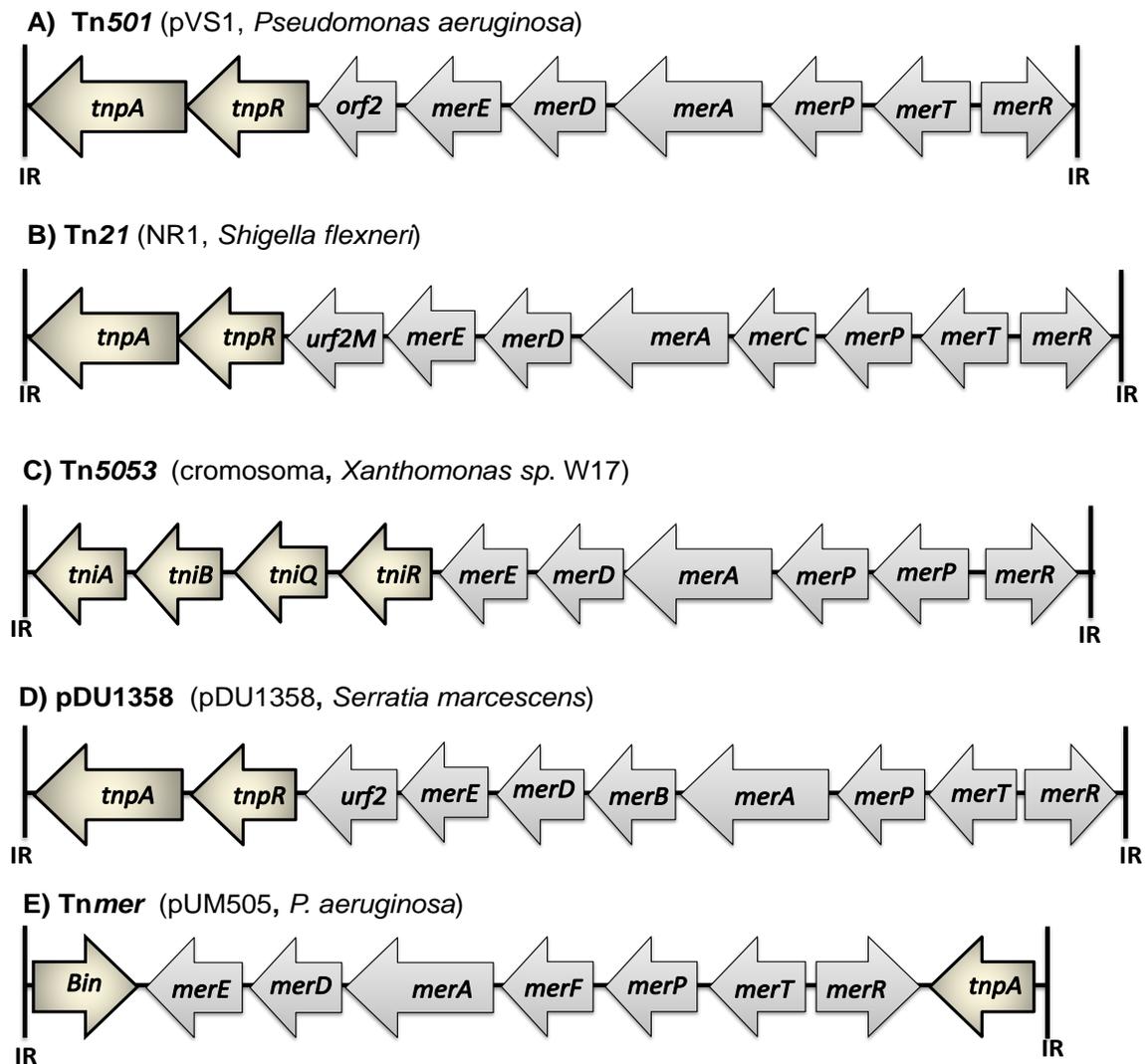


Figura 6. Transposones de resistencia a mercurio. Las flechas representan regiones codificantes y su dirección de transcripción. Las flechas de color claro representan los elementos móviles, *tniA*, *tniB*, *tniQ* y *tnpA*, transposasa y *tnpR*, *TniR* y *Bin*, resolvasa. Las líneas verticales representan secuencias repetidas invertidas (IR). Se indica el nombre del transposón (negritas) y su localización en el genoma y nombre del organismo donde se identificó. (Modificado de Liebert y col., 1999; Ramírez-Díaz y col., 2011).

4. Transposición

La transposición es un proceso espontáneo ampliamente difundido en los organismos por el cual una secuencia de DNA se inserta a sí misma en un nuevo lugar del genoma (Passarge, 2012). Este tipo de secuencia de DNA se denomina transposón (Passarge, 2012).

4.1 Elementos transponibles

Los elementos transponibles son segmentos de DNA capaces de moverse desde una posición a otra en el DNA, es decir “transponerse” o “saltar” desde un sitio determinado hasta otro sitio distinto integrándose en éste (Dale y Park, 2004). Pueden saltar del cromosoma a un plásmido y viceversa o a distintos sitios de la misma molécula de DNA (Dale y Park, 2004). Los elementos transponibles se encuentran tanto en el cromosoma como en los plásmidos (Singleton, 1999).

Los elementos transponibles en las bacterias se dividen en dos clases, en función a su estructura:

Clase I, son de dos tipos: el primero es el elemento más sencillo, llamado secuencia de inserción (IS), que contiene la información genética mínima necesaria para la transposición, consiste en un gen para la transposasa flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas (**IR**) una respecto a la otra (**Figura 7A**) (Mathews y van Holde, 1998). El segundo tipo es denominado transposón compuesto que está formado por determinantes que confieren propiedades adaptativas, como la resistencia a antibióticos, con dos secuencias invertidas repetidas (**IR**) en cada lado (**Figura 7B**) (Mathews y van Holde, 1998).

Clase II, están formados por determinantes que confieren propiedades adaptativas, un gen para la transposasa y un gen para resolvasa (enzima que permite replicar el transposón, así se obtienen dos copias, una de ellas se integra en el DNA blanco y la otra permanece en su sitio original) con dos secuencias repetidas invertidas (**IR**) terminales a los lados (**Figura 7C**) (Mathews y van Holde, 1998).

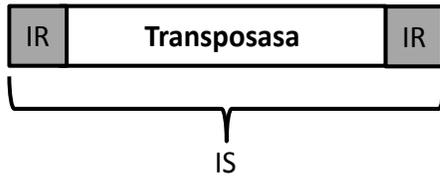
4.2. Mecanismo de transposición

Las secuencias repetidas invertidas que se encuentran en los extremos de los elementos translocables son esenciales para la transposición ya que la transposasa reconoce y se une a ambas secuencias (Madigan y col., 1999). El otro componente esencial es la enzima transposasa, que reconoce estas repeticiones (Madigan y col., 1999).

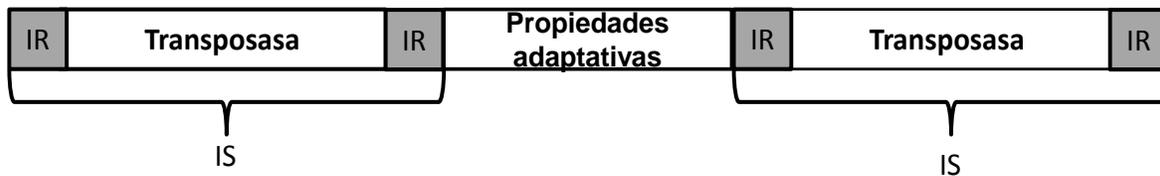
Cuando un elemento transponible se inserta en otra región del DNA (llamado blanco), se duplica una secuencia corta del DNA blanco en el sitio de integración (Madigan y col., 1999). El primer paso es la duplicación de la secuencia blanco surge porque la transposasa origina rupturas monocatenarias (**Figura 8A**) (Madigan y col., 1999). Como segundo paso, el transposón se fija a los extremos monocatenarios que han sido generados y la reparación de estas porciones monocatenaria da como resultado la duplicación (**Figura 8B**) (Madigan y col., 1999). Algunos elementos transponibles reconocen secuencias específicas como DNA blanco, pero otros se pueden insertar prácticamente al azar (Madigan y col., 1999). Se conocen dos mecanismos de transposición; el conservativo y el

Clase I

A) Secuencias de inserción



B) Transposón compuesto



Clase II

C) Transposón



Figura 7. Estructuras de los elementos genéticos transponibles. Los elementos de **clase I** son: **A)** las secuencias de inserción (IS): un gen para la transposasa flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas terminales (IR), y **B)** el transposón compuesto; determinantes implicados en propiedades adaptativas flanqueado por dos IS. Los elementos de **clase II**: **C)** transposón que poseen un gen para la transposasa, determinantes implicados en propiedades adaptativas con dos secuencias repetidas invertidas (IR) terminales (Modificado de Mathews y van Holde, 1998).

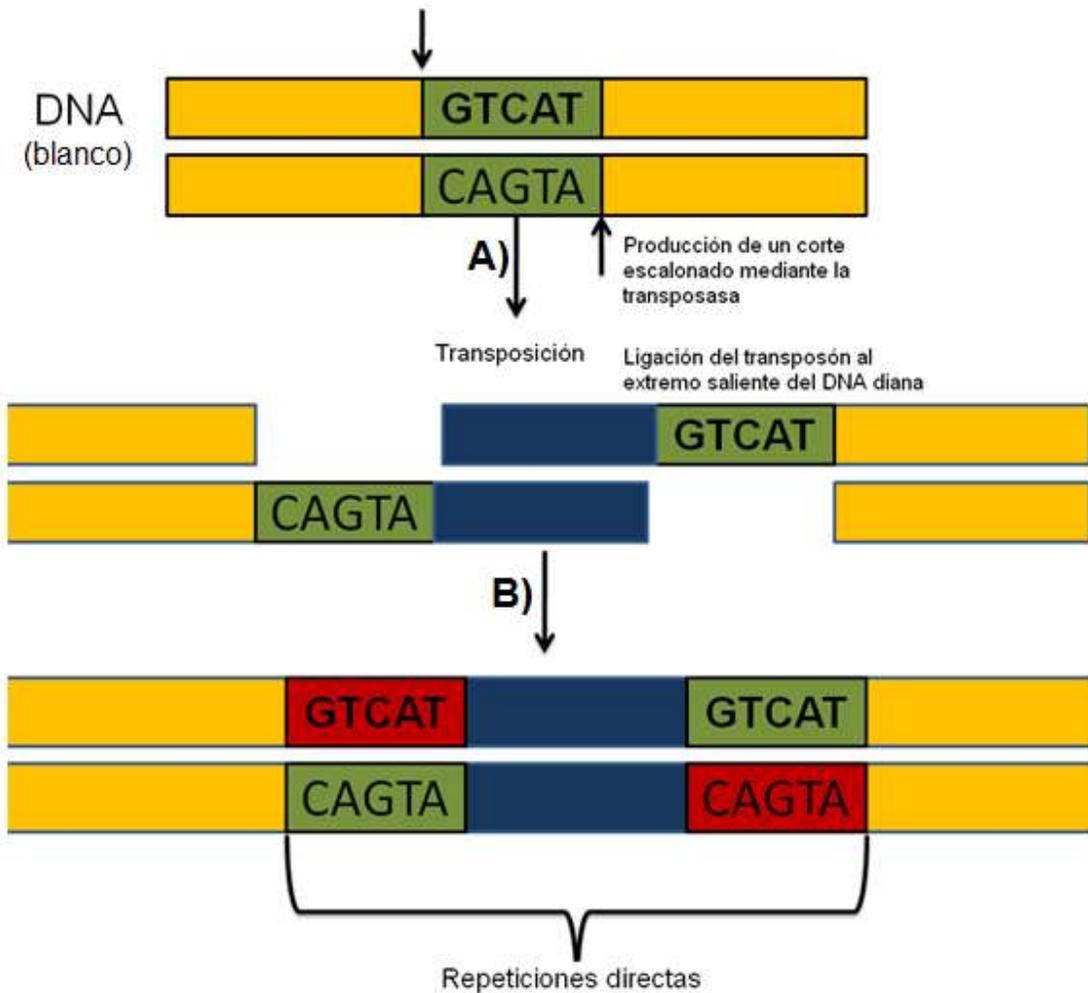


Figura 8. Mecanismo de transposición. **A)** La transposición es originada por la enzima transposasa, quien reconoce las secuencias repetidas y produce los cortes monocatenarios. El transposón se fija a los extremos generados del DNA diana. **B)** Duplicación de las repeticiones directas que flanquean a los transposones. Modificado de Mathews y von Holde, 1990.

replicativo (Madigan y col., 1999). En la transposición conservativa, el elemento transponible se separa de alguna localización en el cromosoma y se reinserta en una segunda localización (Madigan y col., 1999). Por lo tanto permanece solo una copia del transposón (Madigan y col., 1999). Por otra parte en los transposones replicativos la transposición se lleva a cabo por la enzima resolvasa, donde se duplican y la nueva copia se inserta en otra región (Madigan y col., 1999). Tras el proceso completo de transposición replicativa, en el sitio original permanece una copia del elemento y otra copia en el sitio de integración (Madigan y col., 1999).

II. ANTECEDENTES

El análisis de la secuencia del plásmido pUM505, mostro la existencia de elementos genéticos relacionados con la resistencia a metales pesados agrupados en una región llamada isla de resistencia a metales pesados de ~31 kb (Ramírez-Díaz y col., 2011). Los determinantes de resistencia a cromato se localizan dentro de un operón *chrBAC*, flanqueado por genes que codifican para una transposasa (TnpA) y resolvasa (TnpR) formando un posible transposón (**Figura 9A**) (Ramírez-Díaz y col., 2011). La presencia de determinantes de resistencia a cromato en transposones ha sido reportada como en el caso de *O. tritici* 5bv11, que posee el transposón Tn*OtChr* que presenta genes *tnpR* y *tnpA*, que están separados por una región que contiene cuatro genes de resistencia (Branco y col., 2008). También fue identificado un transposón en el plásmido pB4, que contiene una TnpR (resolvasa) y TnpA (transposasa) (Tauch y col., 2003). Esto sugiere que el arreglo de los genes de resistencia cromato de pUM505 puede corresponder a un transposón funcional en *Pseudomonas*.

El plásmido pUM505 también presenta un operón de resistencia a mercurio, *merRTPFADE*, dentro de un transposón con genes que codifican para una resolvasa Bin y una transposasa TnpA (**Figura 9B**), además, una secuencia invertida repetida característica del transposón Tn3, por lo que se trata de un posible transposón (Ramírez-Díaz y col., 2011).

Los sistemas de resistencia a mercurio han sido ampliamente estudiados por ejemplo el transposón Tn501 de *P. aeruginosa* (Misra y col., 1984).

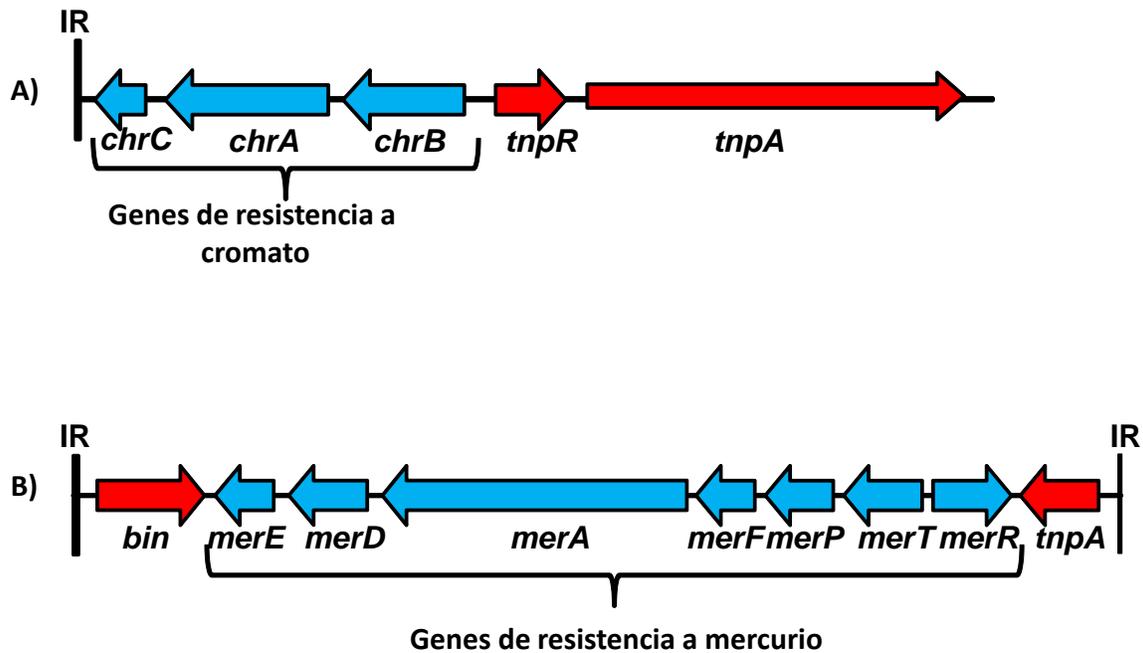


Figura 9. Organización genética de los transposones de resistencia a metales pesados. En las flechas de color azul se indican la dirección de transcripción de los determinantes de resistencia a cromato (A) y mercurio (B). En flecha de color rojo se indican los elementos móviles presentes en transposones, genes que codifican para una transposasa (*tnpA*) y resolvasa (*tnpR* y *bin*). Las (IR) indican las secuencias de repetidas invertidas. Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011.

A pesar de conocerse la funcionalidad de los determinantes de resistencia a cromato y mercurio del plásmido pUM505, no se conoce si estos pueden funcionar como transposones, ya que ambos determinantes de resistencia (cromato y mercurio) presentan elementos móviles (transposasa y resolvasa), además de secuencias invertidas.

Con base en estos antecedentes, se propone determinar la transposición de los determinantes de resistencia a cromato y mercurio del plásmido pUM501.

III. JUSTIFICACIÓN

El plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* posee una isla de resistencia a metales pesados, que contiene determinantes de resistencia a cromo y mercurio, los cuales se localizan entre elementos móviles, formando posibles transposones funcionales. Sin embargo, su capacidad de translocación no se ha analizado.

IV. HIPÓTESIS

Los determinantes de resistencia a cromo y mercurio del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* tienen la capacidad de transponerse.

V.OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si los determinantes de resistencia a cromo y mercurio del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* tienen la capacidad de translocarse.

Objetivos específicos

1. Obtener mutantes de *P. aeruginosa* por translocación de los determinantes de resistencia a cromo y/o mercurio de pUM505
2. Caracterizar las mutantes con los determinantes de resistencia a cromo y/o mercurio.

VI. MATERIALES Y METODOS

1. Medios de cultivo

- a) Caldo Luria (CL): para un litro de agua destilada adicionar, 10 g de NaCl (J.T. Baker), 10 g de peptona caseína y 5 g de extracto de levadura (Bioxon).
- b) Agar Luria (AL): al caldo luria previamente preparado agregar 15 g de agar bacteriológico para un litro (Bioxon).
- c) Caldo Nutritivo (CN): para el litro de agua destilada adicionar 8 g de medio (Bioxon).
- d) Agar Nutritivo (AN): para 1 litro de caldo nutritivo preparado se le adiciona 15 g de agar bacteriológico (Bioxon).

2. Cepas

- *P. aeruginosa* PAO1, no tiene plásmidos, es sensible a estreptomycin y rifampicina (Holloway, 1969), se empleó como célula receptora del vector pUCP20 con los transposones de resistencia a cromato y mercurio.
- *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) (pUCP20) se utilizó para la selección de mutantes con fenotipo cromato resistente Cr^R, mercurio resistente Hg^R y carbenicilina sensible Cb^S.
- *E. coli* JM101 (Yanish-Perron y col., 1985), se utilizó como cepa receptora del vector pUCP20 con el transposón de resistencia a cromato y/o mercurio.
- *E. coli* V517, contiene 8 plásmidos (2.1-56 kb) se empleó como marcador de tamaño molecular de DNA circular (Macrina y col., 1978).

3. Plásmidos

- pUM505, que contiene los transposones de Cr y Hg. Plásmido conjugativo de ~123 kb aislado de una cepa de origen clínico (Ramírez –Díaz y col., 2011) (**Figura 10**).
- pUCP20, este vector se utilizó como receptor de los transposones de resistencia a cromato y mercurio. Contiene un gen de resistencia a ampicilina/carbenicilina, orígenes de replicación para *E. coli* y *Pseudomonas*, así como un sitio de múltiple clonación (West y col., 1994) (**Figura 11**).

4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

La MIC se determinó por el método de dilución en placa de agar mediante el siguiente protocolo: las cepas se crecieron en 4 ml de CN por 18 h a 37 °C con agitación constante de 220 rpm, se realizó una dilución 1:100 en medio fresco y se inocularon 20 µl en placas de AN con concentraciones crecientes de K₂CrO₄ o HgCl₂, las placas se incubaron 24 h a 37°C. El valor de MIC se define como la concentración mínima del metal que inhibe el crecimiento bacteriano.

5. Mutagénesis

La cepa de *P. aeruginosa* (pUM505) (pUCP20) se sembró en 4 ml de CN a 37°C durante toda la noche, se realizaron diluciones de 1x10⁻¹a 1x10⁻⁹con medio fresco, se inoculó en placas de AN y se incubó 18 h a 37°C, para obtener colonias aisladas, que se sembraron por picadura con palillos estériles simultáneamente en placas con AN-Cb (Carbenicilina), AN-Cr (K₂CrO₄), AN-Hg (HgCl₂) y AN. Se

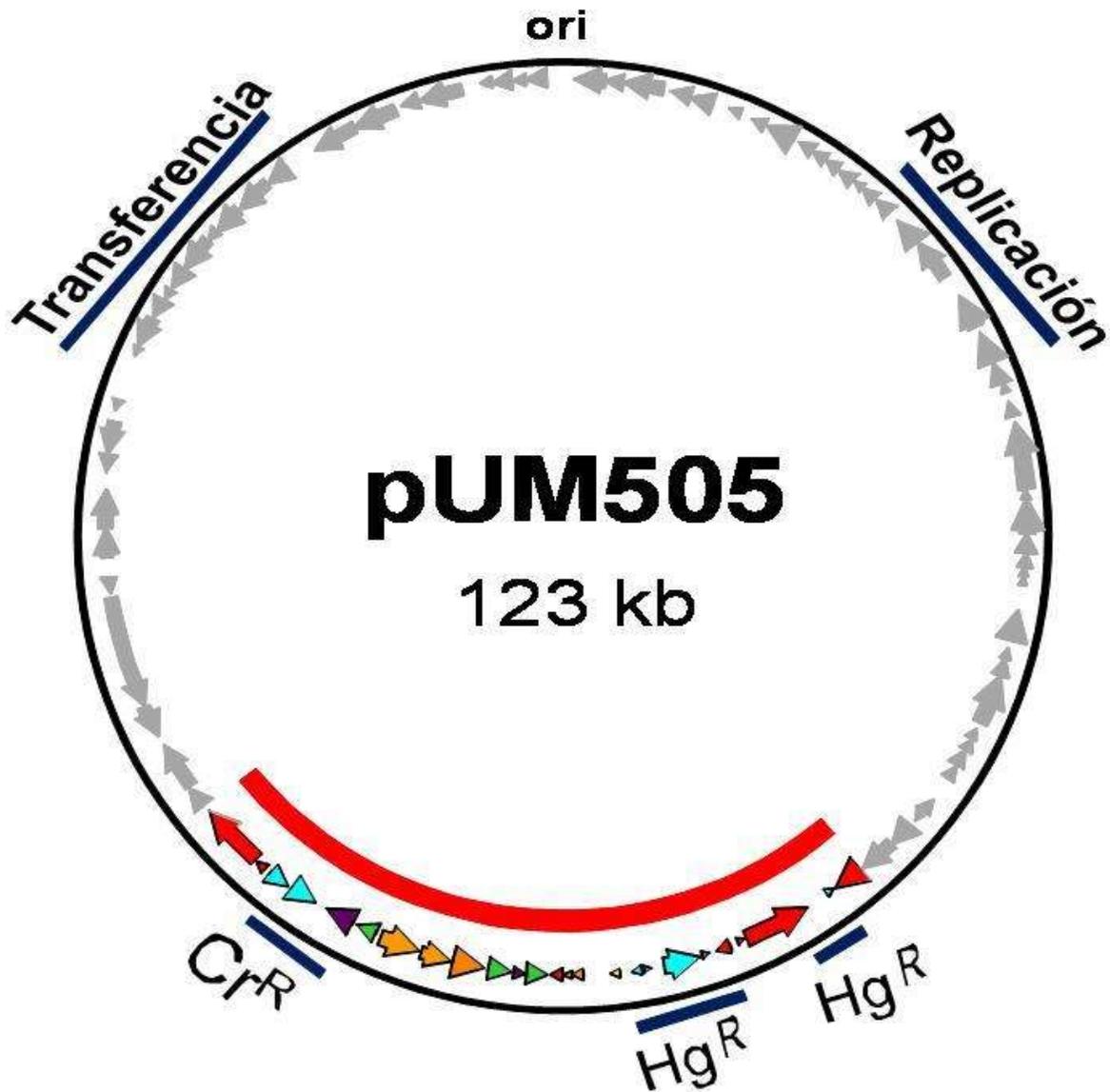


Figura 10. Mapa del plásmido pUM505. Las regiones codificantes se muestran en flechas o puntas de flecha indicando la dirección de transcripción. El origen de replicación se indica (*ori*); contiene regiones codificantes que participan en replicación y transferencia del plásmido. Dentro de la isla de resistencia a metales pesados se encuentran los transposones de resistencia a cromo y mercurio (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).

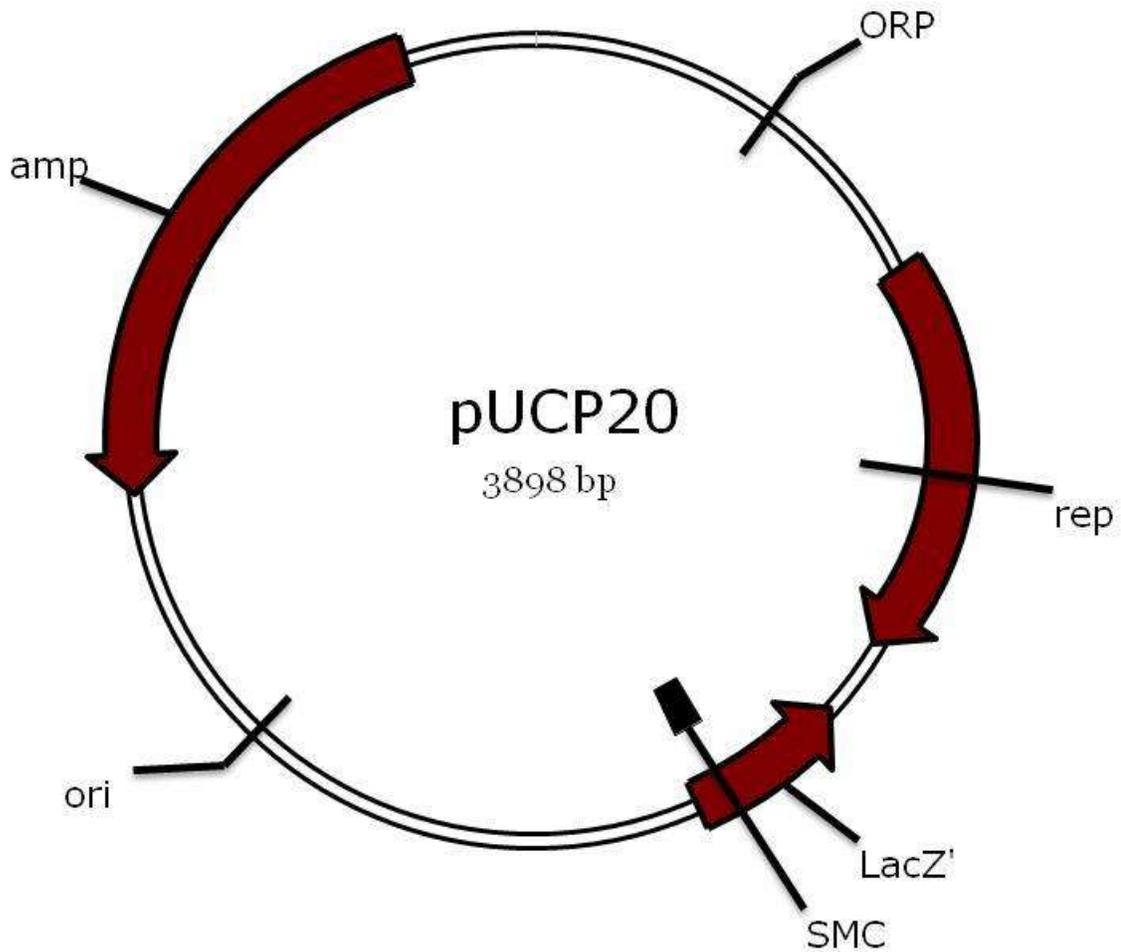


Figura 11. Mapa del vector pUCP20. *amp*, gen de resistencia a ampicilina; *ori* y *ORP*, orígenes de replicación para *E. coli* y *Pseudomonas*, respectivamente, *rep*, gen que codifica para una proteína implicada en la replicación en *Pseudomonas*; *lacZ'*, porción codificante de la β -galactosidasa y SMC, sitio múltiple de clonación (Modificado de West y col., 1994).

incubaron por 24 h a 37°C. Posteriormente se seleccionaron las colonias con un fenotipo Cr^R, Hg^R y Cb^S.

6. Aislamiento de DNA plasmídico

a) Lisis alcalina: El DNA de plásmidos se obtuvo utilizando el método de lisis alcalina (Adaptado de Birnboim y Doly, 1979), de acuerdo al siguiente protocolo: Se creció un cultivo bacteriano en CL durante 18 h a 37°C con agitación constante de 220 rpm, se distribuyó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 2 min a 12000 rpm, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución STE (Sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.0 y EDTA 10 mM, pH 8.0) se le adicionaron 20 µl de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. Posteriormente a la suspensión se le agregó 300 µl de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N y SDS (dodecil sulfato de sodio) 1% [para 1 ml: NaOH 2N:100 µl; SDS 10%: 100 µl; y 800 µl de agua destilada], se agito suavemente y se colocó durante 10 min en hielo. Se le adicionó 200 µl de una solución de acetato de potasio 5 M (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial pH 4.8), se mezcló ligeramente y se colocó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 5 min a 12000 rpm a temperatura ambiente, posteriormente con un palillo estéril se retiraron los restos celulares. Al sobrenadante se le adicionaron 500 µl de fenol:cloroformo (1:1), se mezcló moderadamente, procediendo a centrifugar 10 min a 12000 rpm, recuperándose la fase acuosa superior a la que se adicionó 1 ml de etanol absoluto frio y se mantuvo durante 20 min a -80°C. Se centrifugó durante 15 min a 12000 rpm, el sedimento se lavó 2 veces con 500 µl de etanol al 70% centrifugando durante 3 min entre cada lavado.

Se secó la pastilla a 65°C y se resuspendió en 50 µl de H₂O desionizada estéril o agua HPLC. Se agregó 5 µl de RNAasa e incubó a 37°C durante 30 min, posteriormente se inactivo durante 15 min a 65°C. Las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa (1%).

7. Electroforesis en geles de agarosa

Para llevar a cabo el corrimiento electroforético del DNA plasmídico, se preparó un gel de agarosa (Sigma) a la concentración adecuada de 0.7 % a 1.0% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M), el gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, que contenía el mismo amortiguador. Se mezclaron 7 µl de DNA plasmídico con 2 µl de una solución colorante [azul de bromofenol al 0.05%: EDTA 0.1 M, pH 8.0; SDS 0.5%; sacarosa 40%], y se sometió a corrimiento con un voltaje constante de 125 voltios durante ~30-40 min, empleando una fuente de poder E-C Apparatus Corporation modelo EC452. Como marcador de peso molecular de DNA lineal se utilizó el DNA del fago lambda digerido con la enzima endonucleasa *Hind*III (Promega). Se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min. Se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra.Violet-Products Inc.).

8. Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

Se inocularon 250 ml de CL con 4 ml de cultivo de *E. coli* JM101 crecido a 37°C con agitación constante de 220 rpm durante la noche. Las células se dejaron crecer a 37°C con agitación constante de 220 rpm hasta que alcanzaron una

absorbencia de 0.6 a 590 nm (2-3 h aproximadamente). Posteriormente las células se colocaron en hielo por 20 min y para todos los pasos subsecuentes, tanto las células como el material que se utilizó se mantuvieron a temperatura cercana a 4°C. Las células se cosecharon centrifugando a 6000 rpm durante 10 min a 4°C en una centrifuga BECKMA COULTER. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente y las células obtenidas se lavaran en dos ocasiones con agua desionizada estéril fría, centrifugando a 8000 rpm durante 10 min a 4°C en cada lavado. Las células se resuspendieron en 500 µl de agua destilada con glicerol al 10% estéril y fría, las muestras se guardaron en alícuotas de 250 µl a -80°C.

9. Transformación de células competentes de *E. coli*

La transformación con DNA del plásmido obtenido se realizó mediante el método de electroporacion, que se describe a continuación:

En un tubo eppendorf se mezclaron 100 µl de células competentes con 2 µl de DNA plasmídico. La mezcla se situó entre los electrodos de una celda de electroporacion fría. Se ajustó el micropulso a 1800 V, la celda se colocó en la cámara deslizable de un electroporador 2510 y se dio un pulso de 4-5 milisegundos. Inmediatamente la mezcla se transfirió a un tubo con 2 ml de CL, se incubó a 37°C por 1 h con agitación constante. Se distribuyeron 100 µl del cultivo en cajas de AN adicionadas con 100 µg/ml de ampicilina y 100 µM de HgCl₂.

10. Preparación de células competentes de *P. aeruginosa*

Una caja petri con AL se inoculó con *P. aeruginosa* PAO1 incubando a 37°C por 16 h, almacenando la caja a temperatura ambiente hasta su uso. Se transfirieron

aproximadamente 3 mg de células a un tubo eppendorf con 500 µl de agua desionizada estéril y se resuspendió suavemente en vortex hasta que se formó una mezcla homogénea. Se centrifugó a 12000 rpm en una microcentrifuga por 1 min y se desechó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 500 µl de agua desionizada estéril y se centrifugó a 12000 rpm por 1 min. Se repitió este paso y la mezcla se usó para la transformación por electroporacion.

11. Transformación de células competentes de *P. aeruginosa*

La transformación se realizó mediante el método de electroporacion descrito anteriormente, realizándose la selección de las transformantes en cajas de AN con 150 µM K₂CrO₄ y cajas de AN con 100 µM de HgCl₂.

12. Extracción del DNA en colonia

Las bacterias se crecieron por estriado en medio solido (AL) a 37°C toda la noche. Posteriormente, se tomaron 2 a 3 colonias con palillos estériles y se resuspendieron en 100 µl del agua HPLC en un tubo eppendorf, se calentó en un baño maría a 95°C por 10 min y se enfrió en hielo por 5 min. Se centrifugó por 3 min a 12000 rpm y se tomó del sobrenadante 0.5 µl para las reacciones de PCR.

13. Reacción en cadena de la polimerasa

- Oligonucleótidos utilizados: para las amplificaciones por PCR se utilizaron parejas de oligonucleótidos específicos para los genes *chrA* o *merA* (**Tabla 1**).

- Amplificación: La mezcla de amplificación contenía: 0.5µl de DNA, 1µl de oligonucleótidos (20 pmol/µl), 12.5 µl de PCR Master Mix (Promega) y agua HPLC a un volumen final de 25 µl.
- Las condiciones empleadas para la amplificación de los fragmentos que contienen los genes *chrA* o *merA* se muestran en la **Tabla 2**.

14. Pruebas de susceptibilidad a cromato y mercurio en medio líquido

Se promovió el crecimiento de cepas adicionando 40 µl de cultivo crecido toda la noche a 37°C en tubos con 4 ml de CL y concentraciones crecientes de K₂CrO₄ 0.1 M y HgCl₂ 0.1 M. Los tubos se incubaron durante 22 h a 37°C con agitación constante a 220 rpm y la susceptibilidad se determinó en función a la absorbencia a 590 nm de los cultivos en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de los fragmentos con el gen *chrA* o *merA*.

Gen	Nombre	Dirección 5' →3'	Orientación
<i>chrA</i>	CC-3	GTTACGAGGATCCAACAACGTGAACGCCCCG	Directo
	CC-1	TGGCTTCTGCAGCAAGGTGGATCGGAAACG	Reverso
<i>merA</i>	1D	CATATCGCCATCATTGGCAGC	Directo
	1R	CCTCGATGACCAGCTTGATGAAG	Reverso

Tabla 2. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR de los fragmentos que poseen el gen *chrA* o *merA*.

Condiciones de amplificación (30 ciclos)					
Gen	Desnaturalización	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>chrA</i>	95°C/ 5 min	95°C/ 30 seg	58°C/30 seg	72°C/ 1min 30 seg	72°C/ 5 min
<i>merA</i>			60°C/ 30 seg	72°C/ 1 min	

VII. RESULTADOS

1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Con la finalidad de conocer la susceptibilidad a cromato (K_2CrO_4) y mercurio ($HgCl_2$) de las cepas PAO1, PAO1 (pUCP20) y PAO1 (pUM505/pUCP20) se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC), misma que nos permitió conocer las concentraciones a las cuales se llevó a cabo la selección de colonias mutantes de *P. aeruginosa* (pUM505/pUCP20), como se indica en Materiales y Métodos.

Como resultado de la prueba para K_2CrO_4 , se obtuvo que la cepa de PAO1 presento un MIC de 100 μM , PAO1 (pUCP20) de 50 μM y PAO1 (pUM505/pUCP20) de 200 μM (**Tabla 3A**). Los resultados obtenidos de la prueba con $HgCl_2$ para las cepa PAO1 y PAO1 (pUCP20) fue un valor de un MIC de 0 μM , ya que no presentaron crecimiento en la concentración más pequeña de mercurio empleada; para la cepa PAO1 (pUM505/pUCP20) de 0.4 μM de $HgCl_2$ (**Tabla 3B**). De acuerdo con los resultados obtenidos, las concentraciones a las cuales se realizo la seleccion de las mutantes fueron 150 μM de K_2CrO_4 y 0.1 μM para $HgCl_2$, la concentración seleccionada fue aquella concentración en la cual la cepa receptora utilizada PAO1 fue sensible a ambos iones.

2. Selección de mutantes de *P. aeruginosa* sensibles a carbenicilina

Con el fin de obtener colonias aisladas de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505/pUCP20) con la inserción de los transposones de resistencia a cromato

Tabla 3. Resultados de la prueba de MIC para las cepas de *P. aeruginosa*. (A)

MIC con K_2CrO_4 y **(B)** con $HgCl_2$. (-) ausencia de crecimiento (+), crecimiento mínimo, (++) crecimiento intermedio, (+++) máximo crecimiento.

A)

K_2CrO_4 (μM)	PAO1	PAO1 (pUM505/pUCP20)	PAO1 (pUCP20)
0	+++	+++	+++
50	+++	+++	+++
100	+	+++	-
150	-	+++	-
200	-	++	-

B)

$HgCl_2$ (μM)	PAO1	PAO1 (pUM505/pUCP20)	PAO1 (pUCP20)
0	+++	+++	+++
0.005	+	+++	+
0.01	-	+++	-
0.02	-	+++	-
0.04	-	+++	-
0.06	-	+++	-
0.08	-	+++	-

y/o mercurio en el gen de resistencia a carbenicilina dentro del vector pUCP20, se realizaron diluciones 1×10^{-1} a 1×10^{-9} , empleando las concentraciones de K_2CrO_4 y $HgCl_2$ determinadas en la prueba de MIC. Las diluciones a las cuales se obtuvieron colonias aisladas fueron 1×10^{-7} , 1×10^{-8} y 1×10^{-9} . Se sembraron aproximadamente ~10,000 colonias aisladas de la cepa *P. aeruginosa* (pUM505/pUCP20) por picadura en placas con AN-Cr (agar nutritivo/150 μM K_2CrO_4), AN-Hg (agar nutritivo/ 0.02 μM $HgCl_2$), AN-Cb (agar nutritivo/carbenicilina 400 $\mu g/\mu l$) y AN (agar nutritivo). Se seleccionaron aquellas colonias que presentaron un fenotipo de resistencia a cromato y mercurio pero sensibilidad a carbenicilina, esperando que la pérdida de resistencia al antibiótico fuera debida a la interrupción del gen de resistencia a carbenicilina por inserción de los transposones Tn-*chr*/Tn-*mer*.

Se obtuvieron dos colonias con el fenotipo de resistencia a cromato (Cr^R), resistencia a mercurio (Hg^R) y sensibilidad a carbenicilina (Cb^S), las cuales se nombraron PAO1 (82) y PAO1 (99), a estas mutantes nuevamente se les verifico el fenotipo por medio de pruebas de susceptibilidad en medio líquido a K_2CrO_4 y $HgCl_2$.

3. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes de *P. aeruginosa*

Con el objetivo de evaluar el nivel de susceptibilidad a cromato de las mutantes con fenotipo de sensibilidad a carbenicilina, se realizaron pruebas de susceptibilidad de dicho ión.

Los resultados mostraron que las mutantes con sensibilidad a carbenicilina PAO1 (82) y PAO1 (99) presentaron una resistencia mayor a cromato con respecto del control sensible PAO1 (pUCP20). La resistencia presentada por ambas mutantes fue muy similar a la observada en la cepa resistente PAO1 (pUM505/pUCP20) (**Figura 12**).

4. Pruebas de susceptibilidad a mercurio de las mutantes de *P. aeruginosa*

Para determinar el nivel de sensibilidad a mercurio de las mutantes con fenotipo de sensibilidad a carbenicilina, se realizaron pruebas de susceptibilidad a HgCl₂. Los resultados mostraron que las mutantes PAO1 (82) y PAO1 (99) presentaron un fenotipo de resistencia a mercurio, comparado con el control sensible PAO1 (**Figura 13**).

5. Amplificación de los genes *chrA* y *merA* de las mutantes de *P. aeruginosa*

Para verificar la presencia de los genes de resistencia a cromato y mercurio, en las mutantes seleccionadas se realizó un análisis por PCR. Para amplificar el gen *chrA* se emplearon los oligonucleótidos CC-1 y CC-3 (**Tabla 1**). Para la amplificación de los determinantes de resistencia a mercurio (*merA*), la pareja de oligonucleótidos empleados fueron merA-1D y merA-1R (**Tabla 1**), las regiones de amplificación se muestran en la **Figura 14**.

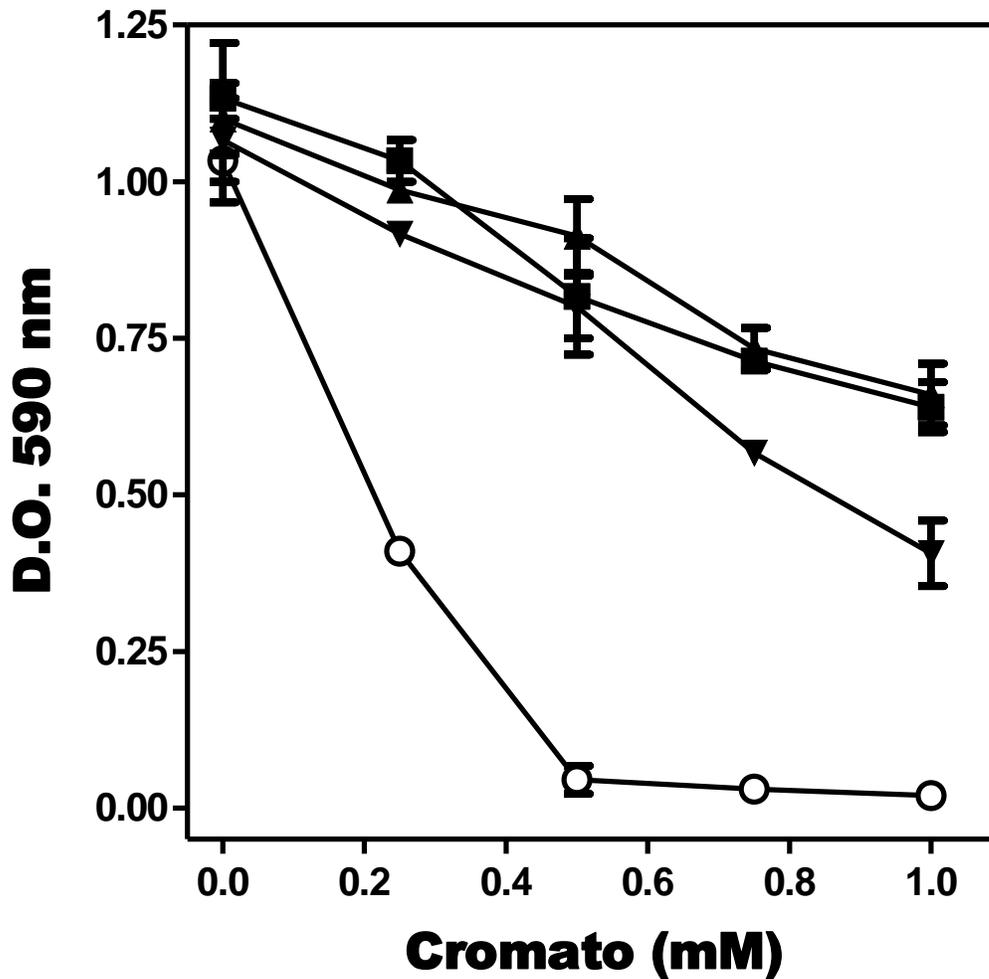


Figura 12. Susceptibilidad a cromato de las mutantes de *P. aeruginosa* (pUCb::*Tnchlmer*). Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo a 37°C por 18 h con las concentraciones de cromato indicadas y agitación constante de 220 rpm. Se determinó la densidad óptica a 590nm de los cultivos. *P. aeruginosa* PAO1 (O), *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505/pUCP20) (■), PAO1 82 (▼) y PAO1 99 (▲). Se muestran las barras de error estándar de la media n=2 (duplicado).

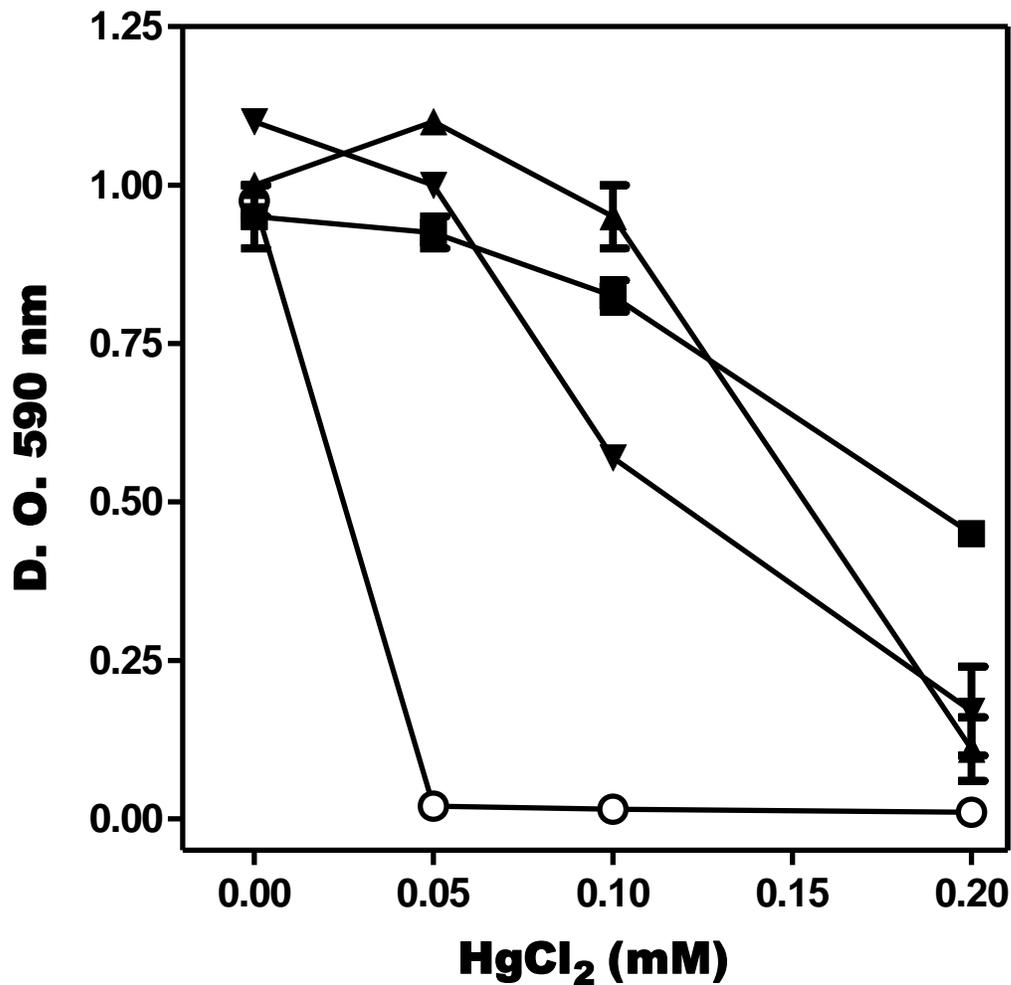


Figura 13. Susceptibilidad a mercurio de las mutantes de *P. aeruginosa* (pUCb::Tnmer/chr). Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo 18 h a 37°C en concentraciones crecientes del ión indicadas y agitación constante 220 rpm. Se determinó la densidad óptica de los cultivos a 590 nm. *P. aeruginosa* PAO1 (O), *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505/pUCP20) (■), PAO1 82 (▼) y PAO1 99 (▲). Se muestran las barras de error estándar de la media n=2 (duplicado).

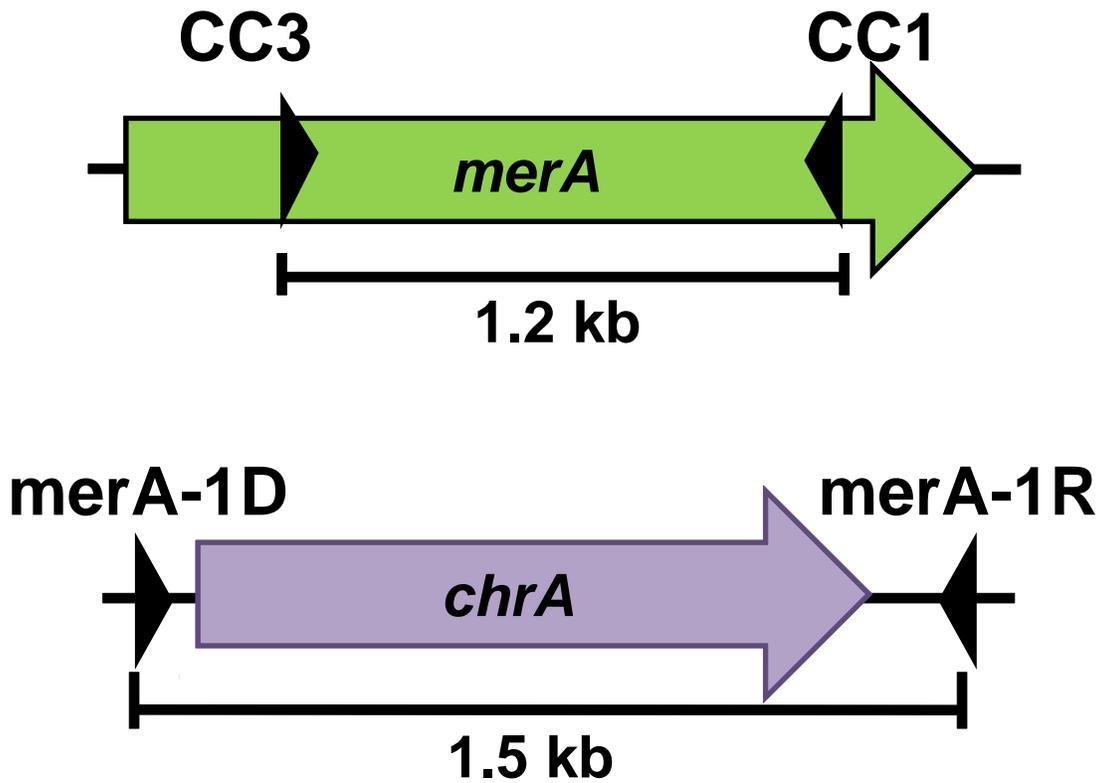


Figura 14. Esquemas de los sitios de amplificación de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes *chrA* y *merA*. Las flechas representan los genes y el sentido de transcripción; las puntas de flecha representan la dirección y sitio de amplificación de los oligonucleótidos. Se indican los tamaños esperado de los fragmentos en kilobases (kb).

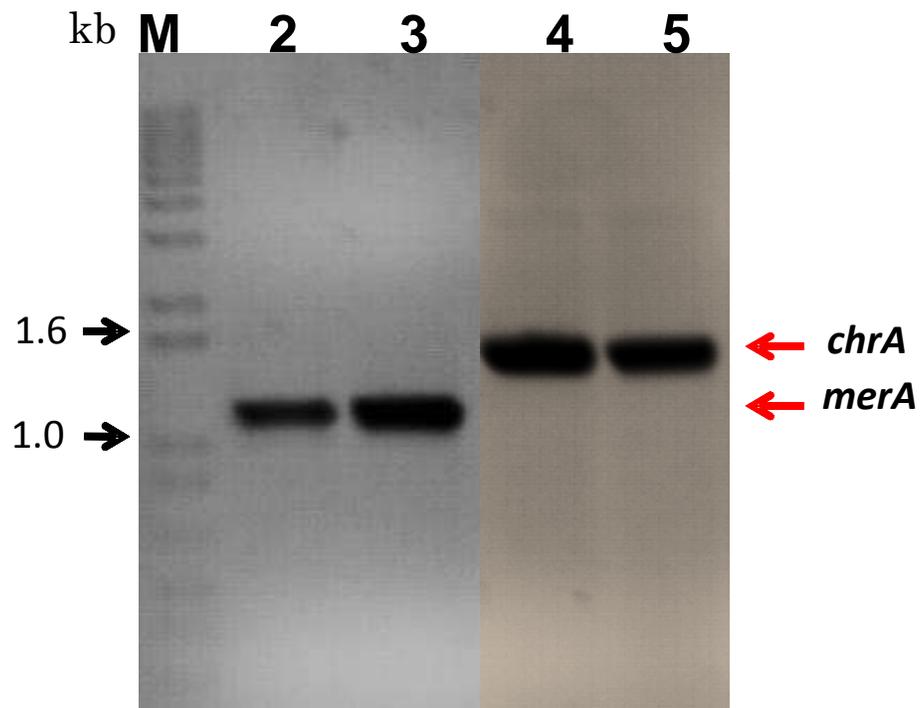


Figura 15. Amplificación por PCR de los genes *chrA* y *merA* de las mutantes de *P. aeruginosa*. Se muestra la fotografía de un gel de agarosa 1%. Carril 1, marcador de 1 kilobase. Carriles 2 y 3 fragmentos de *merA* de 1.2 kb; carriles 4 y 5 fragmentos de *chrA* de 1.5 kb.

Las reacciones se sometieron a corrimiento electroforético, en un gel de agarosa al 1%, para verificar su presencia y tamaño. En la **Figura 15** se muestra la banda de amplificación correspondiente a los genes *chrA* y *merA*.

6. Transferencia del plásmido pUCb::Tn*chr/mer* a *E. coli* JM101

Con el propósito de determinar si el fenotipo obtenido en las mutantes era generado por la inserción de los transposones Tn-*chr* y/o Tn-*mer* en el gen de resistencia a carbencilina del vector pUCP20, se aisló el DNA plasmídico de las mutantes y este fue empleado para transformar cepas de *E. coli*. Las transformantes se seleccionaron en placas de agar nutritivo con HgCl₂ (0.02 µM), debido a que la resistencia a cromato conferida por el gen *chrA* no es funcional en cepas de *E. coli*. Se obtuvo un grupo de 4 transformantes, las cuales se nombraron como JM101 A2, JM101 A3, JM101 B4 y JM101 3D. El DNA de las colonias transformantes se aisló y se sometió a electroforesis en donde se observó una banda en todas cepas de un tamaño aproximado de ~23 kb correspondiente al DNA cromosómico (**Figura 16**); sin embargo, en los carriles 2, 3, 4 y 5 se observó una banda de un tamaño ~35 kb correspondiente probablemente al plásmido recombinante denominado pUCb::Tn*chr/mer* (vector pUCP20 modificado por la transposición de Tn-*chr* y Tn-*mer*). A las transformantes obtenidas se les realizó análisis por PCR para identificar la presencia de *chrA* y pruebas de susceptibilidad a mercurio.

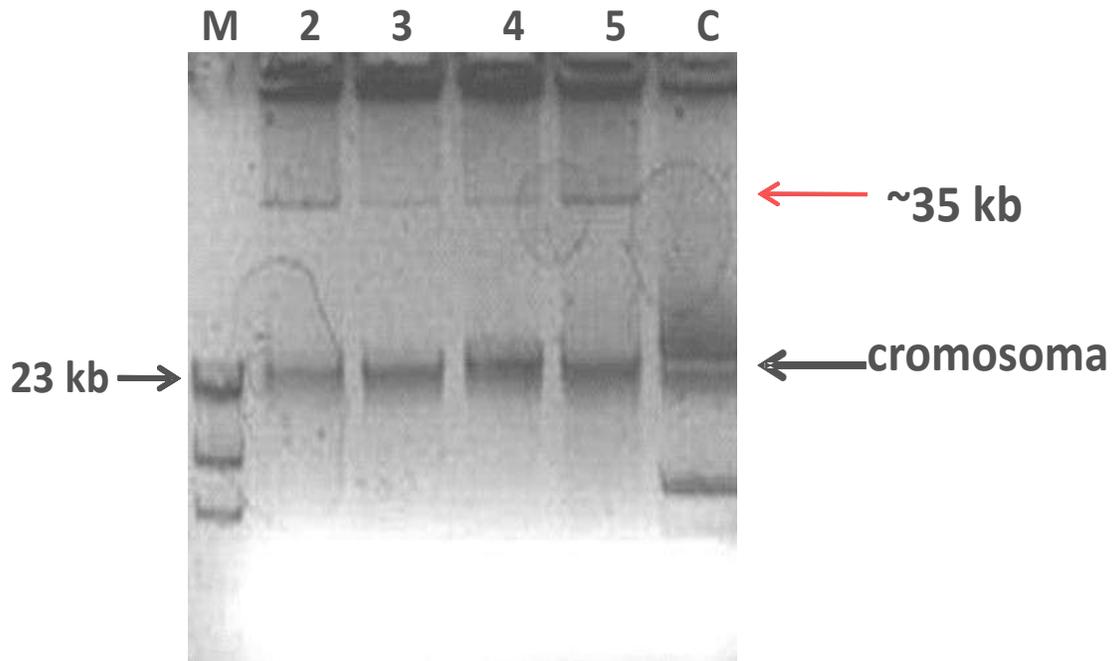


Figura 16. Caracterización de las transformantes de *E. coli* JM101. Se muestra la separación electroforética en gel de agarosa al 0.7% del DNA extraído de las transformantes de JM101 obtenidas. Carril M, marcador de 1 kilobase; carriles 2, 3, 4 y 5, transformantes *E. coli* JM101 (pUCb::Tn*chl/mer*); carril 6, *E. coli* JM101 (pUCP20).

7. Amplificación del gen *chrA* de las transformantes de *E. coli* JM101

Para comprobar que las transformantes obtenidas de *E. coli* presentaban los determinantes de resistencia cromato del plásmido pUCb::Tn*chr/mer*, transferido de las mutantes de *P. aeruginosa*, se realizó un análisis por PCR para amplificar el gen *chrA*, empleando pareja de oligonucleótidos CC-1 y CC-3 (**Tabla 1**). Se amplificó el gen para las 4 colonias transformantes, JM101 A2, JM101 A3, JM101 B4 y JM101 3D, el cual fue sometido a corrimiento electroforético para verificar su tamaño (**Figura 17**). Donde se observó una banda de tamaño aproximado a 1.5 kb, definida en 3 de las 4 transformantes, banda que corresponde a *chrA*.

8. Pruebas de susceptibilidad a mercurio

Para evaluar la participación de los elementos de resistencia a mercurio del plásmido pUCb::Tn*chr/mer* en las transformantes obtenidas de *E. coli* JM101, se realizaron pruebas de susceptibilidad a HgCl₂ en caldo LB. Los resultados se graficaron en % de crecimiento contra concentraciones crecientes de HgCl₂. En la **Figura 18** se muestra la gráfica de susceptibilidad a HgCl₂, como control sensible se empleó la cepa *E. coli* JM101 (pUCP20) y dos de las transformantes JM101 A2 y JM101 3D. Los resultados obtenidos muestran que las cepas transformantes JM101 A2 y JM101 3D presentaron resistencia a HgCl₂ con respecto a la cepa control JM101 (pUCP20).

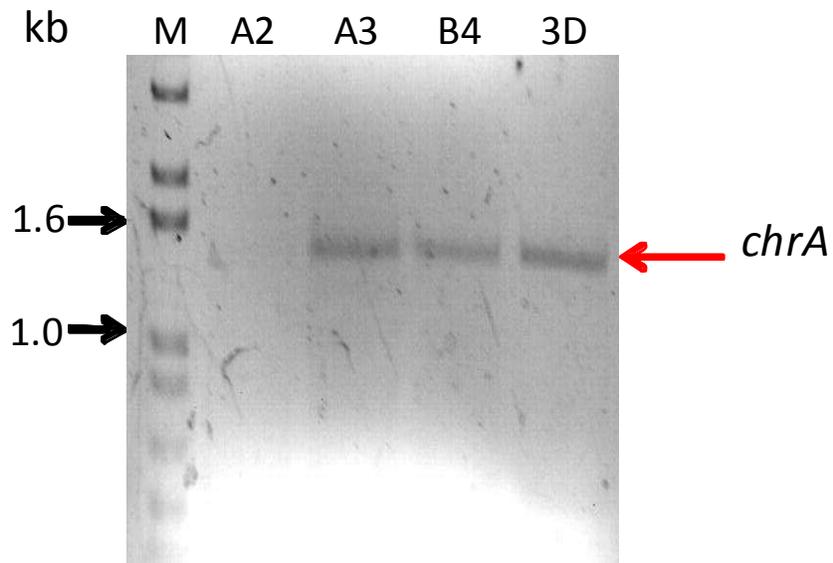


Figura 17. Amplificación del gen *chrA* de las transformantes de *E. coli* JM10.
Electroforesis del gel de agarosa 1%; carril 1, marcador de 1 kilobase y carriles 2, 3, 4 y 5 transformantes pUCb::Tn*chr/mer*.

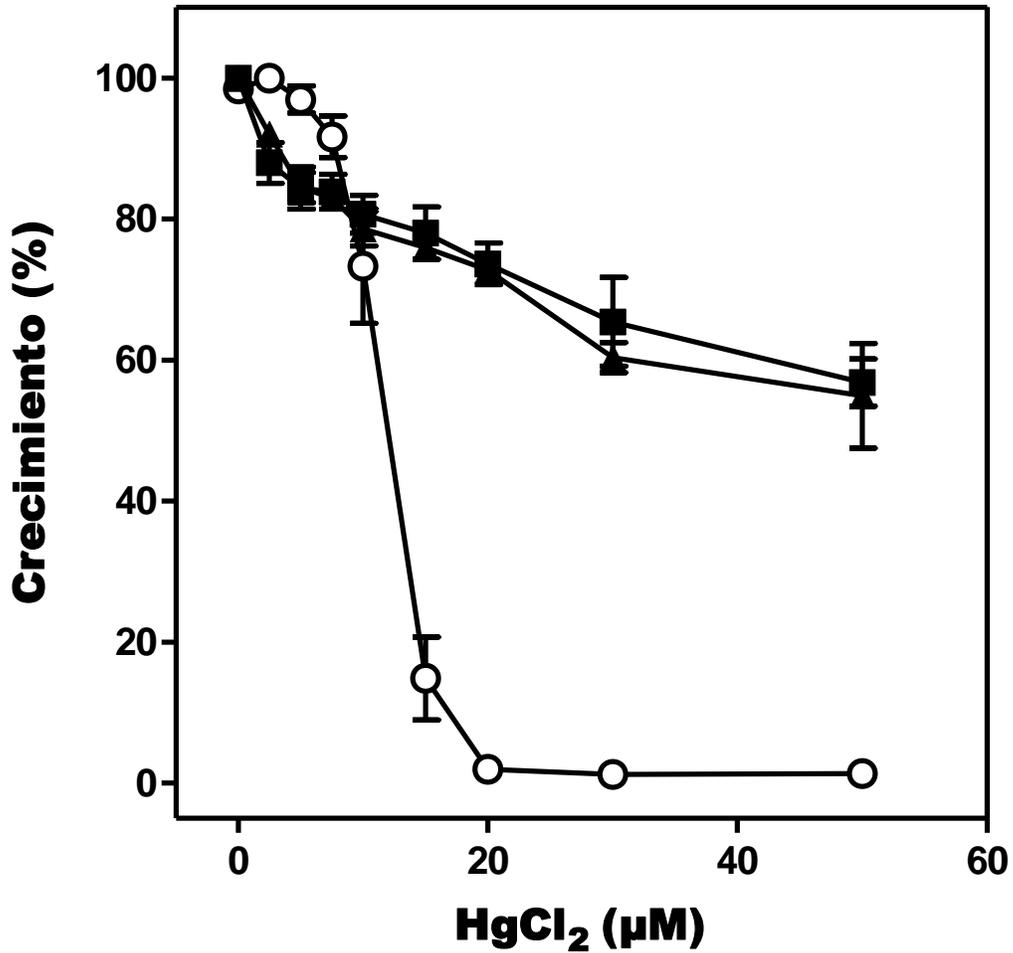


Figura 18. Susceptibilidad a mercurio de las transformantes JM101 (pUCb::Tnchr/mer). Los cultivos se crecieron en CN por 20 h a 37°C y agitación constante. Posteriormente se midió la densidad óptica a 590 nm. Se grafica en % de crecimiento. *E. coli* JM101 (pUCP20) (O), JM101 (A2) (▲) y JM101 (3D) (■). Se muestran las barras de error estándar de la media, n=3 (duplicado).

VIII. DISCUSIÓN

La presencia de metales pesados en altas concentraciones en el medio ambiente ejerce un efecto inhibitorio sobre los microorganismos, esto favorece la selección de cepas resistentes (Cervantes y Silver, 1992). Se han reportado cepas bacterianas resistentes a cromato y mercurio, no solo de origen clínico también de origen ambiental, en las cuales esta resistencia puede estar relacionada con el cromosoma (Mindlin y col., 2002) o con la presencia de elementos móviles como son plásmidos (Cervantes y Silver, 1992; Barkay y col., 1989), elementos IS y transposones (Mindlin y col., 2002). El plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* posee determinantes de resistencia a cromato y mercurio, dentro de una Isla genómica (IGs) llamada isla de resistencia a metales pesados que tiene un tamaño ~31 kb (**Figura 10**), esta región presenta un contenido de G + C de 64 %, mientras que el resto del plásmido y el cromosoma tienen un contenido de G + C de 61 % y 66 %, respectivamente. Esta diferencia sugiere que estos genes tienen un origen diferente y que fueron adquiridos por transferencia horizontal (Ramírez-Díaz y col., 2011). Durante la evolución de las bacterias, la transferencia horizontal de genes de adaptación (que incluye de resistencia a metales) es un factor que favorece la adaptación y emergencia de nuevas especies bacterianas (Hacker y col., 2000).

La resistencia a cromato de pUM505 es conferida por el gen *chrA* que codifica para una proteína de membrana ChrA, que expulsa al cromato a través de un sistema mediado por la energía generada por el potencial de membrana (Pimentel y col., 2002). El gen *chrA* se encuentra acompañado por los genes *chrB* y *chrC*,

dentro de un operón, estos genes se encuentran aledaños al gen *tnpA*, que codifica para una transposasa y el gen *tnpR* que codifica para una resolvasa (**Figura 9**) (Ramírez-Díaz y col., 2011). Los genes *chrBAC* de pUM505 presentan una organización similar a los genes del transposón Tn5719 del plásmido pB4 de *Pseudomonas sp.* el cual también presenta los genes *tnpA* y *tnpR* (Tauch y col., 2003) (**Figura 4**). Las proteínas TnpR y TnpA codificadas en pUM505 presentan un 86% y 66% de identidad, respectivamente, con las proteínas homologas codificadas en pB4 (Ramírez-Díaz y col., 2011); este arreglo estructural sugiere que los genes *chr* de pUM505 pueden formar parte de un transposón funcional.

En la isla de resistencia a metales de pUM505, también se localizaron los genes de resistencia a mercurio dentro de un operón *merRTPFADE*, flanqueado por los genes que codifican para una resolvasa Bin y una transposasa TnpA (Ramírez-Díaz y col., 2011). El primer transposón *mer* caracterizado fue el Tn5053 (Kholodii y col., 1993), el cual aparentemente adquirió el operón *merRTPFAD*, este transposón ha sido relacionado con transposones Tn21 y Tn501 (Kholodii y col., 1995; Brown y col., 1996). Tn5053 cuenta con cuatro genes involucrados en el mecanismo de la transposición *tniA*, *tniB*, *tniQ* y *tniR*. La transposición ocurre vía formación de cointegrados mediada por los productos de los genes *tniABQ*, seguido por una resolución específica del cointegrado que es catalizada por el producto de *tniR* (Kholodii y col., 1995).

El propósito de este trabajo fue determinar la capacidad de translocación de los probables transposones Tn*chr* y Tn*mer* de pUM505. Para determinar esto se obtuvieron mutantes sensibles a carbenicilina (Cb^S) empleando la cepa *P.*

aeruginosa PAO1 (pUM505/pUCP20) y utilizando como presión selectiva el HgCl₂ y K₂CrO₄ en placas de agar nutritivo, para forzar que uno o ambos transposones se translocaran dentro del gen de resistencia a carbenicilina del vector pUCP20.

A las mutantes PAO 82 y PAO 99 obtenidas se les realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato (K₂CrO₄) y mercurio (HgCl₂), con el propósito de determinar si estas mantenían la resistencia a dichos compuestos. Los resultados mostraron que las mutantes PAO 82 y PAO 99 mostraron ser claramente más resistentes a cromato y mercurio que la cepa de *Pseudomonas* que solo posee el vector pUCP20 (**Figuras 12 y 13**), este resultado indica que la mutación solo ocurrió en el gen de resistencia a Cb y que la resistencia a cromato y mercurio es conservada en las mutantes. Sin embargo, este resultado no confirma que la mutación en el gen de Cb hubiera ocurrido por la translocación de alguno de los transposones; pues otra posibilidad es que Tnchr y Tnmer permanecieran en pUM505 y la mutación a Cb hubiera ocurrido por una mutación espontánea. Para descartar esta última posibilidad, el DNA plasmídico de las mutantes fue aislado y empleado para transformar células de *E. coli*. El método de aislamiento empleado permite la obtención de plásmidos con tamaño inferior a 50 kb, por tal motivo el plásmido pUM505 no sería aislado, además se tienen reportes del grupo de trabajo que pUM505 es un plásmido que no puede ser transferido por conjugación a *E. coli*. El aislamiento del DNA plasmídico de las transformantes obtenidas mostro una banda de plásmido de un tamaño ~35 kb, pero este tamaño no corresponde al vector pUCP20 (de 3.9 kb), lo que sugirió que esta banda probablemente pertenece al vector pUCP20 modificado por la transposición de Tn-

chr o Tn-*mer* por lo que dicho plásmido recombinante se denominó pUCb::Tn*chr/mer*. Sin embargo, los transposones Tn-*chr* y Tn-*mer* tienen un tamaño de ~4.8 y 6.5 kb, respectivamente, que al translocarse a pUCP20 darían un plásmido no mayor a 12 kb. Por el tamaño del plásmido observado en las transformantes este resultado sugiere que ambos transposones fueron insertados en el vector, sin embargo, el tamaño del plásmido no sería mayor 16 kb; otra posibilidad es que la isla de resistencia a metales (~31 kb) se integró dando así lugar a un plásmido de ~35 kb. Con el propósito de deducir si uno o ambos transposones fueron integrados en pUCP20, se realizaron pruebas de susceptibilidad a mercurio y la amplificación por PCR del gen *chrA* (ya que el gen no es funcional en *E. coli*) en las transformantes. Los resultados del PCR mostraron que tres de las cuatro transformantes poseen el gen *chrA*, al observar la banda de amplificación del tamaño esperado de 1.5 kb (**Figura 17**), lo que sugiere que estas transformantes poseen el transposón Tn-*chr*. Adicionalmente, las pruebas de susceptibilidad mostraron que las transformantes JM101 A2 y JM101 3D presentan una clara resistencia a mercurio en comparación con la cepa JM101 sin transformar (**Figura 18**). Este resultado indica que las transformantes adquirieron el plásmido pUCb::Tn*chr/mer*, el cual además de poseer el gen de *chrA* de resistencia a cromato y el gen *merA* que confiere resistencia a mercurio, es probable este compuesto por la isla de resistencia a metales de pUM505. La transferencia de IGs entre moléculas de DNA no es un evento raro, por el contrario existe una gran cantidad de IGs para las que se ha demostrado la capacidad de automoverse (Juhas y col., 2009). Se ha descrito que la inserción de lagunas de

las IGs ocurre por un evento de recombinación sitio específica entre regiones de 10 a 20 nt localizados en la molécula blanco y que este proceso es apoyado por integrasas generalmente presentes en las mismas Islas (Ramsay y col., 2006). Por lo tanto, la presencia de ambos determinantes de resistencia en las transformantes y el tamaño del plásmido aislado, sugiere fuertemente que la mutación en el gen de carbenicilina ocurrió por la translocación de la isla de resistencia a metales en lugar de la translocación de cada uno de los transposones de manera independiente.

IX. CONCLUSION

Los determinantes de resistencia a cromato y mercurio del plásmido pUM505 tienen la capacidad de translocarse.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Ackerley, D. F., Gonzalez, C. F. Park, C. H., Blake II, R., Keyhan, M. y Matin, A. (2004). Chromate-Reducing Properties of Soluble Flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 873-882.
2. Aguilar-Barajas, E., Paluscio E., Cervantes, C. y Rensing, C. (2008). Expression of chromate resistance genes from *Shewanella sp.* strain ANA-3 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 285: 97-100.
3. Álvarez, A.H., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes, C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 181: 7398-7400.
4. Barkay, T., Liebert, C. y Gillman, M. (1989). Environmental Significance of the Potential for *mer*(Tn21)-Mediated Reduction of Hg^{2+} to Hg^0 in Natural Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1196-1202.
5. Barkay, T., Miller, S. M. y Summers, A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *Microbiol. Rev.* 27: 355-384.
6. Biel, S. W. y Hartl, D. L. (1983). Evolution of transposons: natural selection for Tn5 in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 103: 581-592.
7. Branco, R., Chung, A. P., Johnston, T., Gurel, V., Morais, P. y Zhitkovich A. (2008). The chromate-Inducible *chrBACF* operon from the transposable element TnOtChr confers resistance to chromium (VI) and superoxide. *J. Bacteriol.* 190: 6996-7003.

8. Broussard, L.A., Hammett-Stabler, C. A. y Winecker, R.E. (2002). The toxicology of mercury. *Lab. Med.* 33: 614-625.
9. Brown, N. L., Misra, T. K., Winnie, J. N., Schmidt, A., Seiff, M. y Silver, S. (1986). The nucleotide sequence of the mercuric resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: further evidence for *mer* genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol. Gen. Genet.* 202: 143-151.
10. Brown, N.L., Shinh, Y. C. Leang, C. Glendinning, K. J., Hobman, J. L. y Wilson, J. R. (2002). Mercury transport and resistance. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 715-718.
11. Cabisco, E., Tamarit, J. y Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacterial and protein damage by reactive oxygen species. *Internal. Microbiol.* 3: 3-8.
12. Cervantes, C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T y Silver, S. (1990). Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant de *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* 172: 278-291.
13. Cervantes, S. y Silver, S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27: 65-71.
14. Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C. y Moreno Sánchez. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 335-347.

15. Dale, J. W. y Park, S. F. (2004). Molecular genetics of bacteria. Wiley. Fourth edition. p. p. 192-200.
16. Endo, G., Narita, M., Huang, C. y Silver, S. (2002). Microbial heavy metal resistance transposons and plasmids: potencial use for environmental biotechnology. *J. Environ. Biotechnol.* 2: 71-82.
17. Gadd, G. M. y Griffiths, A. J. (1978). Microorganisms and Heavy Metal Toxicity. *Microbial Ecol.* 4: 303-317.
18. Gochfeld, M. (2003). Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. *Ecotox. Environ. Safe.* 56: 174-179.
19. Griffin, H. G., Foster, T. J., Silver, S. y Misra, T. K. (1987). Cloning and DNA sequence of the mercuric- and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. *Biochemistry* 84: 3112-3116.
20. Hacker, J., Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 641-679.
21. He, M., Li, X., Guo, L., Miller, S. J., Rensing, C. y Wang, G. (2010). Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus*. *BMC Microbiology* 10: 221-230.
22. Henne, K. L., Nakatsu, C. H., Thompson, D. K. y Konopka, A. E. (2009). High-level chromate resistance in *Arthrobacter* sp. Strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes. *BMC Microbiol.* 9:199-212.
23. Holloway, BW. (1969). Genetics of *Pseudomonas*. *Bacteriol. Rev.* 33: 419-43.

24. Ishibashi, Y., Cervantes, C. y Silver, S. (1990). Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2268-2270.
25. Juhnke, S., Peitzsch, N., Grobe, C. y Nies, D.H. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch. Microbiol.* 179: 15-25.
26. Juhas, M., Van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., Crook, D.W. (2009), Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 33: 376-393.
27. Kadiiska, M.B., Xiang, Q-H. y Mason, R.P. (1994). In vivo free radical generation by chromium (VI): an electron spin resonance spin-trapping investigation. *Chem. Res. Toxicol.* 7: 800-805.
28. Katz, S. A. y Salem, H. (1993). The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* 13: 217-224.
29. Kawanishi, S., Inoue, S. y Sano, S. (1986). Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (IV) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 261: 5952-5958.
30. Kholodii, G. Ya., Yurieva, O.V., Lomovskaya, O.L., Gorlenko, Zn.M., Mindlin, S.Z. y nikiforov, V.G. (1993). Tn5053, a mercury resistance transposon with integron's ends. *J. Mol. Biol.* 230: 1103-1107.
31. Kholodii, G. Ya., Mindlin, S. Z., Bass, I.A., Yurieva, O. V., Minakhina, S. V. y Nikiforov, V. G. (1995). Four genes, two ends, and a *res* region are involved in transposition of Tn5053: a parading for a novel family of transposons carrying either a *mer* operon or an integrin. *Mol. Microbiol.* 17: 1189-1200.

32. Lepora, N. (2005). Chromium. Juvenile Nonfiction. p.p. 20-25.
33. Liebert, C. A., Hall, R. M. y Summers, A. O. (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 507-522.
34. Liebert, C. A., Watson, A. L. y Summers, A. O. (2000). The quality of *merC*, a module of the *mer* mosaic. *J. Mol. Evol.* 51: 607-622.
35. Losi, M. E., Amrhein, C. y Frankenberger, W. T. Jr. (1994). Environmental biochemistry of chromium. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 136: 91-121.
36. Ma, Y-F., Wu, J-F., Wang, S-Y, Jiang, Y., Qi, S-W., Liu, L., Zhao, G-P. y Lui, S-J. (2007). Nucleotide sequence of plasmid pCNB1 from *Comamonas* strain CNB-1 reveals novel genetic organization and evolution for 4-chloronitrobenzene degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4477-4483.
37. Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (1999). Brock Biología de los Microorganismos. 8ª. Edición. Ed. Prentice Hall. pp. 306, 338-342, 374, 375.
38. Mathews, C. K. y van Holde, K. E. (1998). Bioquímica. 2ª. Edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp. 255-257, 1001-1003, 1037-1042.
39. McGrath, S. P. y Smith, S. (1990). Chromium and nickel. En: Heavy Metals in Soils. Alloway, B. J. (Ed.) Wiley, Nueva York. pp. 125-150.
40. Mindlin, S. Z., Bass, I. A., Bogdanova, E. S., Gorlenko, Zh. M., Kalyaeva, E. S., Petrova, M. A. y Nikiforov, V. G. (2002). Horizontal Transfer of Mercury Resistance Genes in Environmental Bacterial Populations. *Mol. Biol.* 36: 160-170.

41. Miranda, A. T., González, M. V., González, G., Vargas, E., Campos-García, J. y Cervantes, C. (2005). Involvement of DNA helicases in chromate resistance by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mutat. Res.* 578: 202-209.
42. Misra, T. K., Brown, N. L., Fritzing, D. C., Pridmore, R. D., Barnes, W. M. Haberstroh, L. y Silver, S. (1984). Mercuric ion-resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: the beginning of the operón including the regulatory region and the first two structural genes. *Biochemistry* 81: 5975-5979.
43. Misra, T. K. (1992). Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid* 27: 4-16.
44. Morel, F.M., Kraepiel, A. M.L. y Amyot, M. (1998). The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu. Rev. Ecol.* 29:543-566.
45. Nascimento A. M. A. y Chartone-Souza, E. (2003). Operón *mer*. Bacterial resistance to mercury and potencial for bioremediation of contaminated environments. *Genet. Mol. Res.* 2: 92-101.
46. Nieboer, E. y Richardson, D. H. S. (1980). The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.* 1: 3-26.
47. Nies, D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 730-750.
48. Nies, D.H. (2004). Metals and their compounds in the environment. Part II. Anke, K., Ihnat, M., Stoepler, M. (Eds). The elements: Essential and toxic effects on microorganisms, Weinheim.

49. Nies, D. H., Nies, A., Chu, L. y Silver S. (1989). Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7351-7355.
50. Nies, D. H., Nies, A. y Silver S. (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265: 5648-5653.
51. Nies, D.H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. y Saier, M.H. (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180: 5799-5802.
52. Ohta, H., Galsworth, P.R. y Pardee, A.B. (1971). Genetics of sulfate transport in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 105: 1053-1062.
53. Ohtake, H., Cervantes, C. y Silver, S. (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 169: 3853-3856.
54. Osborn, A. M., Bruce, K. D., Strike, P. y Ritchie, D. A. (1997). Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiol. Rev.* 19: 239-262.
55. Pardee, A. B., Prestidge, L. S., Whipple, M. B. y Dreyfuss, J. (1966). A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 241: 3962-3969.
56. Passarge, E. (2012). Color atlas of genetics. Thieme. 4th. edition, revised and updated. p.p. 235-295.

57. Pimentel, B.E., Moreno-Sánchez, R. y Cervantes, C (2002). Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 212, 249-254.
58. Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H. Campos-García, J. y Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21: 321-332.
59. Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V., Johnstone, L., Cervantes, C. y Rensing, C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid* 66: 7-18.
60. Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Pérez, C, Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J. y Cervantes, C. (2007). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21: 321-332.
61. Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Stuart, G.S., Lamont, I.L., Ronson, C.W. (2006). Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol. Microbiol.* 62: 723–734.
62. Shi, X. y Dalal, N. S. (1990). On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 342-350.
63. Singleton, P. (1999). Bacteria in biology, Biotechnology and medicine. 5a. edición. Ed. John Wiley & Sons. pp. 161-171.

64. Tauch, A., Schlüter, A., Bischoff, N. y Goesmann, A. (2003). The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 β . *Mol. Gen. Genomics* 268: 570-584.
65. Vasconcelos-Morais, P., Branco, R. y Romeu, F. (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bv11 a strain highly resistant. *Biometals* 24: 401-410.
66. Visick, J. E. y Clarke, S. (1995). Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. *Mol. Microbiol.* 16: 835-845.
67. Wang, Y., Moore, M., Levison, H. S., Silver, S., Walsh, C. y Mahler, I. (1989). Nucleotide Sequence of a Chromosomal Mercury Resistance Determinant from a *Bacillus* sp. With Broad-Spectrum Mercury Resistance. *J. Bacteriol.* 171: 83-92.
68. Wilson, J. R., Leang, C., Morby, A. P., Hobman, J. L. y Brown, N. L. (2000). MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters?. *FEBS Letters.* 472: 78-82.
69. Wurster, S. y Hartl, D. L. (1983). Evolution of Transposons: Natural selection for Tn5 in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 103: 581-592.