



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

**“Contribución de los genes *chr* en la resistencia a cromato de
Burkholderia xenovorans LB400”**

TESIS

Para obtener el grado de: Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Rosa Isela Reyes Gallegos

Asesora:

D.C. Martha Isela Ramírez Díaz

Co-asesor:

D.C. Carlos Cervantes Vega

Morelia, Michoacán, Diciembre 2015

ESTE TRABAJO SE REALIÓ EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORIA DE LA D.C. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ Y COASESORIA DEL D.C. CARLOS CERVANTES VEGA.

EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

INDICE

RESUMEN -----	9
ABSTRACT -----	10
I. INTRODUCCIÓN -----	11
1. Cromo -----	11
2. Transporte de cromo-----	12
3. Toxicidad del cromo-----	14
4. Mecanismos de resistencia bacteriana a cromato-----	15
5. Superfamilia de proteínas CHR-----	17
6. <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400-----	19
II. ANTECEDENTES -----	23
III. JUSTIFICACIÓN -----	28
IV. HIPOTESIS -----	28
V. OBJETIVO GENERAL -----	29
VI. OBJETIVOS PARTICULARES -----	29
VII. MATERIALES Y METODOS -----	30
1. Medios de cultivo-----	30
2. Cepas-----	31
3. Plásmidos-----	31
4. Determinación de la concentraciones mínima inhibitoria (MIC)-----	31
5. Aislamiento de DNA plasmídico-----	35
a) Lisis alcalina-----	35

6. Aislamiento de DNA de colonia-----	37
7. Electroforesis en geles de agarosa-----	37
8. Reacción en cadena de la polimerasa-----	38
9. Restricción con endonucleasas-----	38
10. Preparación de células competentes de <i>B. xenovorans</i> -----	38
-	
11. Transformación de células competentes de <i>B. xenovorans</i> -----	40
12. Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> -----	41
13. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> -----	41
14. Pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido-----	42
15. Cuenta viable-----	42
VIII. RESULTADOS -----	43
1. Determinación de concentración mínima inhibitoria -----	43
2. Selección de las cepas de <i>Burkholderia xenovorans</i> cromato sensibles--	43
3. Transformación de las cepas <i>B. xenovorans</i> Cr ^S con los genes <i>chr</i> -----	46
4. Pruebas de susceptibilidad a cromato-----	46
5. Determinación de la cuenta viable-----	51
6. Construcción del plásmido de integración para la interrupción del gen <i>chrA2</i> -----	51
7. Interrupción del gen <i>chrA2</i> -----	55
8. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes LB400 <i>chrA2::Gm</i> -----	55

9. Transformación de la mutante LB400 <i>chrA2::Gm</i> con los genes <i>chr</i> silvestres de los replicones adaptativos-----	58
IX. DISCUSIÓN -----	62
X. CONCLUSIÓN -----	70
XI. BIBLIOGRAFIA -----	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia a cromo en bacterias-----	13
Figura 2. Expulsión de cromato por la proteína ChrA de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -----	16
Figura 3. Análisis filogenético de las proteínas bidominio LCHR y pares de proteínas monodominio SCHR-----	18
Figura 4. Esquema de los replicones de <i>B. xenovorans</i> LB400-----	20
Figura 5. Susceptibilidad a cromato de <i>B. xenovorans</i> LB400-----	24
Figura 6. Pruebas de susceptibilidad a cromato de transformantes de <i>E. coli</i> con los genes <i>B. xenovorans</i> LB400-----	25
Figura 7. Expresión relativa de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> durante la fase exponencial-----	27
Figura 8. Mapa del vector pBSL141-----	33
Figura 9. Mapa del vector pAC_chxA2-----	35
Figura 10. Construcción del plásmido pAC_chxA2::Gm-----	47
Figura 11. Susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>B. xenovorans</i> Cr ^S ---	48
Figura 12. Caracterización de las transformantes de CAC-124 con los genes <i>chr</i> de LB400-----	49
Figura 13. Susceptibilidad a cromato en medio rico de las transformantes de <i>B. xenovorans</i> CAC-124 con los genes <i>chr</i> de LB400-----	50
Figura 14. Viabilidad de <i>B. xenovorans</i> LB400 y CAC-124-----	52
Figura 15. Viabilidad de las transformantes de <i>B. xenovorans</i> CAC-124 con	

los genes <i>chr</i> de LB400-----	53
Figura 16. Construcción del plásmido pAC_chxA2::Gm -----	54
Figura 17. Caracterización de las colonias de LB400 interrumpidas en el gen <i>chrA2</i> -----	56
Figura 18. Susceptibilidad a cromato de las mutantes <i>chrA2::Gm</i> de <i>B.</i> <i>xenovorans</i> LB400-----	57
Figura 19. Susceptibilidad a cromato de las mutante <i>chrA2::Gm</i> transformada con los genes <i>chr</i> de los replicones adaptativos de LB400-----	59
Figura 20. Susceptibilidad a cromato de las transformantes con los genes <i>chr</i> del cromosoma 1 de LB400-----	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de <i>Burkholderia xenovorans</i> cromato sensibles (Cr ^S)-----	32
Tabla 2. Cepas de <i>E. coli</i> con los plásmidos recombinantes de los genes <i>chr</i> -----	35
Tabla 3. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR-----	39
Tabla 4. MIC de cromato para cepas de <i>B. xenovorans</i> -----	44
Tabla 5. MIC de carbenicilina para cepas de <i>B. xenovorans</i> -----	45

Resumen

ChrA es una proteína hidrofóbica que expulsa cromato de forma dependiente del potencial de membrana. Homólogos bacterianos de ChrA se agrupan dentro de la superfamilia CHR de transportadores de cromato. Se clasifican de acuerdo a su tamaño en proteínas monodominio o SCHR (200 aa) y proteínas bidominio o LCHR (400 aa). *Burkholderia xenovorans* LB400, una bacteria resistente a cromato, posee 9,043 genes distribuidos en tres replicones: Cromosoma 1, Cromosoma 2 y Megaplásmido. Su genoma posee genes *chr* que codifican cuatro proteínas LCHR y dos parejas SCHR. Los genes *chr* clonados y transferidos a *Escherichia coli* confirieron resistencia a cromato, dependiendo de las condiciones del cultivo, sugiriendo que la expresión de los genes *chr* es regulada por sulfato. El análisis por RT-qPCR de los genes *chr* en LB400 mostró que se expresan diferencialmente y que el sulfato no regula su expresión. El gen *chrA2*, codificado en el megaplásmido, fue el único gen *chr* cuya expresión fue inducida por cromato sugiriendo que éste es el más importante para el fenotipo de resistencia a cromato de LB400. El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de los genes *chr* en la resistencia a cromato de *B. xenovorans* LB400. Primeramente se determinó la susceptibilidad a cromato de un grupo de cepas de *B. xenovorans*, seleccionando a la cepa CAC-124, altamente sensible a cromato, como receptora de los genes *chr*. La transferencia de cada uno de los genes *chr* mostró que los genes de los replicones adaptativos (*chr A1b* y *chr1NCb*, del cromosoma 2 y *chrA2*, del megaplásmido) confieren un mayor nivel de resistencia a cromato que los genes *chr* del cromosoma central (*chrA1a*, *chrA6* y *chr1NCa*), siendo el gen *chrA2* el que confirió el mayor nivel de resistencia. Al generar la interrupción del gen *chrA2* en *B. xenovorans* LB400, esta cepa fue altamente sensible a cromato comparado con la cepa LB400 silvestre. Al transferir el gen *chrA2* silvestre a la cepa interrumpida, el fenotipo de resistencia a cromato fue restaurado, mientras que la transferencia de los genes *chrA1* y *chr1NCb* solo permitieron restaurar parcialmente la resistencia a cromato. Esto permitió confirmar que el gen *chrA2*, localizado en el megaplásmido, es el gen principal en la resistencia a cromato de *B. xenovorans* LB400.

Palabras claves: Superfamilia, megaplásmido, adaptativos, transformantes, nivel.

ABSTRACT

CHRA is a hydrophobic protein that expels chromate dependently membrane potential. CHRA bacterial homologous are grouped within the CHR chromate transporter superfamily. They are classified according to their size in single-domain proteins or SCHR (200 aa) and bidominio proteins or LCHR (400 aa). *Burkholderia xenovorans* LB400, chromate-resistant bacteria, has 9,043 genes distributed in three replicons: Chromosome 1, Chromosome 2 and megaplasmid. Its genome has *chr* genes encoding four proteins LCHR and two pairs SCHR. Chr genes cloned and transferred into *Escherichia coli* conferred chromate resistance, depending on culture conditions, suggesting that the expression of *chr* genes is regulated by sulfate. Analysis by RT-qPCR of *chr* genes in LB400 showed that are differentially expressed and that sulfate does not regulate their expression. The *chrA2* gene encoded in the megaplasmid, this *chr* gene was the only whose expression was induced by chromate suggesting that is the most important for resistance chromate phenotype of LB400. The objective of this study was to determine the *chr* genes involvement in resistance chromate *B. xenovorans* LB400. First susceptibility chromate group *B. xenovorans* strains was determined selecting the CAC-124 strain, highly sensitive chromate as recipient of *chr* genes. Transferring each *chr* genes showed that the genes of adaptive replicons (*chrA1b* and *chr1NCb*, chromosome 2 and *chrA2*, the megaplasmid) conferred a higher level of resistance that chromate central chromosome *chr* genes (*chrA1a*, *chrA6* and *chr1NCa*), the *chrA2* gene that conferred the highest level of resistance. When generating interruption *chrA2* gene in *B. xenovorans* LB400, this strain was highly sensitive to chromate compared with the wild LB400 strain. By transferring the *chrA2* gene into the wild disrupted strain, the chromate resistance phenotype was restored, while the transfer of genes *chr1NCb* and *chrA1* allowed only partially restore chromate resistance. This allowed confirm that the *chrA2* gene located in the megaplasmid, is the major gene resistance.

I. INTRODUCCIÓN

1. 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, posee estados de oxidación que van de -2 a +6 (McGrath y Smith, 1990). El Cr (0), Cr (III) y Cr (VI) son los tres principales estados de oxidación del cromo que se encuentran con mayor frecuencia en el medio ambiente. El Cr (0) típicamente se encuentra en su forma metálica en aleaciones con otros metales, tales como Ni, Fe y Co (Zhitkovich, 2004). Aunque el Cr (0) es estable a la oxidación por el oxígeno atmosférico en condiciones ambientales, procesos de altas temperaturas, tales como la soldadura o la exposición a productos químicos corrosivos conducen a la formación de estados de oxidación más altos como el Cr (III) y Cr (VI) (Zhitkovich, 2004).

En contraste, el Cr (III) forma óxidos, hidróxidos o sulfatos, pero es menos móvil y existe principalmente unido a la materia orgánica en el suelo y en ambientes acuáticos. 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). La baja toxicidad de los compuestos que forma el Cr (III) se atribuye generalmente a su pobre absorción y baja retención por las células (Zhitkovich, 2004), y debido a que es menos soluble a pH fisiológico (Ehrlich, 2002).

El Cr (VI), usualmente asociado con oxígeno como iones cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$), es considerado como la forma más tóxica del cromo. 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). Es un fuerte agente

oxidante en presencia de materia orgánica reduciéndose a Cr (III) (McGrath y Smith, 1990).

El uso generalizado del cromo en diversos procesos industriales lo ha convertido en un serio contaminante del agua, suelo y aire (Khashim y col., 1989). La exposición a diversas formas de compuestos de Cr (VI) se ha encontrado consistentemente que se asocia con una elevada incidencia de cáncer en vías respiratorias y otras consecuencias adversas para la salud (Zhitkovich, 2004).

2. Transporte de cromo

En las bacterias el Cr (VI) es altamente tóxico debido a que ingresa rápidamente al citoplasma donde puede ejercer sus efectos nocivos (Katz y Salem, 1993). Se ha demostrado en una variedad de especies bacterianas, que el cromato cruza activamente las membranas biológicas por medio de la vía de captación de sulfato (Cervantes y Campos-García, 2007). El transporte de cromato a través del sistema transportador de sulfato fue demostrado por primera vez en *Salmonella typhimurium* (Dreyfuss, 1964; Pardee y col., 1966) y más tarde en *Escherichia coli* (Sirko y col., 1990), *Pseudomonas fluorescens* (Ohtake y col., 1987) y *Alcaligenes eutrophus* (Nies y Silver, 1989).

Esta permeabilidad radica en la similitud estructural 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). Una vez dentro de las células, el Cr (VI) es rápidamente reducido a Cr (III) por mecanismos no enzimáticos o por la acción de varias enzimas; el Cr (III) generado puede ejercer diversos efectos

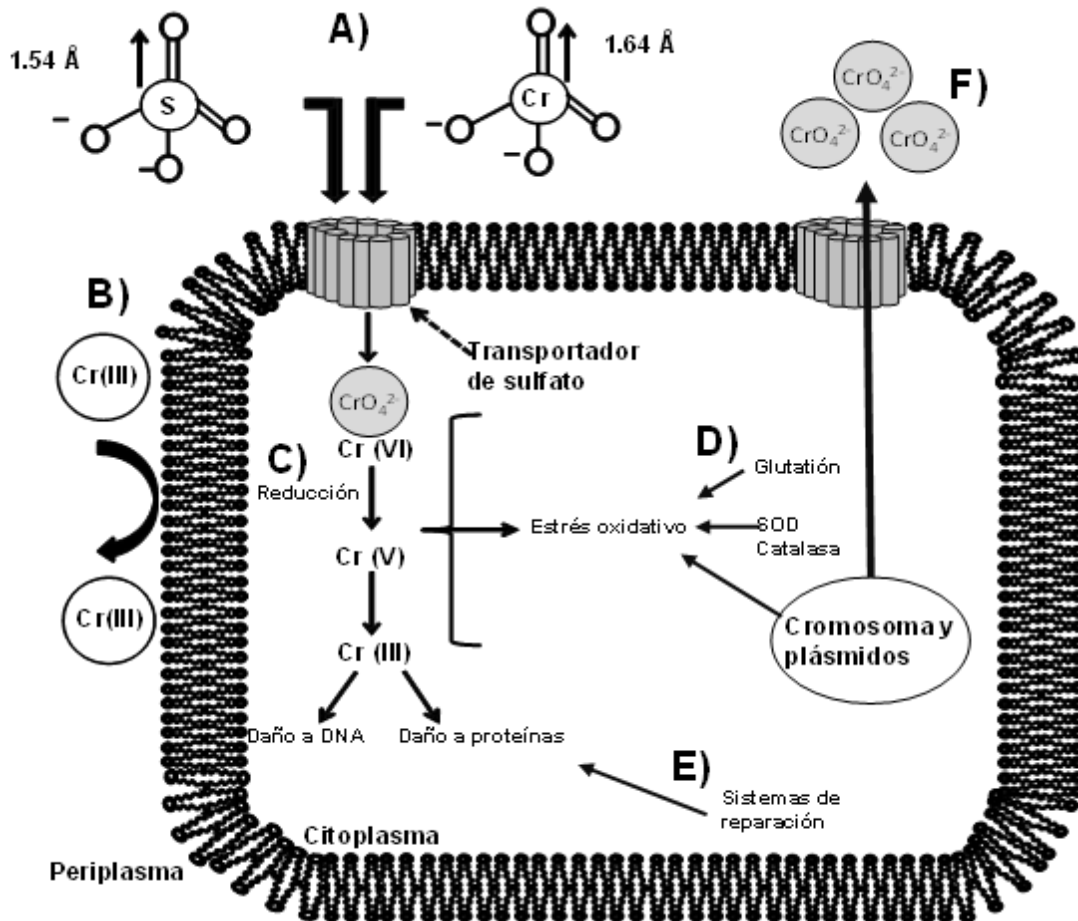


Figura 1. Mecanismos de transporte, toxicidad y resistencia a cromo en bacterias.

(A) Ingreso del cromato a través del transporte de sulfato debido a la similitud estructural entre estos dos oxianiones. (B) Las membranas biológicas son impermeables al Cr (III) por lo que éste resulta inocuo. (C) Reducción intracelular del Cr (VI) a Cr (III), con la producción de radicales libres que generan estrés oxidativo y daño a DNA y proteínas. (D) Enzimas detoxificantes involucradas en protección contra estrés oxidativo. (E) Sistemas de reparación de DNA participan en la protección del daño generado por los derivados del cromo. (F) Transportadores que pueden expulsar cromato del citoplasma (codificados por cromosoma y plásmidos). Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2008.

tóxicos en el citoplasma (**Figura 1C**) (Cervantes y col., 2001). En contraste, la mayoría de las células son impermeables a Cr (III), probablemente debido a que forma complejos insolubles (**Figura 1B**) (Cary, 1982).

3. Toxicidad del cromo

Los efectos biológicos del cromo, dependen de su estado de oxidación: el Cr (VI) es altamente tóxico para la mayoría de los organismos, mientras que el Cr (III) es relativamente inocuo (Cervantes y col., 2001). En condiciones fisiológicas, Cr (VI) por sí mismo no es reactivo para el DNA y requiere la activación reductiva para causar daño biológico. El proceso de reducción se asocia con la producción inestable de Cr (V), Cr (IV), los radicales orgánicos, y finalmente produce Cr (III). La principal atención en el campo de toxicología del Cr (VI) durante muchos años se ha centrado en un papel potencial de las especies reactivas de oxígeno, que fue apoyada por estudios sobre la inducción de estrés oxidativo o la oxidación del DNA en presencia de concentraciones suprafisiológicas de Cr (VI) (Zhitkovich, 2004). 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 (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 creados por la formación de enlaces cruzados de cisteína e histidina de las proteínas con Cr-DNA; también el Cr

(III) puede unirse a los grupos carboxilos y sulfhidrilos de las proteínas afectando su estructura y función (Shi y Dalal, 1990; Kadiiska y col., 1994).

4. Mecanismos bacterianos de resistencia a cromato

La presencia de altas concentraciones de cromato en el ambiente ha originado la selección de variantes bacterianas resistentes a este ion. Se ha reportado una gran variedad de aislados bacterianos resistentes a cromato, incluyendo cepas de origen ambiental y clínico (Cervantes y col., 2001). Los mecanismos de resistencia pueden estar codificados ya sea en plásmidos o en el cromosoma (Cervantes y Silver, 1992).

Los sistemas codificados en el cromosoma tienen que ver con la reducción inespecífica del Cr (VI), actividades de detoxificación de radicales libres, reparación del daño del DNA y procesos asociados con la homeostasis del azufre y el hierro (**Figura 1D y 1E**) (Cervantes y Campos-García, 2007). Por otro lado, los genes localizados en plásmidos codifican transportadores de membrana, los cuales median la expulsión de cromato del citoplasma al periplasma (**Figura 1F**).

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 la proteína ChrA codificada en el plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* (Cervantes y col., 1990; Álvarez y col., 1999) y la proteína ChrA codificada 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 2**). Además de ChrA de *P. aeruginosa* y de

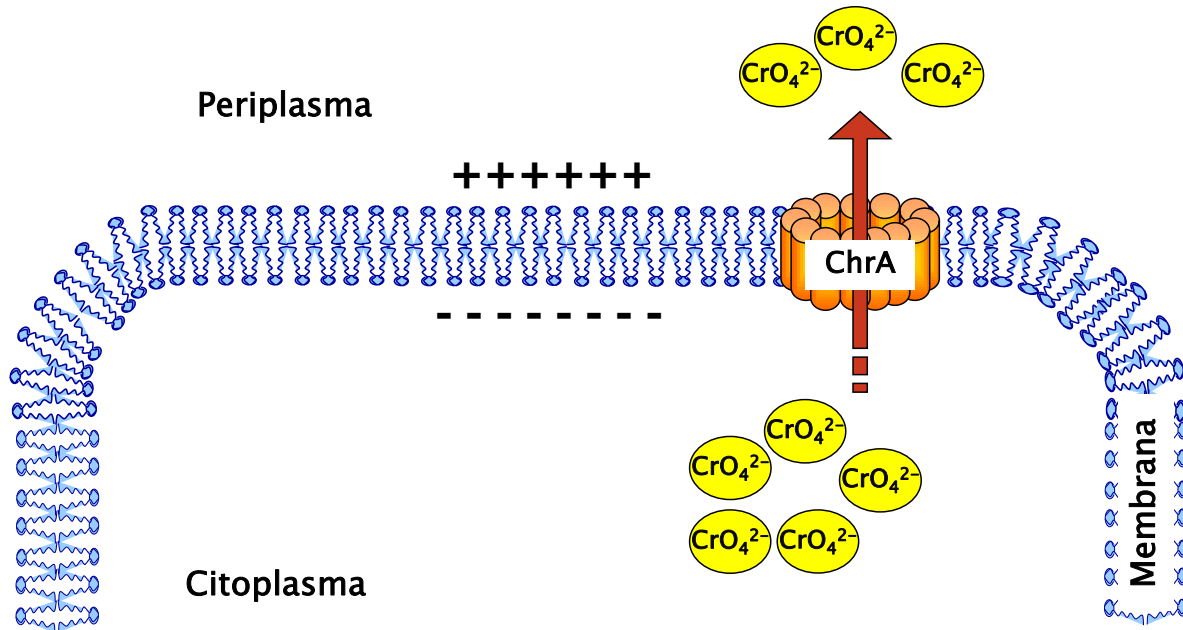


Figura 2. Expulsión de cromato por la proteína ChrA de *Pseudomonas aeruginosa*. La proteína de membrana ChrA expulsa los iones cromato (CrO₄²⁻) del citoplasma hacia el periplasma empleando el potencial de membrana como fuente de energía (Modificado de Álvarez y col., 1999; Pimentel y col., 2002).

C. metallidurans, otros determinantes bacterianos de resistencia a cromato se han caracterizado a nivel experimental: *Shewanella* sp. ANA-3 (Aguilar-Barajas y col., 2008), *Bacillus subtilis* 168 (Díaz-Magaña y col., 2009), *Synechococcus elongatus* PCC7942 (Aguilar-Barajas, 2010) y múltiples homólogos *chrA* de *Burkholderia xenovorans* LB400 (León-Márquez, 2009; Luna-Luna, 2010; Acosta-Navarrete, 2014).

5. Superfamilia de proteínas CHR

La superfamilia de transportadores CHR es un grupo de proteínas involucradas en el transporte de cromato (Nies y col., 1998). Díaz-Pérez y col. en 2007 identificaron 135 secuencias de proteínas no redundantes que se agruparon formando la superfamilia CHR (**Figura 3**). La superfamilia CHR está formada por dos grupos de proteínas:

- ❖ Proteínas de cadena corta o SCHR, son pares de proteínas que presentan un tamaño de ~200 aminoácidos aproximadamente, con un dominio CHR cada una y comúnmente codificadas por un par de genes adyacentes. Se dividen en tres subfamilias (SCHR1-SCHR3).
- ❖ Proteínas de cadena larga o LCHR, son proteínas con una longitud de ~400 aminoácidos aproximadamente. Presentan dos dominios CHR homólogos. Se agrupan en seis subfamilias de bacterias (LCHR1-LCHR6) y una subfamilia de hongos (Díaz-Pérez y col. 2007).

La distribución en la longitud de las secuencias de las proteínas CHR en SCHR y LCHR, ambas con dominios homólogos entre sí, sugiere que las proteínas CHR surgieron por un evento de duplicación génica en tándem (Díaz-Pérez y col., 2007).

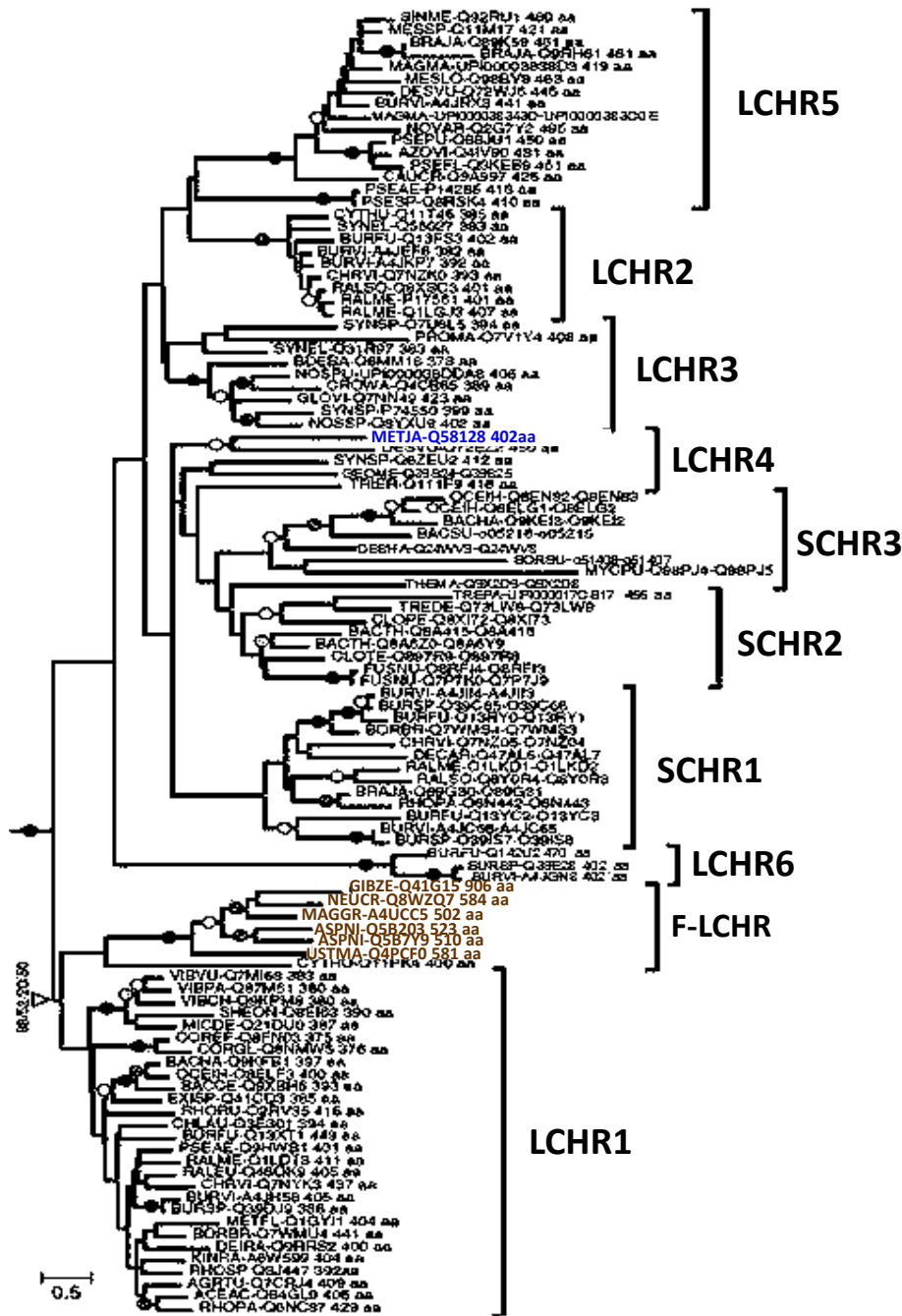


Figura 3. Análisis filogenético de las proteínas bidominio. Los nombres de las secuencias se indican por los nombres abreviados de las especies, seguidos del número de acceso de la base de datos UniProt y del tamaño de la secuencia de la proteína (aa). Las secuencias de las proteínas de bacterias se indican en negro, de arqueas en azul y de hongos en café (Modificado de Díaz–Pérez y col., 2007).

En la actualidad se han reportado aproximadamente 10,000 secuencias de proteínas CHR en la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Aunque la mayoría de los organismos donde se han identificado estas proteínas, presentan sólo un homólogo CHR, algunos organismos presentan múltiples proteínas CHR. Por ejemplo: *Cupriavidus metallidurans*, que posee tres LCHRs y un par de SCHRs; *Burkholderia vietnamiensis* G4 presenta cuatro LCHRs y dos pares de SCHRs y *Burkholderia sp.* 383 posee dos LCHRs y dos pares de SCHRs (Díaz-Pérez y col., 2007).

6. *Burkholderia xenovorans* LB400

Burkholderia xenovorans LB400 es una bacteria gram (-) que pertenece al género *Burkholderia*. Este género fue nombrado en honor al bacteriólogo norteamericano W.H. Burkholder, que fue el descubridor del agente etiológico de la piel agria de la cebolla y el primero en relacionar a las bacterias con enfermedades de las plantas (Burkholder, 1948). El género *Burkholderia* es un grupo de organismos filogenéticamente bien definido, los cuales habitan diversos nichos ecológicos, que van desde suelo hasta ambientes acuosos, asociados a plantas, hongos y animales (Payne y col., 2005). *B. xenovorans* LB400 (anteriormente *Pseudomonas sp.* LB400, *Burkholderia sp.* LB400, *B. fungorum* LB400) es un bacilo Gram-negativo, presenta movilidad y es capaz de fijar nitrógeno. Fue aislada de un suelo contaminado con bifenilos policlorados (PCB) en Moreau, Nueva York, EEUU por ingenieros de la compañía General Electric (Bedard y col., 1986). Su genoma tiene un tamaño de 9.73 Mpb, que contiene 9,043 genes, los cuales se distribuyen en tres replicones, que han sido denominados como cromosoma 1 (4.9 Mpb), cromosoma 2 (3.36 Mpb) y megaplásmido (1.47 Mpb) (**Figura 4**).

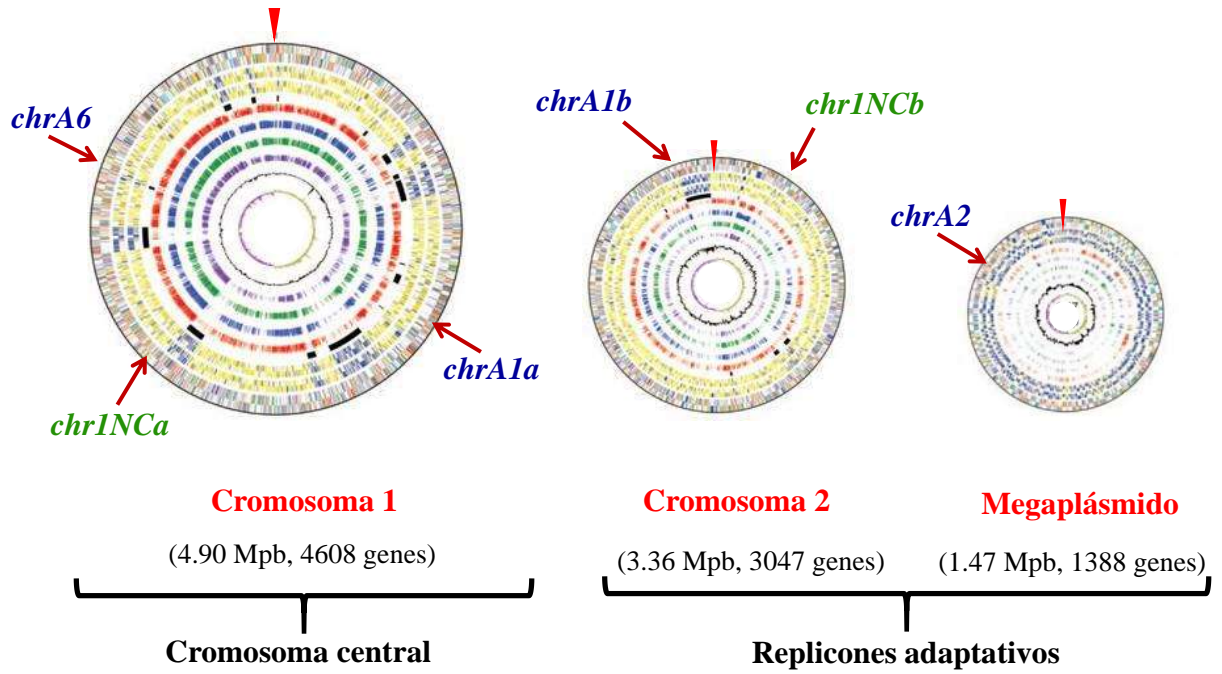


Figura 4. Esquema de los replicones de *B. xenovorans* LB400. En naranja se indica el nombre de cada replicón. Las flechas rojas indican la ubicación de los genes *chr*. En azul se indican los genes que codifican para las proteínas grandes (LCHR) y en verde para las proteínas pequeñas (SCHR). Modificado de Chain y col., 2006.

El cromosoma 1 es considerado como el cromosoma central, debido a que contiene genes involucrados en funciones celulares esenciales, por ejemplo las maquinarias de traducción, de replicación de DNA, de división celular y de metabolismo de nucleótidos (Chain y col., 2006).

El replicón de 3.36 Mpb fue definido como cromosoma 2, debido a la presencia de tres operones para la síntesis de RNA ribosomales y varios genes de tRNA, así como genes que codifican a proteínas que participan en funciones celulares básicas involucradas en la replicación del DNA [DNA primasa (dnaG), DNA polimerasa I (polA)] y de metabolismo de aminoácidos (Chain y col., 2006). Tiene una tendencia funcional hacia el metabolismo energético, metabolismo secundario, transporte y metabolismo de iones inorgánicos, aminoácidos y carbohidratos; estas funciones llevan a definirlo como un replicón determinante del estilo de vida de la cepa LB400 (Chain y col., 2006).

Mientras tanto, el megaplásmido, no contiene tRNAs, ni alguna función esencial y está mayoritariamente ausente en otras cepas de la misma especie. El porcentaje de G-C es 1% más bajo que el de los dos cromosomas, el cual es de 62.7%, y junto a la alta proporción de secuencias de inserción, este replicón parece ser un mosaico de material genético foráneo (Chain y col., 2006).

B. xenovorans LB400 presenta un porcentaje de redundancia de genes de 17.6% (1,581 genes), hasta la fecha este porcentaje de redundancia génica y funcional representa el más alto porcentaje existente entre los genomas de bacterias de vida libre, donde el promedio de redundancia génica es 7.6% (Chain y col., 2006). La redundancia génica se entiende como la presencia de múltiples genes (parálogos), que aparentemente codifican para una misma función dentro del genoma de un organismo y que posiblemente la inactivación de uno de estos genes tenga poco o ningún efecto

sobre el fenotipo (Marx y col., 2004). La lista de parálogos en el genoma de LB400 está enriquecida en genes relacionados a transporte (230 parálogos), transducción de señales (164 parálogos), elementos móviles (112 parálogos), proteínas de membrana (66 parálogos) y metabolismo secundario, incluyendo 120 deshidrogenasas, 32 di-oxigenasas y 13 mono-oxigenasas (Chain y col., 2006). El alto número de parálogos entre proteínas transportadoras se correlaciona con la gran proporción de genes de *B. xenovorans* LB400 dedicados a esta función. Existen más de 180 sistemas de expulsión, que incluye 89 bombas de expulsión de drogas, 18 sistemas de secreción proteica, 21 bombas de expulsión de metales pesados y 18 sistemas de transporte de aminoácidos (Chain y col., 2006). La segunda clase de proteínas que tiene un gran número de parálogos es la transducción de señales. Se ha propuesto que el número de redes de transducción de señales aumenta desproporcionalmente con el tamaño del genoma. El 9% del genoma de *B. xenovorans* está dedicado a la transducción de señales y utiliza casi la totalidad de dominios sensores y reguladores encontrados en la transducción de señales procariontas (Chain y col., 2006). La extraordinaria capacidad de sensar de *B. xenovorans* se enfatiza por el hecho de que *Rhodococcus* sp., un microorganismo con un nicho y un tamaño de genomas similares, posee 25% menos sistemas de transporte y menos de la mitad de sistemas de transducción de señales (McLeod y col., 2006).

II. ANTECEDENTES

El análisis filogenético que realizaron Díaz-Pérez y col. (2007) sobre proteínas homólogas CHR, que agrupó dentro de la superfamilia de proteínas CHR, permitió determinar que *B. xenovorans* LB400 presenta dentro de su genoma cuatro homólogos de la familia LCHR (ChrA1a, ChrA1b, ChrA2 y ChrA6) y dos homólogos de la familia SCHR (Chr1NCb y Chr1NCb). Debido al alto número de homólogos CHR que posee *B. xenovorans* LB400, León-Márquez (2009) realizó pruebas de susceptibilidad a cromato, comparándola con las cepas de referencia *Escherichia coli* W3110 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (**Figura 5**). Encontrando que *B. xenovorans* LB400 presenta un mayor nivel de resistencia a cromato que las cepas de referencia, sugiriendo que los homólogos CHR son los responsables de dicha resistencia. Así mismo, se determinó que los homólogos CHR de *B. xenovorans* LB400 confieren resistencia a cromato cuando se transfieren a cepas de *E. coli*, aunque de manera diferencial, dependiendo de las condiciones de sulfato en el medio (Acosta-Navarrete y col., 2014). Los homólogos ChrA1a, ChrA1b y Chr1NCa confirieron resistencia a cromato en condiciones de alto y bajo sulfato; mientras que los homólogos ChrA6 y Chr1NCb sólo confirieron resistencia en alto sulfato (**Figura 6**). Estos resultados indican que el sulfato puede regular la expresión de los genes *chr* en *E. coli* y sugieren que el sulfato puede regular de manera similar la resistencia a cromato en *B. xenovorans* LB400.

Acosta-Navarrete y col. en el 2014, evaluaron la expresión de los genes *chr* mediante ensayos de RT-PCR tiempo real, partiendo de RNA total de *B. xenovorans* LB400 crecida en medio mínimo con diferentes concentraciones de sulfato y en presencia o ausencia de cromato. Encontrando que los genes *chr* presentan diferentes niveles de

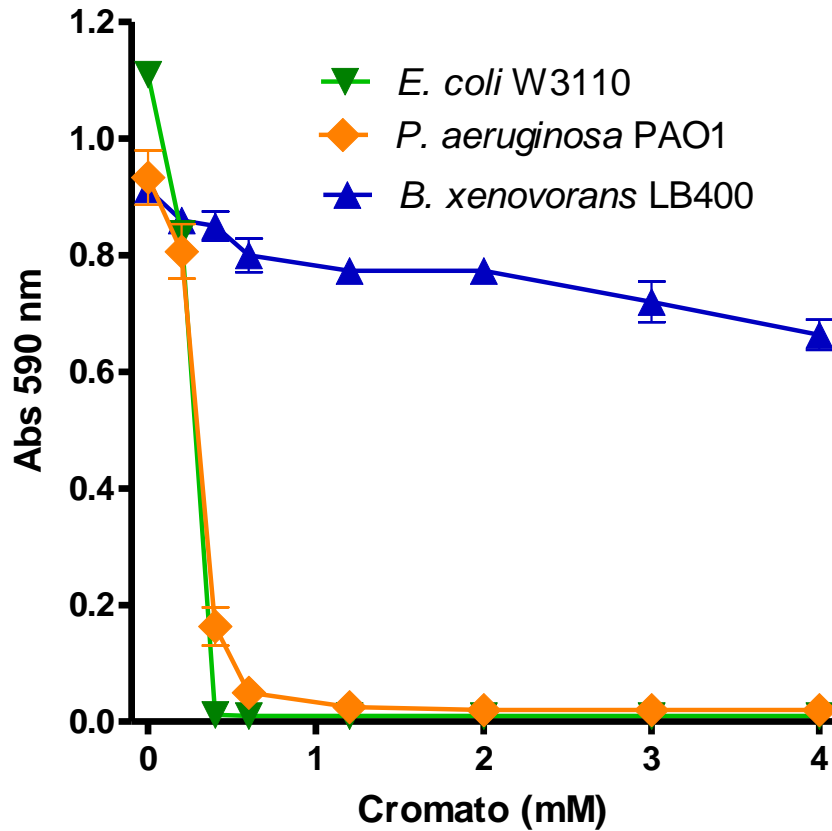


Figura 5. Susceptibilidad a cromato de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se midió la absorbancia a 590 nm. Como cepas de referencia se utilizó *E. coli* W3110 y *P. aeruginosa* PAO1 (Tomado de León-Márquez y col., 2011).

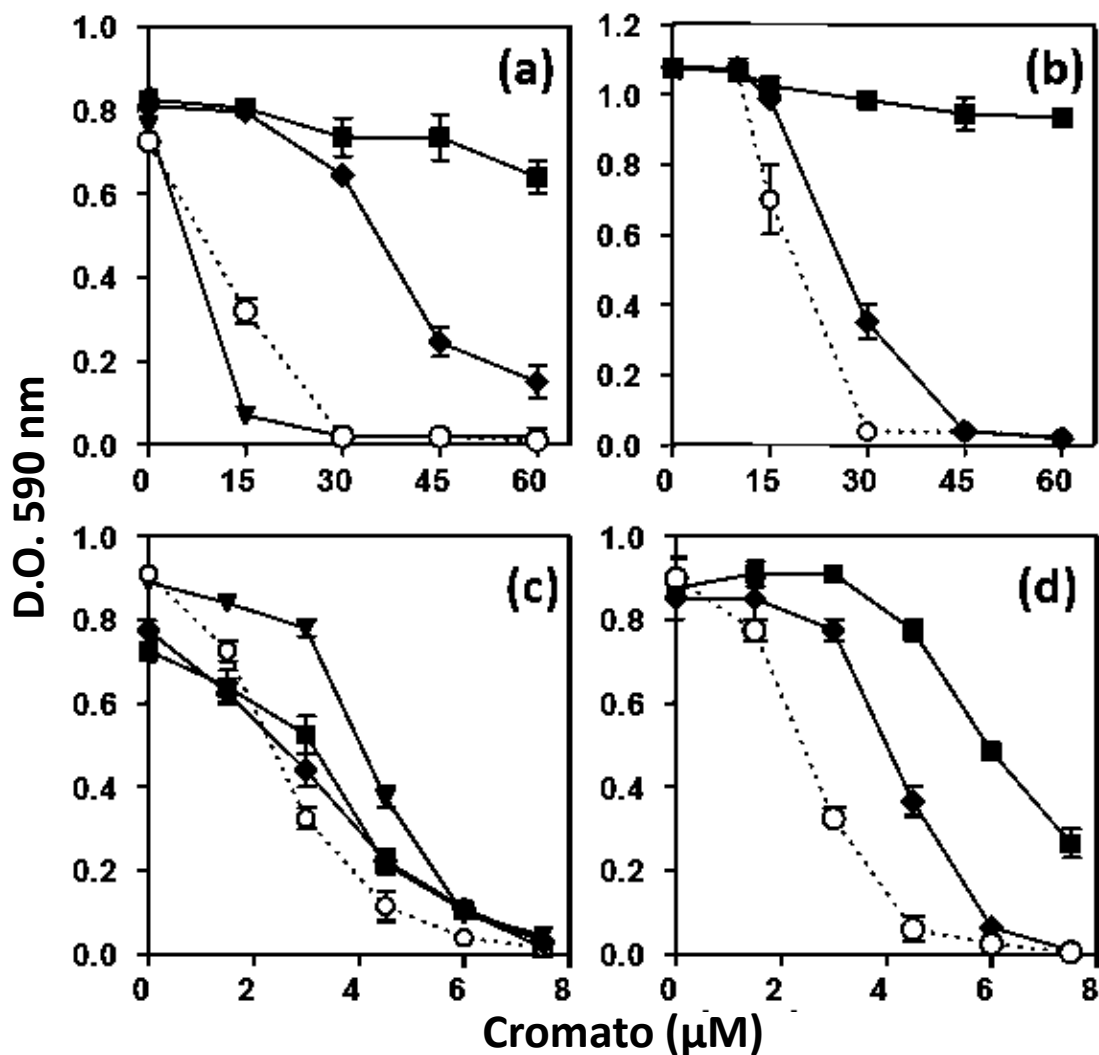


Figura 6. Susceptibilidad a cromato de transformantes de *E. coli* con los genes *B. xenovorans* LB400. Cultivos crecidos en medio M9 con 2mM sulfato (a, b) o 0.2 mM sulfato (c, d) con las concentraciones indicadas de K_2CrO_4 se incubaron por 18 h a 37°C , y se midió la densidad óptica a 590nm. (a, c) Cepa de *E. coli* W3110 transformada sólo con el vector pACYC184 (○), con homólogos LCHR: ChrA1a (■), ChrA1b (◆), ChrA6 (▼). (b, d) *E. coli* W3110 transformada sólo con el vector pACYC184 (○), o con los plásmidos recombinantes de los homólogos SCHR: Chr1NCa (■), Chr1NCb (◆). Tomada de Acosta-Navarrete y col., 2014.

expresión entre sí, pero no cambios significativos en sus niveles de expresión en las diferentes concentraciones de sulfato, por lo que se concluyó que el sulfato no regula la expresión en *B. xenovorans*. Adicionalmente se determinó que a excepción del gen *chrA2*, que forma parte del operón *chrBACF*, localizado en el megaplásmido, el resto de los genes *chr* no incrementaron su nivel de expresión en presencia de cromato, lo que sugiere que *chrA2* podría ser el principal responsable de la resistencia a cromato en *B. xenovorans* LB400 (**Figura 7**). Sin embargo, se desconoce cuál es la participación de los genes *chr* en el nivel de resistencia a cromato en la cepa LB400.

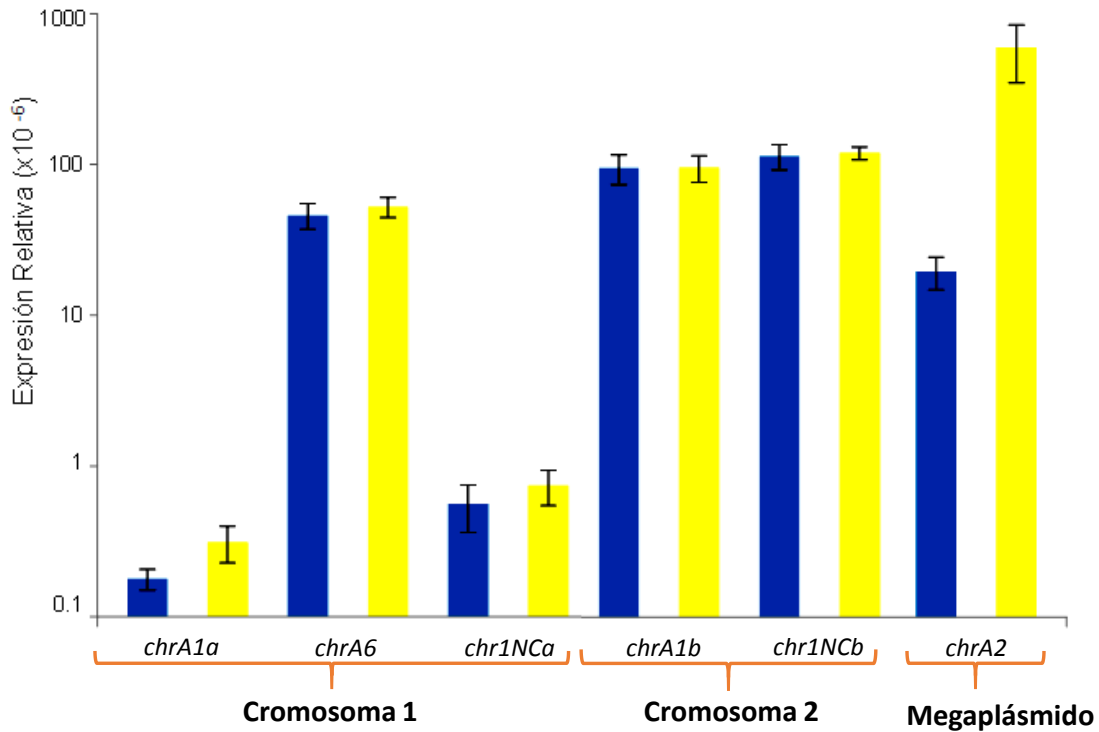


Figura 7. Expresión relativa de los genes *chr* de *B. xenovorans* durante la fase exponencial. Se crecieron los cultivos en medio K1m a una absorbencia de 0.6, en 50 μ M de sulfato en ausencia (barras azules) y presencia de 2 μ M de cromato (barras amarillas). En el eje de las X se indican los genes *chr* y su localización dentro del genoma de *B. xenovorans*. La expresión del gen 16S RNAr se usó como normalizador. Modificado de Acosta-Navarrete y col., 2014.

III. JUSTIFICACIÓN

La cepa resistente a cromato *Burkholderia xenovorans* LB400 contiene múltiples genes *chr* en su genoma, que al ser transferidos a *Escherichia coli* confieren resistencia a cromato de manera diferencial. Los genes *chr* tienen también una expresión diferencial en *B. xenovorans*, siendo los genes de los replicones adaptativos los que presentaron un mayor nivel de expresión, lo que sugiere que estos genes tienen una participación mayor en la resistencia a cromato, por lo que es de interés determinar si estos genes son los responsables de dicho fenotipo.

IV. HIPOTESIS

Los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400 codificados por los replicones adaptativos son los principales responsables de conferir el fenotipo de resistencia a cromato en esta bacteria.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de los genes *chr* en la resistencia a cromato en *Burkholderia xenovorans* LB400.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el nivel de resistencia a cromato conferido por los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 en cepas de *B. xenovorans* Cr^S.
2. Establecer si la interrupción de los genes *chr* de los replicones adaptativos modifica los niveles de resistencia a cromato de la cepa *B. xenovorans* LB400.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de cultivo

- a) Caldo Luria Bertani (CL): para preparar un litro adicionar NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5% (Bioxon).
- b) Caldo nutritivo (CN): Extracto de carne 3.0 g, peptona de carne 5.0 g y agua destilada cbp 1 litro.
- c) Agar nutritivo (AN): adicionar 8 g de medio (Bioxon) a un litro de agua destilada.
- d) Medio mínimo K1 modificado (Acosta-Navarrete y col., 2014): Stock K1 al 10%, elementos traza de Hunter 2% y Glucosa 20 mM.
 - Stock K1 (K_2HPO_4 182.5 mM, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ 25.6 mM, $(NH_4)_2SO_4$ 93.47 mM, $Ca(NO_3)_2$ 0.6 mM y inositol 5 $\mu\text{g/ml}$, riboflavina 10 $\mu\text{g/ml}$, tiamina 10 $\mu\text{g/ml}$).
 - Elementos traza de Hunter ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 17.1 M, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 22.6 mM, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 24H_2O$ 7.5 μM , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.35 mM y 5% del stock denominado 44 metales ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 12.6 μM , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 17.9 mM, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 9.1 mM, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 mM, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 0.85 mM, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 0.5 mM).

2. Cepas

- a) *Burkholderia xenovorans* LB400 (Goris y col., 2004). Cepa que se empleó como control positivo de resistencia a cromato y como donador de genes *chr*.
- b) Cepas de *B. xenovorans* ambientales (**Tabla 1**), donadas por el Dr. J. Caballero Mellado del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.
- c) *Escherichia coli* JM101 (Yanish-Perron y col., 1985). Se utilizó para caracterización del plásmido recombinante pUC_chrA2.

3. Plásmidos

- ❖ pBSL141, contiene un gen de resistencia a gentamicina flanqueado por dos sitios múltiples de clonación. Se utilizó para la construcción de un plásmido de integración para la interrupción del gen *chr* (**Figura 8**).
- ❖ Plásmido recombinante pAC_chrA2, tiene el gen *chrA2* de *B. xenovorans* LB400 (**Figura 9**).
- ❖ Plásmidos recombinantes con los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 clonados individualmente en el vector pUCP20 (**Tabla 2**).

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 20 h a 30 °C con agitación constante de 220 rpm, se realizó una dilución 1:100 en medio fresco y se inocularon

Tabla 1. Cepas de *Burkholderia xenovorans*.

Cepas	Origen	Posibles genes <i>chr</i>	Características
Tco-26 ¹	Rizoplano de tomate	<i>chrA1a, chrA6, chrA1b</i>	Fijadora de nitrógeno. No degrada PCBs ³ .
Tco-39 ¹	Rizósfera de tomate	<i>chrA1a, chrA6, chrA1b</i>	Fijadora de nitrógeno. No degrada PCBs.
Tco-213 ¹	Rizósfera de tomate	<i>chrA1a, chrA6</i>	Fijadora de nitrógeno. No degrada PCBs.
Tco-382 ¹	Rizósfera de tomate	<i>chrA1a, chrA6</i>	Fijadora de nitrógeno. No degrada PCBs.
CAC-124 ²	Rizósfera de café	<i>chrA1a, chrA6, chrA1b, chr1NCb</i>	Genoma 7.83 Mpb. 2 replicones. No degrada PCBs.

¹Caballero-Mellado y col., 2007; ²Chain y col., 2006; ³PCB, bifenilos policlorados.

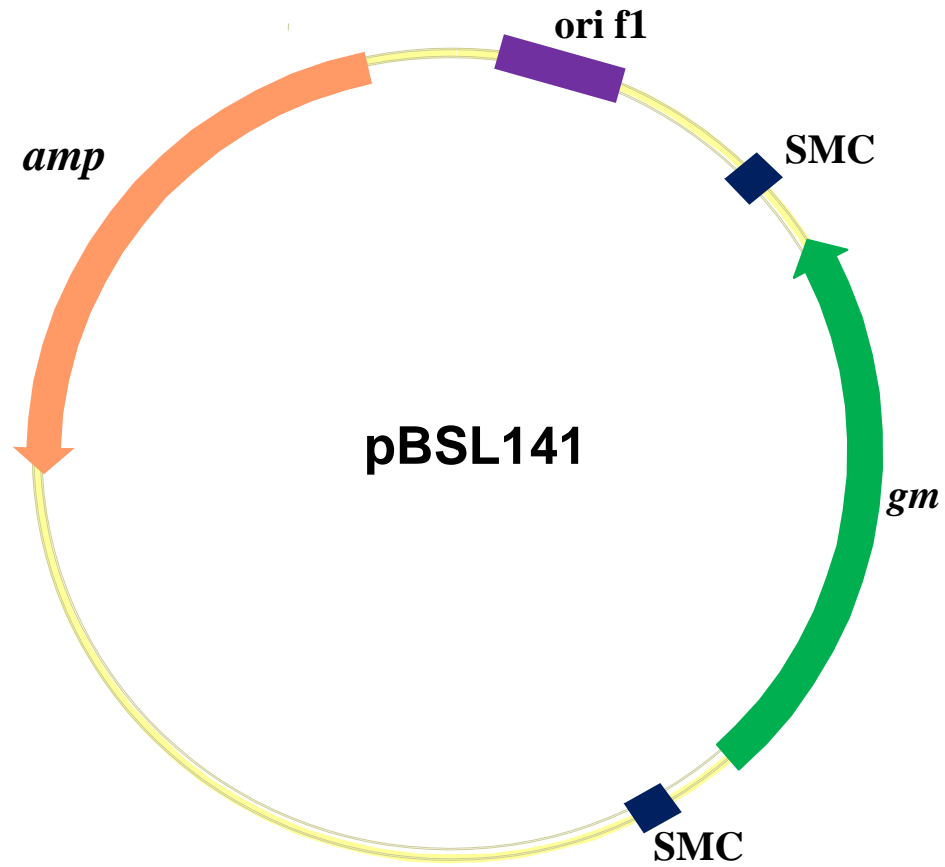


Figura 8. Mapa del vector pBSL141. *amp*, gen de resistencia a ampicilina; *ori f1*, origen de replicación para *E. coli*; *gm*, gen de resistencia a gentamicina; SMC, sitio múltiple de clonación (Modificado de Alexeyev y col., 1995).

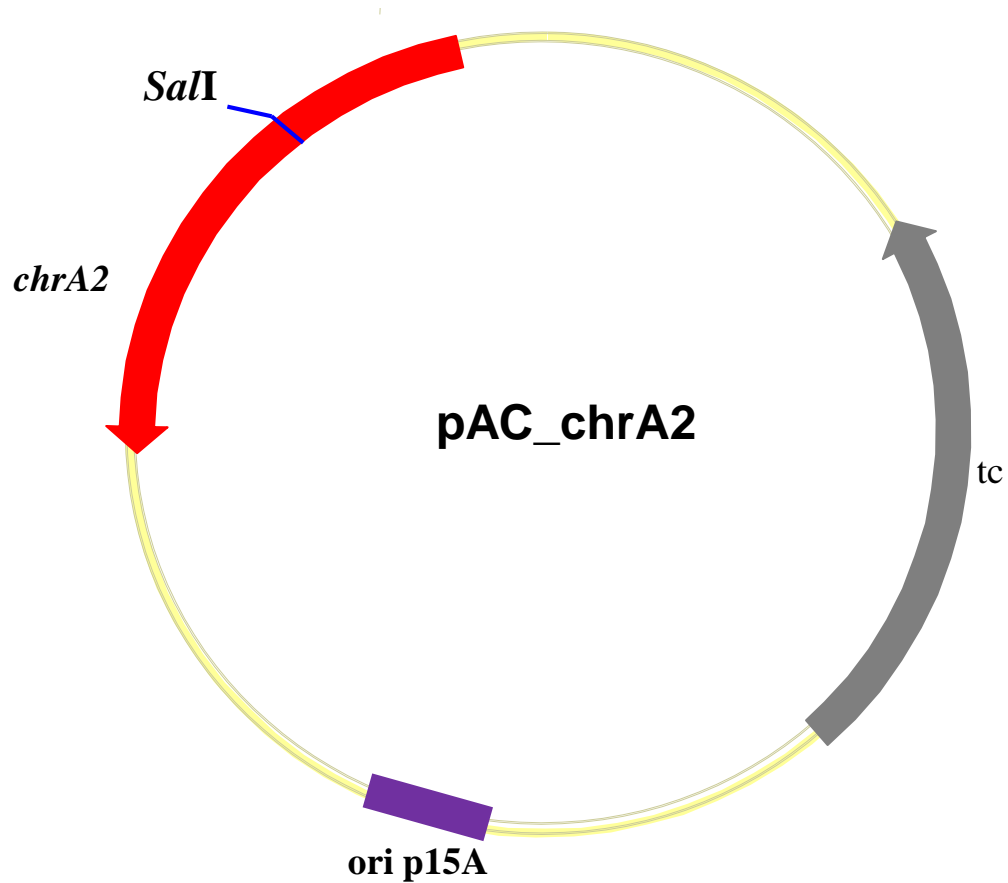


Figura 9. Mapa del plásmido recombinante pAchrA2. *tc*, gen de resistencia a tetraciclina; *ori p15A*, origen de replicación para *E. coli*; *chrA2*, gen de la cepa LB400 que confiere resistencia a cromato y que tiene un sitio interno para la enzima *SalI*.(León-Márquez, 2009).

Tabla 2. Plásmidos recombinantes de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400.

Nombre	Gen	Tamaño (Kb)
pUchrA1a	<i>chrA1a</i>	5.6
pUchrA6	<i>chrA6</i>	5.7
pUchr1NCa	<i>chr1NCa</i>	5.5
pUchrA1b	<i>chrA1b</i>	5.6
pUchr1NCb	<i>chr1NCb</i>	5.6
pUchrA2	<i>chrA2</i>	5.5

León-Márquez, 2009.

20 µl de la dilución en placas de AN con concentraciones crecientes de Carbenicilina (Cb) o K₂CrO₄. Las placas se incubaron 24 h a 30°C. El valor de MIC se define como la concentración mínima del antibiótico o metal que inhibe por completo el crecimiento bacteriano.

5. Aislamiento de DNA plasmídico

Lisis alcalina: El DNA de los plásmidos recombinantes 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%, se agitó 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 frío 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 RNasa e incubó a 37°C durante 30 min, posteriormente se inactivó 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%).

6. Aislamiento de DNA de colonia

Utilizando un palillo estéril, se tomaron 2 o 3 colonias de un cultivo en placa y se resuspendieron en 100 µl de agua HPLC en un tubo eppendorf. Se calentó en 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 el sobrenadante fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

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 de 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 tamaño molecular de DNA lineal se utilizó el DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *HindIII* (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. Reacción en cadena de la polimerasa

Para la amplificación por PCR de los genes *chr*, se utilizó el DNA plasmídico o DNA de colonia. La mezcla de reacción contenía 0.5 μ l de DNA, 2 μ L de oligonucleótidos (10 pmol/ μ l), 12.5 μ l de la mezcla de reacción Super Mix II (Promega) que contiene la enzima Taq polimerasa, ion magnesio y dNTPs a concentraciones optimizadas, y agua HPLC para un volumen final de 25 μ l. Para este proceso se empleó un termociclador de gradiente MultiGene (Labnet international, Inc), utilizando las condiciones que se muestran en la **Tabla 3**.

9. Restricción con endonucleasas

Los DNAs se digirieron enzimáticamente utilizando una unidad de cada una de las endonucleasas de restricción (Promega) por μ g de DNA, y se incubaron a 37 °C por un mínimo de 3 h o durante toda la noche. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético de las mezclas de restricción en un gel de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

10. Preparación de células competentes de *Burkholderia xenovorans*

Para realizar la preparación de células competentes a emplear se realizó el siguiente protocolo:

Tabla 3. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR.

Gen	Desnaturalización inicial	Amplificación (30 ciclos)			Extensión final
		Desnaturalización Tem/Tiempo	Alineamiento Tem/Tiempo	Extensión Tem/Tiempo	
<i>chA1a</i>	95 °C/2 min	95 °C/30 s	48 °C/30 s	72 °C/2 min	72 °C/5 min
<i>chrA6</i>	95 °C/2 min	95 °C/30 s	51 °C/30 s	72 °C/1.30 min	72 °C/5 min
<i>1NCa</i>	95 °C/1 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1 min	72 °C/5 min
<i>chrA1b</i>	95 °C/2 min	95 °C/30 s	55 °C/30 s	72 °C/1.30 min	72 °C/5 min
<i>1NCb</i>	95 °C/2 min	95 °C/30 s	58 °C/30 s	72 °C/1.30 min	72 °C/5 min
<i>chrA2</i>	95 °C/5 min	95 °C/40 s	48 °C/1 min	72 °C/2 min	72 °C/7 min

Se inocularon 250 ml de CN con 4 ml de cultivo de *B. xenovorans*, crecido a 30°C con agitación durante la noche. Las células se dejaron crecer a 30°C con agitación constante de 220 rpm hasta que alcanzaron una absorbencia de 0.6 a 590 nm (3-4 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 lavaron dos veces 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 solución de glicerol al 10% estéril y fría, las muestras se guardaron en alícuotas de 250 µl a -80°C.

11. Transformación de células competentes de *B. xenovorans*

Se realizó la transformación de las cepas de *Burkholderia xenovorans*, con los plásmidos recombinantes mediante el método de electroporación, que se describe a continuación:

En un tubo eppendorf se mezclaron 100 µl de células competentes con 2-4 µl de DNA plasmídico. La mezcla se colocó entre los electrodos de una celda de electroporación fría. Se ajustó el micropulso a 1800 V, la celda se colocó en la cámara deslizable de un electroporador 2510 (Eppendorf) y se dio un pulso de 4-5 milisegundos. Inmediatamente la mezcla se transfirió a un tubo con 2 ml de CN, se incubó a 30°C por 3-4 h con agitación constante. Posteriormente, se distribuyó 100 µl del cultivo en cajas de AN adicionadas con 800 µg/ml de Cb para la obtención de transformantes.

12. Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

Se inoculó 250 ml de CL con 4 ml de cultivo de *E. coli* JM101 crecido a 37°C con agitación constante durante la noche. Las células se dejaron crecer a 37°C con agitación 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. Se desechó el sobrenadante cuidadosamente y las células obtenidas se lavarón 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.

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

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 distribuyó 100 µl del cultivo en cajas de AN adicionadas con 100 µg/ml de ampicilina y 100 µM de HgCl₂.

14. Pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido

Se promovió el crecimiento de las cepas adicionando 40 µl de un cultivo crecido toda la noche a 30°C, en tubos con 4 ml de medio K1m o CN adicionando concentraciones crecientes de K₂CrO₄. Como control de crecimiento bacteriano se incluyó un tubo sin cromato. Los tubos se incubaron durante 24 h a 30°C con agitación constante y la susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm de los cultivos en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

15. Cuenta viable

Se crecieron cultivos en medio K1m y CN de las cepas de estudio con concentraciones de 0.025 y 0.1 mM de K₂CrO₄ y se incubaron a 30° C por 24 h. Partiendo de los cultivos, se realizaron diluciones 1×10^{-6} en medio fresco y se plaqueó 100 µl de la dilución en placas de AN y se incubaron a 30° C por 24 h. Se realizó el conteo de colonias y se calculó las UFC (unidades formadoras de colonias).

VIII. RESULTADOS

1. Determinación de concentración mínima inhibitoria

Con la finalidad de emplear las cepas de *B. xenovorans* ambientales (**Tabla 1**) para la transferencia de los genes *chr*, se determinó la concentración mínima inhibitoria de cromato, utilizando como control la cepa LB400. Los resultados mostraron que la cepa CAC-124 se inhibió a una concentración de 100 μ M de cromato; las cepas Tco-26, Tco-39 y Tco-213 a 200 μ M y la cepa Tco-382 a 400 μ M (**Tabla 4**). Por otra parte, debido a que los plásmidos recombinantes que contiene los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400, contienen un marcador de resistencia a Cb, se procedió a evaluar la resistencia de las cepas *B. xenovorans* a dicho antibiótico; esto para determinar la concentración a emplear de Cb para la selección de transformantes. Para los ensayos de MIC se utilizaron como control la cepa *B. xenovorans* LB400 (pUCP20) (resistente a carbenicilina). Los resultados del MIC (**Tabla 5**) indican que la cepa LB400 (pUCP20) muestra crecimiento a una concentración de 800 μ g/ml de Cb, mientras que el resto de las cepas fueron inhibidas por completo, o presentaron un escaso crecimiento, por lo que ésta fue la concentración de dicho antibiótico empleada para la selección de transformantes. La concentración a utilizar para la selección de transformantes fue de 800 μ g/ml de Cb.

2. Selección de las cepas de *B. xenovorans* para transferencia de los genes *chr*

Para determinar el nivel de susceptibilidad a cromato de las cepas de *B. xenovorans* ambientales con respecto a la cepa de *B. xenovorans* LB400, se realizaron pruebas de susceptibilidad en medio líquido. Los resultados mostraron que las cepas Tco-26 y

Tabla 4. MIC de cromato para cepas de *B. xenovorans*.

Cepas	K₂CrO₄ (μM)					
	0	50	75	100	200	400
LB400	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tco-26	+++	+++	+	+	-	-
Tco-39	+++	++	+	+	-	-
Tco-213	+++	++	+	+	-	-
Tco-382	+++	++	++	+	+	-
CAC-124	+++	+	+	-	-	-

Se crecieron cultivos de las cepas en CN y se realizaron diluciones 1:500, se plaqueó por gota 100 μl de la dilución en placas con las concentraciones de K₂CrO₄ y se incubaron a 30 °C por 24 h. (+++), Crecimiento en toda la superficie de la gota; (++) , crecimiento intermedio; (+), colonias aisladas; (-), no presentó crecimiento.

Tabla 5. MIC de carbenicilina para cepas de *B. xenovorans*.

Cepas	Carbenicilina ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	200	400	600	800
LB400 (pUCP20)	+++	+++	+++	+++	+++
LB400	+++	+++	++	+	-
Tco-26	+++	++	+	+	-
Tco-39	+++	+	+	+	-
Tco-213	+++	++	+	+	-
Tco-382	+++	++	+	+	-
CAC-124	+++	+	+	+	-

Se crecieron cultivos de las cepas en CN y se realizaron diluciones 1:500, se plaqueó por gota 100 μl de la dilución en placas con las concentraciones de K_2CrO_4 y se incubaron a 30 °C por 24 h. (+++), Crecimiento en toda la superficie de la gota; (++) , crecimiento intermedio; (+), colonias aisladas; (-), no presentó crecimiento.

CAC-124 son altamente sensibles al ion, mientras que las cepas Tco-213, Tco-39 y Tco-382 presentan un nivel intermedio de resistencia a cromato en comparación con LB400 (**Figura 10**). Ya que se desea analizar el nivel de resistencia conferido por los genes *chr* de la cepa LB400, se seleccionó en el trabajo a la cepa CAC-124 que es la más sensible a cromato.

3. Transformación de las cepas *B. xenovorans* Cr^S con los genes *chr*

Los plásmidos con los genes *chr* fueron transferidos a la cepa de *Burkholderia* Cr^S (CAC-124) como se describe en métodos y materiales. Se obtuvieron colonias transformantes que se seleccionaron por resistencia a Cb y se caracterizaron amplificando los genes *chr* (**Figura 11**). Comprobando la presencia de los plásmidos recombinantes en las transformantes.

4. Pruebas de susceptibilidad a cromato

Las cepas transformantes de CAC-124 con los plásmidos recombinantes fueron evaluadas mediante pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido, utilizando como controles la cepa resistente *B. xenovorans* LB400 y la cepa receptora CAC-124. En CN, con excepción del gen *chr1NCb*, el resto de los genes *chr* confirieron resistencia a cromato, en diferentes niveles (**Figura 12**). En medio K1m, 4 de los genes *chrA6*, *chrA1b*, *chr1NCb* y *chrA2* confieren mayor nivel de resistencia a cromato (**Figura 13**), mientras que los genes *chrA1b* y *chr1NCa* presentaron niveles similares a la cepa CAC-124. Concluyendo que todos los genes *chr* son capaces de conferir resistencia a cromato en la cepa CAC-124.

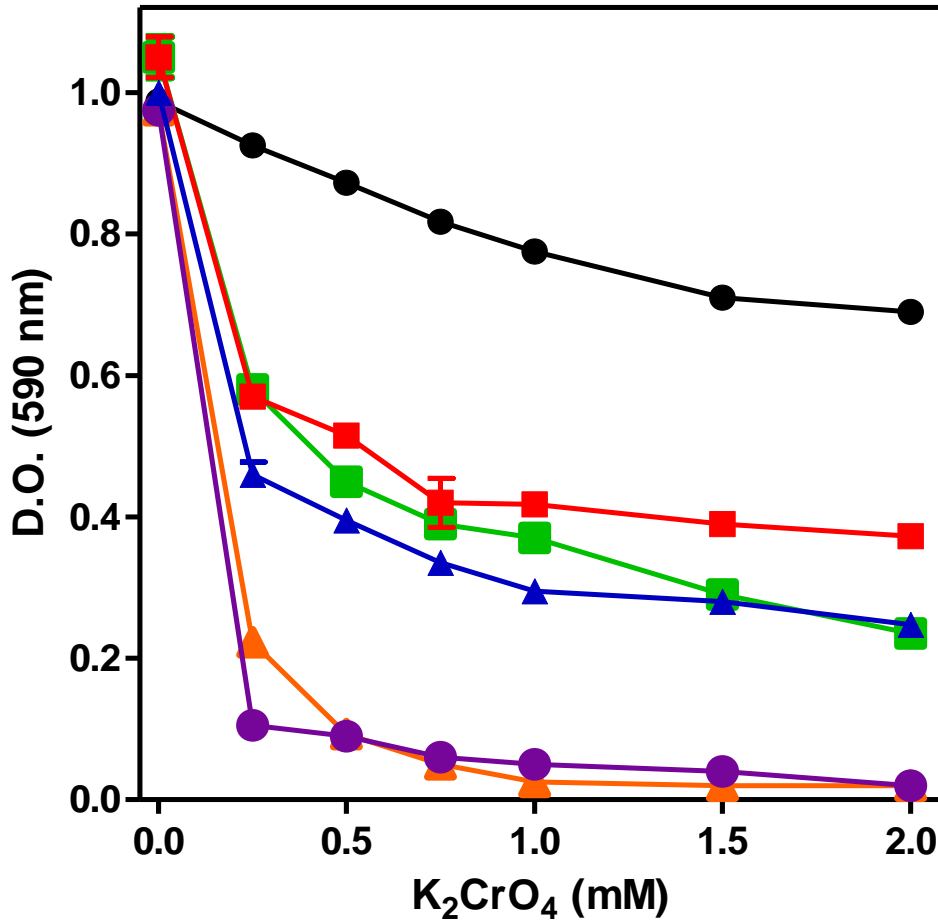


Figura 10. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *B. xenovorans* Cr^S. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo por 24 h a 30°C con agitación constante utilizando las concentraciones de cromato indicadas y se midió la densidad óptica a 590 nm. *B. xenovorans* LB400 (●), CAC-124 (●), Tco-213 (■), Tco-39 (■), Tco-382 (▲) y Tco-26(▲). n=6.

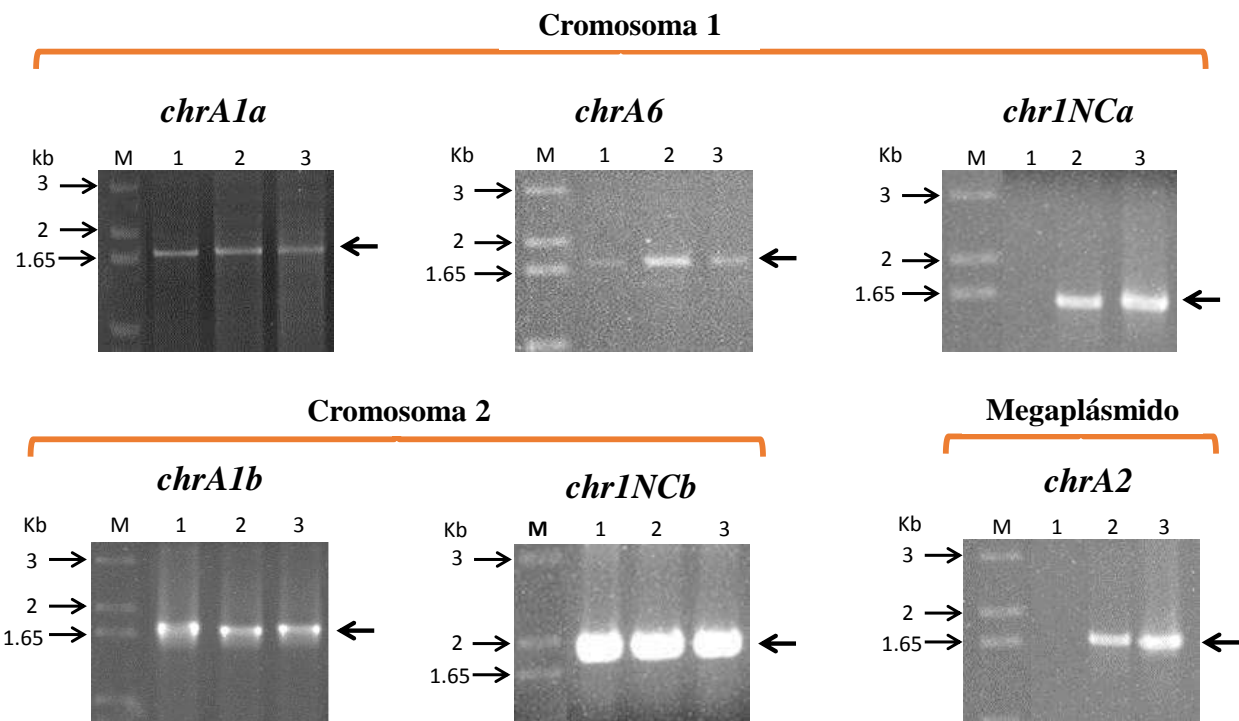


Figura 11. Caracterización por PCR de las transformantes de *B. xenovorans* CAC-124 con los genes *chr* de LB400. Se obtuvo DNA de colonia y se realizó PCR con sus respectivos pares de oligonucleótidos (**Tabla 3**). Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa 1%. En la parte superior de cada gel se indica el gen analizado y con flecha a la derecha se indica la banda correspondiente al gen *chr*. M, marcador 1kb; carril 1, CAC-124; carril 2, transformante; carril 3, LB400.

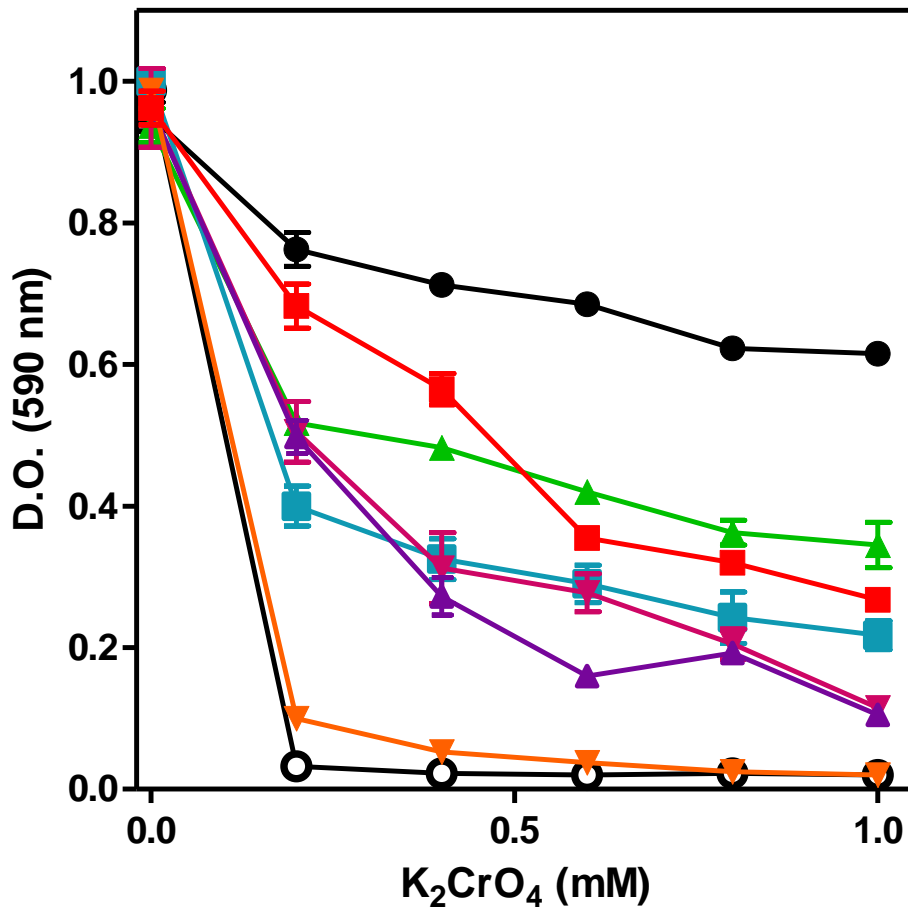


Figura 12. Susceptibilidad a cromato en medio rico de las transformantes de *B. xenovorans* CAC-124 con los genes *chr* de LB400. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. *B. xenovorans* LB400 (●), *B. xenovorans* CAC-124 (○), CAC-124 (pUC_chrA2) (■), CAC-124 (pUC_chrA6) (■), CAC-124 (pUC_chrA1b) (▼), CAC-124 (pUC_chr1NCb) (▲), CAC-124 (pUC_chrA1a) (▲), CAC-124 (pUC_chr1NCa) (▼). n=6.

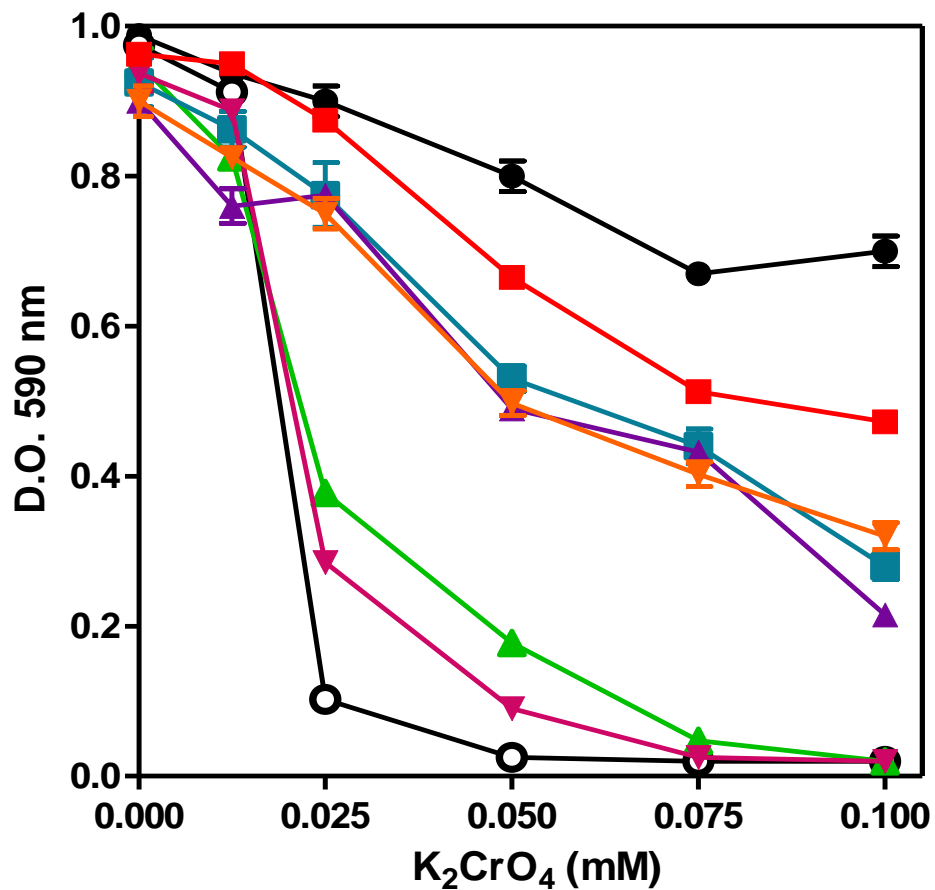


Figura 13. Susceptibilidad a cromato en medio mínimo de las transformantes de *B. xenovorans* CAC-124 con los genes *chr* de LB400. Los cultivos se crecieron en medio K1m con 50 μ M de sulfato por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. *B. xenovorans* LB400 (●), *B. xenovorans* CAC-124 (○), CAC-124 (pUC_chxA2) (■), CAC-124 (pUC_chxA6) (■), CAC-124 (pUC_chxA1b) (▼), CAC-124 (pUC_chr1NCb) (▲), CAC-124 (pUC_chxA1a) (▲), CAC-124 (pUC_chr1NCa) (▼). n=6.

5. Determinación de la cuenta viable

Para determinar de manera más precisa el nivel de resistencia a cromato que los genes *chr* confieren a la cepa CAC-124, se procedió a realizar pruebas de viabilidad. En estos ensayos se cuantificó el número de UFC (unidades formadoras de colonia), es decir, el número de células que sobreviven a la exposición del ion. Como controles se utilizaron la cepa *B. xenovorans* LB400 y la cepa receptora CAC-124 en ausencia de cromato (**Figura 14**). Obteniendo como resultado que en CN a 100 μM de cromato, que las transformantes con los genes *chrA1a* y *chrA2*, presentan mayores valores de UFC, en comparación con la cepa CAC-124; sin embargo, este valor es menor a los valores de UFC obtenidos con la cepa *B. xenovorans* LB400 (**Figura 15**).

En medio K1m a 25 μM de cromato, las transformantes con los genes *chrA6*, *chrA1b*, *chr1CNb* y *chrA2*, presentaron un mayor número de UFC que la cepa receptora CAC-124, sin embargo, al igual que en CN, el valor de UFC de la cepa LB400 es mayor (**Figura 15**). Estos resultados sugieren que el nivel de resistencia que presenta *B. xenovorans* LB400 se debe a la participación conjunta de los productos de los genes *chr*.

6. Construcción del plásmido de integración para la interrupción del gen *chrA2*

Utilizando la construcción de León-Márquez (2009) del plásmido recombinante pAC_*chrA2* (que contiene el gen *chrA2*) y el plásmido pBSL141 (que presenta un gen que confiere resistencia a gentamicina (Gm), flanqueado por dos sitios múltiples de clonación), se construyó un plásmido de integración que carece de origen de replicación para *Burkholderia* (**Figura 16**). Para ello, se realizó la búsqueda de un sitio único de

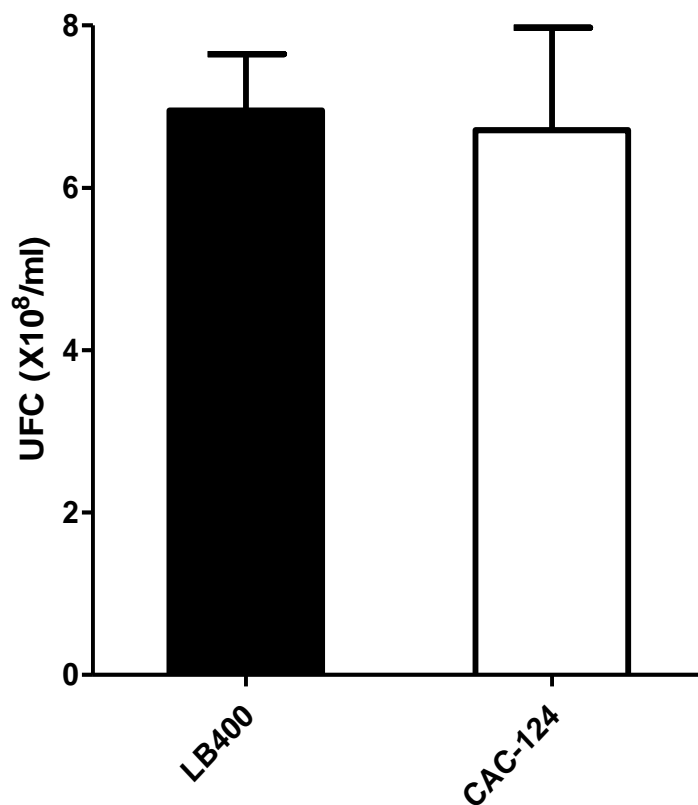


Figura 14. Viabilidad de *B. xenovorans* LB400 y CAC-124. Se crecieron cultivos en CN por 24 h a 30°C con agitación constante, en ausencia de cromato. Se realizaron diluciones 1×10^{-6} y se plaqueó 100 μ L en placas de AN. Se incubaron a 30°C por 24 h y se contabilizó el número de colonias. n=6. Barras, indican la desviación estándar.

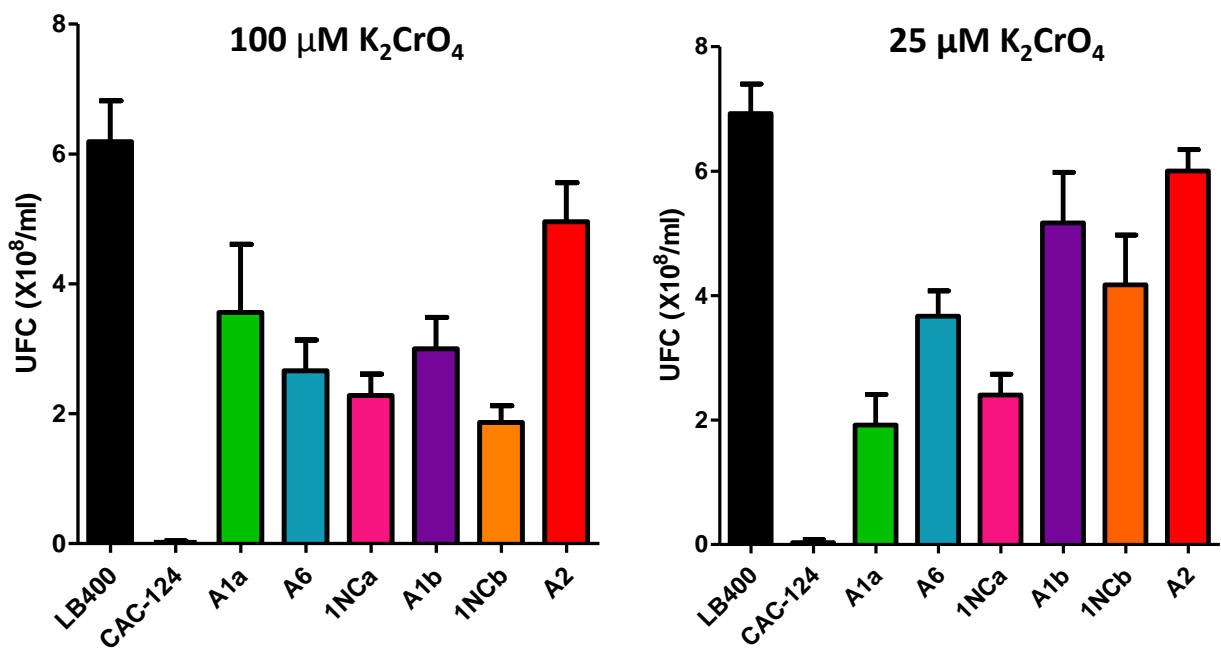


Figura 15. Viabilidad de las transformantes de *B. xenovorans* CAC-124 con los genes *chr* de LB400. Se crecieron cultivos por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones indicadas de cromato. Se realizaron diluciones 1×10^{-6} y se plaqueó 100 μL en placas de AN, se incubaron a 30°C por 24 h y se contabilizó el número de colonias. $n=6$. Barras, desviación estándar.

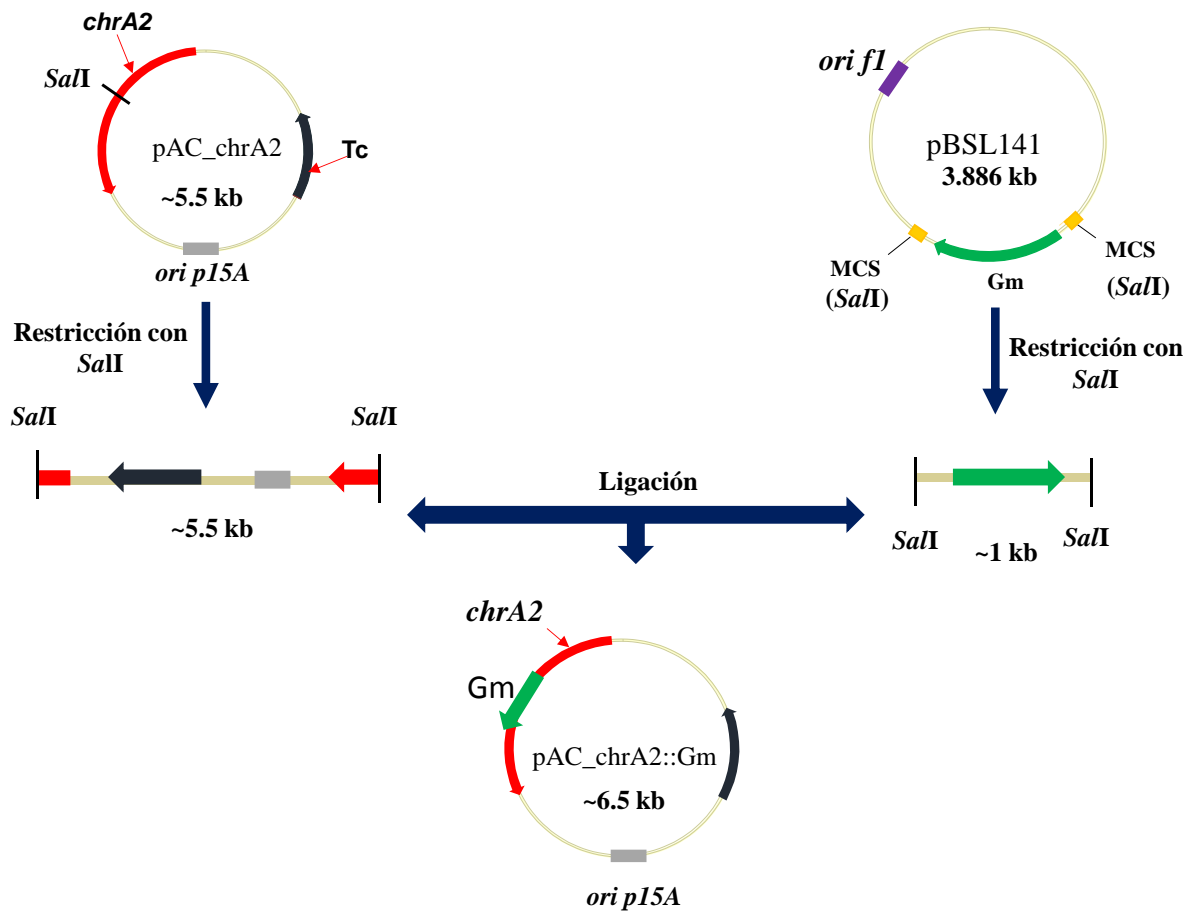


Figura 16. Construcción del plásmido pAC_chrA2::Gm. Los plásmidos pBSL141 y pAC_chrA2 fueron digeridos con la enzima *SalI*, obteniendo los fragmentos esperados que fueron purificados y ligados, obteniendo el plásmido de integración pAC_chrA2::Gm que se empleó para la interrupción del gen *chrA2* de la cepa LB400.

corte dentro de la región del gen *chrA2*, con el propósito de linearizar el plásmido pAC_*chrA2* y poder insertar el gen de resistencia a Gm. La enzima utilizada para la restricción de ambos plásmidos fue *Sall* y las reacciones fueron corridas en un gel de agarosa 1%, las bandas correspondientes al tamaño esperado fueron purificadas y ligadas.

7. Interrupción del gen *chrA2*

Para la interrupción del gen *chrA2*, que se encuentra dentro del megaplásmido, se utilizó el plásmido recombinante pAC_*chrA2*. El plásmido pAC_*chrA2* se transfirió a *E. coli* JM101 como se describe en métodos y se realizó la caracterización de la construcción por aislamiento de DNA plasmidico y digestión con enzimas de restricción (resultados no mostrados). Una vez que se comprobó la construcción, se transfirió a la cepa *B. xenovorans* LB400 por electroporación. Se seleccionaron mutantes por el crecimiento en AL con Gm. Se obtuvieron 2 transformantes, denominadas *chrA2*::Gm-1 y *chrA2*::Gm-2, que fueron caracterizadas por amplificación de PCR del gen *chrA2*. Mostrando una banda de tamaño esperado (~1.7 kb), debido a la integración del gen de Gm (~1 kb) (**Figura 17**).

8. Pruebas de susceptibilidad a cromato de las mutantes LB400 *chrA2*::Gm

Una vez que se caracterizó a las cepas de LB400 *chrA2*::Gm, se analizó su resistencia a cromato mediante pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido. Como control se empleó la cepa LB400 (resistente a cromato y que contiene los 6 genes *chr*). Obteniendo que ambas mutantes presentan una clara disminución en el nivel de crecimiento en presencia del ion, comparado con la cepa LB400 (**Figura 18**), lo que

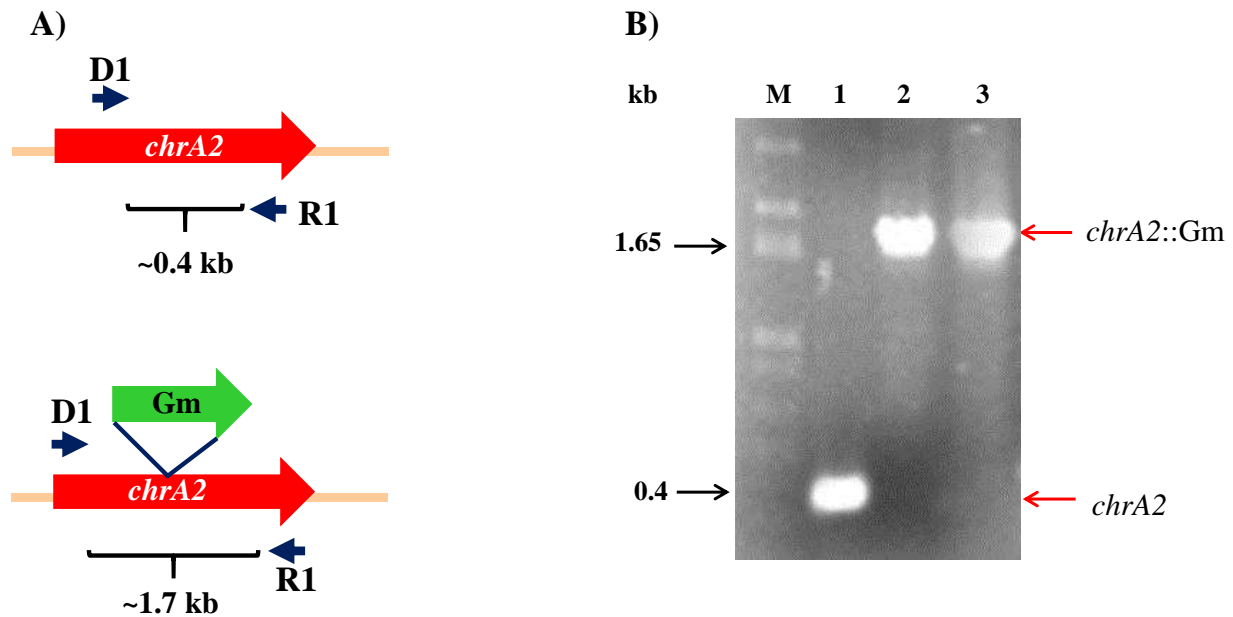


Figura 17. Caracterización de las colonias de LB400 interrumpidas en el gen *chrA2*. **A)** Esquema de los genes *chrA2* y *Gm*, del gen *chrA2* silvestre (parte superior) y del gen *chrA2* con el gen de *Gm* (parte inferior). **B)** Análisis por PCR en un gel de agarosa. 1%. M, marcador 1kb; carril 1, *B. xenovorans* LB400; carril 2, *chrA2::Gm*-1; carril 3, *chrA2::Gm*-2. Las flechas de la derecha indican la banda correspondiente al gen *chr* silvestre y al gen *chrA2* interrumpido con el gen de *Gm* (*chrA2::Gm*).

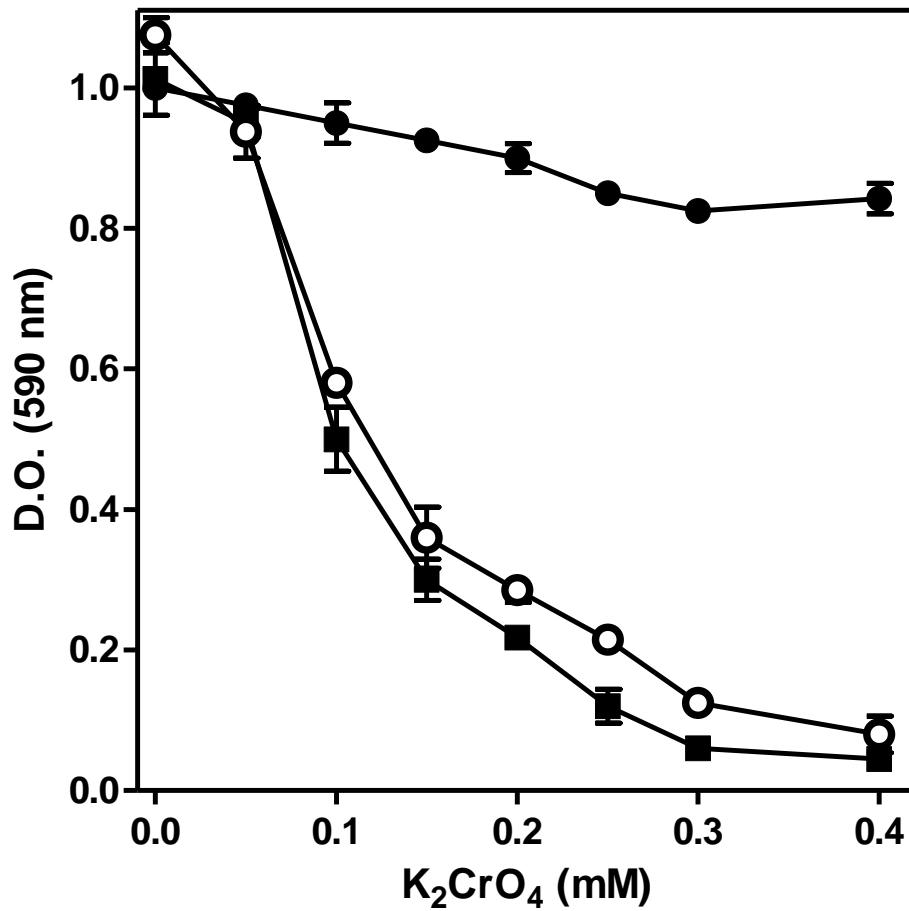


Figura 18. Susceptibilidad a cromato de las mutantes *chrA2::Gm* de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en medio K1m por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. *B. xenovorans* LB400 (●), *chrA2::Gm-1* (○), *chrA2::Gm-2* (■). n=6.

confirma que el gen *chrA2* tiene un papel importante en la resistencia a cromato. Debido a que ambas mutantes mostraron el mismo fenotipo, para el resto de los ensayos sólo se trabajó con la mutante *chrA2::Gm-1*.

9. Transformación de la mutante LB400 *chrA2::Gm* con los genes *chr* silvestres de los replicones adaptativos

Para comprobar que la disminución en el nivel de resistencia a cromato que presenta la mutantes LB400 se debe a la interrupción del gen *chrA2*, se transfirió el plásmido recombinante pUC_*chrA2* por electroporación a la mutante *chrA2::Gm-1*. Obteniendo como resultado que la mutante transformada recuperó el fenotipo de resistencia a cromato, prácticamente al mismo nivel que la cepa LB400 (**Figura 19**). Lo que confirma que el fenotipo de sensibilidad a cromato que presenta la mutante se debe a la interrupción del gen *chrA2*.

Adicionalmente, se transformó la mutante con los genes silvestres *chrA1b* y *chr1NCb* del replicón adaptativo. Observando que la transferencia de ambos genes permitió la recuperación del nivel de resistencia al ion; sin embargo, no se alcanzó el mismo nivel que la cepa complementada con el gen *chrA2*. Lo que confirma que el gen *chrA2* del megaplásmido tiene un papel relevante en la resistencia a cromato.

Finalmente, para determinar el grado de participación de los demás genes *chr*, se transformó la mutante *chrA2::Gm-1* con los genes *chr* del cromosoma 1 y se evaluó la susceptibilidad a cromato. Obteniendo como resultado que los genes *chrA1a*, *chr1NCa* y *chrA6* incrementan muy poco el nivel de resistencia a cromato en comparación con la mutante complementada con los genes *chr* de los replicones adaptativos (**Figura 20**). Lo que corrobora que el nivel de resistencia a cromato de la cepa LB400 está dado principalmente por los genes de los replicones adaptativos.

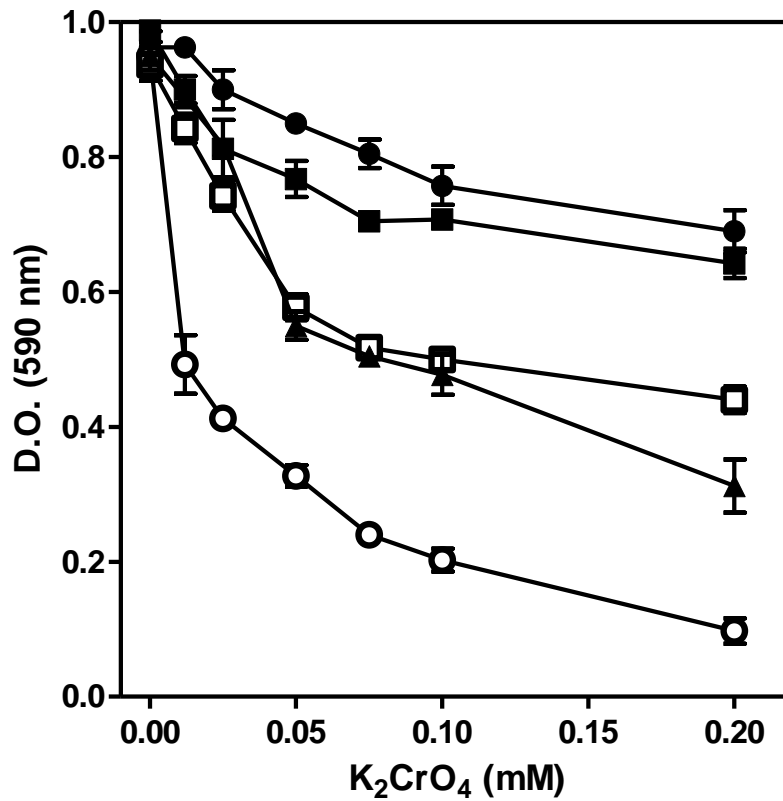


Figura 19. Susceptibilidad a cromato de la mutante LB400 *chrA2::Gm* transformada con los genes *chr* de los replicones adaptativos de LB400. Los cultivos se crecieron en medio K1m por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. *B. xenovorans* LB400 (●), *chrA2::Gm-1* (○), *chrA2::Gm-1* (pUC_chrA2) (■), *chrA2::Gm-1* (pUC_A1b) (□), *chrA2::Gm-1* (pUC_chr1NCb) (▲). n=6.

Finalmente, para determinar el grado de participación de los genes *chr*, se decidió transformar la mutante *chrA2::Gm-1* con el resto de los genes *chr* y se evaluó la susceptibilidad a cromato. Obteniendo como resultado que los genes *chrA1a*, *chr1NCa* y *chrA6* incrementan muy poco el nivel de resistencia a cromato en comparación con la mutante complementada con los genes *chr* de los replicones adaptativos. Lo que indica que el nivel de resistencia a cromato de la cepa LB400 está dado principalmente por los genes de los replicones adaptativos (**Figura 19**).

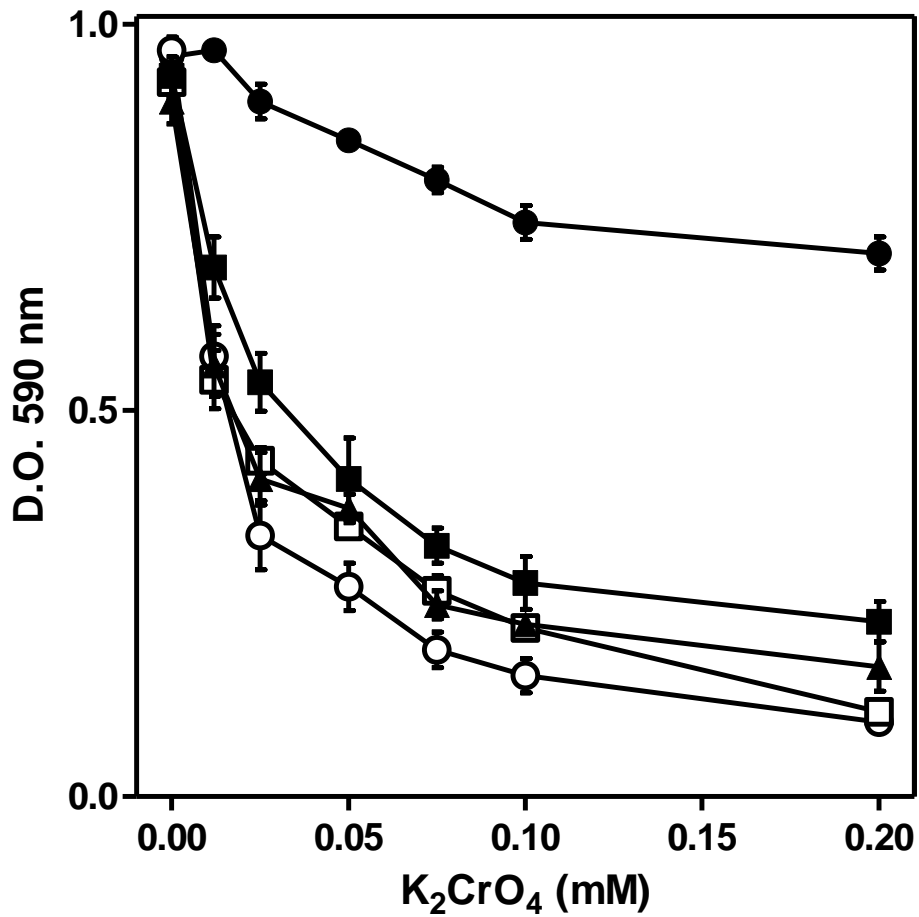


Figura 20. Susceptibilidad a cromato de las transformantes con los genes *chr* del cromosoma 1 de LB400. Los cultivos se crecieron en medio K1m por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. n=6. ● LB400, ○ CAC-124, ■ *chrA6*, □ *chrA1a*, ▲ *chr1NCa*. *B. xenovorans* LB400 (●), *chrA2::Gm-1* (○), *chrA2::Gm-1* (pUC_1NCa) (■), *chrA2::Gm-1* (pUC_A1a) (□), *chrA2::Gm-1* (pUC_1NCa) (▲). n=6.

IX. DISCUSIÓN

Burkholderia xenovorans LB400 tiene un genoma de 9.73 Mbp, con 9,043 genes, los cuales se distribuyen en tres replicones, denominados cromosoma 1 (4.9 Mbp), cromosoma 2 (3.36 Mpb) y megaplásmido (1.47 Mpb) (**Figura 4**). Esta bacteria posee en su genoma seis genes *chr* que codifican proteínas de la superfamilia CHR: cuatro proteínas grandes (ChrA1a, ChrA1b, ChrA6 y ChrA2) y dos pares de proteínas pequeñas (Chr1NCa y Chr1NCb). LB400 es resistente a cromato (**Figura 5**). Los genes *chr* confieren resistencia a cromato cuando se transfieren a *E. coli* (**Figura 6**) y presentan diferentes niveles de expresión en *B. xenovorans* (**Figura 7**). Sin embargo, se desconoce el nivel de resistencia a cromato conferido por cada uno de los genes *chr* en *B. xenovorans* LB400.

Se trabajó con un grupo de cepas ambientales de *B. xenovorans* aisladas de suelo (**Tabla 1**), las cuales presentan algunos genes *chr*, y fueron utilizadas para la transferencia de los plásmidos recombinantes que contienen de manera individual los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 (**Tabla 2**). Inicialmente se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria de cromato para las cepas ambientales de *B. xenovorans*, encontrando que la cepa CAC-124 se inhibió a una concentración de 100 μM de cromato, las cepas Tco-26, Tco-39 y Tco-213 a 200 μM y Tco-382 en 400 μM de K_2CrO_4 (**Tabla 4**). También se determinó la concentración inhibitoria de carbenicilina, debido a que los plásmidos recombinantes con los genes *chr* contienen un gen que confiere resistencia a dicho antibiótico, el cual fue empleado como factor de selección

de las transformantes. Todas las cepas ambientales de *B. xenovorans* se inhibieron a una concentración de 800 µg/ml de carbenicilina (**Tabla 5**).

Con la finalidad de seleccionar una cepa del grupo de *B. xenovorans* ambientales para la transferencia de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400, se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido (**Figura 10**). Se seleccionó la cepa que presentó mayor sensibilidad a cromato, para poder obtener un resultado preciso de la funcionalidad de los genes *chr*. Las cepas CAC-124 y Tco-26 presentaron mayor susceptibilidad a cromato que el resto de las cepas de *B. xenovorans* ambientales. Considerando la pequeña diferencia en uno de los puntos de la curva, se decidió emplear la cepa CAC-124.

Posteriormente, la cepa CAC-124 se transformó por electroporación con los plásmidos recombinantes con cada uno de los genes *chr*, seleccionando transformantes resistentes a carbenicilina. Las transformantes con los genes *chr* fueron caracterizadas por PCR (**Figura 11**), se utilizó el DNA de colonia y se realizó la amplificación de los genes *chr*, de acuerdo a las condiciones de la Tabla 3.

Una vez que se comprobó la presencia de los plásmidos recombinantes se procedió a realizar pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido. Se emplearon dos medios de cultivo: caldo nutritivo (medio rico) y medio K1m (medio mínimo), para analizar el comportamiento de los genes en ambas condiciones de crecimiento. Se utilizaron como controles las cepas de *B. xenovorans* LB400, que es altamente resistente a cromato, y la cepa receptora CAC-124, que es sensible al ion. El medio de cultivo en el que se crecen las bacterias tiene un papel importante para la expresión de los genes de manera que la proteína generada pueda llevar a cabo su función (Mergulhao y col., 2003). En caldo nutritivo (CN), a excepción del gen *chr1NCb*, el resto

de los genes *chr* confirieron resistencia a cromato, aunque a diferente nivel (**Figura 12**). En el medio K1m, todos los genes confirieron resistencia a cromato; sin embargo, se distinguieron dos grupos: las transformantes con los genes *chrA6*, *chrA1b*, *chr1NCb* y *chrA2* presentaron un mayor nivel de resistencia, similar al control resistente (LB400); mientras que las transformantes con los genes *chrA1a* y *chr1NCa* mostraron un comportamiento similar al de la cepa sensible CAC-124 (**Figura 13**).

B. xenovorans LB400 es un microorganismo que tiene un genoma de gran tamaño y una elevada redundancia de genes, lo que probablemente se relaciona con el hecho de que habita en múltiples nichos ecológicos (Chain y col., 2006). El hecho de que algunos genes *chr* (*chrA1b*, *chrA1a* y *chr1NCa*) respondan en determinado medio de cultivo, puede deberse a que sólo bajo condiciones de estrés, como la falta de nutrientes, pueden inducirse. Es decir, que los genes *chr* pueden expresarse o no dependiendo de las condiciones ambientales o de cambios nutricionales a las cuales esta bacteria se expone, lo que le puede conferir una ventaja adaptativa. La expresión diferencial de los genes *chr* le puede permitir a *B. xenovorans* LB400 sobrevivir a la exposición de cromato de manera independiente a la condición del cultivo.

Para obtener resultados cuantitativos de la participación de cada uno de los genes *chr* en el nivel de resistencia a cromato que presenta la cepa *B. xenovorans* LB400, se realizaron pruebas de viabilidad. Debido a que en las pruebas de susceptibilidad algunas de las transformantes mostraron pendientes similares o sobrepuestas, lo que dificulta conocer con precisión el nivel de resistencia que confieren los genes *chr*, considerando también el hecho de que en dichos ensayos se mide la turbidez del cultivo y no el número de células viables. Para determinar la viabilidad, se crecieron los cultivos de las transformantes con los genes *chr* en medios CN y K1m, utilizando

concentraciones de 100 μM y 25 μM de cromato, respectivamente, ya que a estas concentraciones de cromato, el crecimiento de la cepa receptora, CAC-124, se inhibe por completo, lo que permite obtener resultados precisos sobre el nivel de resistencia a cromato de las transformantes. Obteniendo como resultado que en CN, la transformante con el gen *chrA2* mostró el mayor número de UFC. En medio K1m, las transformantes con genes *chr* de replicones adaptativos exhibieron valores superiores de UFC, pero nuevamente la transformante con el gen *chrA2* del megaplásmido presentó el mayor nivel de UFC, valores similares a los obtenidos con la cepa LB400 (**Figura 15**). Estos datos sugieren fuertemente que los genes *chr* de replicones adaptativos son los principales responsables de la resistencia a cromato de la cepa LB400 e indican que el nivel de resistencia puede verse influenciado por el medio de cultivo. Estos resultados concuerdan con los reportados por Acosta-Navarrete y col. (2015), quienes demostraron que en LB400 los genes *chr* de los replicones adaptativos son los que se expresan mayoritariamente, sugiriendo la relevancia de estos genes en la resistencia a cromato. Se ha descrito que el medio de cultivo en el que se crecen los microorganismos puede proporcionar una condición fisiológica específica que influye en la expresión de genes y en la función de las proteínas; cuando las células bacterianas se crecen en medio mínimo, aumenta la expresión de genes relacionados con varios tipos de estrés, incluyendo el nutricional (Mergulhao y col., 2003).

El hecho de que el nivel de resistencia a cromato conferido por los genes *chr* se modifica bajo condiciones específicas de cultivo de la cepa CAC-124, sugiere que la expresión de estos genes probablemente también varía bajo diferentes condiciones de cultivo de *B. xenovorans* LB400. Esto podría explicar por qué LB400 posee genes *chr* redundantes, los cuales parecen inducirse bajo condiciones específicas de crecimiento.

Como el gen *chrA1b*, que sólo mostro resistencia a cromato cuando la transformante se creció en medio K1m (Figura 13).

Es de relevancia mencionar que en ambos medios de cultivo la transformante con el gen *chrA2* fue la que presentó un mayor número de UFC, lo que indica el nivel de resistencia a cromato. Esto puede deberse al hecho de que *chrA2* es el único gen que se induce en presencia de cromato en el medio (Acosta-Navarrete y col., 2015). O puede estar relacionado con la localización del gen *chrA2* dentro del genoma de *B. xenovorans*; es posible que la expresión de los genes de los replicones adaptativos, cromosoma 2 y megaplásmido, sea más eficiente que la del cromosoma central, dependiendo de las condiciones de cultivo (medio rico o mínimo).

Dado que la transferencia de los genes *chr* a la cepa CAC-124 sugirió fuertemente que los genes de los replicones adaptativos, principalmente *chrA2*, son los responsables de la resistencia a cromato, se realizó la interrupción del gen *chrA2* en la cepa LB400. Para esto se construyó un plásmido recombinante de integración, pAC_chrA::Gm, que contiene el gen de resistencia a gentamicina (Gm) (que fue empleado como marcador de selección) flanqueado por regiones 5' y 3' del gen *chrA2* de LB400 (**Figura 16**). Esta construcción se transfirió a la cepa LB400 con el objetivo de que se llevará a cabo un evento de doble recombinación homóloga entre el gen *chrA2* del cromosoma de LB400 y las regiones 5' y 3' de *chrA2* contenidas en el plásmido pAC_chrA2::Gm y de esta forma quedara integrado en el cromosoma el gen de Gm flanqueado por el gen *chrA2* no funcional. Se seleccionaron colonias resistentes a Gm y se comprobó la interrupción del gen *chrA2* del cromosoma de LB400 por análisis de PCR (**Figura 17**). Se observó el aumento esperado en el tamaño de la banda de DNA del gel de agarosa. Esto indicó la

interrupción del gen *chrA2*. Se confirmaron dos mutantes (*chrA2::Gm-1* y *chrA2::Gm-2*) a las que se evaluó el nivel de susceptibilidad a cromato.

Los resultados mostraron que la interrupción del gen *chrA2* en la cepa LB400 disminuye significativamente el nivel de crecimiento en cromato comparado con la cepa control LB400 (**Figura 18**), lo que confirma que este gen tiene una función relevante en la resistencia a cromato. Cuando varios genes de resistencia a metales pesados altamente relacionados están presentes en una bacteria, por lo general sólo uno es inducible por el metal, mientras que el resto se encuentran silenciados o expresados de manera constitutiva (Nies y col., 2006).

Células competentes de la mutante *chrA2::Gm-1* se transformaron con los plásmidos recombinantes con los genes *chr* de los replicones adaptativos. Una vez que fueron caracterizadas las transformantes, se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato en medio K1m, con la finalidad de evaluar si estos genes eran capaces de restaurar el fenotipo de resistencia a cromato con respecto a la resistencia de la cepa LB400. Los resultados obtenidos mostraron que los genes *chrA1b* y *chr1CNb*, al ser transferidos a la cepa *chrA2::Gm-1*, restauran en cierto grado el nivel de resistencia a cromato; sin embargo, la transformante con el gen *chrA2* fue la única que mostró un nivel similar a la cepa silvestre LB400 (**Figura 19**). Este resultado confirma aún más que el gen *chrA2* del megaplásmido es el más importante para la resistencia a cromato en LB400. Algunas bacterias que son resistentes a cromato presentan sólo un gen *chr*, como ocurre en el caso de *P. aeruginosa*, que es capaz de conferir altos niveles de resistencia a cromato con un solo gen *chr* contenido en el plásmido pUM505 (Cervantes y col., 1990); igual es el caso del gen *chrA2* que se localiza dentro del megaplásmido de *B. xenovorans*.

Finalmente, se transformó la cepa *chrA2::Gm-1* con los genes del cromosoma 1 y se realizaron pruebas de susceptibilidad a cromato en medio K1m. Las transformantes con los genes *chrA1a*, *chr1NCa* y *chrA6* recuperaron ligeramente el nivel de resistencia a cromato (**Figura 20**).

Si bien la transferencia de los genes del cromosoma 2, *chrA1b* o *chr1NCb*, no restauró la resistencia a cromato al mismo nivel que el gen *chrA2*, el nivel de resistencia que confieren es mayor que los genes del cromosoma 1, lo que sugiere que los genes *chr* del cromosoma 2 también desempeñan un papel importante en la resistencia a cromato de la cepa LB400.

Aunque se había reportado que en *E. coli* (León-Marquez y col., 2011) los genes *chr* de *B. xenovorans* confieren resistencia a cromato, en este trabajo no sólo se pudo confirmar la funcionalidad de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 cuando se transfieren a cepas de *B. xenovorans* que son sensibles a cromato, sino que, además, se encontró que algunos genes *chr* parecen ser inducidos dependiendo de la condición de crecimiento. El nivel de UFC que presentaron las transformantes con dicho genes concuerda con los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad a cromato en medio líquido, además de que el nivel de UFC en medio K1m coincide con los niveles de expresión de los genes *chr* reportados por Acosta-Navarrete y col. (2015). En este trabajo, el gen *chrA2* presentó un mayor nivel de expresión, lo cual explica por qué al ser interrumpido el nivel de resistencia a cromato de la cepa LB400 disminuye drásticamente. Y que sólo cuando se transfiere el gen silvestre a la mutante *chrA2::Gm-1*, se logra recuperar el nivel de resistencia de la cepa LB400. Sin embargo, el resto de los genes parece tener una participación, aunque a menor nivel, en la resistencia a

cromato. Esto indica que la resistencia a cromato de la cepa *B. xenovorans* LB400 se debe a la participación conjunta de los genes *chr*, los cuales se inducen en determinadas condiciones de crecimiento.

Sin embargo, en este trabajo se pudo demostrar que son los genes de los replicones adaptativos los principales involucrados en la determinación del estilo de vida de *B. xenovorans* LB400, al proporcionar a esta cepa capacidades altamente especializadas (Chain y col., 2006), como en el caso de la resistencia a cromato.

X. CONCLUSIÓN

Es el conjunto de genes *chr* el responsable de la resistencia a cromato de *B. xenovorans* LB400, siendo el gen *chrA2* del megaplásmido el que confiere un mayor nivel de resistencia.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta-Navarrete YM, León-Márquez YL, Salinas-Herrera K, Jácome-Galarza IE, Meza-Carmen V, Ramírez-Díaz MI, Cervantes C (2014). Expression of the six chromate ion transporter homologues of *Burkholderia xenovorans* LB400. *Microbiology* 160:287-295.
2. Aguilar-Barajas E, Paluscio E, Cervantes C, Rensing C (2008). Expression of chromate resistance genes from *Shewanella* sp. strain ANA-3 in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 285:97–100.
3. Aguilar-Barajas E, Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H, Cervantes C (2010). “Heavy metal resistance in Pseudomonads”, en *Pseudomonas*, Capítulo 9, 255-282, DOI: 10.1007/978-90-481-3909-5_9.
4. Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160: 63–67.
5. Álvarez AH, Moreno-Sánchez R, Cervantes C (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 181: 7398-7400.
6. Bedard DL, Unterman R, Bopp LH, Brennan MJ, Haberl ML, Johnson C (1986). Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 761–768.
7. Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 7:1513-1523.

8. Burkholder WH (1948). Bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 2:389-412.
9. Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, and Martínez-Aguilar L (2007). The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5308-5319.
10. Cabisco E, Tamarit J, Ros J (2000). Oxidative stress in bacterial and protein damage by reactive oxygen species. *Internal. Microbiol.* 3: 3-8.
11. Cary EE (1982). Chromium in air, soil, and natural waters. In: Lansgard S. (ed.) *Biological and Environmental Aspects of Chromium* Elsevier, Amsterdam, 48-64.
12. Cervantes C, Campos-García J (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. In: Nies DH, Silver S (eds.) *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin, 407-402.
13. Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno Sánchez (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 335-347.
14. Cervantes C, Ohtake H, Chu L, Misra TK, Silver S (1990). Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* 172:287-291.
15. Cervantes C, Silver S (1990). Inorganic cation and anion transport systems of *Pseudomonas*. 359–372. In: Silver S, Chakrabarty AM, Iglewski B, Kaplan S (eds.). *Pseudomonas: biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC.

16. Cervantes S, Silver S (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27: 65-71.
17. Chain PSG, Denev VJ, Konstantinidis KT, Vergez LM, Agulló L, Latorre-Reyes V, Hauser L, Córdova M, Gómez L, González M, Land M, Lao V, Larimer F, LiPuma JJ, Mahenthiralingam E, Malfatti SA, Marx CJ, Parnell JJ, Ramette A, Richardson P, Seeger M, Smith D, Spilker T, Jun Sul W, Tsoi TV, Ulrich LE, Zhulin IB, Tiedje JM (2006). *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *PNAS*.103:15280-15287.
18. Díaz-Pérez C, Cervantes C, Campos-García J, Julián-Sánchez A, Riveros-Rosas H (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J.* 274: 6215–6227.
19. Dreyfuss J. (1964). Characterization of a sulfate-and thiosulfate-transporting system in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 239:2292-2297.
20. Ehrlich HL (2002). How microbes mobilize metals in ores: A view of current understandings and proposals for further research. *Miner. Metall. Process* 19:220-224.
21. Goris J, De Vos P, Caballero-Mellado J, Falsen E, Quensen III JF, Tiedje JM, Vandamme P (2004) Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400 (t) and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1677–1681.
22. Kadiiska MB, Xiang QH, Mason RP (1994). In vivo free radical generation by chromium (VI): an electron spin resonance spin-trapping investigation. *Chem. Res. Toxicol.* 7: 800-805.

23. Katz SA, Salem H (1993). The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* 13: 217-224.
24. Kawanishi S, Inoue S, Sano S (1986). Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (IV) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 261: 5952-5958.
25. Khashim DI, Kumar NV, Hussain RC (1989). Environmental contamination of chromium in agricultural and animal products near a chromate industry. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 742-746.
26. León-Márquez YL (2009). Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
27. León-Márquez YL, Ramírez-Díaz MI, Cervantes C (2011) Clonación y expresión funcional de proteínas bacterianas de la familia LCHR. *Ciencia Nicolaita* 53: 36-4.
28. Losi ME, Amrhein C, Frankenberger WT Jr (1994). Environmental biochemistry of chromium. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 136: 91-121.
29. Luna-Luna M. (2010). Análisis de la expresión de los genes *chr* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México.
30. Marx CJ, Miller JA, Chistoserdova L, Lidstrom ME (2004). Multiple formaldehyde oxidation/detoxification pathways in *Burkholderia fungorum* LB400. *J. Bacteriol.* 186: 2173-2178.

31. McGrath SP, Smith S (1990). Chromium and nickel. En: Heavy Metals in Soils. Alloway, B. J. (Ed.) Wiley, Nueva York. pp. 125-150.
32. McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Mynhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist A, Wang D, Dosanjh M, Hirofurni H, Pretescu A, Morin RD, Yang G, Stott JM, Schein JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJM, Holt R, Brinkman FSL, Miyauchi K, Fukuda M, Davies, JE, Mohn WW, Eltis LD (2006). The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. PNAS 103:15582–15587.
33. Mergulhao FJM, Monteiro GA, Larsson G, Sandén AM, Farewell A, Nystrom T, Cabral JMS, Taipa MA (2003). Medium and copy number effects on the secretion of human proinsuline in *Eschrichia coli* using the universal stress promoters *uspA* and *uspB*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:495-501.
34. Nies A, Nies DH, Silver S (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant of *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265: 5648-5653.
35. Nies DH, Koch S, Wachi S, Peitzsch N, Saier MH (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulfate antiporters. *J. Bacteriol.* 180: 5799-5802.
36. Nies DH, Silver S (1989) Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171: 896-900.
37. Nies DH, Rehbein G, Hoffman T, Baumann C, Grosse C. (2006). Paralogs of genes encoding metal resistance proteins in *Cupriavidus metallidurans* strain CH34. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11: 82-93.

38. Ohtake H, Cervantes C, Silver S (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 169: 3853-3856.
39. Pardee AB, Prestidge LS, Whipple MB, Dreyfuss J (1966). A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 241: 3962-3969.
40. Payne GW, Vandamm P, Morgan SH, LiPuma JJ, Coenye T, Weightman AJ, Hefin-Jones T, Mahenthiralingam E (2005). Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3917–3927.
41. Pimentel BE, Moreno-Sánchez R, Cervantes C (2002). Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the ChrA protein. *FEMS Microbiol. Lett.* 212: 249-254.
42. Ramírez-Díaz MI, Díaz-Pérez C, Vargas E, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C (2007). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals* 21: 321-332.
43. Shi X, Dalal NS (1990). On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 277: 342-350.
44. Sirko A, Hryniewicz M, Hulanicka D, Böck A (1990). Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: Nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* gene cluster. *J. Bacteriol.* 172:3351-3357.
45. Zhitkovich A (2004) Importance of chromium DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium (VI). *Chem. Res. Toxicol.* 18:3-11.