



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas-Programa de Magíster en Ciencias mención
Microbiología

**Flujo de genes en condiciones oligotróficas.
Pseudomonas sp. aisladas desde ambientes acuáticos
patagónicos como modelo de estudio.**

EVELYN MARISOL HERNÁNDEZ GUÍÑEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2014

Profesor Guía: Miguel Martínez Poblete
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción





Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas-Programa de Magíster en Ciencias mención
Microbiología

**Flujo de genes en condiciones oligotróficas.
Pseudomonas sp. aisladas desde ambientes acuáticos
patagónicos como modelo de estudio.**

EVELYN MARISOL HERNÁNDEZ GUÍÑEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2014

Profesor Guía: Miguel Martínez Poblete
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

Dr. Miguel Martínez Poblete
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

Dr. Víctor Campos Araneda
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Ricardo Barra
Facultad de Ciencias Ambientales
Universidad de Concepción

Director de Programa

Dr. Carlos González Correa
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

A Dios que me ha dado la vida, gracias a esas personas importantes que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda. Con todo mi cariño esta tesis se la dedico a ustedes:

Papá

Mamá

Hermano

Inesita

Tía Lucy



*“Lo que sabemos es una gota de agua;
lo que ignoramos es el océano”.*

Isaac Newton.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada con financiamiento otorgado por Proyecto FONDECYT N° 1100462, DIUC Patagonia 210.036.037-1SP, Beca para estudios de Magíster en Chile 22111562, Programa de Becas de Estipendio Dirección de Postgrado Universidad de Concepción.

Me gustaría expresar en estas líneas mis sinceros agradecimientos a todos los que de una forma u otra contribuyeron al desarrollo de esta tesis de magíster. A mi tutor Dr. Miguel Martínez, quién siempre brindó su apoyo a mis ideas “locas” y me dio las bases para desarrollar mi tesis y concluirla de manera exitosa. Gracias profesor por sus conversaciones de la vida y su comprensión. Quiero también agradecer al Dr. Carlos González quien siempre era un aporte al momento de discutir experimentos o resultados.

A todos los que conocí durante mi estadía en el laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación, especialmente a quienes estuvieron la mayor parte del tiempo del desarrollo de mi tesis, Pamela, Paulina, Matías, Karina, Daniela, y mi “convi” Paulina. Gracias Ruth por enseñarme el manejo de las cosas básicas en el laboratorio, muchas veces me sacaste de aprietos y ayudaste a finalizar un experimento.

A mis colegas y amigos bioquímicos en especial a Cecilia y Valentina que siempre estaban conmigo en tiempo de dificultades.

A Dios y mi linda familia por brindarme su apoyo, sin su ayuda no habría alcanzado la meta, un agradecimiento especial a una persona que ya no está y que me recibió en su hogar cuando decidí venir a Concepción a estudiar, siento mucho que no estés abuelita.

MUCHAS GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
3. METODOLOGÍA	12
3.1. Cepas bacterianas	12
3.2. Caracterización de las cepas	13
3.2.1. Estudio de las capacidades de degradación	13
3.2.2. Perfiles de resistencia a antibióticos y determinación de concentración mínima inhibitoria	13
3.2.3. Identificación bacteriana	14
3.2.4. Estudios de sobrevivencia en inanición de carbono	14
3.3. Conjugación bacteriana	14
3.4. Análisis de datos	17
3.5. Ensayos de Restricción	18
3.6. Ensayos de Actividad Exonucleasa	19
4. RESULTADOS	21
4.1. Caracterización de las cepas	21
4.1.1. Sobrevivencia bacteriana en condiciones de inanición y determinación de la concentración mínima inhibitoria	21
4.2. Conjugación bacteriana	22
4.2.1. Aislamiento y caracterización del plásmido pJP4 en las cepas bacterianas	24
4.3. Ensayos de Restricción	25

4.4. Ensayos de Actividad exonucleasa	26
5. DISCUSIÓN	27
6. CONCLUSIONES	32
7. PROYECCIONES	33
8. REFERENCIAS	34



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Degradación de compuestos aromáticos por vía aeróbica	4
Figura 2. Mapa genético del plásmido pJP4 IncP-1 β	12
Figura 3. Plásmidos pJP4 y pUC19	19
Figura 4. Electroforesis de los productos de amplificación del gen <i>tdfB</i>	25
Figura 5. Gel de digestión pUC19 con extractos celulares	26
Figura 6. Gel de digestión pUC19 con sobrenadante de cultivos celulares	26



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Controles experimentos de conjugación	16
Tabla 2. Partidores detección <i>tdB</i>	17
Tabla 3. Perfiles de resistencia a antibióticos	21
Tabla 4. Ensayos de conjugación	22
Tabla 5. Frecuencia de transconjugantes con y sin inanición de carbono	23
Tabla 6. Eventos de transferencia	23
Tabla 7. Frecuencia de transconjugantes en distintas condiciones de cultivo	24
Tabla 8. Degradación de ácido 2,4-diclorofenoxiacético	24



RESUMEN

En ambientes acuáticos oligotróficos, los microorganismos se enfrentan a fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes, comprometiendo su sobrevivencia. En estas condiciones las bacterias disminuirían la eficiencia de sus sistemas de Restricción- Modificación (RM) favoreciendo la adquisición de ADN plasmidial por conjugación. Se evaluó si en cepas bacterianas aisladas desde ambientes oligotróficos la inanición de carbono disminuiría la eficiencia de los sistemas RM incrementando la frecuencia de transconjugantes.

Se estudió en *Pseudomonas sp.* (RG8, UDEC-P17), aisladas desde ambientes oligotróficos, sus capacidades para adquirir ADN por conjugación utilizando *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 con el plásmido pJP4 como dadora. Los ensayos de conjugación fueron realizados en presencia y ausencia de carbono. Las cepas se cultivaron durante 48 h a 30°C (120 rpm), en caldo Mueller- Hinton (MH) o durante 7 días en medio salino mínimo (MSM) para la condición de inanición. La conjugación se realizó en matraces con 10 mL de caldo MH ó en microplacas, detectándose las transconjugantes en placas con agar MH, adicionadas con gentamicina (15 µg/mL) y cloranfenicol (40 µg/mL) ó por reducción de sales de tetrazolium (WST-1). La eficiencia de los sistemas RM, con o sin inanición, se determinó en ensayos de restricción *in vitro* utilizando como sustrato el plásmido pUC19. Los resultados indican que en inanición de carbono los sistemas RM estarían activos observándose desaparición del ADN plasmidial, con una frecuencia de transconjugantes que disminuye al menos 10 veces en esta condición, sugiriendo que estas bacterias, adquieren ADN por conjugación, y que la inanición y presencia de sistemas RM en células receptoras no sería un impedimento para la transferencia.

ABSTRACT

In oligotrophic aquatic environments, microorganisms are faced to fluctuations in the availability of nutrients, endangering their survival. Under these conditions, bacteria would decrease the efficiency in their Restriction- Modification systems (RM) favoring the acquisition of plasmid DNA by conjugation. The aim of this work was evaluated in bacterial strains isolated from oligotrophic environments it was assessed if carbon starvation would decrease the efficiency of RM systems, increasing the frequency of transconjugants.

The work was carried out using strains isolated from oligotrophic environments *Pseudomonas sp.* (RG8 and UDEC-P17), studying their capacities to acquire DNA by conjugation using as a plasmid donor *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134, carrying plasmid pJP4. Conjugation assays were performed in both presence and absence of carbon source. Strains were incubated in Mueller-Hinton broth (MH) for 48 h at 30°C or during seven days in mineral salt medium to carbon starvation. Conjugation was carried out in flasks with 10 mL MH broth. The transconjugants were selected in MH agar plates containing gentamicin (15 µg/mL) and chloramphenicol (40 µg/mL) or detected in microplates by reduction of tetrazolium salts (WST-1). The efficiency of the RM systems with or without starvation was determined by *in vitro* restriction assays using the plasmid pUC19 as substrate. Results indicate that under carbon starvation RM systems would be active, and the frequency of transconjugants decrease in at least 10 times. Thereby, starvation and presence of RM systems in receptor cells would not be an impediment to the plasmid transfer by conjugation.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias están adaptadas a diversas condiciones existentes en el planeta, incluidos los ambientes acuáticos con baja oferta de nutrientes, considerados oligotróficos, en los cuales la disponibilidad de carbono puede fluctuar entre 1 a 15 mg por litro de agua (Cavicchioli *et al.*, 2003; Roszak y Colwell, 1987). Por la mayor rigurosidad de este tipo de ambientes las bacterias que aquí residen tienen estrategias funcionales y estructurales que les permiten responder a los cambios en la disponibilidad de nutrientes (Harder y Dijkhuizen, 1983). Entre las estrategias desarrolladas por las bacterias se encuentra; la formación de endosporas (Piggot y Hilbert, 2004), dormancia metabólica (Kaprelyants *et al.*, 1993), disminución del tamaño celular (ultramicrobacterias) (Torrella y Morita, 1981) y producción de poli- β -hidroxialcanoato (PHA) (Pavez *et al.*, 2009). También se ha descrito que el intercambio de ADN entre organismos de diferentes especies contribuye a mejorar la sobrevivencia de las bacterias (Jain *et al.*, 2002).

La esporulación se produce en células que se encuentran inicialmente en crecimiento pero son inducidas a diferenciarse en esporas por inanición de carbono, nitrógeno o en algunas circunstancias fósforo, la spora producida durante la esporulación funciona como un medio de conservación del ADN y de proteínas esenciales para cuando las condiciones vuelvan a ser favorables y se produzca la germinación de la spora (Piggot y Hilbert, 2004). El estado “dormante” ayuda a la célula a sobrevivir por un largo tiempo sin crecimiento y multiplicación. La dormancia sería un estado reversible de baja actividad metabólica, en el cual las células no pueden formar una colonia cuando son cultivadas en un medio sólido adecuado, pero no se encuentran muertas, por lo tanto, cuando las condiciones se vuelven favorables pueden revertir a un estado “vivo” (Kaprelyants *et al.*, 1993). Las ultramicrobacterias fueron definidas por Torrella y Morita (1981) como células bacterianas de pequeño tamaño, de tasas

de crecimiento lento, y que no tienen un aumento significativo de su tamaño cuando son cultivadas en agar rico en nutrientes. Para recuperar ultramicrobacterias es necesario concentraciones mínimas de nutrientes y tiempos prolongados de incubación. Estas bacterias serían parte de la comunidad autóctona de medio ambientes como el agua marina y estuarios, y representan una estrategia de sobrevivencia, a las bajas concentraciones de materia orgánica en el agua marina (Roszak y Colwell, 1987; Torrella y Morita, 1981). PHA es un polímero intracitoplasmático de reserva de carbono y energía que puede permitir la sobrevivencia de las células bajo condiciones de estrés, siendo utilizado en distintos procesos metabólicos bacterianos cuando hay escasez de nutrientes, la acumulación de PHA aumenta la sobrevivencia en ambientes cambiantes, permitiendo que la bacteria pueda tolerar el estrés (Ayub *et al.*, 2004). En estudios realizados por Pavez *et al.* (2009) se observó que el PHA actúa protegiendo contra el daño de membrana celular cuando las bacterias son sometidas a inanición de carbono y así evitar la muerte bacteriana, por lo que el contenido de PHA y su consumo puede ser expresado en bacterias que viven en ambientes rigurosos, tales como los con baja disponibilidad de carbono.

La transferencia horizontal de genes (HGT), proceso que permite el intercambio de ADN entre organismos de diferentes especies (Jain *et al.*, 2002), aportaría ventajas puesto que, sería una forma de innovación genética importante en la evolución de los procariontes (Gogarten *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 2002; Popa y Dagan, 2011), incrementando la diversidad metabólica, y con ello mejorando la competencia de esas bacterias en un ambiente que presente oscilaciones de en la cantidad de nutrientes disponibles (Jain *et al.*, 2003; De Souza *et al.*, 2006, Van Wolferen *et al.*, 2013). Estudios realizados por Pál *et al.* (2005) sugieren que HGT sería un mecanismo para la expansión de las vías metabólicas en bacterias, facilitando así la adaptación a nuevos ambientes. Estas vías metabólicas se habrían estructurado en respuesta a factores ambientales, no sólo por cambios en la cinética enzimática, a través, de mutaciones puntuales, sino también por la captación de genes periféricos u operones a través de HGT.

Microorganismos que habitan en ambientes considerados oligotróficos y prístinos (con poca intervención humana), pueden estar expuestos a la presencia de contaminantes orgánicos tóxicos como fungicidas, pesticidas, herbicidas, insecticidas. Estas sustancias que son aplicadas en las cosechas y al suelo son consideradas recalcitrantes, y tóxicas para algunos organismos (Abayomi, 2007). Estos compuestos han sido liberados a los ecosistemas, generalmente como consecuencia de actividades humanas, tales como, la industria agropecuaria, actividad forestal, industria acuícola (Díaz, 2004). Sin embargo, por efecto del transporte atmosférico estos compuestos podrían migrar, a través, de la atmósfera tanto en forma de vapor o adheridos a partículas de aerosoles, y luego condensar favoreciéndose su depósito (Wania y Mackay, 1993), además la influencia del cambio climático y el calentamiento global al que está sometido el planeta, aumentaría el transporte y deposición de contaminantes en zonas remotas donde su uso es menor o no son utilizados (Bargagli, 2008). Lagos ubicados en latitudes altas, también se ven afectados por el depósito de este tipo de compuestos (Borghini *et al.*, 2005; Pozo *et al.*, 2007). Estos compuestos tóxicos se encontrarían tanto en el aire, como depositados en suelo, sedimento y agua presentes en el lugar (Iwata *et al.*, 1993; Ockenden *et al.*, 2001; Pozo *et al.*, 2007). Por otro lado, algunos organismos, tales como, algas y esponjas marinas, bacterias y hongos marinos, algunas plantas terrestres e insectos, también representan una fuente de compuestos orgánicos tóxicos (Gribble, 2003).

Frente a la presencia de compuestos orgánicos considerados tóxicos las bacterias expresan diferentes vías metabólicas (biodegradativas), para la obtención de carbono y la energía necesaria para su metabolismo. Por medio de las vías metabólicas los microorganismos pueden usar diversos compuestos aromáticos como fuente de carbono y energía (Harayama y Timmis, 1992). Esto también se ve reflejado en la existencia de bacterias con propiedades catabólicas que les permiten degradar compuestos orgánicos considerados tóxicos o contaminantes (Figura 1) (Abayomi, 2007; Aguayo *et al.*, 2009; Díaz, 2004).

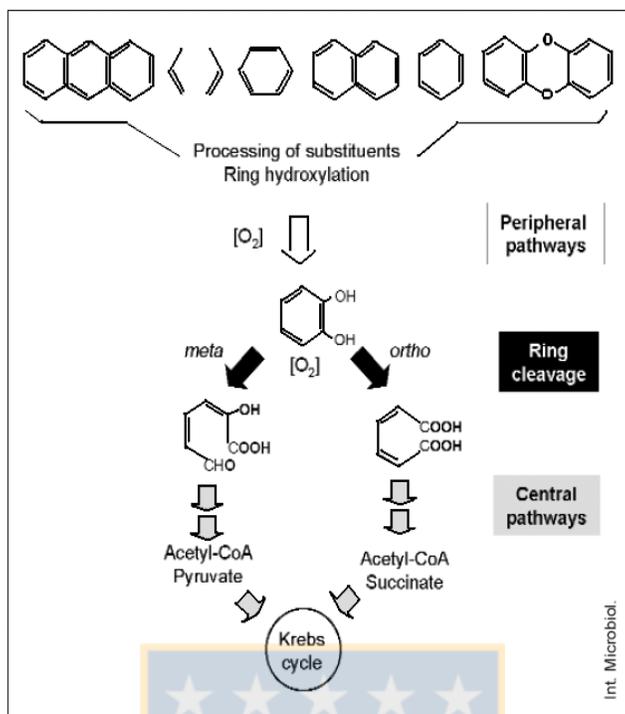


Figura 1. Degradación de compuestos aromáticos por vía aeróbica. Flechas blancas: vías periféricas, flechas negras: clivaje del anillo, flechas plomas: vías centrales. (Extraído de Díaz, 2004).

La adaptación de poblaciones de bacterias aeróbicas heterotróficas a compuestos orgánicos tóxicos se vería favorecida por la existencia de material genético móvil, otorgándoles enzimas necesarias para la degradación de este tipo de compuestos. En efecto, grupos de genes que codifican para el catabolismo de compuestos aromáticos usualmente se encuentran en elementos genéticos móviles, tales como plásmidos o transposones lo cual facilita su transferencia y, por lo tanto, la rápida adaptación de microorganismos a la presencia de contaminantes (Díaz, 2004). Así, se han encontrado genes que codifican para un amplio rango de enzimas catabólicas involucradas en la degradación de compuestos tanto de origen natural, como aportados por actividades humanas (Abayomi, 2007; De la Cruz y Davies, 2000; Díaz, 2004).

Existen variados ejemplos de plásmidos y otros elementos genéticos móviles, que codifican para enzimas involucradas en vías catabólicas de degradación de estos compuestos, por ejemplo, el plásmido pJP4 que codifica para enzimas

involucradas en la degradación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Don y Pemberton, 1985; Trefault *et al.*, 2004). Estos elementos genéticos tienen la propiedad para transferirse a otros microorganismos por medio de HGT, contribuyendo a la diseminación de estos determinantes catabólicos, por conjugación o transformación con posterior integración y replicación en ellos (Top *et al.*, 2002). En este sentido, Jain *et al.* (2003) señalaron que HGT no sería al azar sino que, dependería de factores internos y externos. Los autores señalan que, HGT sería influenciada por algunos componentes del medio ambiente (factores externos), como la temperatura y el pH. Además, consideran que los genes son esencialmente intercambiados entre organismos que comparten similar tamaño del genoma, composición de Guanina/Citosina, utilización de carbono y tolerancia al oxígeno.

Entre los mecanismos de HGT cabe destacar; la transformación y conjugación bacteriana. En la transformación, se produce captación, integración (recombinación homóloga) o reconstitución del ADN plasmidial, y expresión del material genético adquirido (Krüger y Stingl, 2011; Thomas y Nielsen, 2005). Para que ocurra transformación es necesario que las células bacterianas estén en un estado fisiológico de competencia (Dubnau, 1999), en este estado las células bacterianas son capaces de captar y asimilar ADN exógeno (Lopez *et al.*, 2009). El estado de competencia en la mayoría de los casos se desarrolla por un espacio de tiempo limitado, y como respuesta a condiciones ambientales específicas, tales como, limitación de nutrientes o períodos de inanición, estrés genotóxico que produzca daño al ADN (presencia de ciertos antibióticos o radiación UV), o por señales de comunicación bacteriana (*quorum-sensing*) (Seitz y Blokesch, 2013). Para que sea posible la transformación es necesaria: la liberación y persistencia del ADN (fragmentos de ADN o plásmidos) en el medio extracelular, la presencia de células bacterianas competentes y la habilidad para estabilizar el ADN incorporado. Cuando la célula bacteriana entra en contacto con el ADN, se produce una unión no covalente entre el ADN y algunos sitios presentes en la superficie de la célula. Luego de la unión el ADN extracelular es

translocado a través de la membrana interna, y la doble hebra de ADN es convertida en ADN del tipo mono hebra (Chen y Dubnau, 2004; Claverys *et al.*, 2009). Para que el ADN sea translocado, algunas especies bacterianas requieren una secuencia de nucleótidos específica, es decir, son selectivas, mientras que otras especies captan ADN independientemente de su secuencia (Hamilton y Dillard, 2006; Lorenz y Wackernagel, 1994; Stewart y Carlson, 1986; Thomas y Nielsen, 2005). Si el ADN incorporado por transformación a la célula es un plásmido, este nuevo material genético, persistirá brevemente en el citoplasma bacteriano, ya que como mono-hebra no puede replicarse durante la división celular, por otro lado, si se forma una doble-hebra, este puede ser fragmentado por la acción de las enzimas de restricción. Sin embargo, cuando nos referimos a la transformación natural generalmente ésta involucra fragmentos de ADN, los que se encuentran en forma de mono-hebra, por lo que ingresan a la célula bacteriana evadiendo a las endonucleasas de restricción para posteriormente integrarse en el ADN de la célula huésped por recombinación homóloga (Majewski, 2001; Thomas y Nielsen, 2005).

En la conjugación, la transferencia de material genético es mediada por uniones célula-célula y un poro a través del cual puede pasar el ADN (De la Cruz *et al.*, 2010; Llosa *et al.*, 2002). La conjugación se lleva a cabo de distinta manera en las bacterias Gram negativas y Gram positivas. En las bacterias Gram negativas se encuentran los sistemas de conjugación de mayor complejidad, que son aquellos codificados por grandes plásmidos auto-transmisibles que usan un sistema de secreción para producir un *pili* (Llosa *et al.*, 2002). Los sistemas de secreción bacterianos son transportadores macromoleculares que han sido clasificados en 7 grupos principales (grupos I al VII). Dentro de los sistemas de secreción, los del tipo IV (T4SSs) se han descrito como los responsables de producir un *pili* para la conjugación de plásmidos entre bacterias Gram negativas, siendo su función principal transportar el ADN dentro de la bacteria receptora (Hayes *et al.*, 2010). El *pili*, es una estructura que permite el contacto célula-célula para generar una unión entre la bacteria y el poro a través del cual el ADN plasmidial y algunas

proteínas codificadas por la célula dadora, pueden ser transportadas al receptor (Cascales y Christie, 2003). Adicionalmente el *pili* puede servir para abrirse paso, a través, de cualquier barrera presente en el receptor, lo cual facilita la entrada del ADN, a través, del T4SS (Llosa *et al.*, 2002). Una característica considerada importante para la conjugación, es la especificidad de la interacción producida para que se forme este aparato de apareamiento (*pili* o su equivalente) con los lipopolisacáridos y las proteínas de la membrana externa de la superficie de la célula receptora (Anthony *et al.*, 1994; Ishiwa y Komano, 2004), así también se debe considerar: la densidad celular bacteriana, la actividad metabólica celular, la relación entre la célula dadora y la receptora, la disponibilidad de nutrientes y la estructura espacial de la comunidad bacteriana (Seoane *et al.*, 2011). En el caso de los sistemas de conjugación estudiados en bacterias Gram positivas, éstos presentan una mayor diversidad (Grohmann *et al.*, 2003). Una clase de sistemas de transferencia codificados por enterococos, consiste en la producción de feromonas específicas, las que generan como respuesta del receptor, la producción de adhesinas, las que permiten formar agregados de conjugación y así aumentar la frecuencia de transferencia de plásmidos (Grohmann *et al.*, 2003; Hirt *et al.*, 2002).

Para que se realice transferencia horizontal de genes se presentan variadas limitaciones. Una limitante es la exclusión de superficie, la que impide la transferencia entre sistemas de transferencia que estén estrechamente relacionados (Frost *et al.*, 1994). Esta exclusión de superficie resulta de la presencia de dos proteínas *tra*, una proteína de membrana externa y otra de membrana interna. La proteína *tra* de membrana externa (TraT) bloquea los pasos iniciales de formación del par de apareamiento, mientras que la proteína *tra* de membrana interna (TraS), bloquea el paso del ADN cuando el par de apareamiento ya ha sido formado (Frost *et al.*, 1994). También se debe considerar la incompatibilidad de plásmidos, la que implica la incapacidad, de dos plásmidos, de coexistir en una misma célula huésped (Summers, 1996). Esta incompatibilidad se debe principalmente a la interferencia en las funciones de

control de la replicación, ya que los plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad tienen maquinarias de replicación similares, lo que previene que dos plásmidos de la misma familia se repliquen en una misma célula (Dennis, 2005). Otra limitación existente para la transferencia horizontal de genes, es la existencia de los sistemas de Restricción- Modificación (RM), los que representan una barrera al producirse el ingreso de ADN foráneo a la célula, ofreciendo un mecanismo de defensa contra la invasión de éste (Kobayashi, 2001; Wilson y Murray, 1991).

En los sistemas RM las enzimas de restricción reconocen el ADN entrante como foráneo y lo cortan en sitios específicos, mientras que las enzimas de modificación (metiltransferasas) modifican el ADN del huésped por metilación específica para protegerlo de la acción de las enzimas de restricción (Jeltsh, 2003; Murray, 2000; Tock y Dryden, 2005; Wilson y Murray, 1991). Los sistemas RM se clasifican de acuerdo a su composición de subunidades, sitio de reconocimiento del ADN, requerimiento de cofactor y posición de clivaje del ADN, en 4 grupos (I, II, III y IV) (Roberts *et al.*, 2003). En general cuando se produce ingreso de ADN foráneo a la célula este es inactivado por clivaje endonucleolítico de la enzima de restricción, mientras que la metilación de una citosina o adenina específica dentro de la secuencia de reconocimiento confiere protección de la restricción (Tock y Dryden, 2005). Sin embargo, se ha propuesto que en condiciones desfavorables que no permiten la multiplicación celular, las células bacterianas disminuirían la eficiencia de sus sistemas RM (Velkov, 2002). En diversos estudios de transferencia de ADN en los que se ha sometido a la célula receptora, a condiciones de estrés, se ha evidenciado un aumento de la transferencia horizontal de genes (Beaber *et al.*, 2003; Gonzalez *et al.*, 1999; Kelleher y Raleigh, 1994). En la célula receptora se produciría el fenómeno de “Restriction Alleviation” (RA). En general RA genera una disminución de la eficiencia de la restricción ya sea porque *a*) disminuye la expresión de la enzima de restricción, *b*) las células expresan una proteína que puede degradar, inhibir o competir con la enzima de restricción y *c*) en la célula puede haber un producto de reparación del ADN, un metabolito o una estructura

específica en el ADN (por ejemplo, estructura de Holliday), lo que provoca que la enzima de restricción no esté disponible para actuar frente al ADN foráneo (Kelleher y Raleigh, 1994). En este sentido, se tiene evidencia experimental que corrobora que en casos de estrés, tales como, calor (Gonzalez *et al.*, 1999), presencia de ciertos agentes antibacterianos (Beaber *et al.*, 2003), irradiación con luz ultravioleta (Kelleher y Raleigh, 1994), se produce una disminución de la eficiencia de los sistemas RM, generándose como consecuencia un aumento de la frecuencia de transferencia de ADN. Velkov (2002) señala que probablemente con estrategias de este tipo, frente a situaciones de estrés, aumentan las posibilidades para adquirir nuevos genes que codifiquen enzimas que les permitan a las células bacterianas utilizar otros substratos carbonados incluyendo materia orgánica alóctona para mantener su metabolismo e incluso reiniciar su crecimiento.

Los ambientes acuáticos patagónicos pueden ser considerados prístinos o con baja intervención humana (Aguayo *et al.*, 2014), Mackenzie *et al.* (2011) caracterizó genética y metabólicamente comunidades bacterianas de lagos ubicados en la Patagonia chilena encontrando alta diversidad funcional en éstos. Sin embargo, los lagos patagónicos, si bien no están directamente influenciados por actividades humanas o industriales pueden estar expuestos a la presencia de contaminantes orgánicos tóxicos como fungicidas, pesticidas, herbicidas, insecticidas, esto debido a su localización geográfica y su clima frío. Estos dos parámetros favorecerían el depósito de este tipo de compuestos que pueden ser transportados, a través, de la atmósfera en forma de vapor o adheridos a partículas de aerosoles (Borghini *et al.*, 2005; Pozo *et al.*, 2007). Cualquiera sea el origen de la incorporación de compuestos orgánicos tóxicos su presencia puede ocasionar una perturbación al ecosistema. En este sentido, Aguayo *et al.* (2009) describió en lagos ubicados en la Patagonia chilena la existencia de bacterias aeróbicas con la habilidad para utilizar como fuente de carbono y energía compuestos tóxicos (2,4,6- tribromofenol y 2,4,6- triclorofenol). Aguayo *et al.* (2009) señaló que estas comunidades bacterianas podrían participar en procesos

de biorremediación de compuestos tóxicos incorporados al ambiente. Aguayo *et al.* (2014) evaluaron la respuesta de comunidades bacterianas de ambientes acuáticos patagónicos frente a dos herbicidas (Simazina y 2,4-D), sugiriendo que la incorporación de compuestos orgánicos tóxicos a lagos oligotróficos prístinos modificaría su homeostasis, inhibiendo grupos bacterianos específicos y, a su vez modificando la proporción de grupos bacterianos que generalmente estarían en baja representación en la comunidad.

Como ha sido descrito, los ambientes acuáticos patagónicos son prístinos, oligotróficos, y se caracterizan por sus frecuentes oscilaciones en la disponibilidad de nutrientes y en su régimen térmico (Aguayo *et al.*, 2014; Mackenzie *et al.*, 2011; Soto, 2002). En estas condiciones el estrés por inanición de carbono podría disminuir la eficiencia de los sistemas de restricción aumentando la frecuencia de transferencia. Por lo tanto, es posible suponer que las bacterias aisladas desde ambientes oligotróficos serían capaces de adquirir ADN plasmidial por conjugación. La existencia de procesos de transferencia genética en ambientes prístinos como estos lagos, puede por una parte ocasionar cambios en el pool de genes de la comunidad y por otra permitir la adquisición de propiedades metabólicas que les permitan participar en procesos autodepurativos. El objetivo de este trabajo fue evaluar si en cepas bacterianas aisladas desde ambientes acuáticos oligotróficos, la inanición de carbono disminuiría la eficiencia de los sistemas de restricción- modificación incrementando la frecuencia de conjugación.

2. HIPÓTESIS

Las bacterias de ambientes acuáticos oligotróficos que se encuentran sometidas a períodos de inanición, son capaces de adquirir nuevos genes que les permitan renovar su pool enzimático para asegurar su viabilidad. Por lo tanto, se postula que:

“En bacterias aisladas desde ambientes acuáticos oligotróficos, la inanición de carbono disminuye la eficiencia de sus sistemas de restricción-modificación, incrementando la frecuencia de adquisición de ADN exógeno”.

2.1 Objetivo general:

Determinar si bacterias aisladas desde ambientes acuáticos oligotróficos de la Patagonia chilena aumentan la frecuencia de captación de ADN plasmidial concomitante con una disminución de la eficiencia de sus sistemas de restricción-modificación, cuando se someten a estrés por inanición de carbono.

2.2 Objetivos específicos:

1. Determinar, si el estrés por inanición de carbono incrementa la frecuencia de captación de ADN plasmidial por conjugación.
2. Determinar, si disminuye la eficiencia de los sistemas de restricción-modificación en bacterias sometidas a estrés por inanición de carbono.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Se utilizó las cepas bacterianas, *Pseudomonas* sp. (RG8) aislada del Río Grey (Barros *et al.*, 2013), y el bacilo Gram negativo UDEC-P17 aislado del Lago Mercedes ambos de la Patagonia chilena como bacterias receptoras de ADN plasmidial. Como cepa dadora se utilizó *Cupriavidus pinatubonensis* (JMP134 pJP4 ex *Cupriavidus necator*, Ledger *et al.*, 2012) portadora del plásmido pJP4. El plásmido pJP4 (Figura 2) es un plásmido de aproximadamente 87 Kb, con genes que codifican para la degradación de 2,4-D, ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético; también confiere resistencia a merbromina, acetato fenil mercúrico e iones mercurio (Don y Pemberton, 1981) además de poseer un inserto de resistencia a gentamicina.

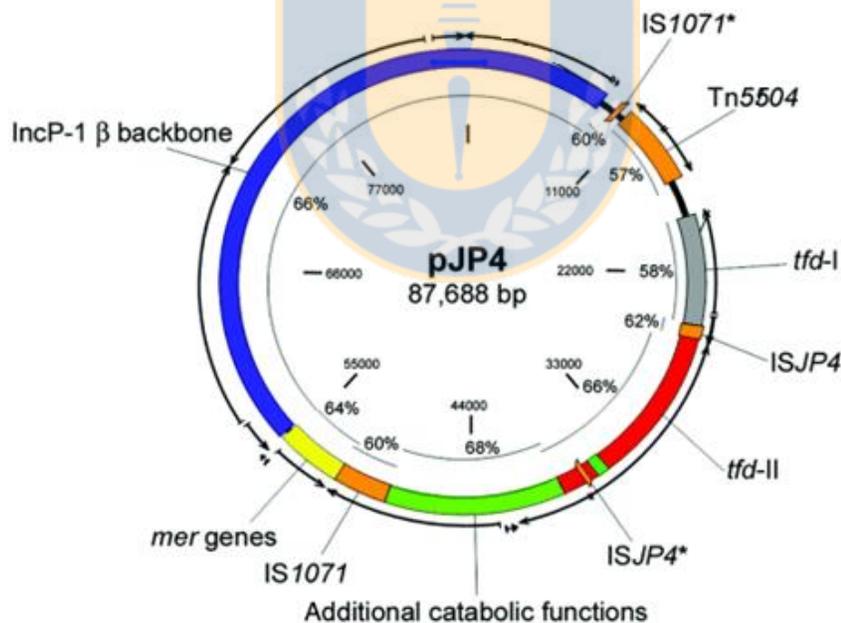


Figura 2. Mapa genético del plásmido pJP4 IncP-1β. Las regiones codificantes se muestran en cajas: azul, parte central de IncP-1β; gris, módulo *tfd-I*; rojo, módulo *tfd-II*; verde, funciones catabólicas adicionales; amarillo, genes *mer*, y naranja, elementos genéticos móviles. Flechas y líneas muestran la dirección de la transcripción y el contenido de GC, respectivamente. IS1071* e ISJP4 representan copias truncadas. (Modificado de Trefault *et al.*, 2004).

3.2 Caracterización de las cepas

Las cepas se caracterizaron evaluando sus capacidades para degradar 2,4-D, su perfil de resistencia a gentamicina (10 µg) y cloranfenicol (30 µg), propiedades que fueron utilizadas para la selección de las cepas bacterianas. Se determinó además las propiedades de fermentación de glucosa, sacarosa y lactosa en medio TSI (agar hierro triple azúcar).

3.2.1 Estudios de las capacidades de degradación

Las cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo R₂A por 48 h a 30 °C, centrifugadas a 10,000g durante 2 min, lavadas tres veces con solución salina MSM (Ca(NO₃)₂, FeSO₄, ZnSO₄, H₃BO₃, CoSO₄, CuSO₄, MnSO₄, Ni(NO₃)₂, NaMoO₄, Na₂WO₄, H₂SO₄) (Aranda *et al.*, 2003). Luego, resuspendidas en la misma solución salina e inoculadas a una densidad celular de 1.0 x10⁷ UFC/mL en matraces con 20 mL de MSM, suplementados con 100 µM de 2,4-D. Para los ensayos de degradación, las bacterias se incubaron a 30 °C (120 rpm) en MSM durante 5 días. La medición de la pérdida de aromaticidad indicativa de la degradación se realizó al inicio del experimento y cada 24 h hasta completar 5 días de incubación. Para esto alícuotas de 1.5 mL fueron centrifugadas a 10,000g durante 2 min y el sobrenadante se analizó por espectroscopía (200-350 nm) (Aguayo *et al.* 2009).

3.2.2 Perfiles de resistencia a antibiótico y determinación de concentración mínima inhibitoria.

Para determinar el perfil de resistencia se realizó un antibiograma con sensidiscos de antibióticos de potencia estandarizada (gentamicina 10 µg, ampicilina 10 µg, amikacina 30 µg, tetraciclina 30 µg y cloranfenicol 30 µg) en placas con agar Mueller-Hinton (Difco) mediante el método de Kirby -Bauer (Jorgensen y Ferraro, 1998) y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para gentamicina y

cloranfenicol utilizando el método de macrodilución en caldo descrito por Andrews (2001).

3.3.3 Identificación bacteriana

La identificación del bacilo Gram negativo UDEC-P17 se realizó por medio de la amplificación del gen ARN 16S de eubacterias con los partidores Eub9-27F y Eub1542R (Dorador *et al.* 2008), los amplificados fueron secuenciados en Macrogen Inc. (Seoul, Korea), utilizados para análisis filogenéticos en los que las secuencias parciales del gen 16S rRNA fueron comparadas con secuencias disponibles en la base de datos de European Nucleotide Archive ENA (<http://www.ebi.ac.uk/ena/home>).

3.2.4 Estudios de sobrevivencia en inanición de carbono

Las cepas fueron cultivadas en condiciones de inanición de carbono, para ello se cultivaron en caldo Mueller-Hinton (MH) por 48h a 30°C. De estos cultivos alícuotas de 1.0 mL fueron lavadas e inoculadas en MSM carente de carbono (Aranda *et al.* 2003), a una densidad celular aproximada de 1.0×10^8 UFC/mL, e incubadas durante 7 días a 30°C con agitación constante (120 rpm). Se determinó el recuento de células viables luego de 7 días de incubación mediante el método de Miles y Misra (Herbert, 1990).

3.3 Conjugación bacteriana

Se utilizaron los protocolos descritos por Schenzle *et al.* (1997) y por Johnsen *et al.* (2002), Johnsen y Kroer (2007) ambos con modificaciones. Brevemente, como cepa dadora se utilizó *C. pinatubonensis* JMP134, que posee el plásmido pJP4 que tiene los genes para la degradación de 2,4-D (Trefault *et al.* 2004). Para la selección de las cepas receptoras se realizaron ensayos de conjugación utilizando 28 cepas bacterianas; de las cuales se seleccionaron las cepas *Pseudomonas sp.*

RG8 y UDEC-P17 que mostraron capacidad para adquirir el plásmido pJP4 mediante conjugación con *C. pinatubonensis* JMP134. Las cepas se cultivaron en caldo MH por 48 h a 30°C con agitación constante (120 rpm). De los cultivos de la cepa receptora se obtuvo alícuotas de 4.5 mL, que fue adicionada a 0.5 mL cultivo de 48 h de la cepa dadora en una proporción 1/10 (Schenzle *et al.* 1997) en 10 mL de caldo MH, y se cultivaron durante 6 h a 30°C. Para la conjugación en microplacas, se utilizó microplacas de 96 pocillos (Tissue culture plate, 96 well Ultra Cruz). En cada pocillo se depositó alícuotas de 30 µL de la mezcla bacteriana anteriormente descrita. Como control negativo se inoculó en los pocillos de la microplaca 30 µL de la cepa dadora o receptora, y un control abiótico sólo con caldo MH. Cada microplaca se incubó por 6 h a 30°C. La densidad celular inoculada se estimó por recuento viable por el método de Miles y Misra (Herbert, 1990).

Para estudiar el efecto de la inanición de carbono sobre la capacidad de las cepas receptoras para aceptar ADN extracromosomal por conjugación, las cepas bacterianas se cultivaron previamente en caldo MH por 48 h a 30 °C con agitación constante (120 rpm), luego las células bacterianas fueron lavadas por centrifugación y suspendidas en MSM a una densidad celular aproximada de 1.0×10^8 UFC/mL e incubadas con agitación constante (120 rpm) a 30 °C durante 7 días. De esta condición se obtuvieron alícuotas de 4.5 mL que fue mezclada con 0.5 mL de cultivo de 48 h de *C. pinatubonensis* JMP134 en 10 mL de caldo MH para obtener una proporción 1/10 dadora/receptora. Para los experimentos en inanición de carbono, tanto de la cepa dadora como la receptora se utilizó, el procedimiento descrito anteriormente pero la mezcla del par conjugante se incubó en un medio salino carente de carbono (MSM). La mezcla celular se cultivó durante 6 h a 30 °C. Utilizando las mismas mezclas de pares conjugantes y sus respectivos controles, se inoculó 30 µL en cada pocillo de la microplaca y se incubó por 6 h a 30 °C.

La selección de las cepas transconjugantes, se realizó después de 6 h de incubación del par conjugante sembrando 0.1 mL de diluciones apropiadas de la mezcla celular, en placas con agar MH adicionadas con gentamicina (15 µg/mL) y cloranfenicol (40 µg/mL). Las placas se incubaron por 7 días, se contaron las colonias y se seleccionaron algunas de ellas para su verificación.

La determinación de los eventos de transferencia en las microplacas se detectó adicionando 100 µL de caldo MH conteniendo gentamicina (15 µg/mL) y cloranfenicol (40 µg/mL). Los cultivos en las microplacas se incubaron durante 7 días y a 30°C (Johnsen y Kroer 2007). Luego se determinó la formación de formazán según el protocolo descrito por Johnsen *et al.* (2002), pero utilizando una solución 50 mM de glucosa como dador de electrones. Se agregó a cada pocillo de la microplaca 50 µL de glucosa (50 mM), se incubó por 3 h 30°C y luego se agregó a cada pocillo 10 µL de WST-1 {4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate}, determinando la absorbancia a 450 nm luego de 5 y 90 min de adicionar la sal de tetrazolium (Johnsen *et al.* 2002). Los controles de los experimentos en microplaca se encuentran descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Controles experimentos de conjugación.

Controles	Cepa receptora (30 µL)	Cepa dadora (30 µL)	Caldo Mueller- Hinton (100 µL)	Gentamicina (15 µg/mL)	Cloranfenicol (40 µg/mL)
1	+		+		+
2		+	+	+	
3			+	+	+

(+) Adicionado al pocillo

La presencia del plásmido pJP4 en las cepas seleccionadas como transconjugantes se detectó cultivando las cepas transconjugantes por 48 h a 30 °C (120 rpm) en 5.0 mL de caldo Luria (Difco) con gentamicina (15 µg/mL) y cloranfenicol (40 µg/mL). La extracción del plásmido se realizó con el kit E. Z. N. A. BAC/PAC DNA kit (Omega® Bio-tek, Norcross, USA) según las instrucciones del fabricante. En el ADN plasmidial se detectó el gen *tfdB*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando partidores específicos (Tabla 2) que amplificaron una secuencia de 205 pb del gen *tfdB* (Neilson *et al.* 1994). A los

amplificados, se les realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.8 %, (p/v) con tinción GelRed Nucleic Acid Gel Stain™ (Biotium, Hayward, CA), como control positivo se utilizó la cepa *C. pinatubonensis* JMP134 y como controles negativos las cepas receptoras *Pseudomonas* sp. RG8 y UDEC-P17. Los fragmentos obtenidos de la amplificación fueron secuenciados en MacroGen Inc. (Seoul, Korea), y su secuencia fue contrastada con la secuencia del gen usando Sequencher DNA sequencing Software.

Tabla 2: Partidores detección *tfdB*

Partidor	Secuencia	Longitud (bases)	Localización (pb)	Contenido GC (%)
591	5'-GCTGACGGCGTGTCTCGCG-3'	20	4848-4867	75
592	5'-GATGGACGATGCGCGACGTA-3'	20	5034-5053	60

(Modificado Neilson *et al.*, 1992).

3.4 Análisis de datos

La frecuencia de transconjugantes para los experimentos realizados en matraces se determinó mediante la razón entre el recuento de colonias transconjugantes con el recuento viable de la cepa receptora (Gasson y Davies, 1980).

El análisis de los datos para el método de conjugación en microplacas se realizó según lo descrito por Johnsen y Kroer (2007), estimando el número total de eventos de transferencia de plásmidos en los distintos tratamientos en relación al número de pocillos con resultados positivos (eventos de transferencia de plásmido) y negativos usando la siguiente ecuación:

$$t = -n \ln(m/n)$$

Donde t es el número total de eventos de transferencia de plásmidos en un experimento dado, m es el número de pocillos negativos y n es el número de pocillos de réplicas (Johnsen y Kroer 2007).

3.5 Ensayos de Restricción

Se realizaron ensayos *in vitro* según el protocolo descrito por Gingeras y Brooks (1983) con modificaciones. Se utilizó *Escherichia coli* DH5 α como control por no tener sistema de restricción y las cepas en estudio (*Pseudomonas sp.* RG8 y UDEC-P17). Las bacterias se cultivaron en caldo MH a 30°C hasta alcanzar una densidad celular de 1.0×10^8 UFC/mL, alícuotas de 10 mL del cultivo se centrifugaron a 4,000g por 10 min a 20 °C y el pellet celular se resuspendió en 500 μ L de buffer Tris (10 mM, pH 7.6), SHCH₂CH₂OH 10 mM, EDTA 10 mM que contiene 0.5 mg de lisozima (1 mg/mL) seguido de un tratamiento por sonicación, empleando 4 ciclos de 10 s de duración cada uno, a intervalos de un minuto (Branson 450 sonifier). Luego se adicionó MgCl₂ a una concentración final de 10 mM y se centrifugó a 12,000g por 15 min (Gingeras y Brooks, 1983). Se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976) estandarizando a una concentración de proteínas totales de 0.35 μ g/ μ L. Los ensayos de actividad endonucleasa fueron realizados en cultivos de 48 h de las cepas bacterianas sin inanición de carbono y después de 7 días de inanición de carbono según el protocolo descrito anteriormente. La actividad endonucleasa de los extractos celulares se realizó utilizando el plásmido pUC19 como ADN sustrato a una concentración final de 3.0 ng/ μ L de ADN a 30 °C por 10 min seguido de 20 min a 65 °C de inactivación enzimática. Los productos de digestión se separaron por electroforesis en gel de agarosa 0.8 % (p/v) y se visualizaron con tinción GelRed Nucleic Acid Gel Stain™ (Biotium, Hayward, CA) (Gingeras y Brooks, 1983).

El plásmido pUC19 es un plásmido pequeño (2,686 pb) de alto número de copias que posee un sitio de multiclonamiento (MCS o polylinker) y otros múltiples sitios de restricción (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), entre los sitios de restricción encontrados en este plásmido se hayan sitios que también están presentes en el plásmido pJP4, (Figura 3 mapas de sitios de restricción de ambos plásmidos).

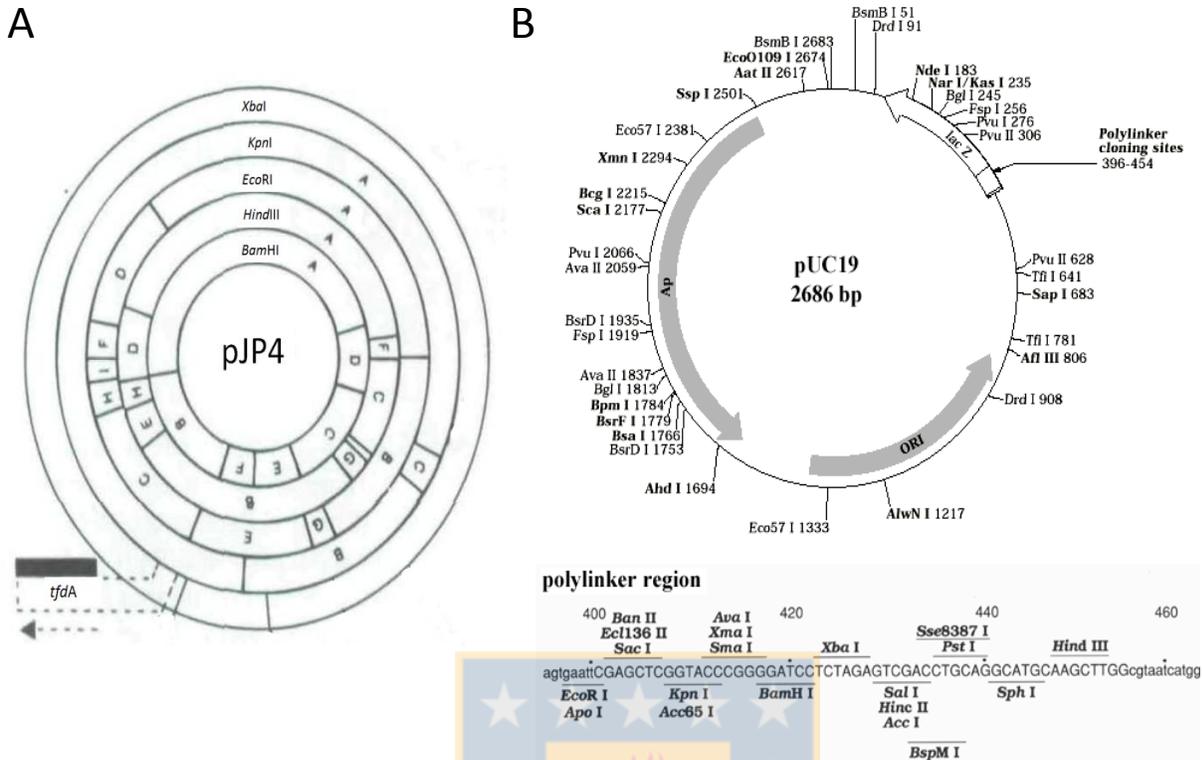


Figura 3. Plásmidos pJP4 y pUC19. A: Mapa de sitios de restricción en pJP4, se muestran los sitios de corte para las enzimas *Xba* I, *Kpn* I, *EcoR* I, *Hind* III, *Bam* HI; B: Mapa de sitios de restricción pUC19, en el sitio polylinker se encuentran los sitios para las enzimas *Kpn* I, *EcoR* I, *Hind* III, *Bam* HI, los cuales están presentes en el plásmido pJP4 (Modificado de You y Ghosal, 1995, http://courses.bio.indiana.edu/L104-Bonner/Sp10/imagesSp10/L38/GM_MPs.html).

3.6 Ensayos de actividad exonucleasa

Se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la presencia de actividad exonucleasa en el sobrenadante de los cultivos bacterianos. Para esto, las cepas *Pseudomonas sp.* RG8 y UDEC-P17 se cultivaron a 30°C hasta alcanzar una densidad celular de 1.0×10^8 UFC/mL, alícuotas de 30 mL del cultivo bacteriano se centrifugaron a 4,000g por 10 min a 20°C y se recuperó el sobrenadante de los cultivos. En estos se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976) estandarizando a una concentración de proteínas totales de 0.35 µg/µL. Los ensayos de actividad exonucleasa fueron realizados en cultivos de 48 h de las cepas bacterianas sin inanición de carbono y después de 7 días de inanición de carbono según el protocolo descrito

anteriormente. La actividad exonucleasa de los extractos celulares se realizó utilizando el plásmido pUC19 como ADN sustrato a una concentración final de 3.0 ng/ μ L de ADN a 30 °C por 10 min seguido de 20 min a 65 °C de inactivación enzimática. Los productos de digestión se visualizaron por medio de electroforesis en gel de agarosa 0.8 % (p/v) (Gingeras y Brooks, 1983).



4. RESULTADOS

4.1 Caracterización de las cepas bacterianas

La amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S de la cepa UDEC-P17 mostró que correspondió al género *Pseudomonas* (European Nucleotide Archive, accession N° HG974393).

4.1.1 Sobrevivencia bacteriana en condiciones de inanición y determinación de la concentración mínima inhibitoria

Luego de 7 días en inanición de carbono (MSM) el porcentaje de sobrevivencia de ambas cepas *Pseudomonas* sp. RG8 y UDEC-P17 fue de 86% con una disminución de 2 órdenes de magnitud por lo que según el criterio de Pearson *et al.* (1980) se consideró que no hubo muerte bacteriana.

Los perfiles de resistencia a antibióticos de las cepas *C. pinatubonensis* JMP134 y las cepas *Pseudomonas* sp. RG8 y UDEC-P17 se muestran en la Tabla 3. La determinación de la CMI las cepas *Pseudomonas* sp. RG8 y UDEC-P17 frente a cloranfenicol fue de 80 µg/mL, y de 10 µg/mL para la cepa *C. pinatubonensis* JMP134.

Tabla 3. Perfiles de resistencia a antibióticos.

Cepas	Resistencia a agentes antibacterianos					
	G	K	AM	AK	T	C
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	S	S	R	S	S	S
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P17	S	S	R	S	S	I
<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134	R	S	S	S	S	S

Antibacterianos; G: gentamicina, K: kanamicina, AK: amikacina, C: cloranfenicol
S: Susceptible; R: resistente; I: intermedio.

4.2 Conjugación bacteriana

Para la selección de las cepas receptoras se realizaron ensayos de conjugación con 28 cepas, de las cuales se seleccionaron *Pseudomonas* sp. RG8 y UDEC-P17
Tabla 4.

Tabla 4. Ensayos de conjugación

Cepa	Lugar aislamiento	Adquiere pJP4
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P5	Lago Burgos (Patagonia)	Si
Bacilo Gram negativo UDECP-13	Lago Burgos (Patagonia)	No
Coco Gram negativo BUR1	Lago Burgos (Patagonia)	No
<i>Aeromonas hydrophila</i> BUR2	Lago Burgos (Patagonia)	No
<i>Aeromonas hydrophila</i> BURC3	Lago Burgos (Patagonia)	No
<i>Pseudomonas</i> sp. C3	Orilla Camino (Patagonia)	No
Bacilo Gram negativo UDEC-P18	Lago Las Torres (Patagonia)	No
Bacilo Gram negativo UDEC-P19	Lago Témpano (Patagonia)	No
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P17	Lago Mercedes (Patagonia)	Si
Bacilo Gram negativo LV2	Lago Venus (Patagonia)	No
Bacilo Gram negativo LV13	Lago Venus (Patagonia)	No
Bacilo Gram negativo PC3	Puerto Cisnes (Patagonia)	No
Bacilo Gram negativo PC9	Puerto Cisnes (Patagonia)	No
<i>Pseudomonas</i> sp. QUE2	Parque Queulat (Patagonia)	No
Coco Gram negativo RG1	Río Grey (Patagonia)	No
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P3	Río Grey (Patagonia)	No
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	Río Grey (Patagonia)	Si
<i>Yersenia aldovae</i> UDEC-P2	Río Pingo (Patagonia)	No
Coco Gram negativo TEM2	Lago Témpano (Patagonia)	No
Coco Gram negativo TEM4	Lago Témpano (Patagonia)	No
Coco Gram negativo TEMF2	Lago Témpano (Patagonia)	No
Bacilo Gram negativo OC5	Orilla Camino (Patagonia)	No
Bacilo Gram negativo OC6	Orilla Camino (Patagonia)	No
<i>Ochrobactrum anthropi</i> UDEC-P6	Orilla Camino (Patagonia)	No
Bacilo Gram negativo UDEC-P16	Patagonia	No
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> UDEC-A3	Meseta Infantería (Antártica)	No
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> UDEC-A9	Meseta Infantería (Antártica)	No
Bacilo Gram negativo ATH10	Meseta Infantería (Antártica)	No

Las frecuencias de transconjugantes de las cepas *Pseudomonas* sp. RG8 y UDEC-P17 con *C. pinatubonensis* JMP134 se muestran en la Tabla 5. La cepa receptora RG8 luego de 7 días de inanición de carbono mostró un recuento viable de 3.2×10^7 UFC/mL, en esta condición disminuyó la frecuencia de transconjugantes y el número de transconjugantes 10 veces en comparación con los cultivos sin inanición de carbono. Sin embargo, cuando se utilizó un recuento

viable de 4.7×10^6 UFC/mL de la cepa receptora RG8 la frecuencia de transconjugantes y el número de transconjugantes varió en forma mínima manteniendo el mismo orden de magnitud. Por el contrario, en la cepa UDEC-P17 luego de 7 días de inanición la frecuencia de transconjugantes y el número de células transconjugantes disminuyó en ambas densidades celulares (2.8×10^7 y 7.1×10^6 UFC/mL).

Tabla 5. Frecuencia de transconjugantes con y sin inanición de carbono

Cepa	Días inanición	*Recuento viable células receptoras	*Recuento células transconjugantes	*Frecuencia transconjugantes
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	0	2.6×10^7	2.3×10^4	8.8×10^{-4}
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	7	3.2×10^7	1.0×10^3	3.1×10^{-5}
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	0	3.9×10^6	1.3×10^5	3.3×10^{-2}
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	7	4.7×10^6	1.0×10^5	2.1×10^{-2}
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P17	0	2.0×10^7	3.0×10^3	1.5×10^{-4}
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P17	7	2.8×10^7	** 4.5×10^2	** 1.6×10^{-5}
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P17	0	6.6×10^6	1.8×10^3	2.7×10^{-4}
<i>Pseudomonas</i> sp. UDEC-P17	7	7.1×10^6	** 4.5×10^2	** 6.3×10^{-5}

* Recuentos en (UFC/mL), ** Límite de detección del método

Por otra parte los pocillos considerados como positivos para los eventos de transferencia de ADN fluctuaron entre 0,063 y > 3.0 unidades de absorbancia. El límite inferior de absorbancia para considerar el pocillo como positivo consideró los cambios de absorbancia del pocillo control de cada tratamiento. El cálculo del número total de eventos de transferencia de plásmidos se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Eventos de transferencia de plásmidos

Cepa	Días inanición	Eventos transferencia
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	0	18,7
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	7	19,9
<i>Pseudomonas</i> sp. UDECP17	0	11,7
<i>Pseudomonas</i> sp. UDECP17	7	10,6

Los ensayos de conjugación en condiciones de inanición de carbono tanto de las cepas receptoras (RG8 y UDEC-P17) como la cepa dadora (*C. pinabonensis* JMP134), no mostraron diferencias significativas entre las frecuencias de transconjugantes, si se comparan con los experimentos en los que la conjugación se realizó en un medio con carbono (caldo Mueller- Hinton) Tabla 7.

Tabla 7. Frecuencia de transconjugantes en distintas condiciones de cultivo

Cepas	Días inanciación	Medio conjugación	Recuento viable células receptoras (UFC/mL)	Frecuencia transconjugantes
<i>Pseudomonas sp.</i> RG8	6	MSM	1.0X10 ⁹	2.7X10 ⁻⁴
<i>Pseudomonas sp.</i> RG8	6	MH	1.0X10 ⁹	1.5X10 ⁻⁴
<i>Pseudomonas sp.</i> UDEC-P17	10	MSM	6.1X10 ⁴	1.5X10 ⁻³
<i>Pseudomonas sp.</i> UDEC-P17	10	MH	6.1X10 ⁴	2.0X10 ⁻³

Medios de cultivo: MSM; medio salino mínimo, MH; caldo Mueller-Hinton.

4.2.1 Aislamiento y caracterización del plásmido pJP4 en las cepas bacterianas

Los análisis espectroscópicos mostraron en los sobrenadantes de las cepa *C. pinatubonensis* JMP134 y de la cepa transconjugante *Pseudomonas sp.* RG8, ausencia de compuestos aromáticos luego de incubarlas en presencia de 2,4-D indicativo de la degradación del halofenol (Tabla 8). No se detectó actividad degradativa de 2,4-D de la cepa transconjugante de *Pseudomonas sp.* UDEC-P17, pero si amplificó para el gen *tfdB* indicativo de la presencia del plásmido pJP4.

Tabla 8. Degradación de ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4- D).

Cepas	Degradación
<i>Pseudomonas sp.</i> RG8	-
<i>Pseudomonas sp.</i> RG8 t	+
<i>Pseudomonas sp.</i> UDEC-P17	-
<i>Pseudomonas sp.</i> UDEC-P17 t	-
<i>C. pinatubonensis</i> JMP134	+

Degradación de 2,4-D (100 µM). (+): Degradación de compuesto; (-): Ausencia de degradación; t: transconjugantes.

En las cepas seleccionadas como transconjugantes se detectó el gen *tfdB* que codifica para la enzima 2,4-diclorofenol hidroxilasa presente en pJP4, amplificando el fragmento de aproximadamente 205 pb (Figura 4). En las cepas transconjugantes se detectó un fragmento con igual tamaño (205 pb), cuya secuencia nucleotídica correspondió al gen *tfdB*.

Ambas cepas seleccionadas como transconjugantes, mostraron que sus secuencias de ADN correspondieron a las cepas bacterianas utilizadas como receptoras UDEC-P17 y RG8 respectivamente.

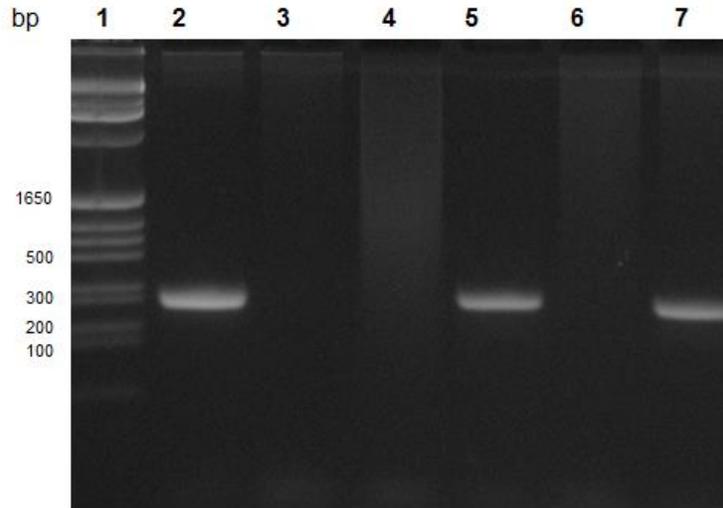


Figura 4. Electroforesis de los productos de amplificación del gen *tfaB* de la cepa dadora *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (pJP4) y las cepas transconjugantes *Pseudomonas* sp. RG8 y UDEC-P17. Carriles 1: Marcador PM; 2: ADN plasmidial *C. pinatubonensis* JMP134 (pJP4); 3: ADN *E. coli* K12; 4: ADN RG8; 5: ADN plasmidial RG8 (pJP4) transconjugante; 6: ADN UDEC-P17; 7: ADN plasmidial UDEC-P17 (pJP4) transconjugante.

4.3 Ensayos de Restricción

La digestión de ADN del plásmido pUC19 se consideró indicativo de actividad endonucleasa en los extractos celulares. Se detectó actividad endonucleasa en los extractos celulares de la cepa UDEC-P17 cuando fue cultivada en presencia de carbono. En los extractos celulares de las cepas (UDEC-P17 y RG8) cultivadas durante 7 días en inanición de carbono no se detectó presencia de ADN del plásmido pUC19 indicativo de actividad endonucleasa (Figura 5).

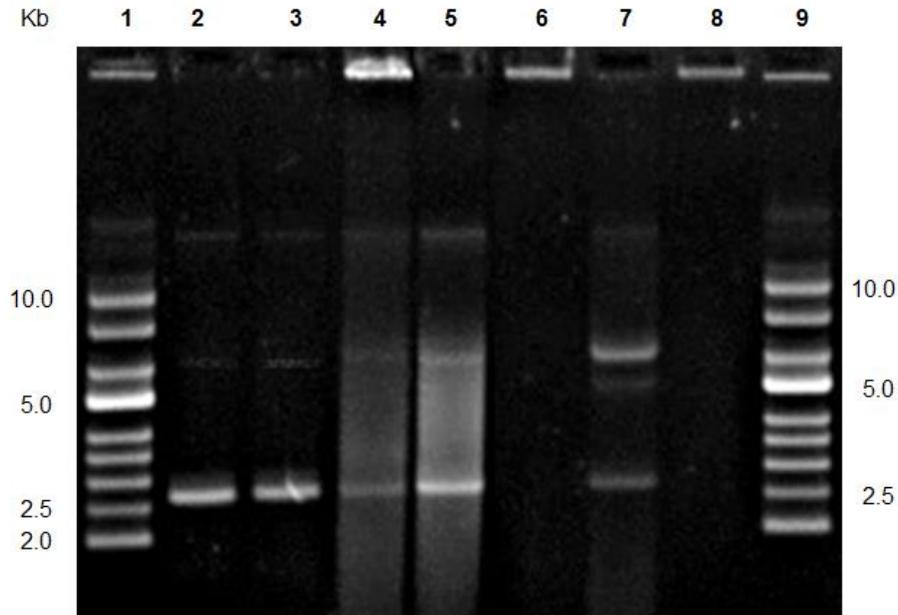


Figura 5. Gel agarosa 0,8 % digestión de pUC19 con extractos celulares de cepas en estudio. Carriles: 1: Marcador peso molecular, 2: pUC19, 3: Control pUC19, 4: Extracto *Escherichia coli* DH5 α , 5: Extracto *Pseudomonas sp.* RG8, 6: Extracto *Pseudomonas sp.* UDEC-P17, 7: Extracto *Pseudomonas sp.* UDEC-P17 7 d inanición, 8: Extracto *Pseudomonas sp.* UDEC-P17 7 d inanición, 9: Marcador peso molecular.

4.4 Ensayos de actividad exonucleasa

En las condiciones ensayos no se detectó actividad exonucleasa (Figura 6).

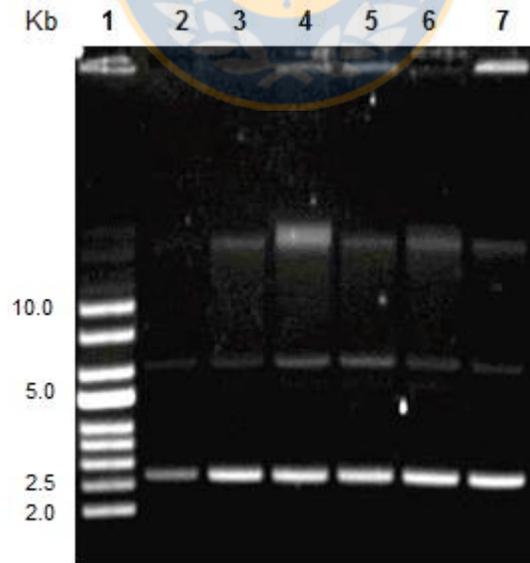


Figura 6. Gel agarosa 0,8 % digestión de pUC19 con sobrenadante de cultivos celulares de cepas en estudio. Carriles: 1: Marcador peso molecular, 2: pUC19, 3: Control pUC19, 4: Sobrenadante *Pseudomonas sp.* UDEC-P17, 5: Sobrenadante *Pseudomonas sp.* UDEC-P17 7 d inanición, 6: Sobrenadante *Pseudomonas sp.* RG8, 7: Sobrenadante *Pseudomonas sp.* RG8 7 d inanición.

5. DISCUSIÓN

El estudio de la transferencia de ADN por conjugación se ha realizado mayormente en condiciones que presentan cantidad de nutrientes suficientes para el crecimiento de las células bacterianas que actúan como receptoras de los plásmidos y con pocos estudios de transferencia de plásmido en condiciones de inanición de carbono (Goodman *et al.*, 1993; Johnsen y Kroer, 2007). En este trabajo se estudió la frecuencia de obtención de transconjugantes tanto en presencia como en ausencia de carbono. La transferencia del plásmido pJP4 fue confirmada por la amplificación del gen *tfdB* que codifica para la enzima 2,4-diclorofenol hidroxilasa (Neilson *et al.*, 1994) y que está codificada en el plásmido pJP4 y no se encuentra en las cepas receptoras (RG8 y UDEC-P17). La cepa *Pseudomonas* sp. RG8 al adquirir el plásmido pJP4 adquirió la capacidad para degradar completamente 2,4-D, sin embargo, en *Pseudomonas* sp. UDEC-P17 transconjugante no se detectó esta capacidad, aun cuando se detectó la presencia del gen *tfdB* lo que indica la presencia del plásmido en esta bacteria. Este fenómeno fue informado en estudios de conjugación realizados en suelo por Bathe *et al.* (2004) y Newby *et al.* (2000). Los autores explicaron este fenómeno, por la ausencia de genes cromosomales en la cepa receptora necesarios para iniciar la mineralización de 2,4-D (Newby *et al.*, 2000). Otra explicación considera que el número de copias del plásmido es menor al necesario para que la cepa pueda sobrevivir en presencia de compuestos aromáticos. En este sentido estudios realizados por Pérez-Pantoja *et al.* (2008), indican que la existencia de una copia del plásmido no sería suficiente para evidenciar el uso de 2,4-D. Trefault *et al.* (2002) por su parte reportó que se requieren al menos cinco copias por célula del plásmido para degradar 2,4-D. No obstante, lo anterior aunque no exista degradación de 2,4-D ambas cepas transconjugantes (*Pseudomonas* sp. RG8 y UDEC-P17) pueden ser un reservorio del plásmido y potencialmente podrían traspasarlo a otras bacterias por procesos de conjugación permitiendo su diseminación hacia especies bacterianas que no eran accesibles al portador inicial de este. Estudios efectuados por Newby *et al.* (2000) en que se utilizó como cepa

dadora del plásmido pJP4 una cepa de *E. coli* (D11) incapaz de degradar 2,4-D, sugieren que esta cepa es más eficiente que *C. pinatubonensis* (JMP134) al momento de transferir el plásmido, contribuyendo así a su diseminación. En este sentido, Dionisio *et al.* (2002) propone un “efecto de amplificación” de la diseminación de un plásmido por conjugación, dentro de una comunidad bacteriana heterogénea, este efecto se produciría por la presencia de una cepa con alto potencial para transferir plásmidos, esta cepa aunque no es la portadora inicial del plásmido al estar en contacto con la cepa portadora inicial, puede recibir el plásmido y, por lo tanto, diseminarlo al resto de la comunidad.

En estudios realizados en microcosmos de suelo (Goris *et al.*, 2002), se encontró que el plásmido pJP4, plásmido autotransmisible de amplio rango de huésped, es transmitido y expresado principalmente en cepas pertenecientes a especies de *Burkholderia* y *Ralstonia*, cuando se utiliza como cepa dadora del plásmido la cepa *Pseudomonas putida* UWC3. Por otro lado, Bathe *et al.* (2004), en muestras de lodos activados utilizando como cepa dadora la cepa *Pseudomonas putida* SM1443, identificaron transconjugantes del plásmido pertenecientes a una amplia distribución taxonómica dentro de α -, β -, $\gamma\beta$ - y γ - *Proteobacteria*, siendo el género más común *Stenotrophomonas*, no obstante, la expresión de las capacidades degradativas del plásmido en su mayor parte se encontraban en cepas del género *Pseudomonas*. Sin embargo, en este estudio utilizando la cepa *C. pinatubonensis* JMP134 como cepa dadora, se obtuvieron cepas transconjugantes pertenecientes al género *Pseudomonas* que fueron aisladas desde ambientes acuáticos, y no se detectó transferencia del plásmido a otro género bacteriano. Estas diferencias en la distribución de especies transconjugantes, refleja la diversidad de especies de los ambientes de donde fueron aisladas las cepas receptoras (Bathe *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren que la transferencia de material genético dependería de la cepa que actúa como dadora del plásmido, del ambiente de procedencia de las cepas receptoras, y de características celulares propias de la cepa receptora.

Johnsen *et al.* (2002) señala que el uso de la sal de tetrazolium WST-1 permite una mayor sensibilidad para detectar células con actividad metabólica, indicando que es posible detectar eventos de transferencia que realizados en matraces no serían detectados. Además, cada microplaca dispone de 96 réplicas del experimento lo que otorga mayor reproducibilidad. Mediante este ensayo de conjugación los eventos de transferencia de plásmido fueron similares tanto los realizados con disponibilidad de carbono como los en inanición.

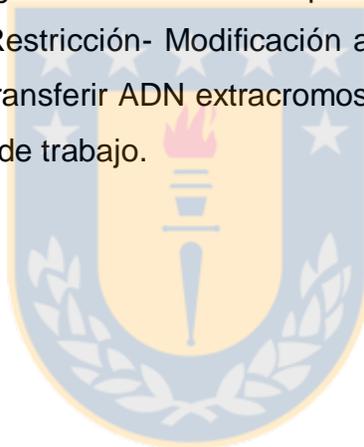
En este estudio, se observó que la densidad celular de la cepa receptora es un factor que modifica el número y la frecuencia de transconjugantes. Esto ha sido señalado en estudios anteriores (Fernandez-Astorga *et al.*, 1992) en los que se hace referencia a la influencia de la densidad celular inicial de las cepas parentales en el número de transconjugantes. Así, en la cepa *Pseudomonas* sp. RG8 su frecuencia de transconjugantes se incrementó con menores densidades celulares, Muela *et al.* (1994) señala también que los estados fisiológicos de la célula dadora y receptora son factores que influyen en el proceso de transferencia. Esto explicaría porque con menores recuentos viables de la cepa receptora el número de transconjugantes fue mayor. Por otra parte la cepa *Pseudomonas* sp. UDEC-P17 en inanición de carbono disminuyó la frecuencia de transferencia independiente del recuento viable inicial. Seoane *et al.* (2011), señaló que en escasez de carbono la frecuencia de conjugación disminuye. Esto sugiere que en inanición de carbono el estado fisiológico de la célula receptora, se encontraría en desventaja energética lo que activaría mecanismos de sobrevivencia que no incluyen la integración de nuevo material genético, lo que sería contrario a lo propuesto por Velkov (2002) que propuso que en condiciones desfavorables, las células bacterianas disminuirían la eficiencia de sus sistemas RM, lo que conlleva a un aumento en la frecuencia de transferencia de ADN.

En cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* se ha descrito actividad de restricción atribuida a sistemas de Restricción-Modificación tipo II (Gingeras y Brooks, 1983; Marshall y Halford, 2010; Morgan *et al.*, 2009). La cepa

Pseudomonas sp. RG8 no presentó actividad de sistemas de RM tipo II en cultivo en presencia de carbono. Sin embargo, esto no demuestra la ausencia de estos sistemas, puesto que una cepa bacteriana puede poseer más de un tipo de sistema de Restricción (Wilson y Murray, 1991). Tampoco se descarta que el plásmido pUC19 no tenga un sitio de reconocimiento para las enzimas presentes en esta cepa. Por el contrario, *Pseudomonas* sp. UDEC-P17, cultivada en presencia de carbono presentó actividad de restricción tipo II, pero cuando se utilizó extracto de células en inanición de carbono no se observó la presencia de ADN, sugiriendo un aumento de la actividad de restricción pero tampoco se puede descartar su utilización como fuente de carbono y energía por la célula bacteriana. Este fenómeno ha sido descrito (Finkel y Kolter, 2001; Palchevskiy y Finkel, 2006, 2009) puesto que se ha encontrado en algunas bacterias enzimas tipo exonucleasas con esta función (Mulcahy *et al.*, 2010; Palchevskiy y Finkel, 2009). Mulcahy *et al.* (2010) señalan que en cepas de *P. aeruginosa* sometidas a estrés por inanición de fosfato, nitrógeno o carbono se expresan exonucleasas que degradan ADN, siendo este utilizado como fuente de fosfato, nitrógeno y carbono. Seper *et al.* (2011) por su parte observaron que el ADN puede ser degradado por exonucleasas incluso después de 1 min de agregado a los cultivos bacterianos. Sin embargo, en ensayos realizados con los sobrenadantes de cultivos de las cepas *Pseudomonas* sp. RG8 y UDEC-P17 tanto en presencia como en ausencia de carbono, no se detectó actividad exonucleasa (Figura 4)

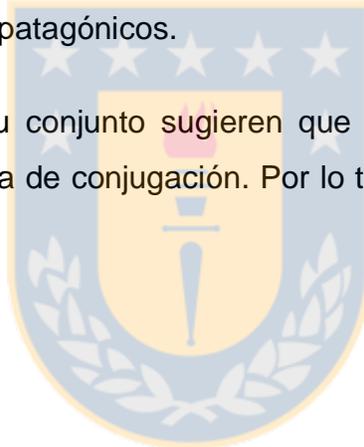
En este trabajo se ha descrito en bacterias provenientes de ambientes acuáticos de la Patagonia chilena la capacidad para adquirir el plásmido pJP4. Estos ambientes, se caracterizan por sus condiciones oligotróficas (Aguayo *et al.*, 2014; Mackenzie *et al.*, 2011; Soto, 2002). Así las bacterias que residen en ellos deberían poseer estrategias que les permitan utilizar diversos compuestos orgánicos; como fuente de carbono y energía (Abayomi, 2007; Díaz, 2004). Así la adquisición de material genético por conjugación tendría una función importante en la adaptación de las bacterias en ambientes extremos (Leahy *et al.*, 1990; Van Wolferen *et al.*, 2013). En efecto, adquirir plásmidos como el pJP4 contribuiría a la

adquisición de nuevas características catabólicas de la comunidad bacteriana (Smets *et al.*, 1993) ampliando su repertorio metabólico. Por otra parte, los ambientes acuáticos considerados prístinos y con baja intervención humana como los patagónicos (Aguayo *et al.*, 2009), pueden estar expuestos a contaminantes orgánicos tóxicos (Bargagli, 2008; Pozo *et al.*, 2007; Wania y Mackay, 1993). Por lo tanto, adquirir plásmidos que permiten la degradación y utilización de compuestos orgánicos considerados tóxicos, permitiría la sobrevivencia de las comunidades bacterianas residentes que enfrentan condiciones de oligotrofia y al mismo tiempo contribuir a disponer de mecanismos autodepurativos. Los resultados en su conjunto sugieren que las bacterias aisladas desde ambientes considerados prístinos, poseen potencial para adquirir material genético extracromosomal por conjugación demostrando que la inanición de carbono, y la presencia de sistemas de Restricción- Modificación activos en estas bacterias no serían impedimentos para transferir ADN extracromosomal por conjugación, por lo que se rechaza la hipótesis de trabajo.



6. CONCLUSIONES

- En lagos oligotróficos de la Patagonia chilena, existen bacterias capaces de adquirir ADN plasmidial por conjugación, y de expresar la información genética codificada en ellos.
- La inanición de carbono y la presencia de sistemas RM tipo II activos en cepas bacterianas provenientes de ambientes oligotróficos, no representan un impedimento para que exista transferencia de ADN por conjugación.
- En condiciones de inanición de carbono no se ve afectada la actividad de los sistemas de restricción presentes en bacterias aisladas desde ambientes acuáticos patagónicos.
- Los resultados en su conjunto sugieren que la inanición de carbono, no aumenta la frecuencia de conjugación. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis planteada.



7. PROYECCIONES

En cepas de bacterias aisladas desde ambientes acuáticos patagónicos se encontró actividad de sistemas RM tipo II, este hallazgo nos permite emplear extractos celulares de estas cepas para la digestión de ADN. Las enzimas de restricción presentes en el extracto celular se pueden purificar, secuenciar e identificar, y de este modo tener disponible para experimentos de rutina en el laboratorio endonucleasas de rápida acción y obtenidas a bajo costo.

Los estudios de los factores que influyen la transferencia de ADN en condiciones de estrés por inanición de carbono representa un modelo de estudio que aporta antecedentes para entender el cómo ocurre este fenómeno en la naturaleza, aun cuando quedan interrogantes sin responder por lo que el estudio de la conjugación y los factores que influyen en este proceso, tanto ambientales como propios de la célula bacteriana debe continuarse para comprender como se desarrolla el flujo de genes bacterianos.

Bacterias de ambientes considerados oligotróficos y prístinos, o con baja intervención humana, son capaces de adquirir por conjugación material genético que permite la degradación de compuestos orgánicos considerados tóxicos, lo que implica que pueden tener un potencial uso en la biorremediación de ambientes oligotróficos y fríos que pueden ser afectados por contaminantes orgánicos tóxicos

8. REFERENCIAS

Abayomi O. 2007. Molecular strategies of microbial adaptation to xenobiotics in natural environment. *Biotechnol. Mol. Biol.* **2** (1): 001-013.

Aguayo J., Barra R., Becerra J., Martínez M. 2009. Degradation of 2,4,6-tribromophenol and 2,4,6-trichlorophenol by aerobic heterotrophic bacteria present in psychrophilic lakes. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **25** (4): 553–560.

Aguayo P., González C., Barra R., Becerra J., Martínez M. 2014. Herbicides induce change in metabolic and genetic diversity of bacterial community from a cold oligotrophic lake. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **30** (3):1101-1110.

Andrews J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemoth.* **48** (S1): 5-16.

Anthony K. G., Sherburne C., Sherburne R., Frost L.S. 1994. The role of the pilus in recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids. *Mol. Microbiol.* **13** (6): 939–953.

Aranda C., Godoy F., Becerra J., Barra R., Martínez M. 2003. Aerobic secondary utilization of a non-growth and inhibitory substrate 2,4,6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Sphingopyxis*- like strain S32. *Biodegradation.* **14** (4): 265–274.

Ayub N.D., Pettinari M.J., Ruiz J.A., López N.I. 2004. A Polyhydroxybutyrate producing *Pseudomonas* sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance. *Curr. Microbiol.* **49**: 170–174.

Bargagli R. 2008. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Sci. Total Environ.* **400**: 212-226.

Barros J., Becerra J., González C., Martínez M. 2013. Antibacterial metabolites synthesized by psychrotrophic bacteria isolated from cold-freshwater environments. *Folia Microbiol* **58**:127–133.

Bathe S., Lebuhn M., Ellwart J.W., Wuertz S., Hausner M. 2004. High phylogenetic diversity of transconjugants carrying plasmid pJP4 in an activated sludge-derived microbial community. *FEMS Microbiol Lett* **235**:215–219.

Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K. 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*. **427**: 72-74.

Borghini F., Grimalt J.O., Sanchez- Hernández J.C., Barra R., Torres C.J., Focardi S. 2005. Organochlorine compounds in soils and sediments of the mountain Andean Lakes. *Environ. Pollut.* **136** (2): 253-266.

Bradford M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

Cascales E., Christie P.J. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**: 137–149.

Cavicchioli R., Ostrowski M., Fegatella F., Goodchild A., Guixa-Boixereu N. 2003. Life under Nutrient Limitation in Oligotrophic Marine Environments: An Eco/Physiological Perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (Formerly *Sphingomonas alaskensis*). *Microbiol. Ecol.* **45** (3): 203–217.

Chen I., Dubnau D. 2004. DNA uptake during natural transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 241–249.

Claverys J.P., Martin B., Polard P. 2009. The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **33** (3): 643-656.

De la Cruz F., Davies J. 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* **8** (3): 128-133.

De la Cruz F., Frost L.S., Meyer R.J., Zechner E.L. 2010. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34** (1): 18- 40.

De Souza, M.J., Nair S., Loka P.A., Chandramohan D. 2006. Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology.* **15** (4): 379–384.

Dennis J.J. 2005. The evolution of IncP catabolic plasmid. *Curr. Opin. Biotech.* **16** (3): 291-298.

Díaz E. 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.* **7** (3): 173–180.

Dionisio F., Matic I., Radman M., Rodrigues O.R., Taddei F. 2002. Plasmids Spread Very Fast in Heterogeneous Bacterial Communities. *Genetics.* **162** (4): 1525–1532.

Don R.H., Pemberton J. M. 1981. Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **145** (2): 681-686.

Don R.H., Pemberton J.M. 1985. Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **161** (1): 466-468.

Dorador C., Vila I., Imhoff J.F., Witzel K.P. 2008. Cyanobacterial diversity in Salar Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile: an example of geographical dispersion?. *FEMS Microbiol Ecol.* **64** (3): 419-432.

Dubnau D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53** : 217-244.

Fernandez-Astorga A., Muela A., Cisterna R., Iriberry J., Barcina I. 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1):392-398.

Field J.A., Stams A.J.M., Kato M., Schraa G. 1995. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *A. Van Leeuw.* **67** (1): 47-77.

Finkel S., Kolter R. 2001. Competence Gene Homologs DNA as a Nutrient: Novel Role for Bacterial. *J. Bacteriol.* **183** (21):6288- 6293.

Frost L.S., Ippen-Ihler K., Skurray R.A. 1994. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol. Rev.* **58** (2): 162–210.

Gasson M.J., Davies F.L. 1980. High-frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. *J. Bacteriol.* **143** (3):1260-1264.

Gingeras T.R., Brooks J.E. 1983. Cloned restriction/modification system from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80** (2): 402-406.

Gogarten J.P., Doolittle W.F., Lawrence J.G. 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* **19** (12): 2226–2238.

Gonzalez P., Zigler J.S., Epstein D.L., Borrás T. 1999. Increasing DNA Transfer Efficiency by Temporary Inactivation of Host Restriction. *BioTechniques*. **26** (5): 892-900.

Goodman A.E., Hild E., Marshall K.C., Hermansson M. 1993. Conjugative Plasmid Transfer between Bacteria under Simulated Marine Oligotrophic Conditions. *Appl Environ Microbiol* **59** (4):1035-1040

Goris J., Dejonghe W., Falsen E., De Clerck E., Geeraerts B., Willems A., Top E.M., Vandamme P., De Vos P. 2002. Diversity of Transconjugants that Acquired Plasmid pJP4 or pEMT1 after Inoculation of a Donor Strain in the A- and B-horizon of an Agricultural Soil and Description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. *System. Appl. Microbiol.* **25**: 340–352.

Gribble G.W. 2003. The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere*. **52** (2): 289-297.

Grohmann E., Muth G., Espinosa M. 2003. Conjugative Plasmid Transfer in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **67** (2): 277–301.

Hamilton H.L., Dillard J.P. 2006. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol. Microbiol.* **59** (2): 376-385.

Harayama S., Timmis K.N. 1992. Aerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. In: Sigel H, Sigel A (eds) *Metal ions in biological systems*. **28**: 99–156.

Harder W., Dijkhuizen L. 1983. Physiological responses to nutrient limitation. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**: 1-23

Hayes C.S., Aoki S.K., Low D.A. 2010. Bacterial Contact Dependent Delivery Systems. *Annu. Rev. Genet.* **44**: 71-90.

Herbert R.A. 1990. Methods for Enumerating Microorganisms and Determining Biomass in Natural Environments. *Method Microbiol.* **22**: 1-39.

Hirt H., Schlievert P.M., Dunny G.M. 2002. *In vivo* induction of virulence and antibiotic resistance transfer in *Enterococcus faecalis* mediated by the sex pheromonesensing system of pCF10. *Infect. Immun.* **70** (2): 716–723.

Ishiwa A., Komano T. 2004. PilV adhesins of plasmid R64 thin pili specifically bind to the lipopolysaccharides of recipient cells. *J. Mol. Biol.* **343** (3): 615–625.

Iwata H., Tanabe S., Sakai N., Tatsukawa R. 1993. Distribution of persistent organochlorines in the ocean air and surface seawater and the role of ocean on their global transport and fate. *Environ. Sci. Technol.* **27** (6): 1080-1098.

Jain R., Rivera M.C., Moore J.E., Lake J.A. 2002. Horizontal Gene Transfer in Microbial Genome Evolution. *Theor. Popul. Biol.* **61** (4): 489–495.

Jain R., Rivera M.C., Moore J.E., Lake J.A. 2003. Horizontal Gene Transfer Accelerates Genome Innovation and Evolution. *Mol. Biol. Evol.* **20** (10): 1598–1602.

Jeltsch A. 2003. Maintenance of species identity and controlling speciation of bacteria: a new function for restriction/modification systems?. *Gene.* **317**: 13–16.

Johnsen A.R., Bendixen K., Karlson U. 2002. Detection of Microbial Growth on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Microtiter Plates by Using the Respiration Indicator WST-1. *Appl. Environ. Microb.* **68** (6): 2683–2689.

Johnsen A.R., Kroer N. 2007. Effects of stress and other environmental factors on horizontal plasmid transfer assessed by direct quantification of discrete transfer events. *FEMS Microbiol. Ecol.* **59** (3): 718–728.

Jorgensen J.H., Ferraro M.J. 1998. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* **26**: 973-980.

Kaprelyants A.S., Gottschal J.C., Kell D.B. 1993. Dormancy in non-sporulating bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **104** (3-4): 271-286.

Kelleher J.E., Raleigh E.A. 1994. Response to UV Damage by Four *Escherichia coli* K-12 Restriction Systems. *J. Bacteriol.* **176** (19): 5888-5896.

Kobayashi I. 2001. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res.* **29** (18): 3742–3756.

Krüger N.J., Stingl K. 2011. Two steps away from novelty – principles of bacterial DNA uptake. *Mol. Microbiol.* **80** (4): 860-867.

Leahy J.G., Colwell R.R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environ. *Microbiol. Rev.* **54** (3): 305-315.

Ledger T., Zúñiga A., Kraiser T., Dasencich P., Donoso R., Pérez-Pantoja D., González B. 2012. Aromatic compounds degradation plays a role in colonization of *Arabidopsis thaliana* and *Acacia caven* by *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134. *A Van Leeuw. J. Microb.* **101** (4):713–723.

Llosa M., Gomis-Rüth F.X., Coll M., de la Cruz F. 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol.* **45** (1): 1-8.

Lopez D., Vlamakis H, Kolter R. 2009. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Rev. **33**: 152–163

Lorenz M.G., Wackernagel W. 1994. Bacterial gene-transfer by natural genetic-transformation in the environment. Microbiol. Rev. **58** (3): 563–602.

Mackenzie R., Barros J., Martínez M. 2011. Characterization of aerobic heterotrophic bacteria in cold and nutrient-poor freshwater ecosystems. World J. Microb. Biot. **27** (11): 2499–2504.

Majewski J. 2001. Sexual isolation in bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **199** (2): 161-169.

Margesin R., Schinner F. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. Appl. Microbiol. Biot. 56 (5-6): 650–663.

Marshall J.J.T., Halford S.E. 2010. The Type IIB restriction endonucleases Biochem. Soc. T. **38**:410-416.

Matthysse A.G., Stretton S., Dandie C., McClure N.C., Goodman A.E. 1996. Construction of GFP vectors for use in Gram-negative bacteria other than *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. **145** (1): 87-94.

Matus V., Sánchez M.A., Martínez M., González B. 2003. Efficient Degradation of 2,4,6-Trichlorophenol Requires a Set of Catabolic Genes Related to *tcp* Genes from *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). App. Environ. Microb. **69** (12): 7108–7115.

Morgan R.D., Dwinell E.A., Bhatia T.K., Lang E.M., Luyten Y.A. 2009. The Mmel family: type II restriction–modification enzymes that employ single-strand modification for host protection. Nucleic Acids Res. **37** (15): 5208–5221.

Muela A., Pocino M., Arana I., Justo J.I., Iriberry J., Barcina I. 1994. Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (12):4273-4278.

Mulcahy H., Charron-Mazenod L., Lewenza S. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environ. Microbiol.* **12** (6): 1621- 1629.

Murray N. E. 2000. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a Legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. R.* **64** (2): 412-434.

Neilson J.W., Josephson K.L., Pillai S.D., Pepper I.L. 1992. Polymerase chain reaction and gene probe detection of the 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid degradation plasmid, pJP4. *Appl. Environ. Microb.* **58** (4): 1271-1275.

Neilson J.W., Josephson K.L., Pepper I.L., Arnold R.B., Di Giovanni G.D., Sinclair N.A. 1994. Frequency of Horizontal Gene Transfer of a Large Catabolic Plasmid (pJP4) in Soil. *Appl. Environ. Microb.* **60** (11): 4053-4058.

Newby D.T., Gentry T.J., Pepper I.L. 2000. Comparison of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors. *Appl. Environ. Microbiol.* **66** (1):3399-3407.

Ockenden W.A., Lohmann R., Shears J.R., Jones K.C. 2001. The significance of PCBs in the atmosphere of the Southern Hemisphere. *Environ. Sci. Pollut. R.* **8** (3): 189-194.

Pál C., Papp B., Lercher M.J. 2005. Adaptative evolution of bacterial metabolic networks by horizontal gene transfer. *Nat. Genet.* **37** (12):1372-1375.

Palchevskiy V., Finkel S.E. 2009. A Role for Single-Stranded Exonucleases in the Use of DNA as a Nutrient. *J. Bacteriol.* **191** (11):3712- 3716.

Pavez P., Castillo J.L., González C., Martínez M. 2009. Poly- β Hydroxyalkanoate exert a protective effect against carbon starvation and frozen conditions in *Sphingopyxis chilensis*. *Curr. Microbiol.* **59** (6): 636–640.

Pearson R.D., Steigbigel R.T., Davis H.T., Chapman S.W. 1980 Method of reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrob Agents Ch* **18** (5):699-708.

Piggot P.J., Hilbert D.W. 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 579–586

Popa O., Dagan T. 2011. Trends and barriers to lateral gene transfer in prokaryotes. *Curr. Opin. Microbiol.* **14** (5): 615-623.

Pozo K., Urrutia R., Barra R., Mariottini M., Treutler H.C., Araneda A., Focardi S. 2007. Records of polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments of four remotes Chilean Andean Lakes. *Chemosphere.* **66** (10): 1911-1921.

Roberts R.J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A.S., *et al.* 2003. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* **31** (7): 1805-1812

Rozzak D.B., Colwell R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51** (3): 365-379.

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

Schenzle A., Lenke H., Fischer P., Williams P.A., Knackmuss H.J. 1997. Catabolism of 3-Nitrophenol by *Ralstonia eutropha* JMP134. Appl. Environ. Microb. **63** (4): 1421-1427.

Seitz P., Blokesch M. 2013. Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **37** (3): 336-363.

Seoane J., Yankelevich T., Dechesne A., Merkey B., Sternberg C., Smets B.F. 2011. An individual-based approach to explain plasmid invasion in bacterial populations. FEMS Microbiol. Ecol. **75** (1): 17–27.

Seper A., Fengler V.H.I., Roier S., Wolinski H., Kohlwein S.D., Bishop A.L., Camilli A., Reidl J., Schild S. 2011. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. Mol. Microbiol. **82** (4): 1015-1037.

Smets B.F., Rittmann B.E., Stahl D.A. 1993. The specific growth rate of *Pseudomonas putida* PAW1 influences the conjugal transfer rate of the TOL plasmid. Appl. Environ. Microbiol. **59** (10):3430-3437.

Soto D. 2002. Oligotrophic patterns in southern Chilean lakes: the relevance of nutrients and mixing depth. Rev. Chil. His. Nat. **75** (2): 377-393.

Stewart G.J., Carlson C.A. 1986. The biology of natural transformation. Annu. Rev. Microbiol. **40** (1): 211- 235.

Summers D.K. 1996. The Biology of Plasmids. 1^a edición. Blackwell Science Ltd, Cambridge. Páginas 7, 8, 97, 10.

Thomas C.M., Nielsen K.M. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Rev. Microbiol.* **3** (9): 711- 721.

Tock M.R., Dryden D.T.F. 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* **8** (4): 466–472.

Top E.M., Springael D., Boon N. 2002. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **42** (2): 199–208.

Torrella F., Morita R.Y. 1981. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(2): 518- 527.

Trefault N., Clément P., Manzano M., Pieper D.H., González B. 2002. The copy number of the catabolic plasmid pJP4 affects growth of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) on 3-chlorobenzoate. *FEMS Microbiol Lett* **212**:95-100.

Trefault N., De la Iglesia R., Molina A.M., Manzano M., Ledger T., Pérez-Pantoja D., Sánchez M.A., Stuardo M., González B. 2004. Genetic organization of the catabolic plasmid pJP4 from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environ. Microbiol.* **6** (7): 655–668.

Van Wolferen M., Ajon M., Driessen A.J.M., Albers S.V. 2013. How hyperthermophiles adapt to change their lives: DNA exchange in extreme conditions. *Extremophiles.* **17** (4): 545–563.

Velkov V.V. 2002. New Insights into the Molecular Mechanisms of Evolution: Stress Increases Genetic Diversity. *Mol. Biol.* **36** (2): 209–215.

Wania F., Mackay D. 1993. Global fractionation and cold condensation of low volatility organochlorine compounds in polar regions. *Ambio*. **22**: 10–18.

Wilson G.G., Murray N.E. 1991. Restriction and modification systems. *Annu. Rev. Genet.* **25** (1): 585—627.

Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. **33**: 103-119.

You I.S., Ghosal D. 1995. Genetic and molecular analysis of a regulatory region of the herbicide 2,4 dichlorophenoxyacetate catabolic plasmid pJP4. *Mol. Microbiol.* **16** (2): 321-331.

