



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias Mención  
Microbiología

# **Efecto de nanopartículas de cobre sobre la transferencia de genes involucrados en la metabolización bacteriana de plaguicidas**



Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Mención  
Microbiología.

BORIS IGNACIO PARRA VERDUGO  
CONCEPCIÓN - CHILE  
2020

Profesor Guía: Dr. Miguel Martínez  
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía: Dr. Gonzalo Tortella  
Universidad de la Frontera

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

Profesores Integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Miguel Martínez  
Profesor Guía  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Gonzalo Tortella  
Profesor Co-Guía  
Universidad de la Frontera



---

Dra. Mara Cea  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad de la Frontera

---

Dr. Víctor Campos  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Carlos Smith  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias,  
Mención Microbiología

***Esta tesis es dedicada a mi Mía, Nachin, Mamá, Papá, Hermanas, Sobrinos y Amigos. Siempre hay que tener presente lo más importante de todo...***



**“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como la oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”.**

**Albert Einstein.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a tantos que me han apoyado y ayudado en esta etapa doctoral. Durante el transcurso de este tiempo no se trata solo de adquirir conocimientos, sino que de formarse íntegramente al máximo nivel de grados académicos.

Quiero agradecer a mi Mía y mi Nachin que son el motor de mi vida. Gracias por hacerme feliz, amarme, apoyarme y permitirme saber que es lo más importante. Agradecer a mi familia (padres, hermanas y sobrinos) por apoyarme y contar siempre con ustedes. Agradecer a mis amigos por esos momentos de distensión y recreación.

Quiero agradecer a mi profesor guía Dr. Miguel Martínez y a mi profesor co-guía Dr. Gonzalo Tortella por ayudarme en la realización de los experimentos y al análisis de resultados.

A todo el grupo del laboratorio, donde este tiempo he pasado más que en mi casa. Agradecer especialmente a Ruth por su inmensa ayuda. A mis compañeros del Doctorado con los cuales compartí las primeras etapas de este postgrado.

Agradezco además al Dr. Arnaud Dechesne que me permitió desarrollar una pasantía doctoral en el laboratorio de ecología microbiana de la Universidad Técnica de Dinamarca, en Copenhague.

**MUCHAS GRACIAS A TODOS!**

Esta Tesis fue realizada con financiamiento otorgado por:

Proyecto FONDECYT No 1161713

Beca CONICYT de Doctorado nacional 21151191



Apoyo de Dirección de Postgrado Universidad de Concepción



## Tabla de contenido

I. RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	14
II. INTRODUCCIÓN .....	16
II.1 Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y los genes que permiten su biodegradación bacteriana.....	19
II.2 Atrazina y los genes que permiten su biodegradación bacteriana.....	24
II.3 Movilización de genes degradativos entre bacterias.....	29
II.4 Capacidad antimicrobiana de nanopartículas metálicas y potencial uso en agricultura.....	32
II.5 Mecanismo de acción del cobre sobre las células bacterianas .....	36
II. 6 Posibles efectos del cobre sobre la conjugación bacteriana.....	38
III. HIPÓTESIS .....	40
IV. OBJETIVOS.....	41
Objetivo general .....	41
Objetivos específicos .....	41
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	42
Cepas bacterianas .....	42
Plaguicidas .....	44
Nanopartículas de cobre .....	44
Medios de cultivo.....	44
V.1 Objetivo 1. Determinar si las nanopartículas de cobre y el sulfato de cobre en concentraciones subinhibitorias modifican la frecuencia de conjugación de plásmidos catabólicos pJP4 y pADP-1.....	46
Caracterización de las nanopartículas de cobre (CuNPs) .....	46
Evaluación de la capacidad bacteriana para degradar los plaguicidas 2,4-D o atrazina como única fuente de carbono o nitrógeno.....	47
Detección de genes degradativos mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	48
Viabilidad de las cepas bacterianas dadoras <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 y <i>Pseudomonas</i> ADP y receptoras <i>P. putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> RG8 frente a CuNPs y CuSO <sub>4</sub> .....	50
Concentración mínima inhibitoria (CMI) de HgCl <sub>2</sub> y Rifampicina para las cepas dadoras <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 y <i>Pseudomonas</i> sp. ADP y las cepas receptoras <i>P. putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> sp. RG8.....	50

Efecto de CuNPs sobre la conjugación entre las cepas dadoras <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 (pJP4) y <i>Pseudomonas</i> sp. ADP (pADP-1) y las cepas receptoras <i>P. putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> sp. RG8.....	51
V.2 Objetivo 2. Determinar el efecto de CuSO <sub>4</sub> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la transferencia por conjugación del plásmido pRO101 desde <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 a <i>P. putida</i> KT2440 y la expresión del gen <i>traK</i> durante la conjugación.....	53
Concentración mínima inhibitoria a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y CuSO <sub>4</sub> de las cepas <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>P. putida</i> KT2440 .....	53
Efecto de CuSO <sub>4</sub> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el recuento viable de <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>P. putida</i> KT2440 .....	53
Concentración mínima inhibitoria de Tetraciclina y Kanamicina para <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>P. putida</i> KT2440 .....	54
Efecto de CuSO <sub>4</sub> y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la conjugación del plásmido pRO101 desde <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 a <i>P. putida</i> KT2440 en caldo LB.....	55
Evaluación de la capacidad degradativa de las cepas transconjugantes portadoras del plásmido pRO101 .....	56
Detección del gen <i>tfdB</i> en las cepas transconjugantes portadoras del plásmido pRO101 mediante PCR.....	57
Diseño de partidores para evaluar la expresión del gen <i>traK</i> por RTqPCR.....	57
Curva de estandarización de qPCR.....	58
Determinación de la expresión del gen <i>traK</i> mediante RT-qPCR en ensayos de conjugación entre <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>P. putida</i> KT2440 en presencia de CuSO <sub>4</sub> .....	59
Integridad de membrana en la cepa dadora expuesta a Cu o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	60
VI. RESULTADOS .....	61
Caracterización de las nanopartículas de cobre .....	61
Concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas dadoras <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 y <i>Pseudomonas</i> ADP y receptoras <i>P. putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> RG8 en presencia de CuNps, CuSO <sub>4</sub> , HgCL <sub>2</sub> y rifampicina.....	66
Recuento viable de las cepas dadoras <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 y <i>Pseudomonas</i> ADP y receptoras <i>P. putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> RG8 en presencia de CuNps.....	67
Transferencia de los plásmidos pJP4 y pADP-1 desde las cepas dadoras <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 y <i>Pseudomonas</i> ADP hacia las cepas receptoras <i>P. putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> RG8.....	68
Degradación de 2,4-D o atrazina por las cepas transconjugantes que adquirieron los plásmidos pJP4 o pADP-1. ....	70
Presencia de genes degradativos <i>tfdB</i> o <i>atzB</i> en las cepas bacterianas.....	71

Concentración mínima inhibitoria a CuSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , tetraciclina y kanamicina por las cepas <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>P. putida</i> KT2440 .....	72
Efecto del CuSO <sub>4</sub> en la viabilidad de <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>P. putida</i> KT2440 .	73
Efecto del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la viabilidad de <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>P. putida</i> KT2440.....	75
Efecto de CuSO <sub>4</sub> en la conjugación del plásmido pRO101 desde <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 a <i>P. putida</i> KT2440 .....	77
Efecto de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en la conjugación del plásmido pRO101 desde <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 a <i>P. putida</i> KT2440.....	79
Expresión del gen <i>traK</i> en presencia de CuSO <sub>4</sub> .....	82
Integridad de membrana en células dadoras expuesta a Cu o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	82
VII. DISCUSIÓN .....	84
Caracterización de las nanopartículas de cobre .....	84
Efecto de nanopartículas y sulfato de cobre en el recuento viable de <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 (pJP4), <i>Pseudomonas</i> sp. ADP (pADP-1), <i>P. putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> RG8.....	86
Efecto de nanopartículas y sulfato de cobre en la transferencia de los plásmidos catabólicos pJP4 y pADP-1 desde las cepas dadoras <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 (pJP4) y <i>Pseudomonas</i> sp. ADP (pADP-1) a las cepas receptoras <i>P. putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> RG8 por conjugación.....	87
Capacidad degradativa de las cepas transconjugantes <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> RG8 portadoras de los plásmidos catabólicos pJP4 y pADP-1 .....	89
Toxicidad del peróxido de hidrógeno sobre la cepa portadora del plásmido catabólico pRO101 <i>C. pinatubonensis</i> AEO106.....	90
Efecto del sulfato de cobre y peróxido sobre la transferencia del plásmido pRO101 desde <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 a <i>P. putida</i> KT2440 .....	91
Efecto del sulfato de cobre en la expresión del gen <i>traK</i> durante la conjugación del plásmido pRO101 desde <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 a <i>P. putida</i> KT2440.....	92
VIII. CONCLUSIONES .....	94
IX. PROYECCIONES.....	95
X. GLOSARIO .....	96
IX: REFERENCIAS .....	97



## Índice de Figuras

Figura 1. Degradación bacteriana de compuestos aromáticos. Flechas blancas: vías metabólicas periféricas, flechas negras: clivaje del anillo, flechas plomas: vías centrales (Díaz, 2004).....	18
Figura 2. Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D). .....	19
Figura 3. Ruta biodegradativa de 2,4-D descrita en el plásmido pJP4 de la cepa bacteriana <i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134 (a). Módulos genéticos involucrados (b) (Pérez-Pantoja et al., 2008).....	20
Figura 4. Mapa genético del plásmido pJP4. En colores se muestran las regiones codificantes (Trefault et al., 2004).....	22
Figura 5. 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (Atrazina).....	25
Figura 6. Ruta biodegradativa de atrazina descrita en <i>Pseudomonas</i> sp. ADP, junto con las enzimas que participan (Shiomi, 2013). .....	26
Figura 7. Mapa genético del plásmido pADP-1. Se indican las posiciones de sitios de restricción, genes y operones. Se indican los genes del catabolismo de atrazina <i>atzA</i> , <i>atzB</i> , <i>atzC</i> , <i>atzD</i> , <i>atzE</i> y <i>atzF</i> (Modificado desde Martínez et al., 2001).....	28
Figura 8. Principales mecanismos de transferencia horizontal de genes: conjugación, transformación y transducción (modificado desde Andersson & Hughes, 2010).....	29
Figura 9. Proteínas del sistema de conjugación en bacterias Gram negativas (Frost et al., 2005). .....	31
Figura 10. Relación inversa entre el tamaño de partícula y el número de moléculas de superficie (Oberdorster et al., 2005). .....	33
Figura 11. Nanopartículas metálicas en contacto con células bacterianas. ....	35
Figura 12. Posibles mecanismos de toxicidad de nanomateriales sobre bacterias. Diferentes nanomateriales pueden causar toxicidad mediante uno o mas de estos mecanismos (Klaine et al., 2008).....	37
Figura 13. Nanopartículas de cobre observadas mediante microscopía electrónica de barrido.....	61
Figura 14. Nanopartículas de cobre observadas mediante microscopía electrónica de transmisión.....	62

Figura 15. Difracción de rayos X de CuNPs. ....	63
Figura 16. Histogramas de los tamaños hidrodinámicos de las CuNPs obtenidos mediante dispersión dinámica de la luz en (A) caldo LB y (B) MSM. ....	64
Figura 17. Liberación de iones desde CuNPs en caldo LB y MSM obtenida mediante espectrofotometría de absorción atómica. ....	65
Figura 18. Recuento viable de <i>C. pinatubonensis</i> JMP134, <i>Pseudomonas</i> sp. ADP, <i>P. putida</i> KT2440 y <i>Pseudomonas</i> sp. RG8 en presencia de CuNPs. Las barras de error representan la desviación estándar. Las diferentes letras muestran diferencias significativas. ....	67
Figura 19. Gel de agarosa (2%) de los productos de PCR de los genes <i>tfdB</i> (205 pb) y <i>atzB</i> (500 pb) en las cepas dadoras, receptoras y transconjugantes. ....	71
Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de CuSO <sub>4</sub> en el recuento viable de <i>C. pinatubonensis</i> AEO106. ....	73
Figura 21. Efecto de diferentes concentraciones de CuSO <sub>4</sub> en el recuento viable de <i>P. putida</i> KT2440. ....	74
Figura 22. Efecto de diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el recuento viable de <i>C. pinatubonensis</i> AEO106. ....	76
Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en el recuento viable de <i>P. putida</i> KT2440. ....	76
Figura 24. Recuento viable de cepas transconjugantes obtenidas en presencia de distintas concentraciones de CuSO <sub>4</sub> . ....	77
Figura 25. Recuento de cepas transconjugantes obtenidas en presencia distintas concentraciones de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	79
Figura 26. Gel de agarosa (2%) para detección del gen <i>tfdB</i> en cepas transconjugantes. ....	81
Figura 27. Histogramas de incorporación de yoduro de propidio por las células de <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 incubadas 5 min en control (a), con 7,9 M de Cu (b) o 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (c), indicativo de integridad de la membrana. ....	83

## Índice de Tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio y algunas de sus propiedades relacionadas a la investigación. ....	43
Tabla 2. Partidores utilizados para la detección mediante PCR de los genes involucrados en la degradación bacteriana de atrazina y 2,4-D. ....	49
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). ....	66
Tabla 4. Frecuencias de conjugación de cepas transconjugantes KT2440 $\Delta$ rpJP4, RG8 $\Delta$ rpJP4, KT2440 $\Delta$ rpADP-1 o RG8 $\Delta$ rpADP-1 en presencia de CuNPs o CuSO <sub>4</sub> . ....	68
Tabla 5. Frecuencias de conjugación del plásmido pJP4 desde <i>C. pinatubonensis</i> JMP134 a <i>P. putida</i> KT2440 en caldo LB diluido (25 %, 50 % o 75 %) o MSM en presencia de CuNPs o CuSO <sub>4</sub> . ....	69
Tabla 6. Degradación de 2,4-D o atrazina. ....	70
Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria a CuSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , tetraciclina y kanamicina para las cepas <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 y <i>P. putida</i> KT2440. ....	72
Tabla 8. Frecuencias de conjugación del plásmido pRO101 desde <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 a <i>P. putida</i> KT2440 en presencia de CuSO <sub>4</sub> . ....	78
Tabla 9. Frecuencias de conjugación del plásmido pRO101 desde <i>C. pinatubonensis</i> AEO106 a <i>P. putida</i> KT2440 en presencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	80
Tabla 10. Expresión de gen <i>traK</i> en presencia de CuSO <sub>4</sub> . ....	82

## I. RESUMEN

Los plaguicidas son sustancias químicas utilizadas ampliamente para controlar plagas en la agricultura. La mayoría de estos compuestos presentan efectos tóxicos para el ser humano y otras especies. Su remoción del ambiente es principalmente realizada por bacterias que presentan plásmidos catabólicos conjugativos, los cuales pueden ser diseminados en la comunidad microbiana mediante conjugación. Este proceso permite la transferencia horizontal de genes mediante el contacto directo entre una célula dadora y una célula receptora.

Debido a su amplio espectro de acción antimicrobiano, se ha propuesto el uso de nanopartículas metálicas con fines agrícolas. Entre estas, las nanopartículas de cobre (CuNPs) presentan un amplio espectro de acción antibacteriana y menor costo de producción comparado a las de oro o plata. El mecanismo de acción de las CuNPs aún no está completamente definido, pero se ha reportado que presentan acción directa sobre la envoltura de las bacterias e indirecta a causa de la producción de especies reactivas de oxígeno que afectan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Sin embargo, hasta la fecha existe muy poca información sobre los efectos de las CuNPs sobre la conjugación, proceso que puede ser afectado por diversos factores como cambios en parámetros físico-químicos o presencia de compuestos tóxicos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue establecer el efecto del cobre a la forma de nanopartículas metálicas y de sulfato de cobre sobre la transferencia por conjugación de plásmidos catabólicos.

En este estudio se realizaron ensayos de conjugación entre las cepas dadoras *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (pJP4) y *Pseudomonas* sp. ADP (pADP-1) hacia las cepas receptoras *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. RG8. El plásmido pJP4 permite la degradación del plaguicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y el plásmido pADP-1 permite la degradación del plaguicida atrazina. Las CuNPs (40-60 nm) fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica, dispersión dinámica de la luz, difracción de rayos X y absorbancia atómica. Se evaluó su efecto sobre la viabilidad de las cepas en estudio y se realizaron ensayos de conjugación en medio líquido durante 6 h en presencia de CuNPs en concentraciones subinhibitorias y un control con una sal de cobre

(CuSO<sub>4</sub>). Las cepas transconjugantes se seleccionaron en placas con agar LB suplementado con agentes selectivos. En todas las cepas bacterianas se detectó su capacidad para degradar los plaguicidas y la presencia de genes degradativos mediante PCR.

Los resultados indicaron que en caldo LB la disolución de las CuNPs es más rápida que en medio mineral. Además, la presencia de CuNPs y CuSO<sub>4</sub> redujo la transferencia por conjugación de los plásmidos catabólicos pADP-1 y pJP4. Esto indicaría que el efecto negativo observado sobre la conjugación sería causado por la acción de los iones del metal más que un efecto de las nanopartículas. Por lo tanto, las CuNPs reducirían la capacidad de diseminación de los genes degradativos dependiendo de la capacidad de liberación de iones hacia el ambiente.

Posteriormente se realizaron ensayos de conjugación entre la cepa dadora *C. pinatubonensis* AEO106 portadora del plásmido pRO101 y la cepa receptora *P. putida* KT2440 en presencia de CuSO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El plásmido pRO101 es un derivado del pJP4 con la misma propiedad para degradar 2,4-D y un inserto genético que otorga resistencia a tetraciclina. Además, se determinó la expresión del gen *traK*, uno de los genes responsables del procesamiento del ADN plasmidial al comienzo de la conjugación, en presencia de distintas concentraciones de CuSO<sub>4</sub>. No se observó una reducción en la transferencia por conjugación en presencia de concentraciones subinibitorias de CuSO<sub>4</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Asimismo, se observó que la transferencia de dicho plásmido catabólico pRO101 ocurre en menos de 5 min, lo cual no ha sido descrito para plásmidos de la familia IncP, y que la expresión del gen *traK* en presencia de CuSO<sub>4</sub> fue similar a su expresión en el control. Por lo tanto, debido a que la diseminación de plásmidos catabólicos por conjugación es fundamental en la remoción de plaguicidas desde el ambiente, este trabajo contribuye al conocimiento respecto de los efectos del cobre en el potencial biodegradativo de las comunidades microbianas.

## ABSTRACT

Pesticides are substances widely used to control pests, which spread to the environment in large quantities. Most of these compounds have toxic effects on humans and other species. Their removal from the environment is mainly carried out by bacteria that have conjugative catabolic plasmids, which can be spread in the microbial community by conjugation. This process allows the horizontal transfer of genes through direct contact between a donor cell and a recipient cell.

Since it was discovered that metal nanoparticles possess toxicity against a variety of bacteria, their use has been proposed for agricultural purposes. Among these nanoparticles, copper nanoparticles (CuNPs) have a broad spectrum of antibacterial action and lower production costs compared to others such as gold or silver. The mechanism of action of CuNPs is not yet fully defined, but it is known that they have direct action on the envelope of bacteria and indirectly due to the production of reactive oxygen species that affect proteins, lipids and nucleic acids. However, to date the effects of CuNPs on conjugation are unknown, a process that can be affected by various factors, such as changes in physical-chemical parameters or the presence of toxic compounds.

In this study, conjugation assays were performed between donor strains *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (pJP4) and *Pseudomonas* sp. ADP (pADP-1) to the recipient strains *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas* sp. RG8. Plasmid pJP4 allows degradation of the pesticide 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and plasmid pADP-1 allows degradation of the pesticide atrazine. CuNPs (40-60 nm) were characterized by electron microscopy, dynamic light scattering, X-ray diffraction and atomic absorbance. The effect of the CuNPs on the viability of the strains under study was evaluated and conjugation assays were performed in liquid medium for 6 h in the presence of CuNPs at subinhibitory concentrations and a control with a copper salt (CuSO<sub>4</sub>). Transconjugant strains were selected on plates with LB agar supplemented with selective agents. In all bacterial strains its ability to degrade pesticides and the presence of degradative genes by PCR were detected. The results indicated that in LB broth the CuNPs dissolve faster than in medium without organic matter. In addition, the presence of CuNPs and CuSO<sub>4</sub> reduced

conjugation transfer of the catabolic plasmids pADP-1 and pJP4. This would indicate that the negative effect observed on conjugation would be caused by the action of metal ions rather than an effect of nanoparticles. Therefore, the CuNPs would reduce the dissemination capacity of the degradative genes depending on the ability of ion release to the environment.

Subsequently, conjugation assays were performed between the donor strain *C. pinatubonensis* AEO106 carrying the plasmid pRO101 and the recipient strain *P. putida* KT2440 in the presence of CuSO<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Plasmid pRO101 is a derivative of pJP4 with the same property to degrade 2,4-D and a genetic insert that gives tetracycline resistance. In addition, the expression of the *traK* gene, one of the genes responsible for processing plasmidial DNA at the beginning of conjugation, was determined in the presence of different concentrations of CuSO<sub>4</sub>. No reduction in transfer by conjugation was observed in the presence of subinhibitory concentrations of CuSO<sub>4</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Furthermore, it was observed that the transfer of catabolic plasmid pRO101 occurs in less than 5 min, which has not been described for plasmids of the IncP family, and that the expression of the *traK* gene in the presence of CuSO<sub>4</sub> was similar to their expression in control. Therefore, because the dissemination of catabolic plasmids by conjugation is fundamental in the removal of pesticides from the environment, this work contributes to knowledge regarding the effects of copper on the biodegradative potential of microbial communities.

## II. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son compuestos con capacidad biocida utilizados para inhibir el desarrollo de ciertos organismos que se consideran plagas. Son empleados masivamente en el sector agrícola para impedir el desarrollo de organismos oportunistas como hongos fitopatógenos, malezas, insectos, roedores, entre otros, y así aumentar la eficiencia en la producción de los cultivos. Estos compuestos son tóxicos, ya que además de afectar su blanco, tienen efectos deletéreos sobre la mayoría de los seres vivos como la microbiota del suelo, animales, plantas y seres humanos. Además, tienden a perdurar por largos periodos de tiempo en el suelo y agua debido a que presentan baja degradación química (Santacruz et al., 2005; Jacobsen & Hjelmsø, 2014). En este sentido, entidades como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization, FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) consideran la mayoría de estos compuestos dentro del grupo de los contaminantes más peligrosos y persistentes incorporados al ambiente por el ser humano (Imfeld & Vuilleumier, 2012; Vargas Gil et al., 2011).

Las bacterias presentan capacidades metabólicas que les permiten hacer frente a diferentes condiciones adversas muchas veces consideradas extremas para el desarrollo de la vida, por lo cual están adaptadas a casi todos los ambientes que se presentan en el planeta (Roszak & Colwell, 1987). Los cambios que ocurren en el entorno que rodea estos organismos unicelulares ejercen un efecto en su metabolismo, crecimiento y viabilidad. Entre estos factores se encuentran la presencia de compuestos tóxicos, la concentración de nutrientes, cambios de temperatura, radiación, salinidad, pH, presión, humedad, entre otros (Morita, 1975;



Torrella & Morita, 1981; Kjelleberg et al., 1983; Cavicchioli et al., 2003; Gómez et al., 2004; Roper & Gupta, 1995). Actualmente se ha descrito una diversidad de bacterias que pueden metabolizar ciertos compuestos utilizados como plaguicidas. Esta mineralización puede ser realizada de forma total por una bacteria, o bien, puede ser realizada por consorcios microbianos formados por diferentes especies para así degradar totalmente el compuesto y todos sus derivados (Días, 2004). Generalmente las primeras etapas degradativas ocurren en vías metabólicas periféricas, consideradas no esenciales para la bacteria, aunque los productos de estos procesos posteriormente son incorporados a vías metabólicas centrales como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Fig. 1) (Díaz, 2004).

La capacidad bacteriana para metabolizar plaguicidas radica en que muchos de estos compuestos presentan estructuras similares a compuestos de origen biológico que se encuentran en el ambiente (Whitfield et al., 1999; Ahn et al., 2003; Vetter y Janussen, 2005). En este sentido Aguayo et al. (2009) describieron la existencia de bacterias capaces de metabolizar compuestos fenólicos en ecosistemas prístinos sin registro de uso y con una baja intervención humana (Aguayo et al., 2009). Al respecto, Aguayo et al. (2014) demostraron que la incorporación de estos compuestos modifica la comunidad, inhibiendo el desarrollo de bacterias susceptibles y aumentando el desarrollo de bacterias que toleran y/o metabolizan los compuestos, las cuales generalmente se encuentran en baja representación. Estos resultados sugieren que las bacterias que metabolizan plaguicidas desempeñan una función fundamental en la biorremediación de los ambientes contaminados con estos compuestos, y desde el punto de vista biológico, poseen

ventajas adaptativas frente a los microorganismos susceptibles (Gómez et al., 2006; Santacruz et al., 2005).

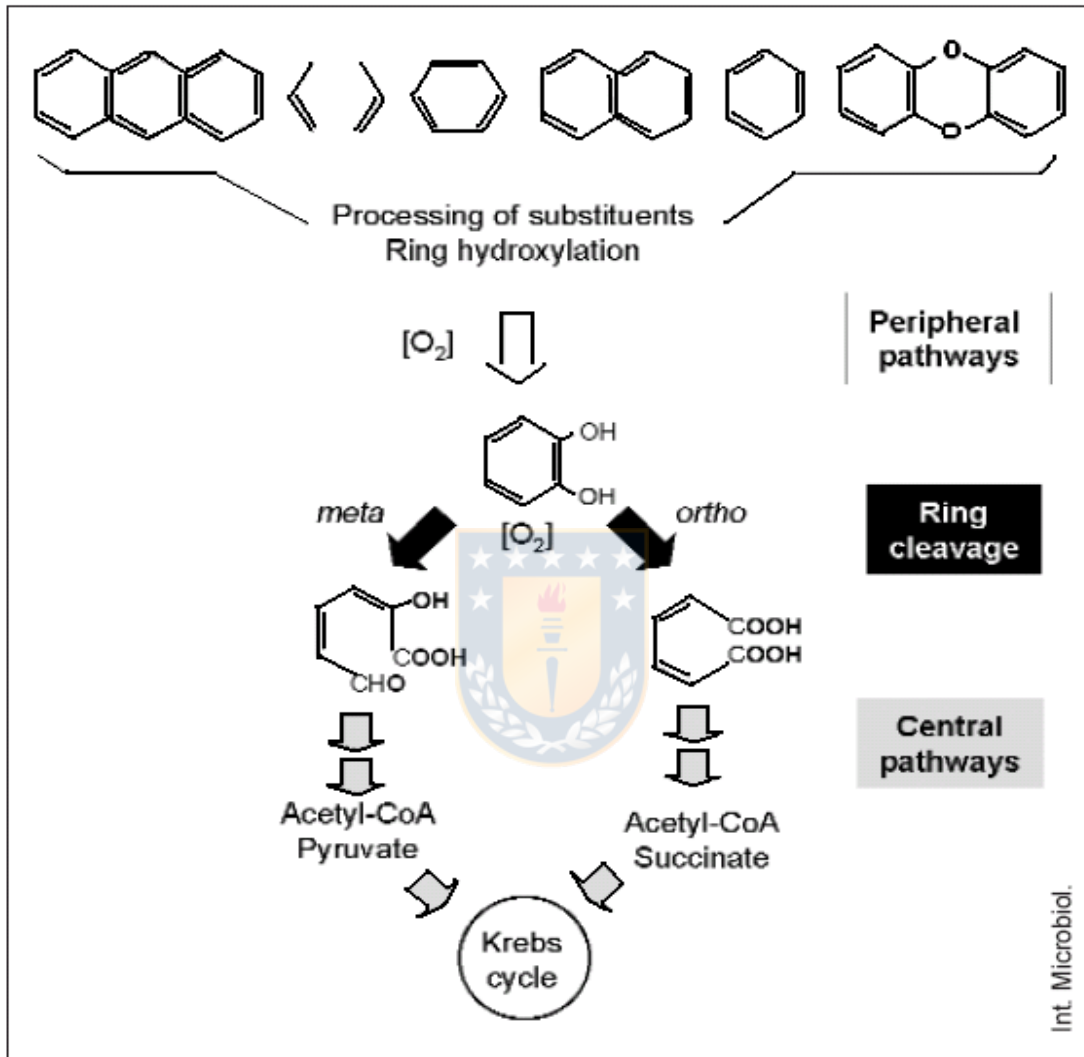


Figura 1. Degradación bacteriana de compuestos aromáticos. Flechas blancas: vías metabólicas periféricas, flechas negras: clivaje del anillo, flechas plomas: vías centrales (Díaz, 2004).

## II.1 Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y los genes que permiten su biodegradación bacteriana

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Fig. 2) es ampliamente utilizado en agricultura debido a sus propiedades como herbicida (Roberts, 1998; Munro et al., 1992). Es uno de los plaguicidas más antiguos que se conocen, ya que su efecto fue descubierto durante la segunda guerra mundial (Harvey & Robbins, 1947). Los organismos vegetales susceptibles a 2,4-D son principalmente especies dicotiledóneas, en cambio las especies monocotiledóneas poseen una excelente tolerancia, por lo cual prácticamente no son afectadas. Es decir, inhibe el desarrollo de malezas sin afectar cultivos de importancia comercial, como por ejemplo, cereales tales como trigo, maíz y arroz (Harvey & Robbins, 1947). Su mecanismo de acción es de tipo hormonal auxínico, ya que reemplaza la fitohormona auxina cuya función es regular el crecimiento (Tu et al., 2001). Es el componente activo de más de 1500 productos (Tu et al., 2001) y se encuentra clasificado por la OMS dentro de la clase II de los productos químicos considerados moderadamente peligrosos. Sin embargo, estudios más actuales indican que poseería efectos cancerígenos para el ser humano (Loomis et al., 2015).

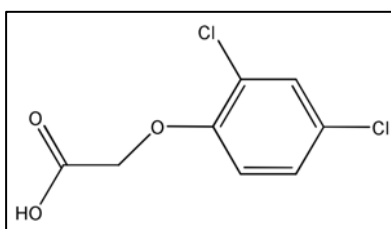


Figura 2. Ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4 D).

Diversos microorganismos pueden metabolizar el ácido 2,4 diclorofenoxiacético y utilizarlo como fuente de carbono y energía para sus procesos celulares (Evans et al., 1971; Michalowicz & Duda, 2007). Entre estos, se encuentran especies bacterianas pertenecientes a diversos géneros como *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Chromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, entre otras (Sandmann et al., 1988; Seo et al., 2009). Además, diversas especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Bukowska, 2006; Seo et al., 2009).

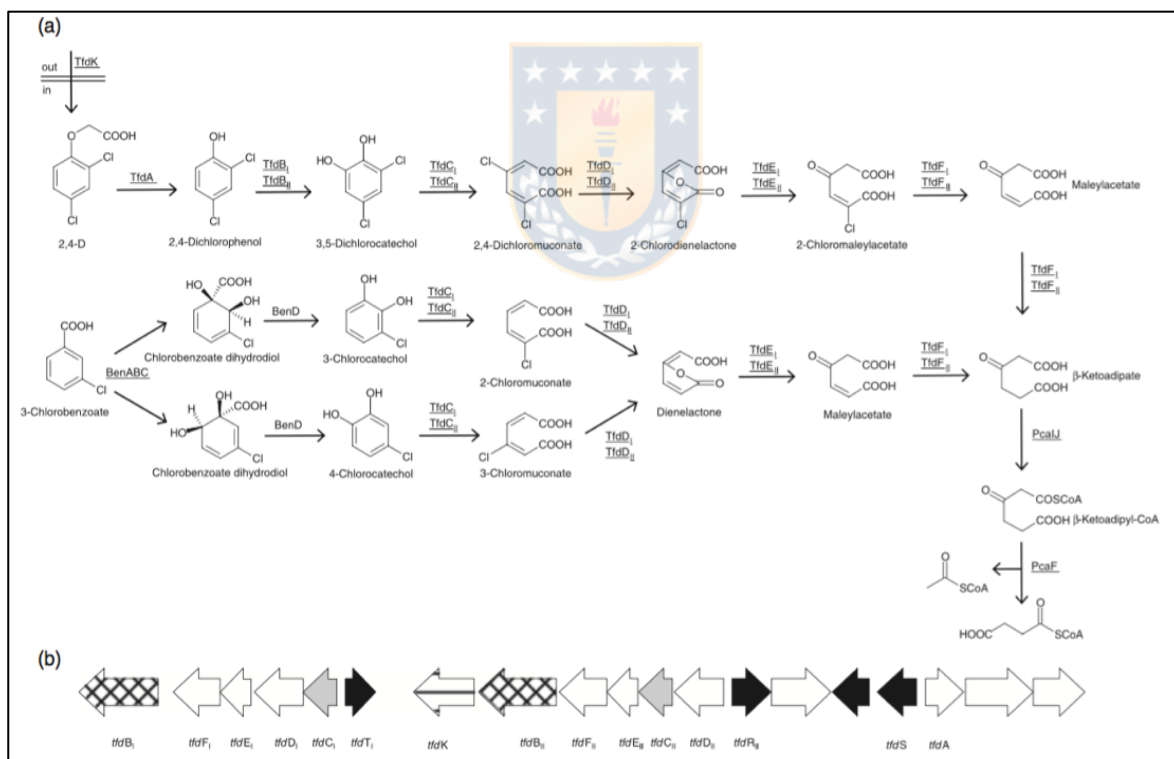


Figura 3. Ruta biodegradativa de 2,4-D descrita en el plásmido pJP4 de la cepa bacteriana *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (a). Módulos genéticos involucrados (b) (Pérez-Pantoja et al., 2008).

Actualmente se conocen todas las vías degradativas y enzimas que permiten la metabolización completa del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y sus derivados (Fig. 3a). Los genes que codifican estas enzimas fueron descubiertos en una molécula de ADN extracromosomal denominado plásmido pJP4 (Fig.4), el cual forma parte del genoma de la cepa bacteriana *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (Don & Pemberton, 1981; Trefault et al., 2004). Estos determinantes genéticos fueron denominados genes *tfd* debido a las siglas en ingles “two, four-dichlorophenoxyacetate”, y actualmente se encuentran secuenciados y caracterizados totalmente (Fig. 3b) (Streber et al., 1987; Perkins et al., 1990; Top et al., 2002).

EL gen *tfdA* codifica para una enzima con función 2,4 D/ $\alpha$ -cetoglutarato dioxigenasa (TfdA), la cual produce la transformación de  $\alpha$ -cetoglutarato en succinato y CO<sub>2</sub>, y de 2,4-D en glioxilato y 2,4 diclorofenol (2,4 DCP) (Pérez-Pantoja et al., 2008). La siguiente etapa en la biodegradación de 2,4-D, es la transformación de 2,4 DCP en 3,5 diclorocatecol (3,5 DCC), la cual es catalizada por la enzima 2,4 diclorofenol hidroxilasa (TfdB). El 3,5 DCC es uno de los intermediarios central en el metabolismo de compuestos cloroaromáticos. Posteriormente, la enzima clorocatecol 1,2 dioxigenasa (TfdC) produce la transformación de 3,5DCC en 2,4 dicloromuconato mediante la vía que produce el clivaje del anillo en posición orto. La molécula de 2,4 dicloromuconato es sustrato para la enzima cloromuconato cicloisomerasa (TfdD), la cual lo convierte en dienelactona. Luego la enzima dienelactona hidrolasa (TfdE) cataliza la transformación de dienelactona en maleilacetato. Por ultimo, la enzima maleilacetato reductasa (TfdF) cataliza la reducción de los dobles enlaces de maleilacetato, transformándolo en  $\beta$ -

cetoadipato. Éste último compuesto puede ser convertido posteriormente en acetil-CoA e ingresar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Pérez-Pantoja et al., 2008).

El plásmido pJP4 (Fig. 4) corresponde a una molécula de ADN de 87kb perteneciente al grupo de incompatibilidad de plásmidos de bajo número de copias, conocida como IncP-1 (Don & Pemberton, 1981; Pemberton & Don, 1981; Don & Pemberton, 1985). Esta familia de plásmidos es una de las más estudiadas debido a su extenso rango de huésped y su aparente prevalencia en el ambiente (Carattoli et al., 2005; Dennis, 2005). Además, permiten la transferencia de genes que codifican para vías degradativas de contaminantes, resistencia a metales pesados y resistencia a antibióticos (Sen et al., 2012; Popowska et al., 2013).

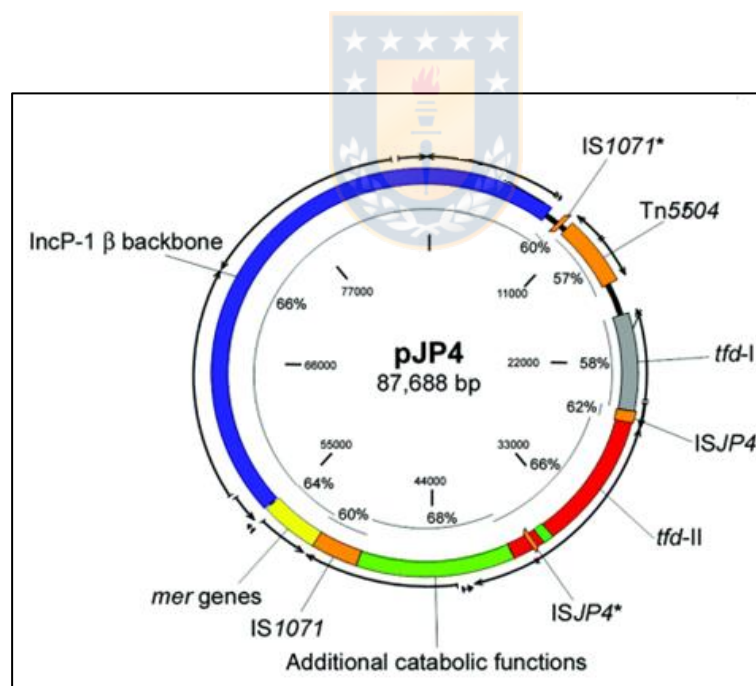


Figura 4. Mapa genético del plásmido pJP4. En colores se muestran las regiones codificantes (Trefault et al., 2004).

En el plásmido pJP4 se encuentran dos clústeres de genes *tfd*, denominados como *tfdI* y *tfdII* (Pérez-Pantoja et al., 2000). En conjunto, ambos clústeres alcanzan un tamaño de 22 kb (Laemmli et al., 2000). El clúster *tfdII* codifica las mismas funciones que el clúster *tfdI*, aunque presenta ciertas excepciones (Plumeier et al., 2002). El clúster *tfdI* codifica un regulador putativo de tipo LysR (producto del gen *tfdT*) interrumpido en su extremo carboxilo por una secuencia de inserción ISJP4 (Fig. 3b) (Leveau & Van der Meer, 1996). Además, los genes *tfdD<sub>II</sub>* y *tfdC<sub>II</sub>* se encuentran en un orden diferente a los *tfdD<sub>I</sub>* y *tfdC<sub>I</sub>*, en el módulo II se incluye un gen *tfdK* que codifica para una proteína de membrana citoplasmática que participa en el transporte de 2,4-D (Leveau et al., 1998) y dos genes reguladores de tipo LysR, denominados *tfdR* y *tfdS* (Fig. 3b). Estudios realizados por Pérez-Pantoja et al. (2008) indicaron que se requieren más de una copia del plásmido para que la cepa pueda sobrevivir en presencia de compuestos aromáticos y metabolizar el compuesto. Al respecto, Trefault et al. (2002) reportaron que se requieren al menos cinco copias por célula del plásmido para degradar 2,4-D.

*Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 es una bacteria Gram negativa perteneciente al orden Burkholderiales dentro de las  $\beta$ -proteobacterias. En diversas ocasiones ha cambiado su nomenclatura (*Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Wautersia eutropha* y *Cupriavidus necator*) (Ledger et al., 2012). Es una de las cepas más estudiada y utilizada como modelo para la degradación bacteriana de compuestos aromáticos tóxicos (Pieper et al., 2010). En la actualidad se encuentra secuenciado su genoma, el cual consiste en 4 replicones, de los cuales dos corresponden a cromosomas y dos a plásmidos (Lykidis et al., 2010). Esta cepa bacteriana además de poder utilizar el ácido 2,4 diclorofenoxiacético como única fuente de carbono y

energía, también crece y degrada una variedad de otros sustratos aromáticos como el 4-cloro-2-metilfenoxiacetato, ácido 3-clorobenzoico, 2,4,6 triclorofenol y 4-fluorobenzoato (Clément et al., 1995; Schlömann et al., 1990; Ghosal et al., 1985). Trefault et al. (2004) analizaron la secuencia de la molécula de ADN plasmídico pJP4, y propusieron un modelo que explicaría la adaptación de las bacterias frente a contaminantes cloroaromáticos como el ácido 2,4 diclorofenoxiacético. De acuerdo con este modelo, los genes catabólicos se encuentran entre módulos genéticos que permiten que este plásmido sea de amplio rango de huésped, es decir, pueda ser incorporado a diversas especies bacterianas. Estos autores mencionan que el plásmido pJP4 posee secuencias de inserción que habrían permitido su formación mediante recombinación con otros elementos genéticos como transposones, otros plásmidos e incluso cromosomas (Trefault et al., 2004).

## **II.2 Atrazina y los genes que permiten su biodegradación bacteriana**

La atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) es un herbicida ampliamente utilizado en agricultura a nivel mundial (Alice & Nilanjanda, 2012). Actúa a nivel del fotosistema II, por lo que inhibe el proceso de fotosíntesis (Ralebitso et al., 2002; Abigail & Das, 2012). Junto con la simazina son las principales componentes de la familia de las s-triazinas, las cuales son los herbicidas más utilizados en Estados Unidos (38.000 toneladas al año). Estos compuestos contaminan tanto el suelo como el agua, detectándose incluso en agua potable por sobre los niveles estándares aceptados de  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$  en Unión Europea y  $3.0 \mu\text{g L}^{-1}$  Estados Unidos, respectivamente (Rousseaux et al., 2001). De igual



manera, en Chile ha sido uno de los herbicidas más utilizados (350 toneladas por año, Dinamarca et al., 2007), a pesar de sus comprobados efectos cancerígenos en el ser humano (Ralebitso et al., 2002; Tappe et al., 2002).

La degradación microbiana es el principal mecanismo de remoción de atrazina desde suelo y agua (Ralebitso et al., 2002), mientras que su degradación química es lenta y poco eficiente (Gunasekara et al., 2007). La diversidad de bacterias que poseen esta capacidad, metabolizan el compuesto y lo utilizan como fuente de nitrógeno (Mandelbaum et al., 1995; Topp et al., 2000; Rousseaux et al., 2001; García-González et al., 2003; Dinamarca et al., 2007). Por ejemplo, especies de los géneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Pseudaminobacter*, *Chelatobacter*, *Delftia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardioides*, *Streptomyces*, entre otros (Mandelbaum et al., 1993; Radosevich et al., 1995; Shelton et al., 1996; Topp et al., 2000; Rousseaux, 2001; Piutti et al., 2003; Satsuma, 2006).

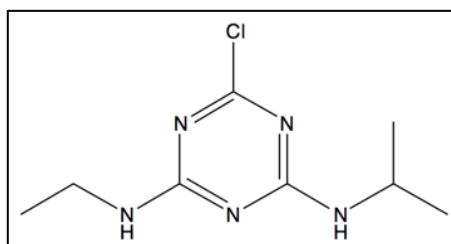


Figura 5. 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (Atrazina)

Las primeras etapas del catabolismo de las triazinas se conocen como la vía superior y tiene como resultado la generación de ácido cianúrico (Fig. 6) (Shao et al., 1995; De Souza et al., 1996; Hernández et al., 2008; Govantes et al., 2009). Estos procesos son realizados por 3 enzimas codificadas en los genes *atzA*, *atzB* y

*atzC* que son altamente conservados (De Souza et al., 1998). La primera enzima de la ruta catabólica se denomina atrazina clorohidrolasa, que cataliza la decloración de atrazina a hidroxiatrazina, y se encuentra codificada por el gen *atzA*. La enzima hidroxiatrazina etilaminohidrolasa codificada por el gen *atzB*, convierte la hidroxiatrazina a N-Isopropilammelida. La enzima N-isopropylammelide isopropilaminohidrolasa codificada en el gen *atzC*, convierte la N-Isopropilammelida en ácido cianúrico (Boundy-Mills et al., 1997; De Souza et al., 1998; Sadowsky et al., 1998). Todas estas enzimas pertenecen a la familia amidohidrolasas (Janssen et al., 2005), las cuales están ampliamente distribuidas entre los seres vivos ya que participan en la mineralización de diversos compuestos que contienen nitrógeno (Strong et al., 2002; Wackett et al., 2002).

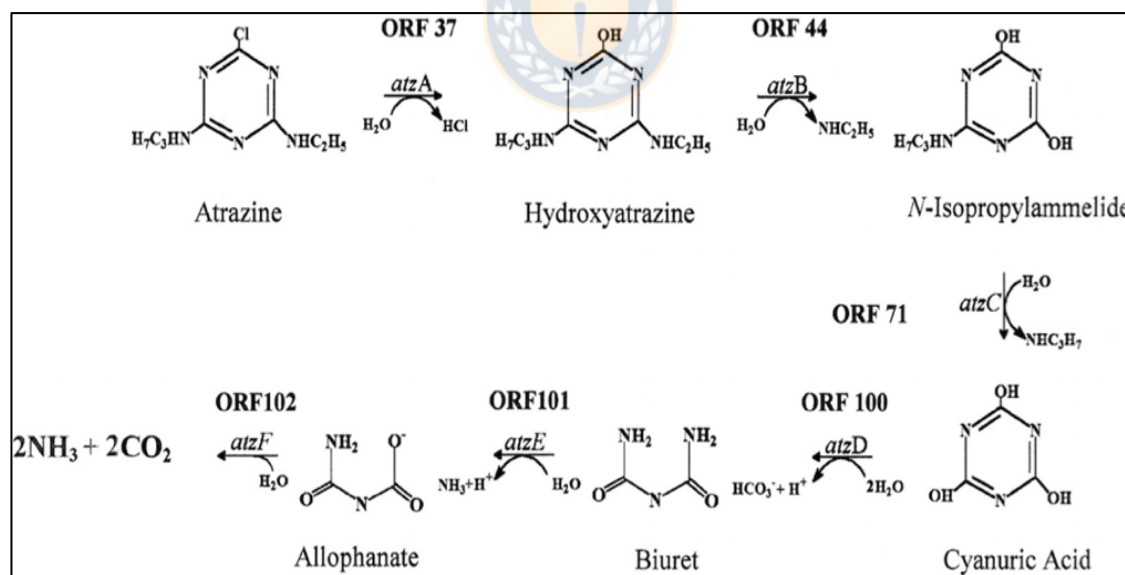


Figura 6. Ruta biodegradativa de atrazina descrita en *Pseudomonas* sp. ADP, junto con las enzimas que participan (Shiomi, 2013).

La vía degradativa inferior permite la transformación de ácido cianúrico a dióxido de carbono y amonio mediante tres enzimas codificadas en los genes *atzD*, *atzE* y *atzF* (De Souza et al., 1998; Govantes et al., 2009), la amidohidrolasa del ácido cianúrico, la hidrolasa biuret y la alofanato hidrolasa, respectivamente (Shiomi, 2013) (Fig. 6). Estas enzimas permiten la transformación del ácido cianúrico a biuret, el cual es luego transformado a alofanato y éste posteriormente transformado a dióxido de carbono y amonio (Strong et al., 2002; Cheng et al., 2005; Shapir et al., 2005; Kolic et al., 2007).

La cepa bacteriana *Pseudomonas* sp. ADP ha sido el microorganismo más utilizado para estudiar los genes y enzimas involucradas en la biodegradación bacteriana de atrazina (Sene et al., 2010; Martínez et al., 2001). Esta bacteria fue aislada por Mandelbaum et al. (1995), quien demostró la capacidad de esta bacteria para degradar completamente atrazina. Diversos estudios han demostrado que las primeras enzimas de la vía degradativa de atrazina son altamente específicas (De Souza et al., 1996; Seffernick et al., 2001). De hecho, AtzA cataliza la decoloración de atrazina, simazina, y desetilatrastina, pero no es activa en presencia de melamina, terbutilazina o desisopropilatrastina (De Souza et al., 1996; Seffernick et al., 2001). Boundy-Mills et al. (1997) estudiaron las secuencias de los genes *atzA* y *atzB* del plásmido pADP-1. Estos autores observaron que las secuencias de aminoácidos de las proteínas AtzA y AtzB no presentan homología significativa, pero las secuencias regulatorias río arriba de los genes presentan más de 600 nucleótidos idénticos. Esta homología es mayor a la esperada en elementos reguladores de genes que participan en la misma vía metabólica, lo que les permitió sugerir que en esta región ocurrió algún tipo de duplicación genética o inserción

(Boundy-Mills et al., 1997). Posteriormente, De Souza et al. (1998) publicaron que los genes que permiten la degradación de atrazina en *Pseudomonas* sp. ADP se encuentran en un elemento genético extracromosomal auto-transmisible, que fue denominado plásmido pADP-1 (Fig. 7). Esta molécula de ADN de 108kb es auto-transmisible mediante conjugación ya que posee los genes *tra* (De Souza et al., 1998; Seffernick et al., 2001; Martínez et al., 2001). Por su parte, Martínez et al. (2001) describieron la secuencia completa del plásmido pADP-1, demostrando la presencia de secuencias de inserción entre los genes que permiten la degradación de atrazina (Martínez et al., 2001).

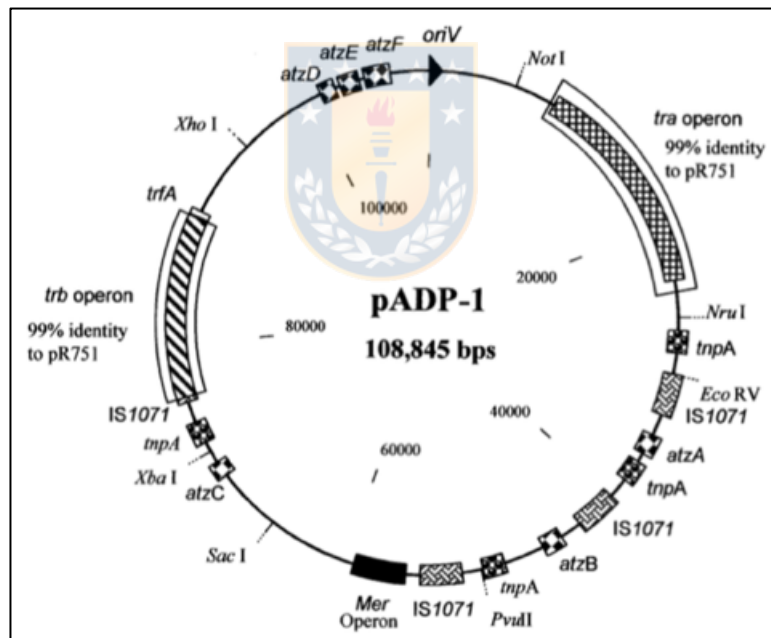


Figura 7. Mapa genético del plásmido pADP-1. Se indican las posiciones de sitios de restricción, genes y operones. Se indican los genes del catabolismo de atrazina *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* y *atzF* (Modificado desde Martínez et al., 2001).

### II.3 Movilización de genes degradativos entre bacterias

Los genes que codifican para las enzimas que permiten la metabolización bacteriana de compuestos orgánicos tóxicos suelen encontrarse en moléculas de ADN móviles como plásmidos (Cork & Khalil, 1995; Top et al., 2002; Díaz, 2004; Trefault et al., 2004). Éste hecho ha permitido que dichos genes puedan ser transferidos entre los microorganismos de la comunidad mediante transferencia horizontal de genes (THG) (Jain et al., 2002; Bathe et al., 2004). La THG junto con el fenómeno de mutación han contribuido a la diversificación genética y metabólica que conocemos actualmente en bacterias (Gogarten et al., 2002; De Souza et al., 2006). Éste intercambio de genes puede ocurrir inclusive entre organismos de distintas especies, sin que necesariamente compartan una cercanía filogenética (Dionisio et al., 2002; Newby & Pepper, 2002; Díaz, 2004).

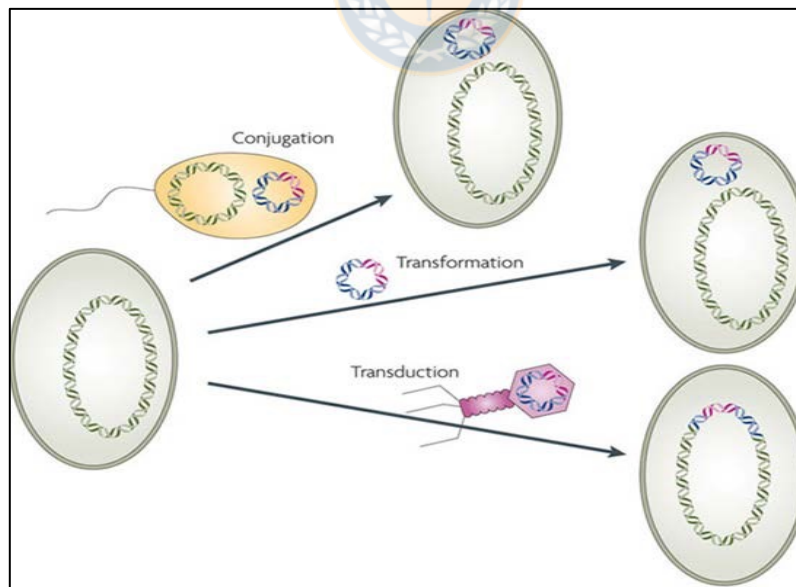


Figura 8. Principales mecanismos de transferencia horizontal de genes: conjugación, transformación y transducción (modificado desde Andersson & Hughes, 2010).

Los distintos mecanismos de THG son transducción, transformación y conjugación (Fig. 8) (Andersson & Hughes, 2010). La transformación corresponde a la captación de ADN libre desde el ambiente (Dubnau, 1999; Chen & Dubnau, 2004). Este proceso tiene los inconvenientes que el ADN se degrada fácilmente (Murray, 2000; Berndt et al., 2003) y además las bacterias poseen enzimas que reconocen ADN extraño (Lorenz et al., 1994; Hamilton & Dillard, 2006). La transducción permite la transferencia de ADN mediante bacteriófagos que actúan como vectores del ADN (Thomas & Nielsen, 2005). En este caso, existe gran especificidad entre los virus y las bacterias a las cuales infectan. Por esto, este mecanismo igualmente ocurre en baja frecuencia (Thomas & Nielsen, 2005).

La conjugación bacteriana es el principal mecanismo de transferencia horizontal de genes (Ochman et al., 2000; Wozniak & Waldor, 2010; Koraiman & Wagner, 2014). En este proceso la transferencia de ADN ocurre mediante un contacto directo entre células bacterianas, una dadora del material genético y una receptora de éste (Norman et al., 2009). Los sistemas de conjugación mas comunes son aquellos codificados por plásmidos auto-transferibles presentes en bacterias Gram negativas (Llosa et al., 2002; Zechner et al., 2013; Soucy et al., 2015). Estos plásmidos contienen los genes que permiten su transferencia por conjugación (tra) (Adamczyk & Jagura-Burdzy, 2003; Schlüter et al., 2007). Estos genes se dividen en dos grupos funcionales, los genes que codifican las proteínas que conforman el pili o sistema de secreción tipo IV (Christie et al., 2005; Sørensen et al., 2005; Grohmann et al., 2018) y los que codifican para las enzimas que realizan el procesamiento del ADN (Alvarez-Martinez & Christie, 2009; Smillie et al., 2010). El pili es una estructura proteica que sobresale de la superficie de la célula dadora y se une a la superficie

de la célula receptora permitiendo el contacto íntimo célula-célula (Fig. 9) (Anthony et al., 1994; Ishiwa & Komano, 2004). El conjunto de proteínas que procesan el ADN se conoce como relaxosoma, y se une al sitio  $oriT$ , corta una hebra del plásmido e inicia la conjugación luego de la unión entre células (Llosa et al., 2002; De la Cruz et al., 2010). En los plásmidos IncP, los genes que codifican las principales proteínas del relaxosoma se conocen como TraI, TraJ, TraK, TraL, TraM, TraN (Hamilton et al., 2000; Sem et al., 2010; Norberg et al., 2011).

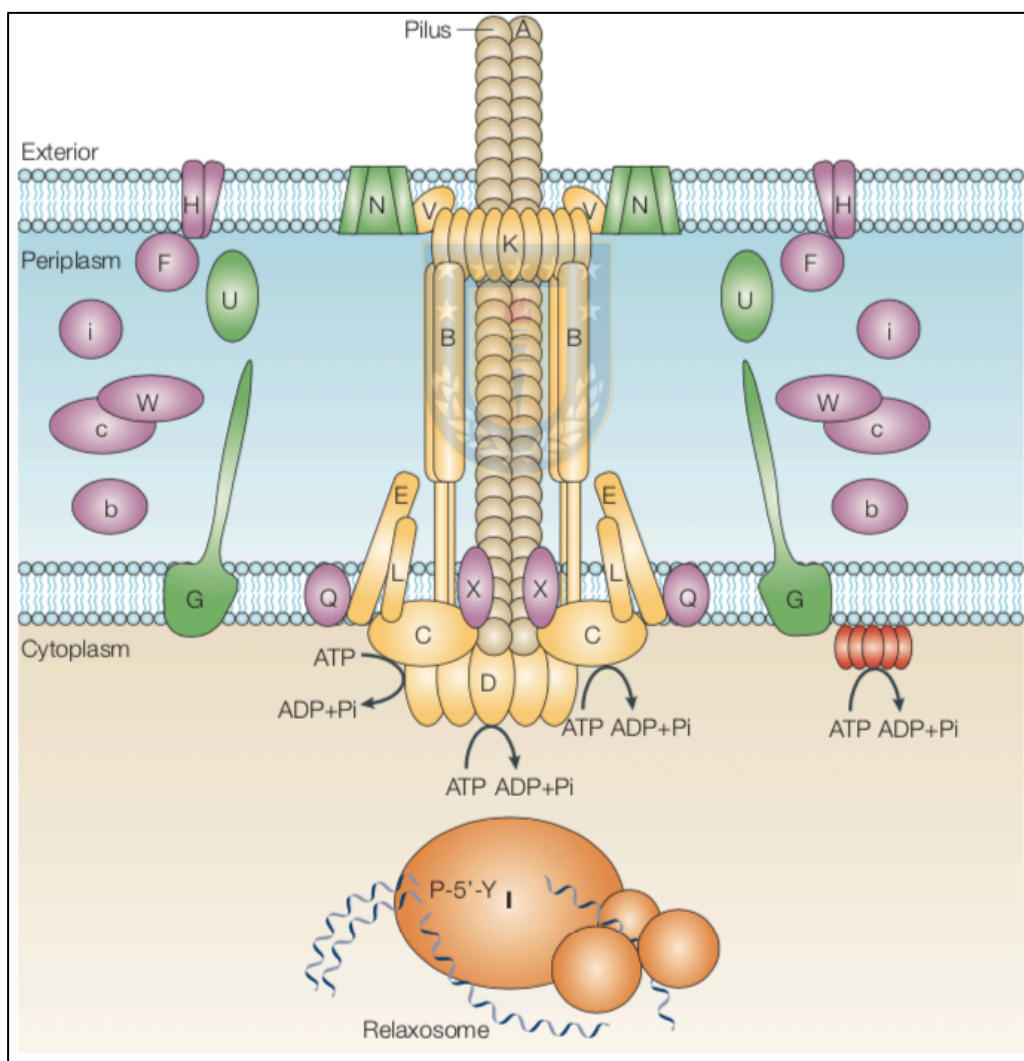


Figura 9. Proteínas del sistema de conjugación en bacterias Gram negativas (Frost et al., 2005).

La transferencia de ADN mediante conjugación depende de factores como la permisividad del receptor para incorporar y expresar el material genético, así como la presencia de incompatibilidad entre las distintas familias de plásmidos, ya que se ha descrito que en una célula bacteriana puede haber solo un tipo de plásmido de cada familia de incompatibilidad (Bahl et al. 2007; Sen et al., 2011). Además, existen factores ambientales que también pueden afectar la conjugación, como fluctuaciones en las condiciones fisicoquímicas del entorno, disponibilidad de sustratos o la presencia de compuestos tóxicos (Wang et al., 2014; Garbisu et al., 2017; Wang et al., 2018).

#### **II.4 Capacidad antimicrobiana de nanopartículas metálicas y potencial uso en agricultura.**

La nanotecnología ha sido utilizada en sectores tan diversos como medicina, producción de alimentos, industria textil, entre otros (Ingale & Chaudhari, 2013). Las nanopartículas presentan al menos una dimensión con tamaños entre 1-100  $\mu\text{m}$  (Jeevanandam et al., 2018). Se caracterizan por poseer una mayor razón superficie/volumen, lo cual les otorga propiedades fisicoquímicas distintas a los materiales de la misma composición, pero de mayor tamaño (Morones et al., 2005; Nel et al., 2006).

Durante los últimos años se ha reportado que ciertas nanopartículas metálicas presentan propiedades biocidas contra bacterias y hongos (Kim et al., 2007; Hajipour et al., 2012), por lo cual han sido utilizadas en el control de esos microorganismos, y recientemente han sido propuestas como herramienta para ser



utilizada en agricultura (Wang et al., 2010; Ramyadevi et al., 2012; Lemire et al., 2013; Sekhon, 2014). Sobre todo, si consideramos que el uso sostenido de plaguicidas ha llevado a la generación de resistencia, lo cual a su vez ha implicado un aumento en su uso (Wei et al., 2010; Usman et al., 2013; Parada et al., 2019).

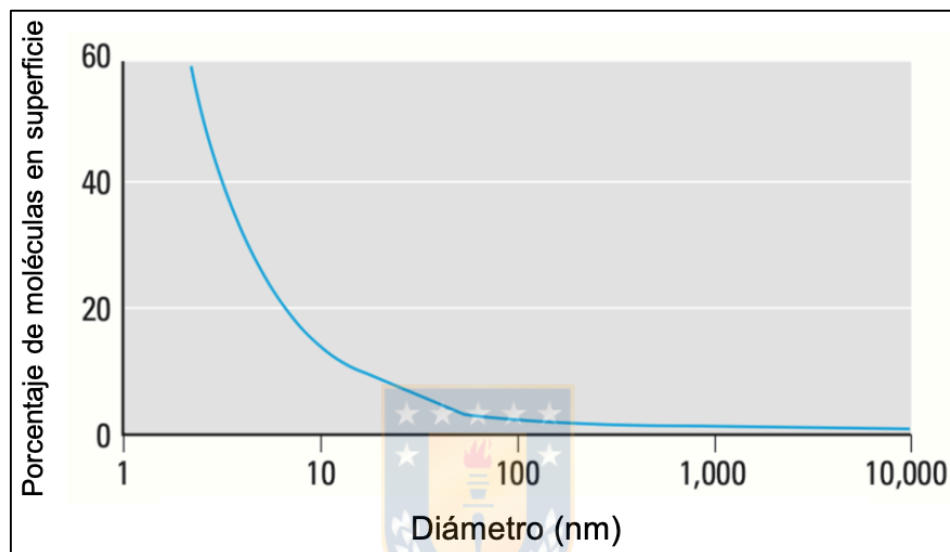


Figura 10. Relación inversa entre el tamaño de partícula y el número de moléculas de superficie (Oberdorster et al., 2005).

Se ha observado que la toxicidad de las nanopartículas metálicas sobre las células bacterianas depende de su composición, forma y tamaño, siendo las nanopartículas de menor tamaño las que presentan una mayor actividad respecto de las nanopartículas de mayor tamaño (Lok et al. 2007; Yoon et al., 2007; Chatterjee et al., 2012; Wang et al., 2016). En este sentido, Sondi & Salopek-Sonodi (2004) reportaron la actividad bactericida de nanopartículas de plata (AgNps) de entre 10 y 20 nm sobre la bacteria *Escherichia coli*, observando una concentración mínima

inhibitoria (CMI) de  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Al respecto, Yoon et al. (2007) evaluaron el efecto de AgNps y nanopartículas de cobre (CuNPs) de distintos tamaños sobre *E. coli* y *Bacillus subtilis*, observando una CMI de  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$  para las AgNps y de  $60 \mu\text{g ml}^{-1}$  para las CuNPs sobre ambas cepas bacterianas (Yoon et al., 2007).

Por su parte, Lok et al. (2007) evaluaron la oxidación que presentan las AgNps en solución, y el efecto que estas tienen sobre cepas de *E. coli* resistentes y no-resistentes a plata. Además, evaluaron el efecto del tamaño de estas nanopartículas. Sus resultados indican que las propiedades antibacterianas de AgNps se reducen en presencia de oxígeno, ya que las AgNps oxidadas presentan menor actividad antibacteriana. Además, evidenciaron la formación de iones  $\text{Ag}^+$  en la superficie de las nanopartículas, los cuales son tolerados sólo por las cepas resistentes a plata. Por otra parte, comprobaron que la actividad antibacteriana de las AgNps está relacionada con su tamaño, siendo las partículas más pequeñas las que presentan mayor actividad. Esto se debe a que el número de moléculas de superficie (expresado como % de las moléculas en la partícula) está inversamente relacionado con el tamaño de partícula (Oberdorster et al., 2005).

Se ha descrito que la exposición de *E. coli* a AgNps produce una acumulación en el citoplasma de precursores de proteínas de membrana externa como OmpA, OmpC, OmpF y OppA (Lok et al., 2006). Estos autores describen que la causa sería una disminución del potencial de membrana necesario para la síntesis ATP y por consiguiente una disminución en la energía para el desarrollo de procesos celulares como la translocación de proteínas de membrana externa causado por la acción de estas nanopartículas (Lok et al., 2006).

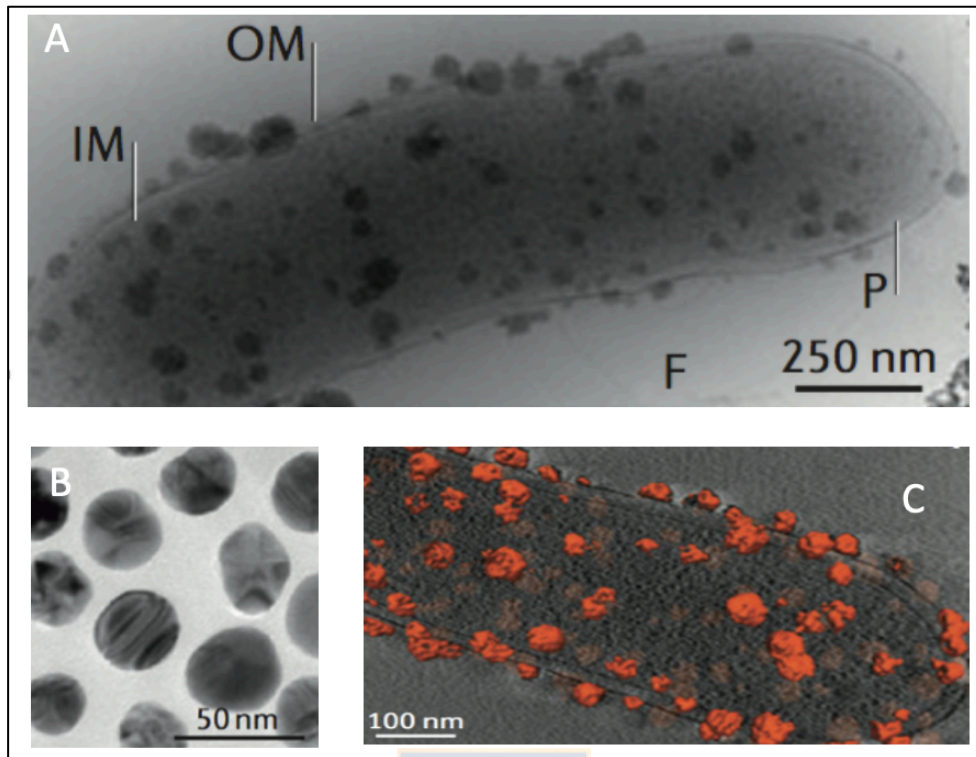


Figura 11. Nanopartículas metálicas en contacto con células bacterianas.

A: nanopartículas adheridas a la superficie de *E. coli*. (OM: membrana externa, IM: membrana interna, P: peptidoglicán, F: flagelo); B: nanopartículas de plata (AgNps) de 50 nm promedio observadas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM); C: esquema representativo de la adición de nanopartículas a la superficie bacteriana (Lemire et al., 2013).

Entre las nanopartículas metálicas en que se ha detectado y estudiado su capacidad antimicrobiana, las CuNPs presentan un menor costo de producción respecto de las AgNps (Rai & Bai, 2011; Theivasanthi & Alagar, 2011). Las CuNPs poseen un amplio espectro de acción biocida frente numerosas especies bacterianas de diferentes grupos taxonómicos como *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Xanthomonas axonopodis*, *Clavibacter michiganensis*, *Curtobacterium*

*flaccumfaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* (Sondi & Salopek-Sonodi, 2004; Yoon et al., 2007; Lok et al. 2007; Dinesh et al, 2012; Cioffi et al, 2005; Theivasanthi & Alagar, 2011).

Chatterjee et al. (2012) evaluaron el efecto de nanopartículas de cobre de 60-80 nm sobre *E. coli*, *B. subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Sus resultados indican que *E. coli* presenta una concentración mínima inhibitoria (CMI) de  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  y una concentración mínima bactericida (CMB) de  $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por su parte, *B. subtilis* presenta CMI de  $3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  y CMB de  $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que *S. aureus* presenta CMI de  $4.5 \mu\text{g mL}^{-1}$  y CMB de  $9,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Además, estos autores evidenciaron mediante microscopia electrónica un crecimiento filamentosos en células de *E. coli* y *B. subtilis* expuestas a nanopartículas de cobre en concentraciones subinhibitorias, lo cual sugiere posibles daños en el ADN o cambios en el metabolismo que llevan a divisiones incompletas de las células (Chatterjee et al., 2012).

## **II.5 Mecanismo de acción del cobre sobre las células bacterianas**

El cobre es un abundante elemento traza que se encuentra en una variedad de rocas y minerales (Flemming & Trevors, 1989). Es considerado un micronutriente esencial ya que es requerido para un amplio rango de procesos metabólicos en células procariontes y eucariontes (Flemming & Trevors, 1989). El cobre es un metal de transición que presenta tres estados de oxidación: ( $\text{Cu}^0$ , metal sólido), +1 [ $\text{Cu(I)}$ , ion cuproso] y +2 [ $\text{Cu(II)}$ , ion cúprico]. Además, el cobre es clasificado como metal pesado debido a que presenta una densidad mayor a  $5 \text{ g cm}^{-3}$  (Flemming & Trevors, 1989).

Para considerar el uso de las nanopartículas de cobre en agricultura es necesario establecer los efectos que produce su incorporación sobre la comunidad microbiana del suelo, ya que ésta es esencial para el desarrollo saludable de los cultivos. Si bien el mecanismo de acción de las nanopartículas metálicas sobre las células bacterianas aun no ha sido completamente definido, se ha descrito que inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) similar al efecto de las sales de cobre. Estos ROS posteriormente producen alteraciones en diversas componentes celulares como las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros (Nowack & Bucheli, 2007; Rai et al., 2009; Dizaj et al., 2014; Raffi et al., 2010). Además, se ha descrito que los átomos de cobre se pueden unir en ciertas enzimas deshidratasas disminuyendo su eficiencia e incluso bloqueando su funcionalidad (Macomber & Imlay, 2009).

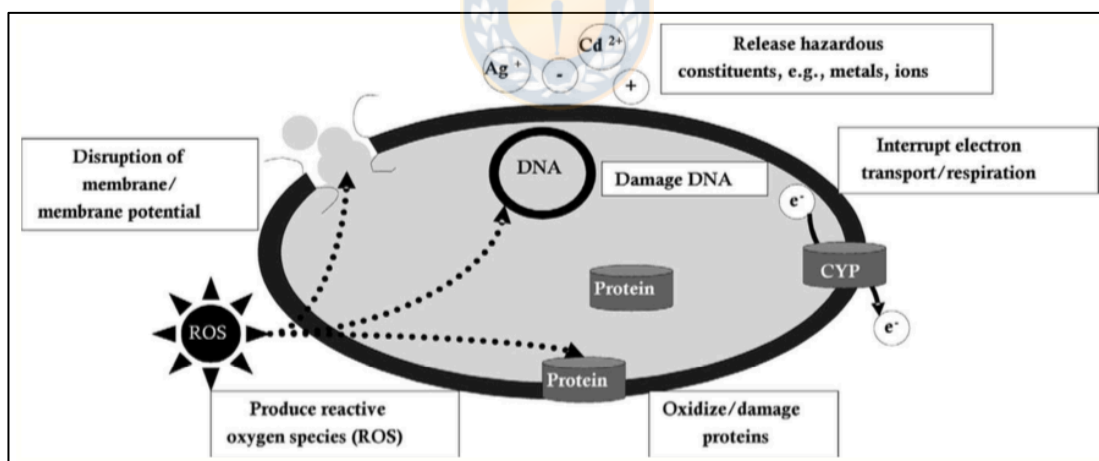


Figura 12. Posibles mecanismos de toxicidad de nanomateriales sobre bacterias. Diferentes nanomateriales pueden causar toxicidad mediante uno o mas de estos mecanismos (Klaine et al., 2008).

Debido al tamaño de las nanopartículas estas presentan una menor capacidad de ingresar al citoplasma de las células respecto de las sales, por lo que interactúan

principalmente con los componentes que rodean las células como la pared y las membranas (Fig. 8). Esto genera alteraciones en las proteínas y lípidos de dichos componentes y una consiguiente disminución de la permeabilidad celular o en algunos casos interrumpir el transporte de electrones (Klaine et al., 2008; Neal et al., 2008; Ramyadevi et al., 2012). Asimismo, los iones que son liberados desde las nanopartículas pueden tener efectos tóxicos en componentes internos de las células bacterianas de la misma manera que los iones o indirectamente las ROS (Klaine et al., 2008; Rizwan et al., 2017).

## **II. 6 Posibles efectos del cobre sobre la conjugación bacteriana**

Aunque el cobre es un micronutriente esencial para muchas funciones biológicas, puede ser tóxico cuando se encuentra disponible en altas concentraciones (Svenningsen et al., 2017). En suelos agrícolas se puede acumular debido al uso de abonos contaminados (Mantovi et al., 2003; Svenningsen et al., 2017) o caldo bordelés que contiene sulfato de cobre. Sin embargo, es insuficiente la información que existe de los efectos de este metal en la conjugación bacteriana, ya que es sabido que diversos compuestos pueden afectar dicho proceso (Wang et al., 2014; Garbisu et al., 2017; Wang et al., 2018; Lu et al., 2018; Zhang et al., 2018). En este sentido, Klümper et al., (2017) reportaron que la conjugación es modulada en presencia de sulfato de cobre a concentraciones subhinibitorias, y recientemente, Zhang et al., (2019) reportaron que la transferencia por conjugación de genes de resistencia antibacteriana sería promovida por la presencia de Nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) y sulfato de cobre.

Si bien las nanopartículas no pueden difundir a través de la pared bacteriana intacta, se ha descrito su acumulación en el citoplasma de células permeabilizadas (Sondi & Salopek-Sonodi, 2004; Lok et al., 2007). El contacto entre las nanopartículas metálicas y la superficie bacteriana es controlado por fuerzas electrostáticas, las cuales pueden ser atractivas o repulsivas dependiendo de las cargas de las nanopartículas y de las células bacterianas (Chatterjee et al., 2014). Se ha descrito que una vez que se produce la unión de las CuNps a la célula, se generan especies reactivas de oxígeno que causan daño celular (Rizwan et al., 2017). Sin embargo, aún es insuficiente el conocimiento que se tiene de esta temática para poder determinar los posibles efectos de las nanopartículas de cobre sobre la conjugación bacteriana y así comprender de mejor manera los procesos de transferencia horizontal de genes en las comunidades que potencian las capacidades autodepurativas del ambiente.



### III. HIPÓTESIS

Considerando que se ha reportado que nanopartículas o sales de cobre afectan estructuras bacterianas de la pared, las nanopartículas de cobre han mostrado ser más tóxicas que el cobre en otras formas y recientemente se ha reportado algunos efectos del cobre en la transferencia de genes mediante conjugación bacteriana,

se postula que:

El cobre a la forma de nanopartículas o sal a concentraciones subinibitorias disminuiría la frecuencia de conjugación de plásmidos catabólicos que permiten la biodegradación de plaguicidas.





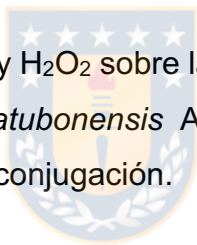
## IV. OBJETIVOS

### Objetivo general

Establecer el efecto de las nanopartículas y sal de cobre sobre la transferencia de plásmidos catabólicos mediante conjugación bacteriana.

### Objetivos específicos

1. Determinar si las nanopartículas de cobre y el sulfato de cobre en concentraciones subinibitorias modifican la frecuencia de conjugación de plásmidos catabólicos pJP4 y pADP-1.
2. Determinar el efecto de  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la transferencia por conjugación del plásmido pRO101 desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT2440 y la expresión del gen *traK* durante la conjugación.



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción (Concepción, Chile).

### Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en ese estudio se presentan en la Tabla 1. Para ensayos de conjugación se utilizaron como cepas dadoras *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 y *Pseudomonas* sp. ADP (DSMZ 11735). *C. pinatubonensis* metaboliza diversos plaguicidas aromáticos debido a la presencia del PCC pJP4 (Don & Pemberton, 1981), mientras que *Pseudomonas* sp. ADP metaboliza atrazina (Mandelbaum et al., 1995) debido a que posee el PCC pADP-1. Ambos PCC pertenecen a la familia de incompatibilidad IncP y contienen los genes (*mer*) que otorgan resistencia a mercurio (Martínez et al., 2001). También se utilizó en ensayos de conjugación la cepa dadora *C. pinatubonensis* AEO106 (pRO101). Esta deriva de la cepa *C. pinatubonensis* JMP134 ya que el plásmido pRO101 es idéntico al plásmido pJP4 con un inserto que otorga resistencia a tetraciclina (Tc) (Harker et al., 1989).

Como cepas receptoras de los plásmidos mediante conjugación se utilizaron las cepas bacterianas *Pseudomonas putida* KT2440 (Franklin et al., 1981) y *Pseudomonas* sp. RG8 (Barros et al., 2013). *P. putida* KT2440 es un bacilo Gram negativo no fermentador que se encuentra de forma natural en el ambiente del suelo y cuerpos de agua. Esta cepa ha sido manipulada genéticamente para eliminar su

sistema de restricción y de esta forma pueda recibir genes mediante transferencia horizontal (Franklin et al., 1981; Nelson et al., 2002). *Pseudomonas* sp. RG8 es una bacteria psicrófila aislada desde un ambiente de agua dulce ubicado en la Patagonia de Chile (rio Grey, Parque Nacional Torres del Paine 51°10' S; 72°57' W), que fue utilizada debido a que se ha demostrado su capacidad para recibir y expresar el plásmido pJP4.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio y algunas de sus propiedades relacionadas a la investigación.

Cepa bacteriana	Plásmido	Genes plasmidiales	Referencia
<i>C. pinatubonensis</i> JMP134 (D)	pJP4	<i>tfd</i> y <i>mer</i>	Don and Pemberton, 1981
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP (D)	pADP-1	<i>atz</i> y <i>mer</i>	De Souza et al., 1998
<i>C. pinatubonensis</i> AEO106 (D)	pRO101	<i>tfd</i> , <i>mer</i> y Tc <sup>r</sup>	Harker et al., 1989
<i>P. putida</i> KT2440 (R)	-	Rif <sup>r</sup> , Kn <sup>r</sup>	Franklin et al., 1981
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8 (R)	-	Rif <sup>r</sup>	Barros et al., 2013

*tfd*: genes que permiten degradar 2,4-D; *atz*: genes que permiten degradar atrazina; *mer*: genes que permiten resistir al mercurio; Rif<sup>r</sup>: resistencia a rifampicina; Tc<sup>r</sup>: resistencia a tetraciclina; Kn<sup>r</sup> resistencia a kanamicina.

## **Plaguicidas**

El ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) de calidad analítica (99% pureza) fue obtenido desde Sigma Aldrich (St. Louis, USA), mientras que la atrazina de calidad analítica (99% pureza) fue obtenida desde Chem Service (West Chester, USA). Para la preparación de los estándares se utilizó NaOH 1N como solvente para 2,4-D, mientras que para atrazina se utilizó metanol al 100% como solvente. Ambos estándares fueron almacenados a 4°C en oscuridad. El stock de 2,4-D fue preparado a 2000 ppm ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), mientras que el de atrazina a 500 ppm ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

## **Nanopartículas de cobre**

Las nanopartículas de cobre (tamaño nominal 40–60nm,  $\geq 99.5\%$  pureza) fueron obtenidas desde Sigma Aldrich (St. Louis, USA) y resuspendidas en agua Milli-Q (5 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) y almacenadas en oscuridad a 4 °C. Previo a cada uso fueron ultrasonificadas (250 W, 40 kHz) para prevenir su aglomeración (Kaweeteerawat et al., 2015).

## **Medios de cultivo**

Todas las cepas bacterianas fueron rutinariamente cultivadas en caldo LB a 30 °C en agitación constante (120 rpm) durante 24 h en matraces Erlenmeyer.

El medio salino (MSM) (Aranda et al., 2003) fue preparado en agua destilada estéril adicionando ( $\text{g L}^{-1}$ ): 0.715  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.365  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 0.1  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ . Además, fue suplementado con 0,5% (vol/vol) de una solución de elementos traza y 1% (vol/vol) de una solución de vitaminas. La solución de elementos traza contiene

(mg L<sup>-1</sup>): Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O 880, FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 200, ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 10, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10, CoSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 10, CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O 10, MnSO<sub>4</sub> x 1H<sub>2</sub>O 4, Ni(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O 4, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 3, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O 2 y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 N, preparada en agua destilada y posteriormente esterilizada por autoclave. La solución de vitaminas contiene (mg L<sup>-1</sup>): ácido p- aminobenzoico 5, biotina 2, ácido fólico 2, piridoxina hidrocloreuro 1, riboflavina 5, tiamina 5, ácido nicotínico 5, ácido pantoténico 6 y vitamina B12 0,1, preparada en agua destilada y posteriormente esterilizada por filtración con filtros de nitrocelulosa de 0,2 µm de poro (Aranda et al., 2003).



**V.1 Objetivo 1. Determinar si las nanopartículas de cobre y el sulfato de cobre en concentraciones subinibitorias modifican la frecuencia de conjugación de plásmidos catabólicos pJP4 y pADP-1.**

### **Caracterización de las nanopartículas de cobre (CuNPs)**

La caracterización de las nanopartículas fue realizada mediante microscopía electrónica de barrido con detector de rayos X (SEM-EDS), microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de la luz (DLS) y difracción de rayos X (XRD). La observación SEM-EDS fue realizada con el microscopio JSM-6380 (Jeol; Tokio, Japón) y para el TEM se utilizó el microscopio JEOL-JEM 1200 EX II (Jeol Ltd., Tokio, Japón). Ambas técnicas permitieron determinar la morfología y el tamaño de las nanopartículas, y además el detector de rayos X permitió determinar su pureza. Mediante DLS (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments; Malvern, Worcestershire, UK) se comprobó el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas y mediante difracción de rayos X (XRD) (Bruker D8 advance diffractometer, Cu K $\alpha$ , 40 kV and 40 mA, Billerica, Massachusetts, USA) se estableció su composición química.

La liberación de iones desde las nanopartículas en medio líquido fue cuantificada mediante espectrofotometría de absorción atómica (AAS) utilizando el SensAA (GBC; Melbourne, Australia). Para esto, caldo LB y MSM fueron suplementados con CuNPs (10 o 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubados a 30 °C en agitación constante (120 rpm). Alícuotas desde cada muestra fueron obtenidas a 0.5, 3 and 6 h. Los controles fueron preparados sin adicionar CuNPs. MSM es un medio de cultivo libre de cobre

que contiene ( $\text{mg mL}^{-1}$ ):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.715,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.365,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 (Aranda et al., 2003). Este medio fue preparado utilizando agua Milli-Q y luego esterilizado mediante autoclave y almacenado a 4 °C.

### **Evaluación de la capacidad bacteriana para degradar los plaguicidas 2,4-D o atrazina como única fuente de carbono o nitrógeno.**

Se comprobó la capacidad degradativa de las cepas dadoras, receptoras y transconjugantes (10 cepas obtenidas al azar por cada par conjugante) sobre los plaguicidas 2,4-D y atrazina. La determinación fue realizada en caldo MSM suplementado con 2,4-D como única fuente de carbono o atrazina como única fuente de nitrógeno. Como controles negativos se utilizaron preparaciones sin la adición de bacterias (controles abióticos). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Las cepas bacterianas fueron cultivadas rutinariamente a 30 °C en caldo LB durante 24 h en agitación constante (120 rpm). Alícuotas fueron centrifugadas (10000 g 5 min) y el pellet fue resuspendido con MSM estéril para obtener una densidad celular de  $1 \times 10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Estos cultivos fueron suplementados con cada plaguicida (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubados a 30 °C durante 48 h en agitación constante (120 rpm). Alícuotas de 2 ml de cada muestra se traspasaron a tubos Eppendorf estériles, los cuales fueron centrifugados durante 1 min a 10.000 g. Los sobrenadantes fueron filtrados con membranas PTFE de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Millipore, USA) y posteriormente analizados por espectroscopía entre los 200 y los 350 nm (UV-vis TU-1810, Beijing Purkinje) para comparar los perfiles de absorbancia de los

tratamientos con el control y de esta forma evidenciar la posible pérdida de aromaticidad indicativo de la degradación de los plaguicidas.

Además, los sobrenadantes fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en el cromatógrafo Merck Hitachi L-2130 equipado con una bomba de Rheodyne 7725, un inyector de 20  $\mu\text{L}$  y un detector de red de diodos Merck Hitachi L-2455. La separación fue realizada con una columna C18 (Chromolit RP- 8e, 4.6  $\times$  100 mm). Como eluyente A se utilizó ácido fosfórico (0.1%) y como eluyente B, acetonitrilo a 25/75% y 50/50% para atrazina y 2,4-D, respectivamente. La tasa de flujo fue de 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ , con 0–10 min en un modo isocrático. La temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C. Para la adquisición de datos el detector fue configurado a 222 nm para atrazina y 228 nm para 2,4-D. La calibración del equipo y la posterior cuantificación fue realizada utilizando como referencia stocks puros de cada pesticida a diferentes concentraciones (0.1–10 mg  $\text{L}^{-1}$ ).

### **Detección de genes degradativos mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Como ADN templado, se utilizó el material genético de las cepas bacterianas purificado con el kit comercial Ultra clean microbial DNA Isolation kit® (MoBio, CA, EE.UU) de acuerdo a los protocolos del fabricante. La detección de los genes degradativos fue realizada utilizando el kit comercial Sapphire® Fast PCR Máster Mix kit (Takara Bio Inc., Japón) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los programas fueron realizados en el termociclador MyGene MG 25+ (ImaGene Labs Inc., USA).



Tabla 2. Partidores utilizados para la detección mediante PCR de los genes involucrados en la degradación bacteriana de atrazina y 2,4-D.

Gen	Secuencia del partidor
<i>tfdB</i>	5'-GCTGACGGCGTGTCGTCGCG-3'
	5'-GATGGACGATGCGCGACGTA-3'
<i>atzB</i>	5'-TCACCGGGGATGTCGCGGGC-3'
	5'-CTCTCCCGCATG GCATCGGG-3'

Se utilizaron los partidores descritos por Neilson et al. (1992) que permiten detectar un fragmento de 205 pb del gen *tfdB* (Tabla 2). Su presencia es indicativa de la presencia del plásmido pJP4. Mientras que, en el caso de atrazina, se utilizaron los partidores descritos por De Souza et al. (1998), los cuales permiten detectar un fragmento de 500 pb del gen *atzB* (Tabla 2), lo cual es indicativo de la presencia del plásmido pADP-1.

Para detectar la presencia de amplicones, los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Dichos geles fueron teñidos con GelRed (Biotium, Hayward, CA) y luego visualizados en un transiluminador de luz azul LED y registrados fotográficamente.

### **Viabilidad de las cepas bacterianas dadoras *C. pinatubonensis* JMP134 y *Pseudomonas* ADP y receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* RG8 frente a CuNPs y CuSO<sub>4</sub>**

Se utilizaron cultivos puros de cada cepa incubada previamente en caldo LB durante 24 h a 30 °C con agitación constante (120 rpm). Se prepararon cultivos en matraces Erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de caldo LB a densidad celular final de 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Estos cultivos fueron suplementados con CuNPs o CuSO<sub>4</sub> (10, 20, 50, 100, 200, 400 o 500 µg Cu mL<sup>-1</sup> por triplicado). Posteriormente los cultivos fueron incubados a 30 °C en agitación constante (120 rpm) durante 24 h para detectar crecimiento bacteriano mediante turbidez visible y densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>).


Además, luego de 24 h de incubación se evaluó el recuento viable de las cepas bacterianas inoculando volúmenes de 0.02 mL en placas con agar LB. Las placas fueron incubadas durante 24 h a 30 °C para realizar el recuento de colonias. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **Concentración mínima inhibitoria (CMI) de HgCl<sub>2</sub> y Rifampicina para las cepas dadoras *C. pinatubonensis* JMP134 y *Pseudomonas* sp. ADP y las cepas receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. RG8**

Considerando que los plásmidos pJP4 de *C. pinatubonensis* JMP134 y pADP-1 de *Pseudomonas* sp. ADP poseen los genes que otorgan la capacidad para resistir a mercurio (genes *mer*), se utilizó cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) para la selección de las cepas transconjugantes en los posteriores ensayos de conjugación. Por otra parte, se seleccionaron cepas mutantes resistentes al antibiótico rifampicina (Rif) de

ambas cepas receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. RG8, para utilizar este compuesto como agente selectivo junto con HgCl<sub>2</sub> en la selección de cepas transconjugantes en los posteriores ensayos de conjugación.

Para esto, se determinó el nivel de resistencia de ambas cepas dadoras y el nivel de susceptibilidad de ambas cepas receptoras frente a HgCl<sub>2</sub> y Rif. Para esto se utilizaron cultivos puros de cada cepa previamente incubada en caldo LB durante 24 h a 30 °C con agitación constante (120 rpm). Estos cultivos fueron expuestos a concentraciones crecientes de HgCl<sub>2</sub> o Rif (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 o 256 µg mL<sup>-1</sup> por triplicado) inoculados a una densidad celular de 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> e incubados a 30 °C en agitación constante (120 rpm). Luego de 24 h de incubación, se evaluó el crecimiento bacteriano mediante turbidez visible y densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>)



**Efecto de CuNPs sobre la conjugación entre las cepas dadoras *C. pinatubonensis* JMP134 (pJP4) y *Pseudomonas* sp. ADP (pADP-1) y las cepas receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. RG8**

Los ensayos de conjugación fueron realizados en medio líquido e incubados 6 h a 30 °C. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Para esto, se utilizaron como cepas dadoras *C. pinatubonensis* JMP134 (pJP4) y *Pseudomonas* sp. ADP (pADP-1) y como cepas receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. RG8. Estas cepas fueron cultivadas en caldo LB 24 h a 30 °C (120 rpm) y luego se mezclaron en proporción 1:9 (4.5 mL dadora + 0.5 mL receptora) (Schenzle et al. 1997) en 10 ml de caldo LB. Estos cultivos fueron suplementados con CuNPs a concentraciones subinibitorias según lo determinado en el ensayo de CMI (0, 10,

20, 50 o 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) o  $\text{CuSO}_4$  como control en las mismas concentraciones, y luego incubados durante 6 h a 30 °C sin agitación

Para seleccionar las cepas transconjugantes desde la mezcla se diseminaron 0.1 mL en placas con agar LB suplementados con los agentes selectivos ( $\text{HgCl}_2$  a 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y Rif a 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) y se incubaron durante 48 h a 30 °C. Además, alícuotas de 0.1 mL fueron diseminadas en agar LB suplementado sólo con rifampicina (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para seleccionar tanto las cepas transconjugantes como las cepas receptoras. La frecuencia de conjugación (FC) fue determinada mediante la razón entre el recuento viable de cepas transconjugantes respecto del recuento viable de cepas receptoras (Gasson y Davies, 1980). Los resultados obtenidos fueron analizados y comparados utilizando el test estadístico Tukey ( $p \leq 0.05$ ) mediante el programa SPSS (SPSS Inc., trial version) ( $n = 3$ ).

Además, para evaluar el efecto de la cantidad de materia orgánica sobre la conjugación, se realizaron ensayos en caldo LB diluido (25%, 50% and 75%) y MSM utilizando el par conjugante *C. pinatubonensis* JMP134 (pJP4) y *P. putida* KT2440.

**V.2 Objetivo 2. Determinar el efecto de CuSO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la transferencia por conjugación del plásmido pRO101 desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT2440 y la expresión del gen *traK* durante la conjugación.**

**Concentración mínima inhibitoria a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y CuSO<sub>4</sub> de las cepas *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida* KT2440**

Se evaluó la CMI de las cepas bacterianas *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida* KT2440. Para esto, las cepas se cultivaron en caldo LB durante 24 h a 30 °C con agitación constante (120 rpm). Desde estos cultivos se prepararon diluciones para obtener una densidad celular de 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> los que fueron expuestos a concentraciones crecientes de CuSO<sub>4</sub> (0.25, 0.5, 1, 2, 4 o 8 Cu M) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5, 1, 2, 4 o 8 mM) e incubados a 30 °C en agitación constante (120 rpm) durante 24 h para detectar crecimiento mediante turbidez y densidad óptica a 600 nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

**Efecto de CuSO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el recuento viable de *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida* KT2440**

Se determinó el efecto del CuSO<sub>4</sub> y del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la viabilidad de las cepas bacterianas *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida* KT2440. Para esto, se cultivaron las cepas en caldo LB durante 24 h a 30 °C con agitación constante (120 rpm). Alícuotas de estos cultivos fueron diluidos para obtener una densidad celular de 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, se suplementaron con CuSO<sub>4</sub> (0.3, 0.8, 1.6, 3.9 o 7.9 Cu M) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 o 5 mM) y se incubaron a 30 °C en agitación constante (120 rpm).

Muestras de estos cultivos fueron diluidas en caldo LB y sembradas (20  $\mu$ L) en placas con agar LB luego de 5, 10, 20 y 30 min de incubación. Estas placas fueron incubadas durante 24 h a 30 °C para realizar el recuento de colonias. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **Concentración mínima inhibitoria de Tetraciclina y Kanamicina para *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida* KT2440**

La cepa *C. pinatubonensis* AEO106 posee el plásmido pRO101, el cual contiene un gen que otorga resistencia al antibiótico Tetraciclina (Tc) (Harker et al., 1989). Por esto, se utilizó este compuesto para seleccionar cepas transconjugantes que adquieren el plásmido pRO101. Por otra parte, la cepa receptora *P. putida* KT2440 es resistente al antibiótico kanamicina (Kn), el cual también fue utilizado para la selección de cepas transconjugantes en los ensayos de conjugación

Se evaluó la CMI de tetraciclina y kanamicina que inhibe el desarrollo de la cepa dadora *C. pinatubonensis* AEO106 y de la cepa receptora *P. putida* KT2440. Para esto, cultivos de cada cepa fueron incubados en caldo LB durante 24 h a 30 °C con agitación constante (120 rpm) y luego diluidos para obtener una densidad celular de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. Posteriormente estos cultivos fueron expuestos a concentraciones crecientes de Tc o Kn (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 o 256  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) e incubados a 30 °C en agitación constante (120 rpm) durante 24 h para detectar crecimiento mediante turbidez y densidad óptica a 600 nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

## **Efecto de CuSO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la conjugación del plásmido pRO101 desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT2440 en caldo LB**

Los ensayos de conjugación fueron realizados por triplicado en caldo LB a 30 °C sin agitación. Para esto, tubos Eppendorf de 2 mL que contenían 1 mL de caldo LB estéril fueron inoculados con las cepas dadora y receptora en proporción de 1:9, adicionando 50 µL de la cepa dadora *C. pinatubonensis* AEO106 junto con 450 µL de la cepa receptora *P. putida* KT2440 (Schenzle et al., 1997) previamente cultivadas en caldo LB durante 24 h a 30 °C (120 rpm). Los cultivos fueron suplementados con CuSO<sub>4</sub> a 0.3, 0.8, 1.6, 3.9 o 7.9 µM o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 o 5 mM e incubados a 30 °C sin agitación. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Posteriormente, se tomaron alícuotas de 0.1 mL a diferentes tiempos (5, 10, 20 y 30 min), las cuales fueron sembradas por diseminación en placas con agar LB suplementadas con Tc (25 µg mL<sup>-1</sup>) y Kn (50 µg mL<sup>-1</sup>) para seleccionar las cepas transconjugantes. Alícuotas de 0.1 mL fueron sembradas por diseminación en placas con agar LB suplementadas con Tc (25 µg mL<sup>-1</sup>) para cuantificar las cepas transconjugantes y las cepas receptoras. Luego de 24 h de incubación a 30 °C, se realizó el recuento de colonias y se estimó la frecuencia de conjugación mediante la razón entre el recuento viable de cepas transconjugantes/receptoras (Gasson y Davies, 1980). Los resultados fueron analizados mediante el test Tukey ( $p \leq 0.05$ ) utilizando el software SPSS (SPSS Inc., trial version) (n = 3).

## **Evaluación de la capacidad degradativa de las cepas transconjugantes portadoras del plásmido pRO101**

Se determinó la capacidad para degradar el plaguicida 2,4-D en 4 cepas transconjugantes portadoras del plásmido pRO101 obtenidas mediante conjugación desde la cepa dadora *C. pinatubonensis* AEO106 a la cepa receptora *P. putida* KT2440. La determinación fue realizada en MSM suplementado con 2,4-D como única fuente de carbono. Como controles negativos se utilizó cultivos sin la adición de bacterias (abiótico). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Para esto, las cepas fueron cultivadas en caldo LB a 30 °C por 24 h en agitación constante (120 rpm). Alícuotas fueron centrifugadas (10000 g 5 min) y el pellet fue resuspendido con MSM estéril para obtener una densidad celular de  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. Estos cultivos fueron suplementados con 2,4-D ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e incubados a 30 °C durante 48 h. Alícuotas de 2 ml se traspasaron a tubos Eppendorf estériles y fueron centrifugados 1 min a 10.000 g. Los sobrenadantes fueron filtrados con membranas PTFE de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Millipore, USA) y luego analizados por espectroscopía entre los 200 y los 350 nm (UV-vis TU-1810) para comparar los perfiles de absorbancia de los tratamientos con el control y de esta forma evidenciar la posible pérdida de aromaticidad indicativo de la degradación del plaguicida.



## **Detección del gen *tfdB* en las cepas transconjugantes portadoras del plásmido pRO101 mediante PCR**

Se utilizaron los partidores descritos en la Tabla 2 para detectar la presencia del gen *tfdB*, indicativo de la presencia del plásmido pRO101, en las cepas transconjugantes. Para esto, se purificó el ADN de 4 cepas transconjugantes luego de ser cultivadas 24 h en caldo LB a 30 °C en agitación constante (120 rpm) utilizando el kit Ultra clean microbial DNA Isolation kit ® (MoBio, CA, EE.UU) de acuerdo a los protocolos del fabricante. La PCR fue realizada con el kit Sapphire® Fast PCR Master Mix kit (Takara Bio Inc, Japón) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante en el termociclador MyGene MG 25+ (ImaGene Labs Inc., USA). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA). El gel luego fue visualizado en un transiluminador de luz azul LED y registrado fotográficamente.

## **Diseño de partidores para evaluar la expresión del gen *traK* por RTqPCR**

Para esto se utilizó la secuencia del gen disponible en GenBank (AY365053.1) junto con el software primer3plus (Primer3 v. 0.4.0). Los partidores diseñados (GGCTATGCGATGAAAACGAT y GTGAAGCGGTACATCAAGGC) permiten amplificar un fragmento de 101 pb del gen.

El programa de PCR utilizado corresponde a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 20 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 45 s. Posteriormente se realizó un análisis de curva de fusión para evaluar la eficiencia y especificidad de los partidores con el programa de PCR descrito.

## Curva de estandarización de qPCR

Se realizó una curva de estandarización para calcular el número absoluto de copias de ARNm del gen *traK* mediante qPCR. Para esto, se clonó el producto de PCR de 101 pb en el vector pGEM (3000 pb) del kit comercial pGEM®-T Vector System (Promega Corp. Wisconsin USA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Posteriormente el vector fue insertado mediante transformación por electroporación en cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  electro competentes (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts USA). Las cepas portadoras del plásmido fueron seleccionadas en placas con agar LB suplementado con ampicilina (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), IPTG (0.5 mM) y X-Gal (80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Posteriormente, las cepas fueron cultivadas en caldo LB durante 24 h a 30 °C en agitación (120 rpm) y se purificó el ADN plasmídico mediante el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps (Promega Corp. Wisconsin USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El ADN cuantificado mediante espectrofotometría 260/280 nm y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Para esto, se preparó el gel, se tiñó con GelRed Nucleic Acid Gel Stain™ (Biotium, Hayward, CA) y se visualizó en un transiluminador de luz azul LED para ser registrado fotográficamente.

Posteriormente, se prepararon 5 diluciones decrecientes del vector en la razón 1/10 con agua Milli-Q libre de nucleasas por duplicado, y se realizó la qPCR utilizando como templado dichas diluciones. El análisis de resultados permitió establecer la eficiencia del sistema de amplificación y determinar la curva de estandarización con su respectiva ecuación de la recta, la cual permitió posteriormente obtener el número de copias absolutas de ARNm en las muestras.

### **Determinación de la expresión del gen *traK* mediante RT-qPCR en ensayos de conjugación entre *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida* KT2440 en presencia de CuSO<sub>4</sub>**

La expresión del gen *traK* fue determinada en mezclas bacterianas de la cepa dadora *C. pinatubonensis* AEO106 y la cepa receptora *P. putida* KT2440 según lo descrito en los ensayos de conjugación en presencia de CuSO<sub>4</sub> a 0.3, 0.8, 1.6 o 3.9 Cu M. Luego de 30 min de incubación, se realizó la extracción de ARN desde alícuotas de 1 mL utilizando el kit NucleoSpin® RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, Düren Germany) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN complementario (ADNc) fue obtenido a partir del ARN utilizando el kit comercial ProtoScript® Taq RT-PCR Kit (New England Biolabs Inc., Massachusetts USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Además, se purificó el ADN del control en ausencia de cobre luego de 30 min de incubación utilizando el kit Ultra clean microbial DNA Isolation kit® (MoBio, CA, EE.UU) de acuerdo a los protocolos del fabricante.

Por último, las qPCR fueron realizadas utilizando el kit comercial Brilliant II SYBR® Green QPCR Máster Mix (Agilent Technologies Inc. California USA) según las recomendaciones del fabricante, utilizando como templado el ADNc obtenido en el paso anterior. Los números de copias del gen fueron calculados relacionando los valores C<sub>t</sub> en la curva de estandarización. Los números de copias de ADNc fueron convertidos en equivalentes de ARNm y la expresión del gen fue calculada como copias de ARNm por copias de ADN.

### **Integridad de membrana en la cepa dadora expuesta a Cu o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Se utilizó yoduro de propidio (PI) para evaluar la integridad de la membrana de las células de la cepa dadora *C. pinatubonensis* AEO106 expuestas a CuSO<sub>4</sub> o peróxido. Para esto, la cepa bacteriana se cultivó en caldo LB (24 h, 30 °C, agitación constante a 120 rpm). Luego, se prepararon suspensiones celulares en *c.a.* 1x10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup> en PBS con CuSO<sub>4</sub> 3.9 Cu M o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5mM que fueron incubadas durante 5 min a 30 °C bajo agitación continua (120 rpm). Alícuotas de 1 mL fueron teñidas con 1 µl de yoduro de propidio 20 mM (Molecular Probes). Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se analizaron 20,000 eventos de cada muestra por citometría de flujo.

La fluorescencia de las muestras se analizó en un citómetro de flujo BD FACSAria III clasificador (BD, EE.UU.) equipado con un láser de estado sólido de argón de 20 mW 488 nm. La emisión fluorescente se detectó con un filtro de paso de banda 616/23. Los datos se analizaron con la versión de prueba FlowJo v.10 (FlowJo LLC).

## VI. RESULTADOS

### Caracterización de las nanopartículas de cobre

Las CuNPs fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión (Fig. 13 y Fig 14).

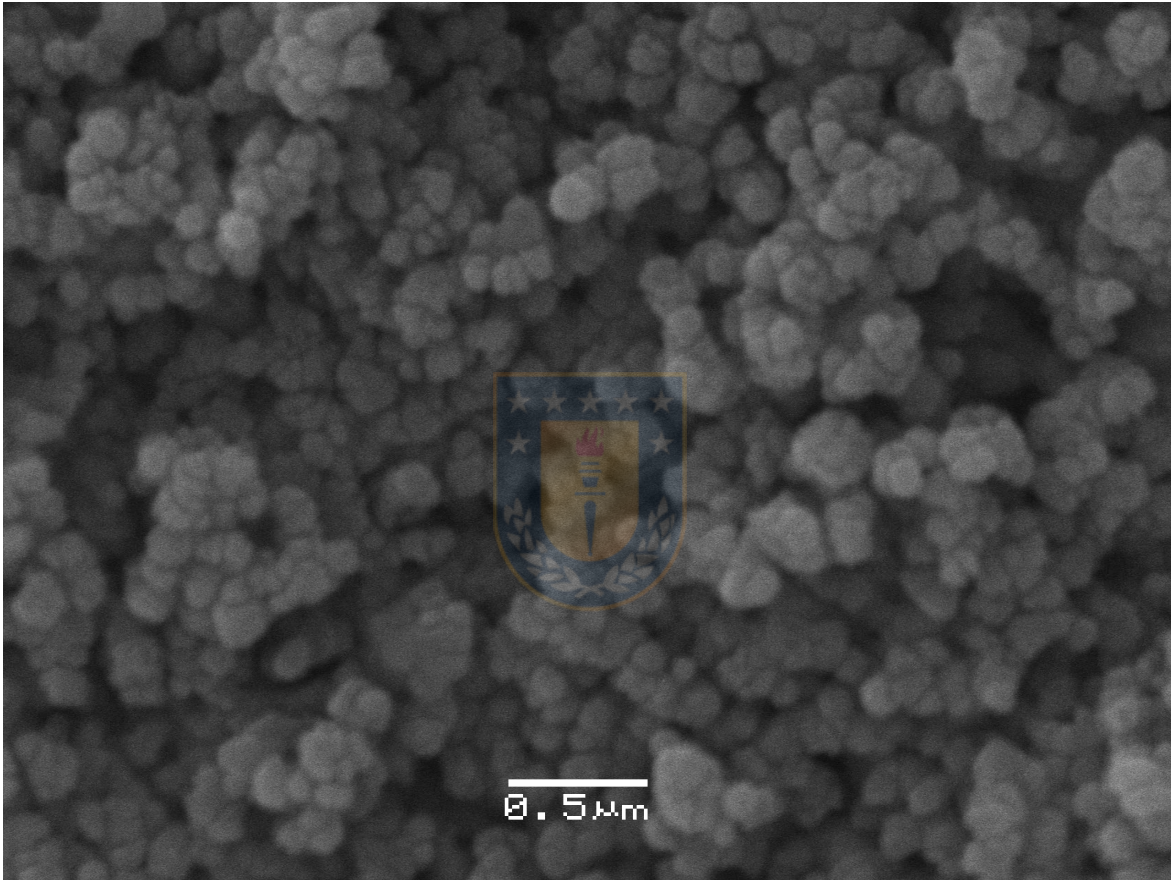


Figura 13. Nanopartículas de cobre observadas mediante microscopía electrónica de barrido.

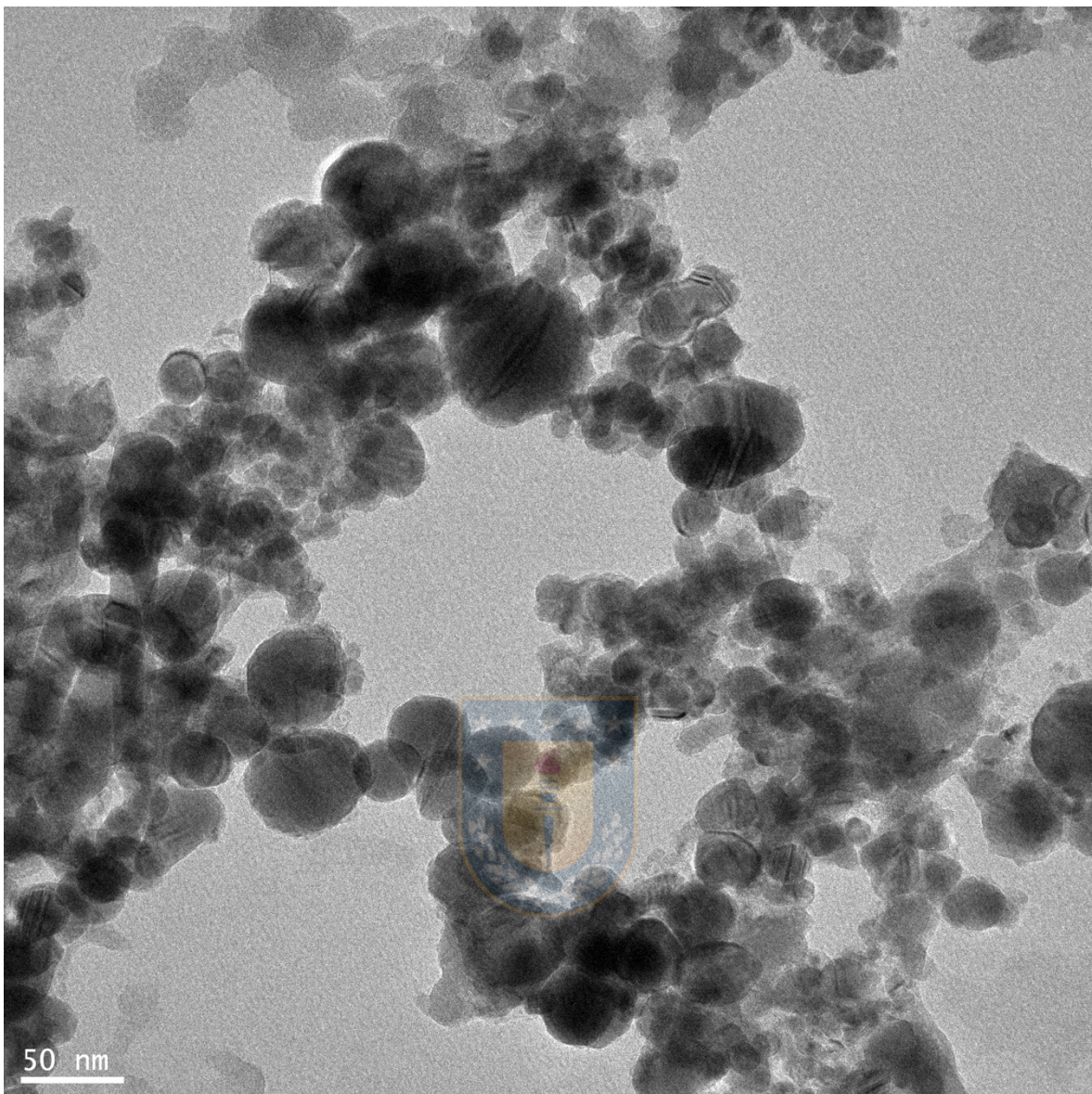


Figura 14. Nanopartículas de cobre observadas mediante microscopía electrónica de transmisión.

Mediante difracción de rayos X se obtuvo el gráfico de  $2\theta$  de las nanopartículas disueltas en caldo LB. Se observaron 6 picos entre los  $30$  y  $80^\circ$ . El principal pico se observó aproximadamente a los  $45^\circ$  (Fig. 15).

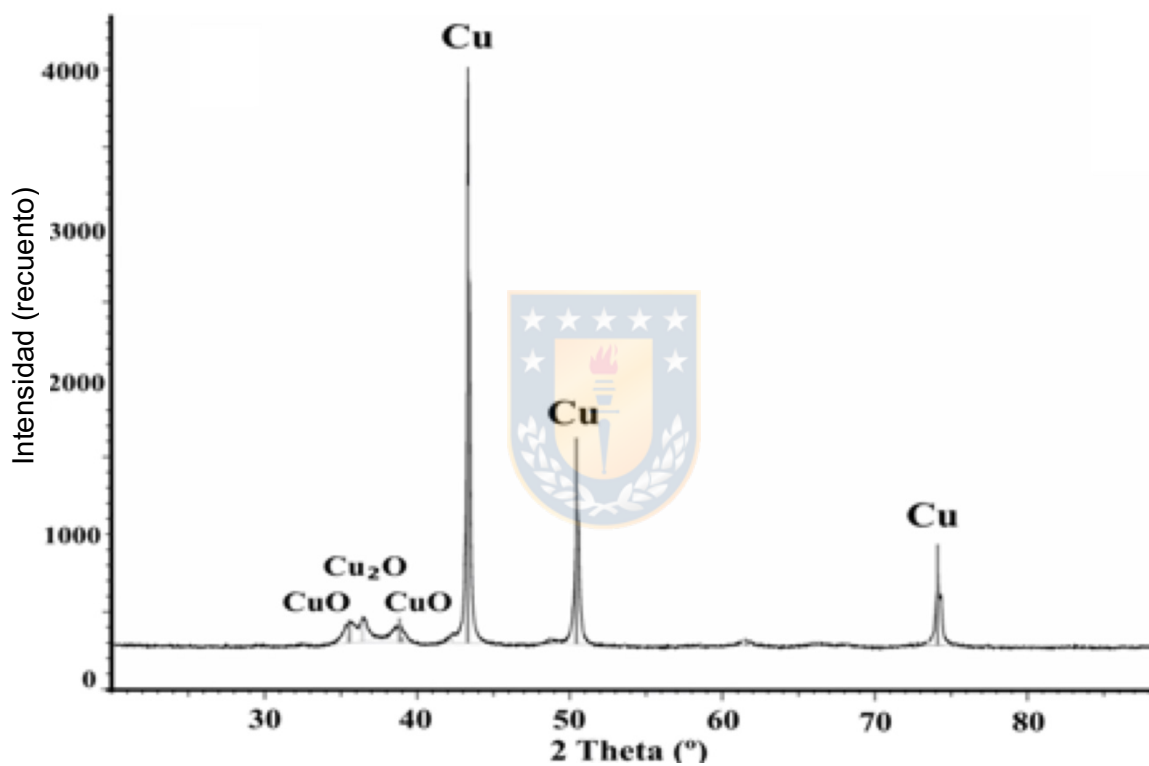


Figura 15. Difracción de rayos X de CuNPs.

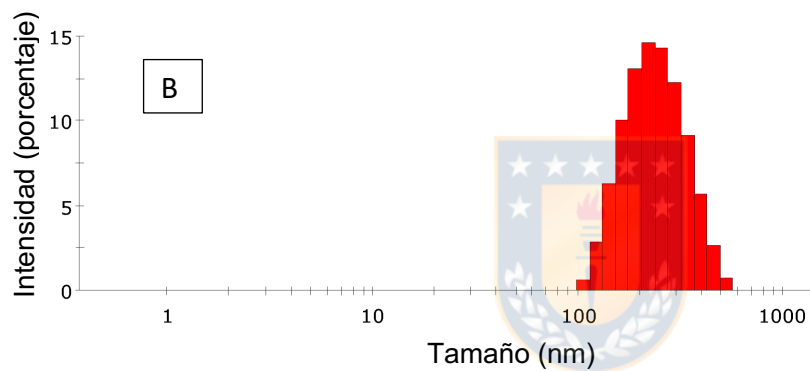
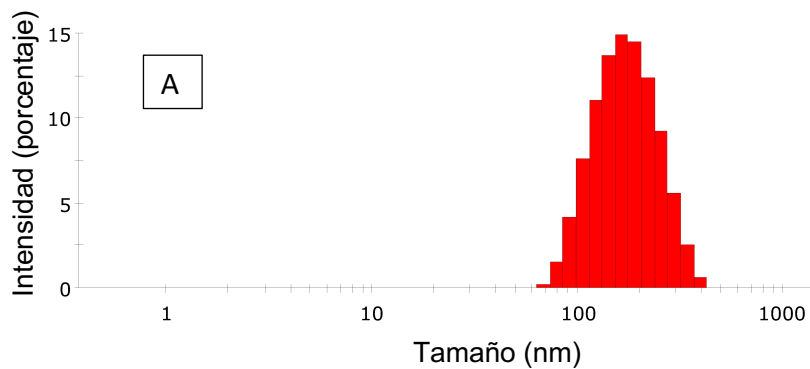


Figura 16. Histogramas de los tamaños hidrodinámicos de las CuNPs obtenidos mediante dispersión dinámica de la luz en (A) caldo LB y (B) MSM.

El análisis realizado mediante difracción dinámica de la luz mostró que el promedio del tamaño hidrodinámico inicial de las CuNPs fue 190,5 nm en LB (Fig. 16 Panel A) y 239,4 nm en MSM (Fig. 16 Panel B).



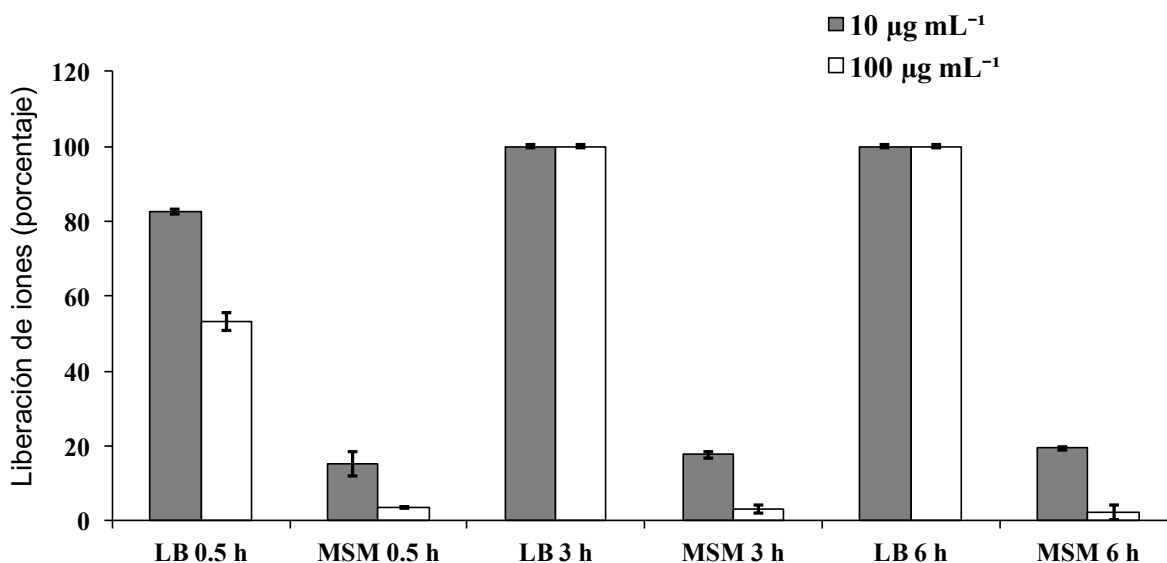


Figura 17. Liberación de iones desde CuNPs en caldo LB y MSM obtenida mediante espectrofotometría de absorción atómica.

Se observó mediante espectrometría de absorbancia atómica la liberación de iones  $\text{Cu}^{+2}$  desde las CuNPs en caldo LB y MSM luego de 0.5, 3 y 6 h posterior a la incorporación de las nanopartículas al medio (Fig. 17). Los resultados demuestran una liberación de iones  $\text{Cu}^{+2}$  en el caldo LB que alcanza el 100% luego de 3 h de incubación tanto a 10 como a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas dadoras *C. pinatubonensis* JMP134 y *Pseudomonas* ADP y receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* RG8 en presencia de CuNPs, CuSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub> y rifampicina.**

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Cepas bacterianas	CuNPs	CuSO <sub>4</sub>	HgCl <sub>2</sub>	Rifampicina
<i>C. pinatubonensis</i> JMP134	200	200	32	2
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	400	400	32	2
<i>P. putida</i> KT2440	500	200	4	128
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	500	200	4	128

Ambas cepas dadoras, *C. pinatubonensis* JMP134 y *Pseudomonas* sp. ADP, exhiben una CMI de  $32 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente a HgCl<sub>2</sub> y  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente a Rif. Mientras las cepas receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. RG8 exhiben una CMI de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$  de HgCl<sub>2</sub> y  $128 \mu\text{g mL}^{-1}$  en el caso de Rif (Tabla 3).

En el caso del cobre, *C. pinatubonensis* JMP134 presentó una CMI de  $200 \mu\text{g Cu mL}^{-1}$  y *Pseudomonas* sp. ADP  $400 \mu\text{g Cu mL}^{-1}$  para ambas formas de cobre. *P. putida* KT2440 presentó una CMI de  $500 \mu\text{g Cu mL}^{-1}$  frente a CuNPs y  $200 \mu\text{g Cu mL}^{-1}$  frente a CuSO<sub>4</sub>. *Pseudomonas* sp. RG8 presentó una CMI de  $500 \mu\text{g Cu mL}^{-1}$  frente a CuNPs y  $200 \mu\text{g Cu mL}^{-1}$  frente a CuSO<sub>4</sub> (Tabla 3).

**Recuento viable de las cepas dadoras *C. pinatubonensis* JMP134 y *Pseudomonas* ADP y receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* RG8 en presencia de CuNPs.**

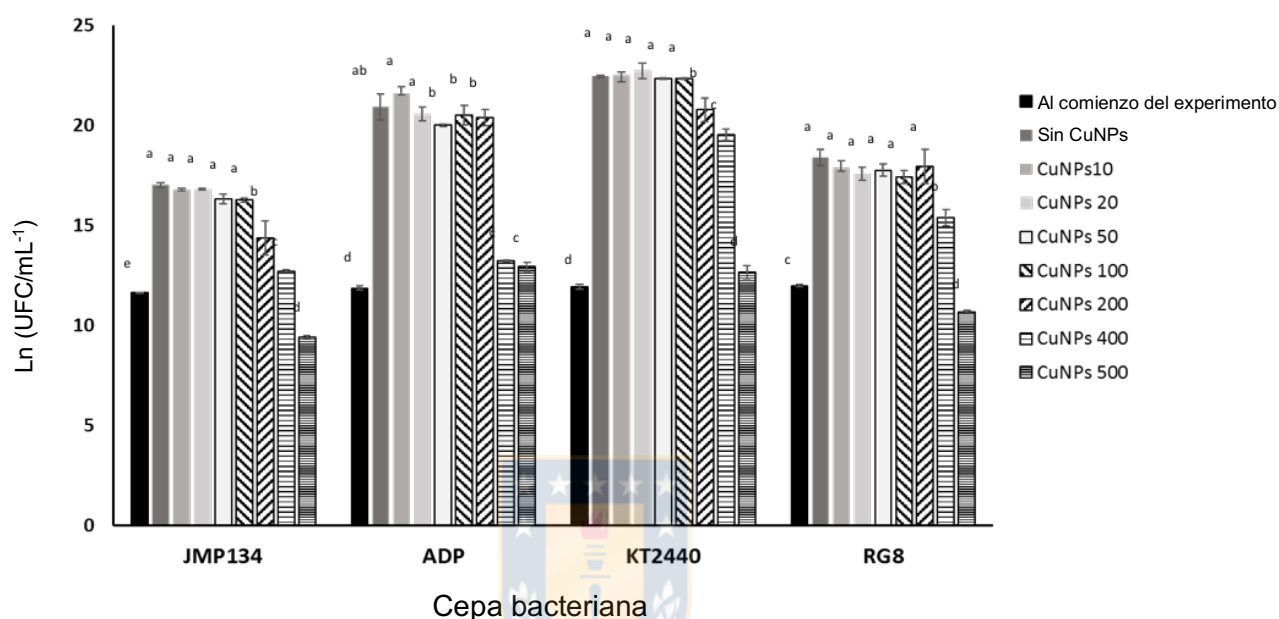


Figura 18. Recuento viable de *C. pinatubonensis* JMP134, *Pseudomonas* sp. ADP, *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. RG8 en presencia de CuNPs. Las barras de error representan la desviación estándar. Las diferentes letras muestran diferencias significativas.

Las CuNPs a 10, 20, 50 o 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no afectaron el recuento viable de las cepas bacterianas luego de 24 h de incubación a 30 °C comparado con el control sin CuNPs ( $p \leq 0.05$ ) (Figura 18). Por lo tanto, esas concentraciones de CuNPs fueron utilizadas posteriormente en los ensayos de conjugación en presencia de concentraciones subinibitorias.

**Transferencia de los plásmidos pJP4 y pADP-1 desde las cepas dadoras *C. pinatubonensis* JMP134 y *Pseudomonas* ADP hacia las cepas receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* RG8.**

Las cepas transconjugantes obtenidas KT2440 (pJP4), RG8 (pJP4), KT2440 (pADP-1) o RG8 (pADP-1), representan los pares ensayados. En presencia de CuNPs o CuSO<sub>4</sub> a 10 µg Cu mL<sup>-1</sup> las FC de los pares conjugantes fueron similares al control. Sin embargo, los FC se redujeron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) en presencia de 20, 50 o 100 µg mL<sup>-1</sup> de ambas formas de cobre (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencias de conjugación de cepas transconjugantes KT2440ΔrpJP4, RG8ΔrpJP4, KT2440ΔrpADP-1 o RG8ΔrpADP-1 en presencia de CuNPs o CuSO<sub>4</sub>.

	KT2440 (pJP4)	RG8 (pJP4)	KT2440 (pADP-1)	RG8 (pADP-1)
Control	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a	8,4 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,3a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,2b	1,2 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,0a
CuSO <sub>4</sub>	10	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a	8,4 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,4a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a
	20	1,1 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,8b	8,4 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,2b	1,2 x 10 <sup>-5</sup> ± -6,3b
	50	1,1 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,9b	8,4 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,1b	1,0 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,7b
	100	5,0 x 10 <sup>-6</sup> ± -5,8b	1,4 x 10 <sup>-6</sup> ± -5,9c	5,1 x 10 <sup>-6</sup> ± -5,9b
CuNPs	10	1,2 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,3a	8,5 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,6a	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,9a
	20	1,2 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,7b	8,3 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,3b	1,1 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,8b
	50	1,1 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,7b	8,4 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,4b	1,0 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,6b
	100	5,1 x 10 <sup>-6</sup> ± -6,0b	1,4 x 10 <sup>-6</sup> ± -5,9c	5,1 x 10 <sup>-6</sup> ± -5,6b

Los valores corresponden al promedio de tres réplicas independientes ± la desviación estándar en expresión logarítmica. Las diferentes letras muestran diferencias significativas entre los valores, determinadas con n=3 mediante el test Tukey ( $p < 0.05$ ).

La FC del plásmido pJP4 desde *C. pinatubonensis* JMP134 a *P. putida* KT244 (representada por la cepa transconjugante KT2440 (pJP4)) fue 8 veces menor que la FC del plásmido pJP4 transferido desde *C. pinatubonensis* JMP134 a *Pseudomonas* sp. RG8 (representada por la cepa transconjugante RG8 (pJP4)). Mientras que la FC del plásmido pADP-1 desde *Pseudomonas* ADP fue similar en ambas cepas receptoras ( $p \leq 0.05$ ) (representadas por las cepas transconjugantes KT2440 (pADP-1) y RG8 (pADP-1)) (Tabla 4).

Tabla 5. Frecuencias de conjugación del plásmido pJP4 desde *C. pinatubonensis* JMP134 a *P. putida* KT2440 en caldo LB diluido (25 %, 50 % o 75 %) o MSM en presencia de CuNPs o CuSO<sub>4</sub>.

	MSM	LB 25%	LB 50%	LB 75%
Sin Cu	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,8a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,8a
	10 1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,3a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,4a	1,2 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,9a	1,2 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,2a
CuSO <sub>4</sub>	20 1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,9a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,9a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,4a
	50 1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,2a	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,2a	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,8a	1,0 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,0a
	100 1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,3a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,8a	1,0 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,0a	5,0 x 10 <sup>-6</sup> ± -5,3b
CuNPs	10 1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,4a	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,3a	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,5a	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a
	20 1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,7a	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1a
	50 1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,0a	1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,0a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,8a	1,0 x 10 <sup>-5</sup> ± -4,7a
	100 1,1 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,0a	1,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,3a	1,1 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,4a	5,0 x 10 <sup>-6</sup> ± -4,9b

Los valores corresponden al promedio de tres réplicas independientes ± la desviación estándar en expresión logarítmica. Las diferentes letras muestran diferencias significativas entre los valores, determinadas con n=3 mediante el test Tukey ( $p < 0.05$ ).

Las FC del plásmido pJP4 desde *C. pinatubonensis* JMP134 a *P. putida* KT2440 en caldo LB diluido (25 %, 50 % o 75 %) o MSM se muestran en la tabla 5. En LB 50

% con ambas formas de cobre a 100  $\mu\text{g Cu mL}^{-1}$ , la FC disminuyó a 10%. En LB 75% con ambas formas de cobre a 50  $\mu\text{g Cu mL}^{-1}$  la FC disminuyó en 90 %, y con 100  $\mu\text{g Cu mL}^{-1}$  disminuyó en 99 %. Por su parte, la FC en MSM y LB 25 % en presencia de ambas formas de cobre a todas las concentraciones ensayada fueron similares a la FC observada en el control sin cobre ( $p \leq 0.05$ ) (Tabla 5).

### **Degradación de 2,4-D o atrazina por las cepas transconjugantes que adquirieron los plásmidos pJP4 o pADP-1.**

Las cepas transconjugantes que recibieron el plásmido pADP-1, *P. putida* KT2440 (pADP-1) y *Pseudomonas* RG8 (pADP-1) degradaron atrazina. Asimismo, la cepa transconjugante *Pseudomonas* RG8 (pJP4) degradó 2,4-D. Sin embargo, la cepa transconjugante *P. putida* KT2440 (pJP4) no degradó 2,4-D (Tabla 6).

Tabla 6. Degradación de 2,4-D o atrazina.

Cepa bacteriana	2,4-D	Atrazina
<i>C. pinatubonensis</i> JMP134	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	-	+
<i>P. putida</i> KT2440	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8	-	-
<i>P. putida</i> KT2440 (pJP4) (T)	-	-
<i>P. putida</i> KT2440 (pADP-1) (T)	-	+
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8 (pJP4) (T)	+	-
<i>Pseudomonas</i> sp. RG8 (pADP-1) (T)	-	+

T: cepa transconjugante.

## Presencia de genes degradativos *tfdB* o *atzB* en las cepas bacterianas.

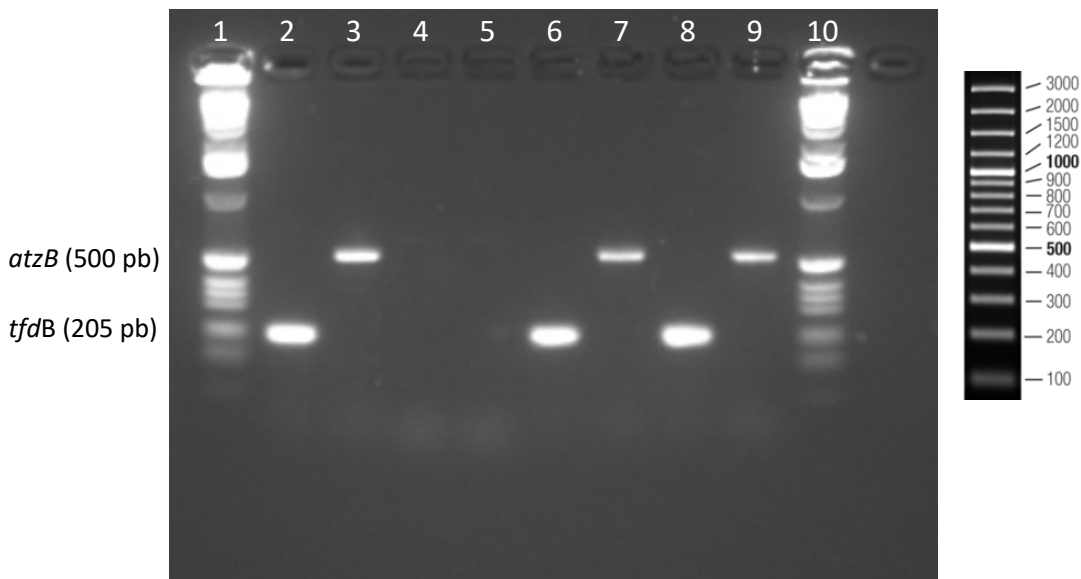


Figura 19. Gel de agarosa (2%) de los productos de PCR de los genes *tfdB* (205 pb) y *atzB* (500 pb) en las cepas dadoras, receptoras y transconjugantes.

Carril 1 y 10: 100 pb Marcador de peso molecular, carril 2: producto de PCR para gen *tfdB* en *C. pinatubonensis* JMP134, carril 3: producto de PCR para gen *atzB* en *Pseudomonas* sp. ADP, carril 4: producto de PCR para gen *tfdB* en *P. putida* KT2440, carril 5: producto de PCR para gen *tfdB* en *Pseudomonas* sp. RG8, carril 6: producto de PCR para gen *tfdB* en *P. putida* KT2440 (pJP4), carril 7: producto de PCR para gen *atzB* en *P. putida* KT2440 (pADP-1), carril 8: producto de PCR para gen *tfdB* en *Pseudomonas* sp. RG8 (pJP4), carril 9: producto de PCR para gen *atzB* en *Pseudomonas* sp. RG8 $\Delta$  (ADP-1).

La presencia de los genes degradativos (*tfdB* y *atzB*) fue confirmada en ambas cepas dadoras y transconjugantes; mientras que en ambas cepas receptoras se confirmo su ausencia (Figura 19).

**Concentración mínima inhibitoria a CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tetraciclina y kanamicina por las cepas *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida* KT2440**

Los resultados de CMI frente a tetraciclina y kanamicina mostraron que *C. pinatubonensis* AEO106 fue inhibida con Tc a 64 µg mL<sup>-1</sup> y Kn a 8 µg mL<sup>-1</sup> y *P. putida* KT2440 fue inhibida con Tc 8 µg mL<sup>-1</sup> y Kn 256 µg mL<sup>-1</sup> (Tabla 7). Por lo tanto, para seleccionar las cepas transconjugantes en placas con agar LB, se utilizo Tc a 25 µg mL<sup>-1</sup> y Kn a 50 µg mL<sup>-1</sup>.



Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria a CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tetraciclina y kanamicina para las cepas *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida* KT2440.

Cepa bacteriana	Tc (µg mL <sup>-1</sup> )	Kn (µg mL <sup>-1</sup> )	CuSO <sub>4</sub> (Cu M)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)
<i>C. pinatubonensis</i> AEO106 (D)	64	8	2	1
<i>P. putida</i> KT2440 (R)	8	256	8	8

D: cepa dadora; R: cepa receptora.

Los resultados de CMI frente a CuSO<sub>4</sub> mostraron que *C. pinatubonensis* AEO106 fue inhibida en presencia de CuSO<sub>4</sub> a 2 M y *P. putida* KT2440 en presencia de 8 M. En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *C. pinatubonensis* AEO106 fue inhibida con 1 mM y *P. putida* KT2440 con 8 mM (Tabla 7).



## Efecto del CuSO<sub>4</sub> en la viabilidad de *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida*

KT2440

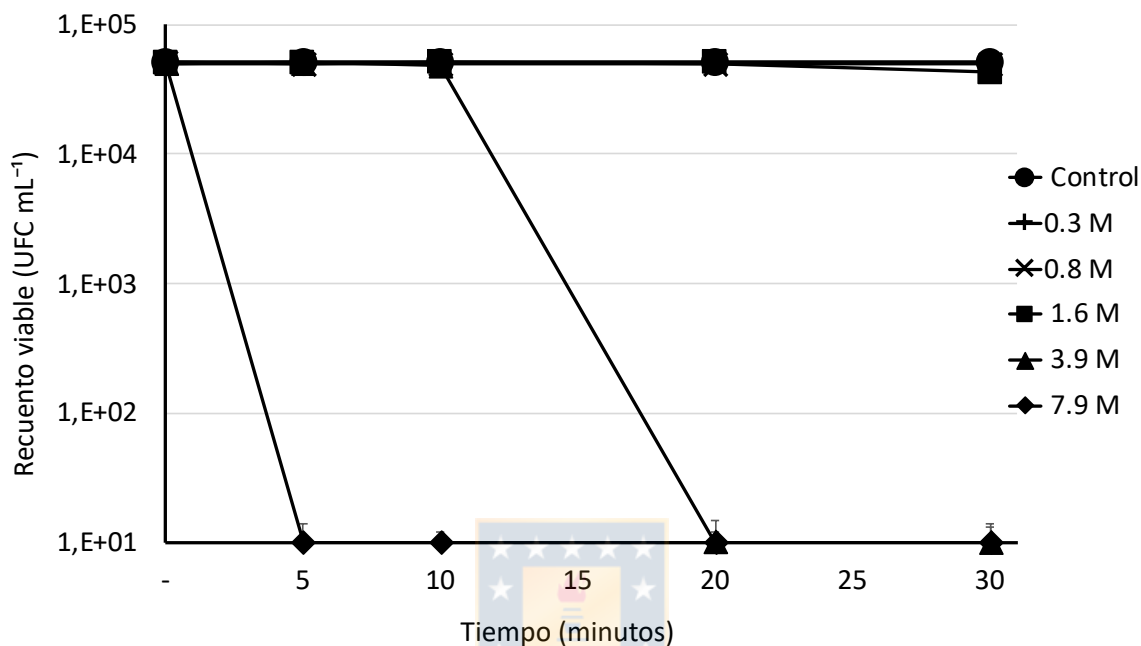


Figura 20. Efecto de diferentes concentraciones de CuSO<sub>4</sub> en el recuento viable de *C. pinatubonensis* AEO106.

Los resultados de viabilidad en presencia de CuSO<sub>4</sub> mostraron que *C. pinatubonensis* AEO106 en presencia de  $\leq 1.6$  M no presentó diferencias respecto del control luego de 30 min de incubación. En presencia de 3.9 M luego de 20 min disminuyó en más de 3 ciclos logarítmicos sus recuentos viables por lo que se considera muerte bacteriana. En esta condición se observó una tasa de muerte de  $4,7 \times 10^3$  UFC min<sup>-1</sup>. En presencia de 7.9 M redujo su recuento viable en 3 ciclos logarítmicos luego de 5 min de incubación. En esta condición se observó una tasa de muerte de  $1,0 \times 10^4$  UFC min<sup>-1</sup> ( $p \leq 0.05$ ) (Fig. 20).

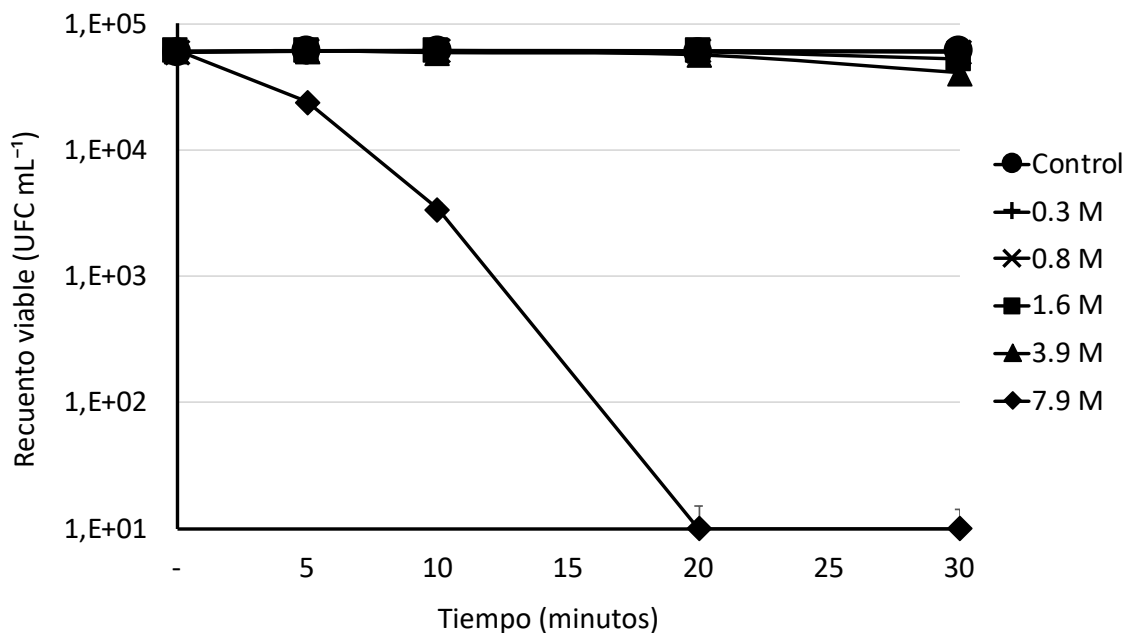


Figura 21. Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{CuSO}_4$  en el recuento viable de *P. putida* KT2440.



*P. putida* KT2440 en presencia de 7.9 M redujo en 1 orden de magnitud sus recuentos viables luego de 10 min de incubación. Sin embargo, luego de 20 min se redujo en más de 3 ordenes de magnitud por lo que se considera muerte bacteriana. En esta condición se observó tasa de muerte de  $2,8 \times 10^3 \text{ UFC min}^{-1}$ . En presencia de  $\leq 3.9 \text{ M}$  no se observaron diferencias respecto del control incubada hasta 30 min (Fig. 21).

## **Efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la viabilidad de *C. pinatubonensis* AEO106 y *P. putida* KT2440**

Los resultados de viabilidad con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indican que *C. pinatubonensis* AEO106 en presencia de 0.1 mM no se observó diferencias respecto del control en ausencia del compuesto. En presencia de 0.2 mM disminuyó sus recuentos viables a los 10 min de incubación, hasta que luego de 30 min disminuyó sus recuentos en más de 1 ciclo logarítmico, mostrando una tasa de muerte de  $1,7 \times 10^3$  UFC min<sup>-1</sup>. En presencia de 0.5 mM redujo sus recuentos viables desde los 5 min de incubación, hasta llegar a más de 3 ciclos logarítmicos luego de 30 min de incubación, mostrando una tasa de muerte de  $1,6 \times 10^3$  UFC min<sup>-1</sup>. En presencia de 1 mM se observó reducción de 1 ciclo logarítmico luego de 5 min de incubación, hasta llegar a más de 3 ciclos logarítmicos luego de 20 min de incubación con una tasa de muerte de  $2,1 \times 10^3$  UFC min<sup>-1</sup>. En presencia de 2 y 5 mM se observó muerte bacteriana luego de 5 min de incubación con una tasa de  $1,0 \times 10^5$  UFC min<sup>-1</sup>.

Los resultados de viabilidad con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indican que *P. putida* KT2440 redujo su recuento viable en más de 3 ciclos logarítmicos en presencia de 5 mM luego de 30 min de incubación con una tasa de muerte de  $2,3 \times 10^3$  UFC min<sup>-1</sup> (Fig. 23).

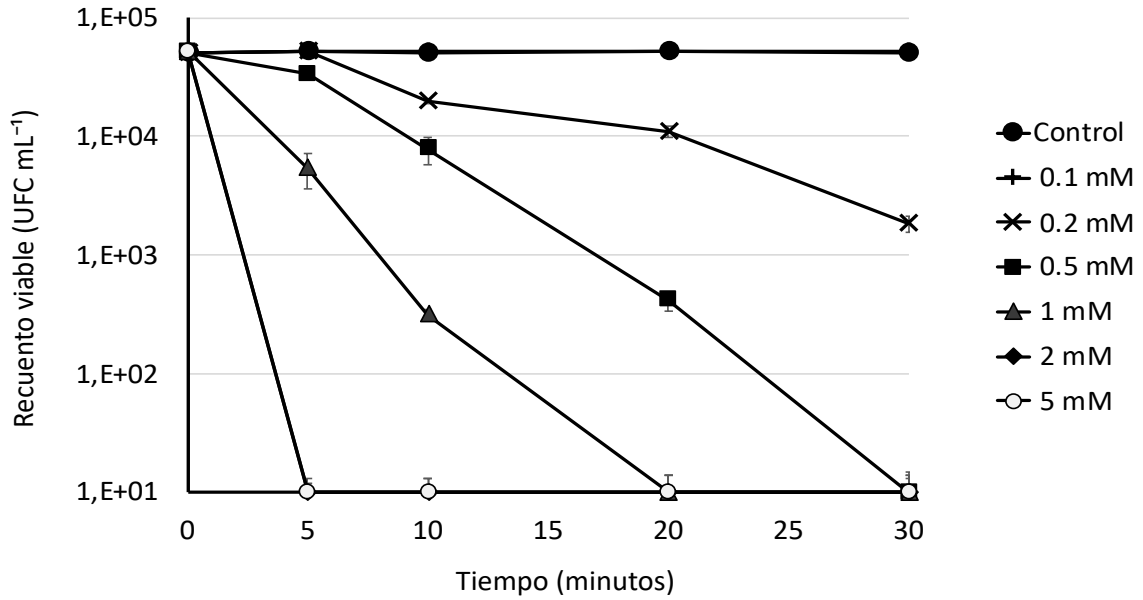


Figura 22. Efecto de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el recuento viable de *C. pinatubonensis* AEO106.

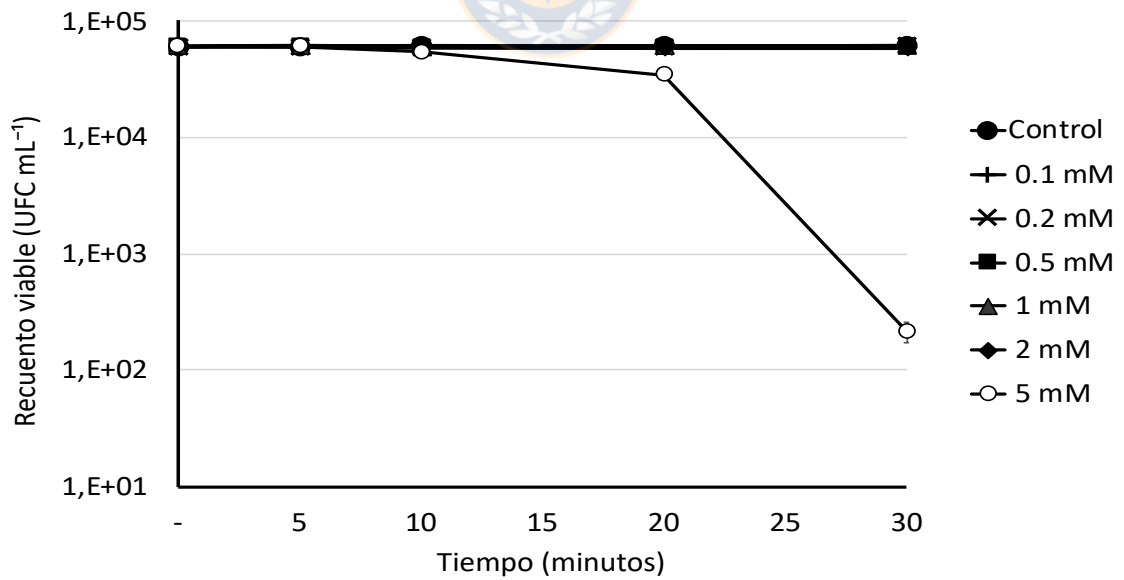


Figura 23. Efecto de diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el recuento viable de *P. putida* KT2440.

### Efecto de $\text{CuSO}_4$ en la conjugación del plásmido pRO101 desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT2440

En presencia de Cu a  $\leq 0.8$  M el recuento de cepas transconjugantes fue similar al control. En presencia 1.6 M se observó una reducción no significativa a los 30 min de incubación. En presencia de 3.9 M se observó una reducción significativa luego de 20 min de incubación. En presencia de 7.9 M se observó una reducción significativa de aproximadamente 3 ciclos logarítmicos luego de 5 min de incubación (Fig. 24). Respecto de la frecuencia de conjugación, se observa una reducción significativa en presencia de 3.9 M luego de 20 min de incubación y en presencia de e 7.9 M luego de 5 min de incubación (Tabla 8).

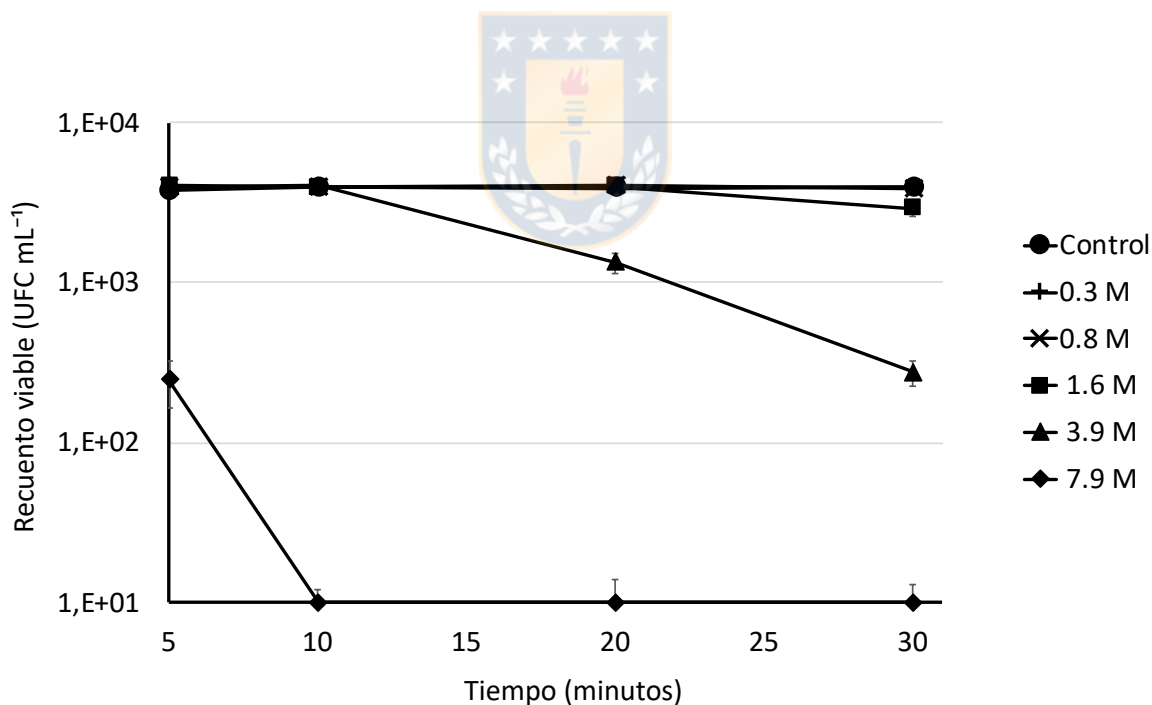


Figura 24. Recuento viable de cepas transconjugantes obtenidas en presencia de distintas concentraciones de  $\text{CuSO}_4$ .

Tabla 8. Frecuencias de conjugación del plásmido pRO101 desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT2440 en presencia de CuSO4

	Control	0.3 M	0.8 M	1.6 M	3.9 M	7.9 M
5 min	$1,8 \times 10^{-4} \pm -5,0$	$1,9 \times 10^{-4} \pm -5,0$	$1,9 \times 10^{-4} \pm -4,9$	$1,6 \times 10^{-4} \pm -5,1$	$1,8 \times 10^{-4} \pm -4,8$	$1,2 \times 10^{-5} \pm -5,4$
10 min	$1,9 \times 10^{-4} \pm -5,2$	$1,9 \times 10^{-4} \pm -5,0$	$1,8 \times 10^{-4} \pm -5,1$	$1,9 \times 10^{-4} \pm -4,9$	$1,9 \times 10^{-4} \pm -5,1$	$4,8 \times 10^{-7} \pm -7,6$
20 min	$1,7 \times 10^{-4} \pm -4,8$	$1,8 \times 10^{-4} \pm -5,0$	$1,8 \times 10^{-4} \pm -4,7$	$1,9 \times 10^{-4} \pm -4,9$	$5,5 \times 10^{-5} \pm -5,2$	$4,8 \times 10^{-7} \pm -7,6$
30 min	$1,9 \times 10^{-4} \pm -5,6$	$1,9 \times 10^{-4} \pm -5,0$	$1,8 \times 10^{-4} \pm -4,9$	$1,4 \times 10^{-4} \pm -4,6$	$1,4 \times 10^{-5} \pm -5,5$	$4,7 \times 10^{-7} \pm -7,6$

Los valores corresponden al promedio de tres réplicas independientes  $\pm$  la desviación estándar en expresión logarítmica.

**Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la conjugación del plásmido pRO101 desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT2440.**

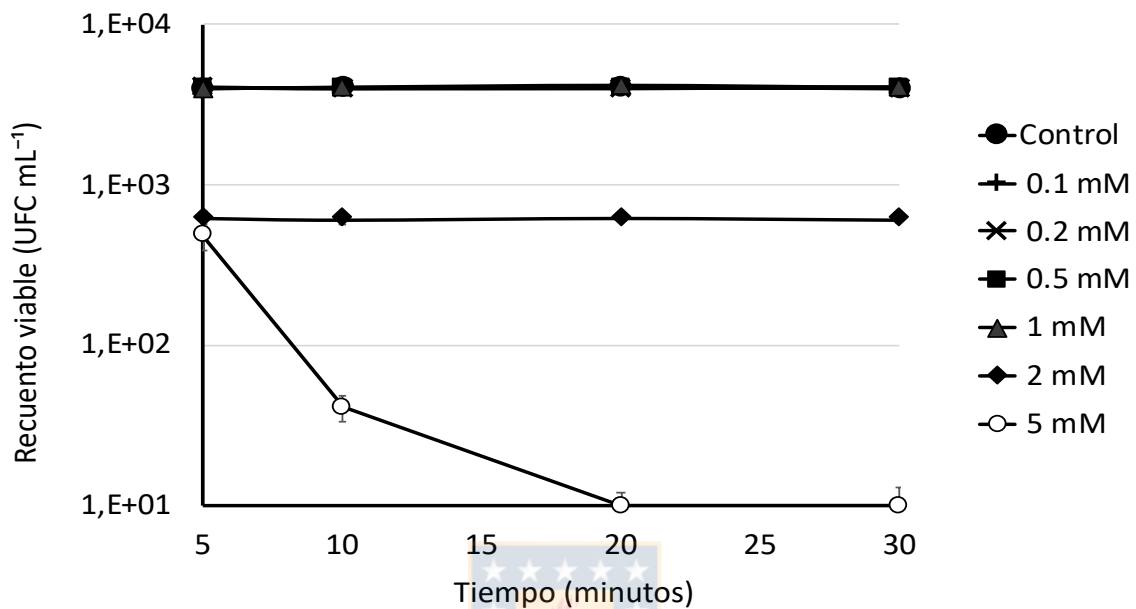


Figura 25. Recuento de cepas transconjugantes obtenidas en presencia distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ≤ 1mM el recuento de cepas transconjugantes fue similar al control hasta los 30 min de incubación. En presencia de 0.2 mM se redujo el recuento de células transconjugantes desde 5 min de incubación y se mantuvo similar hasta el obtenido luego de 30 min de incubación. En presencia de 5 mM se observó una reducción significativa luego de 10 min de incubación y se acentuó hasta caer en aproximadamente 3 ciclos logarítmicos luego de 20 min de incubación (Fig. 25).

Tabla 9. Frecuencias de conjugación del plásmido pRO101 desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT2440 en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Control	0.1 mM	0.2 mM	0.5 mM	1 mM	2 mM	5 mM
5 min	1,9 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,0	1,9 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,0	1,7 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,3	1,8 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,8	3,1 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,4	2,4 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,3
10 min	2,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,9	1,9 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,0	1,9 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,9	2,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,1	3,0 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,6	2,0 x 10 <sup>-6</sup> ± -6,3
20 min	1,8 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,8	1,8 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,7	1,9 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,8	1,7 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,7	3,0 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,5	4,8 x 10 <sup>-7</sup> ± -7,6
30 min	1,9 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,5	1,9 x 10 <sup>-4</sup> ± -4,9	2,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,0	2,0 x 10 <sup>-4</sup> ± -5,3	2,9 x 10 <sup>-5</sup> ± -5,6	4,7 x 10 <sup>-7</sup> ± -7,6

Los valores corresponden al promedio de tres réplicas independientes ± la desviación estándar en expresión logarítmica.



## Presencia de genes degradativos y capacidad para degradar 2,4-D en las cepas transconjugantes que adquirieron el plásmido pRO101

La presencia del gen *tfdB* fue detectado en las cepas transconjugantes mediante PCR (Fig. 26).



Figura 26. Gel de agarosa (2%) para detección del gen *tfdB* en cepas transconjugantes.

Los ensayos de degradación indicaron que las cepas transconjugantes fueron incapaces de degradar el plaguicida 2,4-D ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) como única fuente de carbono.

### Expresión del gen *traK* en presencia de CuSO<sub>4</sub>

La expresión del gen *traK* no presentó diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en las células expuestas a CuSO<sub>4</sub> y el control luego de 30 min de incubación (Tabla 10).

Tabla 10. Expresión de gen *traK* en presencia de CuSO<sub>4</sub>.

Cu	<i>traK</i> ARNm (ADN) <sup>-1</sup>
Control (0)	$3,62 \times 10^{-2} \pm 3,09 \times 10^{-3}$
0.3 M	$1,55 \times 10^{-2} \pm 2,11 \times 10^{-3}$
0.8 M	$1,43 \times 10^{-2} \pm 5,03 \times 10^{-3}$
1.6 M	$1,62 \times 10^{-2} \pm 2,64 \times 10^{-3}$
3.9 M	$1,88 \times 10^{-2} \pm 6,71 \times 10^{-3}$

Los valores corresponden al promedio de tres réplicas  $\pm$  la desviación estándar.



### Integridad de membrana en células dadoras expuesta a Cu o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Los resultados demostraron que el control mostró un porcentaje de células no dañadas del 97,2% (Fig. 27a). Los cultivos expuestos a Cu 3.9 M mostraron un 96.7% de células dañadas (Fig. 27b). Los cultivos expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM mostraron un 2,3% de células dañadas (Fig. 27c).

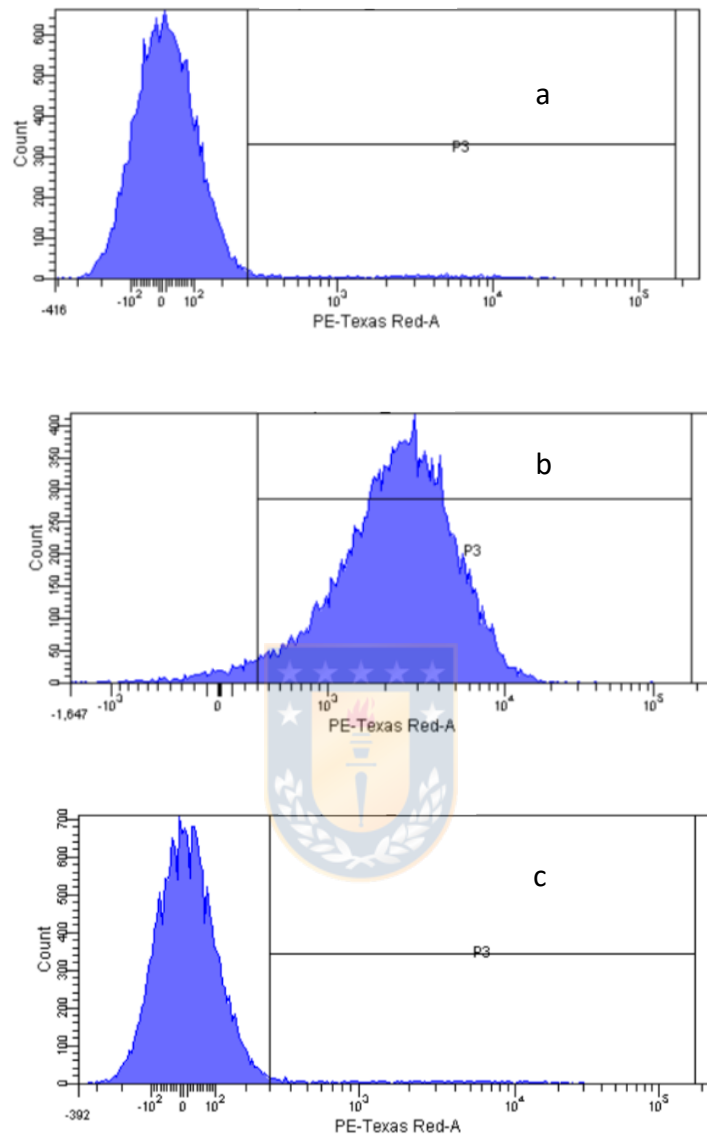


Figura 27. Histogramas de incorporación de yoduro de propidio por las células de *C. pinatubonensis* AEO106 incubadas 5 min en control (a), con 7,9 M de Cu (b) o 5 mM  $H_2O_2$  (c), indicativo de integridad de la membrana.

## VII. DISCUSIÓN

La transferencia de plásmidos catabólicos mediante conjugación es fundamental para la remoción de plaguicidas, debido a que este tipo de plásmidos se diseminan entre las bacterias que integran las comunidades. Este trabajo contribuye a conocer los efectos del cobre en la diseminación de los genes que permiten la biodegradación de plaguicidas en las comunidades microbianas. Sobre todo, considerando que este metal en forma de nanopartículas o sales es cada vez más incorporado al ambiente.

### **Caracterización de las nanopartículas de cobre**

Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido y transmisión muestran que las CuNPs corresponden a nanopartículas de cobre con tamaños que oscilan entre 40 y 80 nm aproximadamente. El análisis realizado mediante SEM-EDS demostró que las CuNPs corresponden a 87.2% de cobre y 12.7% oxígeno. Los patrones obtenidos mediante difracción de rayos X demuestran la presencia de tres picos característicos del cobre. Se observó a  $2\theta$  ( $43^\circ$ ,  $50^\circ$ ,  $74^\circ$ ) tres planos (111, 200 y 220) que corresponden a los cristales cúbicos de cobre (Suresh et al., 2014). Además, los picos a  $2\theta$  entre  $35.5^\circ$  y  $38.7^\circ$  correspondientes a (002) y (111) mostraron que las nanopartículas presentan algunos residuos de óxidos.

Los resultados obtenidos mediante DLS indican que el promedio del tamaño hidrodinámico de las CuNPs fue 190,5 nm en LB y 239,4 nm en MSM. En este sentido, generalmente el tamaño obtenido mediante DLS se observa levemente mayor al estimado mediante microscopía electrónica, debido a que cuando un

medio líquido mueve una partícula dispersa, se adhiere una capa eléctrica polar a su superficie (Huang et al., 2007). Además, esto indica que el tamaño de las CuNPs fue mayor en MSM comparado con caldo LB, probablemente debido a la mayor disolución de las nanopartículas en el medio enriquecido LB. Esto igualmente se observó en los resultados obtenidos por espectrometría de absorción atómica, ya que la liberación de iones  $\text{Cu}^{+2}$  desde las CuNPs en caldo LB fue mayor a la liberación en MSM luego de 0.5, 3 y 6 h posterior a la incorporación de las nanopartículas al medio.

Vale et al. (2016) reportaron que las CuNPs experimentan una rápida disolución en un medio con un mayor nivel de materia orgánica en comparación con un menor nivel de materia orgánica. Gunawan et al. (2011) sugirieron que la lixiviación de las nanopartículas de óxido de cobre (CuONPs) se debe a la formación de complejos con los aminoácidos del medio de cultivo. Bondarenko et al., (2012) describieron que la disolución de las nanopartículas metálicas es clave para desencadenar sus efectos tóxicos sobre las células bacterianas. Por su parte, Wang et al. (2016) utilizando la bacteria *Photobacterium phosphoreum* como modelo de estudio, describió que las CuONPs perturbaban las células bacterianas por un efecto combinado entre los iones liberados y las nanopartículas. Sin embargo, estos autores mencionaron que la liberación de iones de CuONPs depende del equilibrio entre la disolución y la adsorción en solución, la cual a su vez es dependiente de la concentración. En este sentido, los mismos autores describen que en presencia de una baja concentración de nanopartículas, la disolución es mayor que la capacidad de adsorción, mientras que con una alta concentración este fenómeno se revierte. En nuestro caso se observó una mayor y más rápida liberación de iones Cu desde

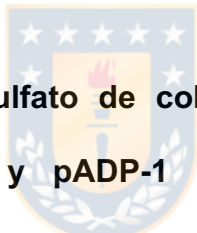
las CuNPs cuando se encuentran en un medio de cultivo con materia orgánica como el caldo LB respecto de un medio sin materia orgánica como MSM, lo cual reafirma las ideas descritas por los autores anteriores.

**Efecto de nanopartículas y sulfato de cobre en el recuento viable de *C. pinatubonensis* JMP134 (pJP4), *Pseudomonas* sp. ADP (pADP-1), *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* RG8.**

Se conoce la actividad tóxica de las nanopartículas de cobre sobre una diversidad de cepas bacterianas. Sin embargo, hasta la fecha generalmente se han estudiado cepas de importancia clínica y poco se ha estudiado su efecto sobre cepas bacterianas de ambientes como el suelo o agua. Nuestros resultados indican que ambas formas de cobre (CuNPs y CuSO<sub>4</sub>) utilizadas en este estudio presentaron concentraciones mínimas inhibitorias iguales para ambas cepas bacterianas portadoras de plásmidos catabólicos conjugativos *C. pinatubonensis* JMP134 y *Pseudomonas* sp. ADP (200 y 400 µg Cu mL<sup>-1</sup> para CuNPs y CuSO<sub>4</sub> respectivamente). Por su parte, ambas cepas receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* sp. RG8 presentaron una mayor CMI para las CuNPs en comparación con la CMI frente a sulfato de cobre (500 y 200 µg Cu mL<sup>-1</sup> respectivamente). Esto indicaría que los iones liberados de la sal de cobre presentarían una mayor toxicidad sobre estas cepas bacterianas. Esto contradice lo descrito por Kaweeteerawat et al. (2015) utilizando *E. coli* y *Lactobacillus brevis*, quienes informaron que las CuNPs ejercen mayor toxicidad que los análogos iónicos sobre estas bacterias. Por lo tanto, es válido sugerir que la toxicidad de un tipo u

otro de cada forma del metal dependería de cada microorganismo en estudio, siendo su efecto especie-específico. Además, *E. coli* y *Lactobacillus* son bacterias que forman parte de la microbiota humana, por lo que podrían estar menos expuestas al contacto con cobre comparadas con bacterias ambientales del suelo o agua como las utilizadas en este estudio.

Las concentraciones de nanopartículas y el sulfato de cobre  $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$  fueron consideradas subhinibitorias debido a que no afectaron el recuento viable de las cepas bacterianas luego de 24 h de incubación a 30 °C. Sin embargo, presentarían una acción bacteriostática en estas condiciones, ya que el recuento viable se mantiene similar al comienzo del experimento y luego de 24 h de incubación.



**Efecto de nanopartículas y sulfato de cobre en la transferencia de los plásmidos catabólicos pJP4 y pADP-1 desde las cepas dadoras *C. pinatubonensis* JMP134 (pJP4) y *Pseudomonas* sp. ADP (pADP-1) a las cepas receptoras *P. putida* KT2440 y *Pseudomonas* RG8 por conjugación.**

Si bien se conocen los mecanismos de acción de las nanopartículas de cobre sobre los ciertos componentes de las células bacterianas como proteínas y lípidos de la pared celular, hasta la fecha no se ha estudiado su efecto sobre la conjugación bacteriana. Sobre todo, en la transferencia de genes que permiten la biodegradación de compuestos tóxicos como plaguicidas.

En presencia de CuNPs o  $\text{CuSO}_4$  a  $10 \mu\text{g Cu mL}^{-1}$  las FC de los plásmidos catabólicos pJP4 y pADP-1 desde las cepas dadoras *C. pinatubonensis* JMP134 (pJP4) y *Pseudomonas* sp. ADP (pADP-1) hacia las cepas receptoras *P. putida*

KT2440 y *Pseudomonas* RG8 fueron similares al control. Sin embargo, en presencia de 20, 50 o 100  $\mu\text{g Cu mL}^{-1}$  de ambas formas de cobre, los FC se redujeron significativamente en  $> 90 \%$ . Por lo tanto, es posible sugerir que esta reducción se debe a la acción de los iones solubles de cobre; de hecho, se ha descrito que estos iones pueden modular la expresión de ciertos genes bacterianos (Guo et al., 2017). En este sentido, se ha descrito que la presencia de iones de zinc, similares a los iones Cu, también modifican la frecuencia de conjugación (Ou y Anderson, 1972; Ou, 1973). Esto permite suponer dos posibles efectos de este metal sobre la conjugación: 1) que interfieren la expresión de genes plasmidiales que permiten la conjugación, o 2) afectan ciertas proteínas de las células dadoras o receptoras involucradas en este proceso.

La FC del plásmido pJP4 desde *C. pinatubonensis* JMP134 a *P. putida* KT2440 fue 8 veces menor que su transferencia a *Pseudomonas* sp. RG8. Mientras que la FC del plásmido pADP-1 desde *Pseudomonas* ADP fue similar en ambas cepas receptoras. Esto indicaría que la cepa *Pseudomonas* sp. RG8 es una mejor receptora de este tipo de plásmidos. Además, esta cepa bacteriana fue aislada desde un ambiente acuático prístino de la Patagonia de nuestro país con baja cantidad de materia orgánica disponible (rio Grey, Parque Nacional Torres del Paine; Barros et al., 2013), lo que implica que podría ser reservorio de plásmidos catabólicos conjugativos en lugares donde aún existe una baja intervención humana, como lo son los cuerpos de agua ubicados en el sur de Chile.

Se observó que la FC del plásmido pJP4 desde *C. pinatubonensis* JMP134 a *P. putida* KT2440 en caldo LB diluido 25, 50 o 75 % cambió respecto de la FC en caldo LB sin diluir, lo cual indicaría que en ambientes con baja disponibilidad de materia



orgánica podrían tener menor efectos negativos las CuNps en la conjugación bacteriana y ayuda a reforzar la idea de que el efecto sobre la conjugación es principalmente asociado a los iones Cu.

### **Capacidad degradativa de las cepas transconjugantes *Pseudomonas putida* KT2440 y *Pseudomonas* RG8 portadoras de los plásmidos catabólicos pJP4 y pADP-1**

*P. putida* KT2440 es una bacteria del suelo que ha sido certificada como huésped bioseguro para la clonación de genes foráneos según el Comité Asesor de ADN Recombinante y es el huésped preferido para la clonación y la expresión génica entre las bacterias del suelo Gramnegativas (Nelson et al., 2002). Sin embargo, las cepas transconjugantes *P. putida* KT2440 portadora del plásmido pJP4 y *P. putida* KT2440 portadora del plásmido pRO101 no fueron capaces de degradar 2,4-D. Este efecto ha sido descrito previamente (diGiovanni et al., 1996; Clément et al., 2001; Goris et al., 2002; Pérez-Pantoja et al., 2008), por lo que se sugieren dos posibles causas: A) una posibilidad es que las cepas transconjugantes no tienen suficientes copias de los plásmidos requeridos para la degradación, ya que aunque estos plásmidos tiene dos operones *tfd*, se requieren al menos 5 copias de plásmido por célula para que las bacterias realicen el metabolismo de 2,4-D (Pérez-Pantoja et al., 2008), B) otra posible causa es que las cepas transconjugantes hayan perdido genes, ya que se ha descrito que el plásmido pJP4 presenta secuencias de inserción flanqueando los genes degradativos lo que facilita su pérdida (Don y Pemberton, 1985; Martínez et al., 2001; Wackett et al., 2002; Juhas et al., 2009). De

hecho, Clément et al. (2001) demostró que *C. pinatubonensis* JPM134 es capaz de perder fragmentos del plásmido pJP4 y generar cepas incapaces de metabolizar 2,4-D.

Por su parte, ambas cepas transconjugantes de *Pseudomonas* sp. RG8 (*Pseudomonas* sp. RG8 con el plásmido pJP4 y *Pseudomonas* sp. RG8 con el plásmido pADP-1) metabolizaron los plaguicidas 2,4-D y atrazina, respectivamente. Esto indica que *Pseudomonas* sp. RG8 fue capaz de adquirir y expresar los genes degradativos que permiten la metabolización de los plaguicidas.

#### **Toxicidad del peróxido de hidrógeno sobre la cepa portadora del plásmido catabólico pRO101 *C. pinatubonensis* AEO106**

Los resultados de CMI frente  $H_2O_2$  mostraron que *C. pinatubonensis* AEO106 fue inhibida en presencia de 1 mM. En este sentido, Svenningsen et al. (2017) demostraron que *C. pinatubonensis* AEO106 incubada en medio mínimo con el plaguicida ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (MCPA) como única fuente de carbono en presencia de peróxido de hidrógeno, respondió al estrés oxidativo antes de inducir la expresión de los genes para degradar el plaguicida. Nuestros resultados demuestran que *C. pinatubonensis* con fuente de carbono (caldo LB) es menos afectada por cobre o  $H_2O_2$ , ya que se requirió mayores concentraciones de estos compuestos para inhibir su desarrollo. Esto sugiere que la materia orgánica presente en el caldo LB forma complejos con el cobre o el  $H_2O_2$ , reduciendo su toxicidad sobre las células bacterianas.

## **Efecto del sulfato de cobre y peróxido sobre la transferencia del plásmido pRO101 desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT2440**

Se ha descrito que el plásmido F de *E. coli* presenta una velocidad de transferencia mediante conjugación de alrededor de 45 kb por minuto a 37 °C (Lanka & Wilkins, 1995; Andrup & Andersen, 1999; Lawley et al., 2004). Este plásmido tiene un tamaño de aproximadamente 100 kb, lo cual implica que se transfiere en menos de 2 minutos (Wilkins & Frost, 2002; Arutyunov & Frost, 2013).

Los resultados de esta investigación demuestran que el plásmido pRO101 se transfiere desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT240 en menos de 5 minutos. Además, se observó que en presencia de concentraciones subinibitorias de CuSO<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se transfiere en frecuencias similares al control. Sin embargo, se observó que ocurrió también transferencia en presencia de concentraciones sobre la CMI, lo que podría sugerir que la conjugación sería más rápida que la acción tóxica de dichos compuestos, permitiendo la transferencia del material genético en dichas condiciones.

El plásmido F es el plásmido conjugativo más estudiado (Arutyunov & Frost, 2013). Este plásmido pertenece a una familia de plásmidos distinta a IncP del plásmido pRO101 y posee otros mecanismos de regulación de los genes *tra* (De la Cruz et al., 2010). En este sentido, no se habían estudiado hasta la fecha la velocidad de transferencia de algún plásmido de la familia IncP, a pesar de ser una de las familias de plásmidos más estudiadas debido a su amplio rango de huésped, su aparente prevalencia en el ambiente y su notable capacidad para transferir genes que permiten la degradación de compuestos tóxicos u otras propiedades como por ejemplo la resistencia a antibióticos (Dennis, 2005; De la Cruz et al., 2010).

Además del tiempo de incubación del par conjugante con CuSO<sub>4</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, existe la posibilidad de que ocurra conjugación posteriormente en las placas para selección de transconjugantes, ya que el efecto de los agentes selectivos no es instantáneo, sino que demoran un cierto tiempo. Por ejemplo, se ha descrito que la acción de la kanamicina demora como mínimo 10 min (Garrett & Won, 1973).

### **Efecto del sulfato de cobre en la expresión del gen *traK* durante la conjugación del plásmido pRO101 desde *C. pinatubonensis* AEO106 a *P. putida* KT2440**

El cobre ejerce toxicidad sobre las células bacterianas de forma directa sobre ciertas enzimas (Macomber & Imlay, 2009; Lemire et al., 2013) o indirecta mediante la acción de las ROS sobre diversos componentes celulares (Svenningsen et al., 2017; Klümper et al., 2017). Probablemente dicha toxicidad sea el resultado de la combinación de estos diferentes mecanismos.

Se ha demostrado que el cobre puede modular la expresión de diversos genes bacterianos (Bondarenko et al., 2012; Gao et al., 2012; Guo et al., 2017; Svenningsen et al., 2017). En este caso, se utilizó el gen *traK* debido a que codifica para una proteína que permite el comienzo del procesamiento del ADN en la conjugación (Smillie et al., 2010). Es decir, su expresión se incrementa una vez que una célula dadora reconoce una célula receptora y ocurre unión entre ellas (Zatyka et al., 1994; Zatyka & Thomas, 1998).

Nuestros resultados indican que la expresión del gen *traK* fue levemente menor en el control comparado con la expresión en presencia de cobre; sin embargo, esta diferencia no es significativa ( $p < 0.05$ ). Además, la conjugación fue similar en dichas

condiciones. Por lo tanto, se sugiere que el debido a la rapidez con la que ocurre la transferencia, probablemente ocurrió un aumento en la expresión del gen *traK* en algún un momento anterior al momento en el cual se realizó la determinación. En este sentido, es sabido que la expresión de los genes *tra* que codifican para las enzimas que realizan el procesamiento del ADN plasmidial, se encuentra muy regulada para evitar un “agobio” en las células (Zatyka et al., 1994; Zatyka & Thomas, 1998).



## VIII. CONCLUSIONES

La disolución de las nanopartículas de cobre es más rápida en presencia de materia orgánica, lo cual genera un efecto negativo en la transferencia por conjugación de los plásmidos pJP4 y pADP-1.

Las cepas bacterianas transconjugantes *P. putida* KT240 portadoras de genes *tfd* no son capaces de degradar el plaguicida 2,4-D como única fuente de carbono.

Los plásmidos de la familia IncP-1 son transferidos mediante conjugación rápidamente en menos de 5 minutos, lo cual contribuiría a su diseminación en presencia de compuestos tóxicos.



Las bacterias portadoras de plásmidos degradativos son capaces de transferir estos elementos genéticos a pesar de estar dañadas y en tránsito a la muerte, lo cual podría ser un mecanismo de resguardo para evitar la extinción de estos genes beneficiosos para el ambiente.

## IX. PROYECCIONES

El uso de pesticidas es un problema de salud pública, ya que su uso desmedido genera efectos nocivos en el ambiente, por lo que se requieren más estudios que vinculen las propiedades degradativas de las comunidades microbianas con la incorporación de estos u otros compuestos agroindustriales recalcitrantes.

Se requieren más estudios que permitan establecer si el uso de nanopartículas de cobre o sales de cobre afectan negativamente las capacidades biodegradativas de las comunidades bacterianas.



## X. GLOSARIO

CuNPs: nanopartículas de cobre.

2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiacético

CuSO<sub>4</sub>: sulfato de cobre

Atrazina: 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina

THG: transferencia horizontal de genes

Genes tra: genes que permiten la transferencia de plásmidos por conjugación

Genes *tfd*: genes que permiten la degradación de 2,4-D

Genes *atz*: genes que permiten la degradación de atrazina

AgNps: nanopartículas de plata

CMI: concentración mínima inhibitoria

CMB: concentración mínima bactericida

TEM: microscopía electrónica de transmisión

SEM: microscopía electrónica de barrido

ROS: especies reactivas de oxígeno

CuONPs: nanopartículas de óxido de cobre

Genes *mer*: genes que otorgan resistencia a mercurio

LB: Luria Bertani

Tc: tetraciclina

Kn: kanamicina

Rif. rifampicina

HgCl<sub>2</sub>: cloruro de mercurio

MSM: medio salino mineral

DLS: dispersión dinámica de la luz

XRD: difracción de rayos X

AAS: espectrofotometría de absorción atómica

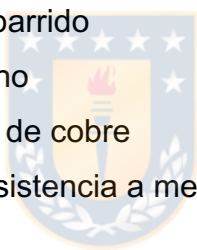
HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

DO: densidad óptica

FC: frecuencia de conjugación

PI: yoduro de propidio





## IX: REFERENCIAS

1. Abigail, M. E. A., & Nilanjana, D. (2012). Microbial degradation of atrazine, commonly used herbicide. *Int J Adv Biol Res*, 2, 16-23.
2. Abigail, M. E. A., Lakshmi, V., & Das, N. (2012). Biodegradation of atrazine by *Cryptococcus laurentii* isolated from contaminated agricultural soil. *J Microbiol Biotech Res*, 2, 450-457.
3. Adamczyk, M., & Jagura-Burdzy, G. (2003). Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochimica Polonica*, 50(2), 425-453.
4. Ahn Y., S. Rhee, D. Fennell, L. Kerkhof, U. Hentschel, M. Haggblom. (2003). Reductive dehalogenation of brominated phenolic compounds by microorganisms associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl Environ Microbiol* 69:4159–4166.
5. Aguayo J., C. González, R. Barra, J. Becerra & M. Martínez. (2014). Degradation of 2, 4, 6 tribromophenol and 2, 4, 6 trichlorophenol by aerobic heterotrophic bacteria present in psychrophilic lakes. *World J Microbiol Biotechnol* 25:553–560.
6. Aguayo P., C. González, R. Barra, J. Becerra, M. Martínez. (2014). Herbicides induce change in metabolic and genetic diversity of bacterial community from a cold oligotrophic lake. *World J Microbiol Biotechnol* 30:1101–1110.
7. Alvarez-Martinez, C. E., & Christie, P. J. (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 73(4), 775-808.
8. Andersson, D., & Hughes, D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?." *Nature Reviews Microbiology* 8.4: 260.
9. Andrup, L., & Andersen, K. (1999). A comparison of the kinetics of plasmid transfer in the conjugation systems encoded by the F plasmid from *Escherichia coli* and plasmid pCF10 from *Enterococcus faecalis*. *Microbiology*, 145(8), 2001-2009.

10. Anthony, K. G., C. Sherburne, R. Sherburne and L. S. Frost. (1994). The role of the pilus in recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids. *Mol Microbiol* 13: 939–953.
11. Aranda C., F. Godoy, J. Becerra, R. Barra & M. Martínez. (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* 14:265–274.
12. Arutyunov, D., & Frost, L. S. (2013). F conjugation: back to the beginning. *Plasmid*, 70(1), 18-32.
13. Bahl, M. I., Hansen, L. H., Goesmann, A., & Sørensen, S. J. (2007). The multiple antibiotic resistance IncP-1 plasmid pKJK5 isolated from a soil environment is phylogenetically divergent from members of the previously established  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\delta$  sub-groups. *Plasmid*, 58(1), 31-43.
14. Barros, J., Becerra, J., González, C., Martínez, M. (2013). Antibacterial metabolites synthesized by psychrotrophic bacteria isolated from cold-freshwater environments. *Folia Microbiol.* 58 (2), 127–133.
15. 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.
16. Berndt, C., P. Meier & W. Wackernagel. (2003). DNA restriction is a barrier to natural transformation in *Pseudomonas stutzeri* JM300. *Microbiology*. 149: 895–901.
17. Bondarenko, O., Ivask, A., Käkinen, A., Kahru, A. (2012). Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action. *Environ. Poll.* 169, 81–89.
18. Boundy-Mills, K. L., de Souza, M. L., Mandelbaum, R. T., Wackett, L. P. and Sadowsky, M. J. (1997) The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 916 – 923.

19. Bukowska, B. (2006). Toxicity of 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid- Molecular Mechanisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(3), 365-374.
20. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods*, 63(3), 219-228.
21. Cavicchioli R., M. Ostrowski, F. Fegatella, A. Goodchild & N. Guixa-Boixereu. (2003). Life under nutrient limitation in oligotrophic marine environments: an eco/ physiological perspective of *Sphingopyxis alaskensis* (formerly *Sphingomonas alaskensis*). *Microbial Ecology* **45**:203–217.
22. Chatterjee, A. K., Sarkar, R. K., Chattopadhyay, A. P., Aich, P., Chakraborty, R., & Basu, T. (2012). A simple robust method for synthesis of metallic copper nanoparticles of high antibacterial potency against *E. coli*. *Nanotechnology*, 23(8), 085103.
23. Chatterjee, A. K., Chakraborty, R., & Basu, T. (2014). Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology*, 25(13), 135101.
24. Chen I., Dubnau D. (2004). DNA uptake during natural transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 241–249.
25. Cheng, G., Shapir, N., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2005). Allophanate hydrolase, not urease, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4437-4445.
26. Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., & Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 451-485.
27. Cioffi, N., Torsi, L., Ditaranto, N., Tantillo, G., Ghibelli, L., Sabbatini, L. & Traversa, E. (2005). Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials*, 17(21), 5255-5262.
28. Clément P., Matus, V., Cardenas, L., & Gonzalez, B. (1995). Degradation of trichlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *FEMS microbiology letters*, 127(1-2), 51-55.

29. Clément, P., Pieper, D.H., González, B. (2001). Molecular characterization of a deletion/ duplication rearrangement in *tfd* genes from *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) that improves growth on 3-chlorobenzoic acid but abolishes growth on 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Microbiology* 147 (8), 2141–2148.
30. Cork, D. J., & Khalil, A. (1995). Detection, isolation, and stability of megaplasmid-encoded chloroaromatic herbicide-degrading genes within *Pseudomonas* species. *Adv Appl Microbiol* 40, 289-321.
31. De La Cruz, F., Frost, L. S., Meyer, R. J., & Zechner, E. L. (2010). Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34(1), 18-40.
32. De Souza, M. L., Sadowsky, M. J. and Wackett, L. P. (1996) Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. *J Bacteriol* 178, 4894–4900.
33. De Souza, M. L., Wackett, L. P., Boundy-Mills, K. L., Mandelbaum, R. T. and Sadowsky, M. J. (1995) Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Appl. Environ. Microb.* 61, 3373–3378.
34. De Souza, M. L., Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D. E., Hay, A., Sadowsky, M. J. and Wackett, L. P. (1998) Molecular basis of a bacterial consortium interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microb.* 64, 178 – 184.
35. 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.
36. Dennis, J. J. (2005). The evolution of IncP catabolic plasmids. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3), 291-298.
37. Díaz E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *Int. Microbiol.* **7** (3): 173–180.
38. DiGiovanni, G.D., Neilson, J.W., Pepper, I.L., Sinclair, N.A (1996). Gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (7), 2521–2526.

39. Dinamarca, M. A., Cereceda-Balic, F., Fadic, X., & Seeger, M. (2010). Analysis of s-triazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration and tetrazolium-salt detection. *International Microbiology*, 10(3), 209-215.
40. Dinesh, R., Anandaraj, M., Srinivasan, V., & Hamza, S. (2012). Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma*, 173, 19-27.
41. 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.
42. Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., & Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 44, 278-284.
43. Don R.H. & J. M. Pemberton. (1981). Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **145** (2): 681-686.
44. Don R. H. & J. M. Pemberton. (1985). Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **161** (1): 466- 468.
45. 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.
46. Dubnau D. (1999). DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 217-244.
47. Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A., & Kuske, C. R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1662-1669.
48. Evans W. B. Smith, H. Zernley & J. Davies. (1971). Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Biochem. J.* 122:543-551.

49. Flemming, C. A., & Trevors, J. T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 44(1-2), 143-158.
50. Franklin, F.C., Bagdasarian, M., Bagdasarian, M.M., Timmis, K.N. (1981). Molecular and functional analysis of the TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of genes for the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (12), 7458–7462.
51. Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 722.
52. Gao C-h, Yang M, He Z-G (2012). Characterization of a Novel ArsR-Like Regulator Encoded by Rv2034 in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* 7(4): e36255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036255>
53. Garbisu, C., Garaiurrebaso, O., Epelde, L., Grohmann, E., Alkorta, I. (2017). Plasmid-mediated bioaugmentation for the bioremediation of contaminated soils. *Front. Microbiol.* 8:1966.
54. García-González, V., Govantes, F., Shaw, L. J., Burns, R. G., & Santero, E. (2003). Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 6987-6993.
55. Garrett, E. R., & Won, C. M. (1973). Kinetics and mechanisms of drug action on microorganisms XVII: Bactericidal effects of penicillin, kanamycin, and rifampin with and without organism pretreatment with bacteriostatic chloramphenicol, tetracycline, and novobiocin. *Journal of pharmaceutical sciences*, 62(10), 1666-1673.
56. Garland J (1996) Analytical approaches to the characterization of samples of microbial communities using patterns of potential source utilization. *Soil Biol Biochem* 28:213–221.
57. Gasson M.J., Davies F.L. (1980). High-frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. *J. Bacteriol.* **143** (3):1260-1264.
58. Ghosal D, You IS, Chatterjee OK, Chakrabany AM (1985) Genes specifying degradation of 3-chlorobenzoic acid in plasmids pAC27 and pJP4. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 1638-1642.

59. Gogarten J.P., Doolittle W.F., Lawrence J.G. (2002). Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol.* **19** (12): 2226–2238.
60. Gomez E., L. Ferreras & S. Toresani. (2006). Soil bacteria functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technol* 97:1484–1489.
61. Gomez E., J. Garland & M. Conti. (2004). Reproducibility in the response of soil bacterial community-level physiological profiles from a land use intensification gradient. *Appl. Soil Ecol.* 26, 21e30.
62. 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. *Syst. Appl. Microbiol.* 25 (3), 340–352.
63. Govantes, F., Porrúa, O., García-González, V., & Santero, E. (2009). Atrazine biodegradation in the lab and in the field: enzymatic activities and gene regulation. *Microbial biotechnology*, 2(2), 178-185.
64. Graves Jr., J.L., Tajkarimi, M., Cunningham, Q., Campbell, A., Nonga, H., Harrison, S.H., Barrick, J.E. (2015). Rapid evolution of silver nanoparticle resistance in *Escherichia coli*. *Front. Genet.* 6, 42.
65. Grohmann, E., Christie, P. J., Waksman, G., & Backert, S. (2018). Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Molecular microbiology*, 107(4), 455-471.
66. Gunasekara AS, Troiano J, Goh KS & Tjeerdema RS (2007) Chemistry and fate of simazine. *Rev Environ Contam Toxicol* 189: 1–23.
67. Gunawan, C., Teoh, W.Y., Marquis, C.P., Amal, R. (2011). Cytotoxic origin of copper (II) oxide nanoparticles: comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts. *ACS Nano* 5 (9), 7214–7225.+
68. Guo, J., Gao, S.H., Lu, J., Bond, P.L., Verstraete, W., Yuan, Z., 2017. Copper oxide nanoparticles induce lysogenic bacteriophage and metal-resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9 (27), 22298–22307.

69. Hajipour, M.J., Fromm, K.M., Ashkarran, A.A., de Aberasturi, D.J., de Larramendi, I.R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J., Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 30 (10), 499–511.
70. Hamilton, H. L. and J. P. Dillard. (2006). Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Molecular Microbiology.* 59 (2): 376-385.
71. Hamilton, C. M., Lee, H., Li, P. L., Cook, D. M., Piper, K. R., von Bodman, S. B., Lanka, E., Ream, W., & Farrand, S. K. (2000). TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *Journal of Bacteriology*, 182(6), 1541-1548.
72. Harker, A. R., Olsen, R. H., & Seidler, R. J. (1989). Phenoxyacetic acid degradation by the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (TFD) pathway of plasmid pJP4: mapping and characterization of the TFD regulatory gene, *tfdR*. *Journal of bacteriology*, 171(1), 314-320.
73. Harvey W. A. & W. W. Robbins. (1947). 2, 4-D as a weed killer. Circular of California Agricultural Extension Service. College of Agriculture, University of California, Berkeley. 133: 1-10.
74. Hernández, M., Villalobos, P., Morgante, V., González, M., Reiff, C., Moore, E., & Seeger, M. (2008). Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from agricultural soil of central Chile, *Pseudomonas* sp. MHP41. *FEMS microbiology letters*, 286(2), 184-190.
75. Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., Wang, H., Wang, Y., Shao, W., He, N., Hong, J., Chen, C. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 18, 105104–105114.
76. Imfeld G. & S. Vuilleumier. (2012). Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *European Journal of Soil Biology.* 49:22-30.



77. Ingale, A. G., & Chaudhari, A. N. (2013). Biogenic synthesis of nanoparticles and potential applications: An eco-friendly approach. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 2013.
78. Ishiwa, A. and T. Komano. (2004). PilV adhesins of plasmid R64 thin pili specifically bind to the lipopolysaccharides of recipient cells. *Journal Molecular Biology*. 343: 615–625.
79. Jacobsen C. & M. Hjelmso. (2014). Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Current opinion in Biotechnology*. 27:15-20.
80. 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.
81. Janssen, D. B., Dinkla, I. J., Poelarends, G. J., & Terpstra, P. (2005). Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environmental microbiology*, 7(12), 1868-1882.
82. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein journal of nanotechnology*, 9(1), 1050-1074.
83. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. (1998). Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clin. Infect. Dis.* **26**: 973-980.
84. Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., Crook, D.W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 33 (2), 376–393.
85. Kaweeterawat, C., Chang, C.H., Roy, K.R., Liu, R., Li, R., Toso, D., Fischer, H., Ivask, A., Ji, Z., Zink, J.I., Zhou, Z.H., Chanfreau, G.F., Telesca, D., Cohen, Y., Holden, P.A., Nel, A.E., Godwin, H.A., 2015. Cu nanoparticles have different impacts in *Escherichia coli* and *Lactobacillus brevis* than their micro-sized and ionic analogues. *ACS Nano* 9 (7), 7215–7225.
86. Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H., Cho, M.H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: NBM* 3 (1), 95–101.

87. Kjelleberg S., B. Humphrey & K. Marshall. (1983). Initial Phases of Starvation and Activity of Bacteria at Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(5):978-984.
88. Klaine, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R. (2008). Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **27** (9), 1825–1851.
89. Klümper, U., Dechesne, A., Riber, L., Brandt, K.K., Gulay, A., Sorensen, S.J., Smets, B.F. (2017). Metal stressors consistently modulate bacterial conjugal plasmid uptake potential in a phylogenetically conserved manner. *ISME J.* **11** (1), 152–165.
90. Klümper, U., Riber, L., Dechesne, A., Sannazzarro, A., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Smets, B. F. (2015). Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community. *The ISME journal*, **9**(4), 934.
91. Kolic N.U., Hrsak D., Kolar, A.B., Petric I., Stipicevic, S., Soulas, G., Martin-Laurent F. (2007). Combined metabolic activity with an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. *Int. Biodet. Biodeg.*, **60**, 299-307.
92. Koraimann, G., & Wagner, M. A. (2014). Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **4**, 54.
93. Laemmli, C. M., J. H. Leveau, A. J. B. Zehnder, and J. R. van der Meer. (2000). Characterization of a second *tfd* gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J. Bacteriol.* **182**:4165–4172.
94. Lanka, E., & Wilkins, B. M. (1995). DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annual review of biochemistry*, **64**(1), 141-169.
95. Lawley, T., Frost, L. S., & Wilkins, B. M. (2004). Bacterial conjugation in gram-negative bacteria. In *Plasmid biology* (pp. 203-226). American Society of Microbiology.
96. 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.

97. Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(6), 371-384.
98. Leveau, J. H., F. König, H. Fuchslin, C. Werlen, and J. R. van der Meer. (1999). Dynamics of multigene expression during catabolic adaptation of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Mol. Microbiol.* **33**:396–406.
99. Leveau, J. H., and J. R. van der Meer. (1996). The *tfdR* gene product can successfully take over the role of the insertion element-inactivated *tfdT* protein as a transcriptional activator of the *tfdCDEF* gene cluster, which encodes chlorocatechol degradation in *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *J. Bacteriol.* **178**:6824–6832.
100. Li, L., Dechesne, A., He, Z., Madsen, J. S., Nesme, J., Sørensen, S. J., & Smets, B. F. (2018). Estimating the transfer range of plasmids encoding antimicrobial resistance in a wastewater treatment plant microbial community. *Environmental Science & Technology Letters*, *5*(5), 260-265.
101. Llosa, M., F. X. Gomis-Rüth, M. Coll and F. de la Cruz. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*. *45* (1): 1-8.
102. Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H. & Che, C. M. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome research*, *5*(4), 916-924.
103. Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H. & Che, C. M. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *12*(4), 527-534.
104. Loomis D., Guyton K., Grosse Y., El Ghissasi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Guha N., H. Mattock & K. Straif. (2015) Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Lancet Oncol.* *16*:891–892.
105. Lorenz M.G., Wackernagel W. (1994). Bacterial gene-transfer by natural genetic-transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58** (3): 563–602.

106. Lykidis, A., Pérez-Pantoja, D., Ledger, T., Mavromatis, K., Anderson, I.J., Ivanova, N.N., *et al.* (2010) The complete multipartite genome sequence of *Cupriavidus necator* JMP134, a versatile pollutant degrader. *PLoS ONE* 5:9729.
107. Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(20), 8344-8349.
108. Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., & Wackett, L. P. (1995). Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1451-1457.
109. Mandelbaum, R. T., Wackett, L. P., & Allan, D. L. (1993). Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1695-1701.
110. Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L. P., Wing, R., & Sadowsky, M. J. (2001). Complete Nucleotide Sequence and Organization of the Atrazine Catabolic Plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5684-5697.
111. Michalowicz J & Wirgiliusz D. (2007). Phenols transformations in the environment and living organisms. *Current Topics in Biophysics* 30, 24-36.
112. Morita R. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriological Reviews*. 39: 144-167.
113. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
114. Munro I. C., Carlo G. L., Orr J. C., Sund K. G., Wilson R. M., Kennepohl E. & Jablinske M. (1992). A comprehensive, integrated review and evaluation of the scientific evidence relating to the safety of the herbicide 2, 4-D. *International Journal of Toxicology*, 11(5), 559-664.

115. 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.
116. Musovic, S., Klümper, U., Dechesne, A., Magid, J., & Smets, B. F. (2014). Long-term manure exposure increases soil bacterial community potential for plasmid uptake. *Environmental microbiology reports*, 6(2), 125-130.
117. Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311 (5761), 622–627.
118. Neal, A. L. (2008). What can be inferred from bacterium–nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles?. *Ecotoxicology*, 17(5), 362-371.
119. 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. *Applied and environmental microbiology*, 58(4), 1271-1275.
120. Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V. A. P., ... & Brinkac, L. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental microbiology*, 4(12), 799-808.
121. Newby D. T., & Pepper, I. L. (2002). Dispersal of plasmid pJP4 in unsaturated and saturated 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid contaminated soil. *FEMS microbiology ecology*, 39(2), 157-164.
122. Norberg P, Bergstrom M, Jethava V, Dubhashi D, Hermansson M. (2011). The IncP-1 plasmid backbone adapts to different host bacterial species and evolves through homologous recombination. *Nat Commun.* 2:268.
123. Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1527), 2275-2289.
124. Nowack, B., Bucheli, T.D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150 (1), 5–22.

125. Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823-839.
126. Ochman, H., Lawrence, J. G., Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 405(6784):299-304.
127. Ou, J.T., Anderson, T.F. (1972). Effect of Zn<sup>2+</sup> on bacterial conjugation: inhibition of mating pair formation. *J. Bacteriol.* 111 (1), 177–185.
128. Ou, J.T., (1973). Effect of Zn<sup>2+</sup> on bacterial conjugation: increase in ability of F<sup>-</sup> cells to form mating pairs. *J. Bacteriol.* 115 (2), 648–654.
129. Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), 1712-1720.
130. Parada, J., Rubilar, O., Diez, M.C., Cea, M., Sant'Ana da Silva, A., Rodriguez-Rodriguez, C.E., Tortella, G.R. (2019). Combined pollution of copper nanoparticles and atrazine in soil: effects on dissipation of the pesticide and on microbiological community profiles. *J. Hazard Mater.* 361, 228–236.
131. Pemberton J. M. & R. H. Don. (1981). Plasmids of agricultural and environmental importance. *Agric. Environ.* 6:23-32.
132. Pérez-Pantoja D, De la Iglesia R, Pieper DH, Gonzalez B (2008) Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant- degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiol Rev* 32: 736– 794.
133. Pérez-Pantoja D., L. Guzmán, M. Manzano, D. H. Pieper, and B. González. (2000). Role of *tfdCIDIEIFI* and *tfdDIICIIIFII* gene modules in catabolism of 3-chlorobenzoate by *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1602–1608.
134. Perkins E. J., M. P. Gordon, O. Caceres & P. F. Lurquin. (1990). Organization and sequence analysis of the 2, 4-dichlorophenol hydroxylase and

- dichlorocatechol oxidative operons of plasmid pJP4. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2351-2359.
135. Pieper, D.H., González, B., Cámara, B., Pérez-Pantoja, D., and Reineke, W. (2010) Aerobic degradation of chloroaromatics. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 839–864.
  136. Piutti, S., Semon, E., Landry, D., Hartmann, A., Dousset, S., Lichtfouse, E., Topp, E., Soulas, G. and Martin- Laurent, F. (2003) Isolation and characterisation of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk- and maize rhizosphere soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 111–117.
  137. Popowska, M., & Krawczyk-Balska, A. (2013). Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Frontiers in microbiology*, 4, 44.
  138. Plumeier, I., D. Pérez-Pantoja, S. Heim, B. González, and D. H. Pieper. (2002). The importance of different *tfd* genes for the degradation of chloroaromatics by *Ralstonia eutropha* JMP134. *J. Bacteriol.* **184**:4054–4064.
  139. Radosevich, M., Traina, S. J., Hao, Y. L., & Tuovinen, O. H. (1995). Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 297-302.
  140. Raffi, M., Mehrwan, S., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A., Yawar, W. & Hasan, M. M. (2010). Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*, 60(1), 75-80.
  141. Rai, V., & Bai, J. A. (2011). Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. A Méndez-Vilas A, editor. Mysore: Formatex.
  142. Rai, M., Yadav, A., Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of anti- microbials. *Biotechnol. Adv.* 27 (1), 76–83..
  143. Ralebitso, T. K., Senior, E., & Van Verseveld, H. W. (2002). Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation*, 13(1), 11-19.

144. Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G., & Rahuman, A. A. (2012). Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Materials Letters*, 71, 114-116.
145. Ravishankar Rai, V., & Jamuna Bai, A. (2011). Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. *Science against microbial pathogens, communicating current research and technological advances*. Formatex, Badajoz, 197-209.
146. Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M.F., Ok, Y.S., Adrees, M., Ibrahim, M., Zia-ur-Rehman, M., Farid, M., Abbas, F. (2017). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *J. Hazard Mater.* 322, 2–16.
147. Roberts T. R. (1998). *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 1. Herbicides and Plant Regulators*. Royal Society of Chemistry.
148. Roper M.M. & V. Gupta. (1995). Management practices and soil biota. *Aust. J. Soil Res.* 33, 321–339.
149. Roszak D. B. & R. R. Colwell. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51 (3): 365-379.
150. Rousseaux, S., Hartmann, A., & Soulas, G. (2001). Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 211-222.
151. Sadowsky, M. J., Tong, Z., de Souza, M., & Wackett, L. P. (1998). AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *Journal of bacteriology*, 180(1), 152-158.
152. Sandmann E., M. A. Loos & L. P. van Dyk. (1988). The microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 101:1-53.
153. Santacruz G., E. R. Bandala & L. G. Torres. (2005). Chlorinated pesticides (2,4-D and DDT) biodegradation at high concentrations using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Environmental Science and Health -*



Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, vol. 40, no. 4, pp. 571– 583.

154. Satsuma, K. (2006) Characterisation of new strains of atrazine-degrading *Nocardioides* sp isolated from Japanese riverbed sediment using naturally derived river ecosystem. *Pest Manag. Sci.* 62, 340 –349.
155. 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.
156. Schlömann, M., Schmidt, E., & Knackmuss, H. J. (1990). Different types of diene lactone hydrolase in 4-fluorobenzoate-utilizing bacteria. *Journal of bacteriology*, 172(9), 5112-5118.
157. Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., & Top, E. M. (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 449-477.
158. Seffernick, J. L., de Souza, M. L., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2001). Melamine deaminase and atrazine chlorohydrolase: 98 percent identical but functionally different. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2405-2410.
159. Sekhon, B.S. (2014). Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnol. Sci. Appl.* 7, 31.
160. Sen D, Van Der Auwera G, Rogers L, Thomas CM, Brown CJ, Top EM. (2011). Broad-host-range plasmids from agricultural soils have IncP-1 backbones with diverse accessory genes. *Appl Environ Microbiol.* 77: 7975–7983.
161. Sen D, Yano H, Suzuki H, Krol JE, Rogers L, Brown CJ, Top EM. (2010). Comparative genomics of pAKD4, the prototype IncP-1d plasmid with a complete backbone. *Plasmid* 63:98–107.
162. Sen, D., Brown, C. J., Top, E. M., & Sullivan, J. (2012). Inferring the evolutionary history of IncP-1 plasmids despite incongruence among backbone gene trees. *Molecular biology and evolution*, 30(1), 154-166

163. Sene, L., Converti, A., Secchi, G. A. R., & Simão, R. D. C. G. (2010). New aspects on atrazine biodegradation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(2), 487-496.
164. Seo J.S., Y. S. Keum & Q. X. Li. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1), 278–309.
165. Shao, Z. Q., Seffens, W., Mulbry, W., Behki, R. M. (1995) Cloning and expression of the s-triazine hydrolase gene (*trzA*) from *Rhodococcus corallinus* and development of *Rhodococcus* recombinant strains capable of dealkylating and dechlorinating the herbicide atrazine. *J. Bacteriol.* 177, 5748 – 5755.
166. Shapir, N., M.J. Sadowsky, and L.P. Wackett. (2005). Purification and characterization of allophanate hydrolase (*atzF*) from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J. Bacteriol.* 187:3731–3738.
167. Shelton, D. R., Khader S., Karns, J. S. and Pogel, B. M. (1996) Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. *Biodegradation*. 7, 129–13.
168. Shiomi, N. (2013). A Novel Bioremediation Method for Shallow Layers of Soil Polluted by Pesticides. *Edited by Yogesh B. Patil and Prakash Rao*, 285.
169. Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74(3), 434-452.
170. Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182.
171. Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 700.
172. Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472.a
173. Streber W. R., K. N. Timmis & M. H. Zenk. (1987). Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *J. Bacteriol.* 169:2950-2955.

174. Strong LC, Rosendahl C, Johnson G, Sadowsky MJ & Wackett LP (2002) *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Appl Environ Microbiol* 68: 5973–5980.
175. Suresh, Y., Annapurna, S., Singh, A.K., Bhikshamaiah, G. (2014). Green synthesis and characterization of tea decoction stabilized copper nanoparticles. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol.* 3, 11265–11270.
176. Svenningsen, N. B., Damgaard, M., Rasmussen, M., Pérez-Pantoja, D., Nybroe, O., & Nicolaisen, M. H. (2017). *Cupriavidus pinatubonensis* AEO106 deals with copper-induced oxidative stress before engaging in biodegradation of the herbicide 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid. *BMC microbiology*, 17(1), 211.
177. Tappe, W., Groeneweg, J., & Jantsch, B. (2002). Diffuse atrazine pollution in German aquifers. *Biodegradation*, 13(1), 3-10.
178. Theivasanthi, T., & Alagar, M. (2011). Studies of copper nanoparticles effects on micro-organisms. *arXiv preprint arXiv:1110.1372*.
179. Thomas, C. M., & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 711-721.
180. 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.
181. Topp, E., Zhu, H., Nour, S. M., Houot, S., Lewis, M., & Cuppels, D. (2000). Characterization of an Atrazine-Degrading *Pseudaminobacter* sp. Isolated from Canadian and French Agricultural Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2773-2782.
182. Torrella F. & R. Y. Morita. (1981). Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(2): 518- 527.
183. 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.
184. 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.
  185. Tu M., C. Hurd, J. Randall & The Nature Conservancy. (2001). *Weed Control Methods Handbook: Tools & Techniques for Use in Natural Areas*. All U.S. Government Documents (Utah Regional Depository). Paper 533.
  186. Usman M. (2013). Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *International journal of nanomedicine*, **8**, 4467-4479.
  187. Vale, G., Mehennaoui, K., Cambier, S., Libralato, G., Jomini, S., & Domingos, R. F. (2016). Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: a critical overview. *Aquatic Toxicology*, **170**, 162-174.
  188. Vargas Gil S., J. Meriles, C. Conforto, M. Basanta, V. Radl, A. Hagn, M. Schloter, G. J. March. (2011). Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. *European Journal of Soil Biology*. **47**:55-60.
  189. Vetter W. & D. Janussen. (2005) Halogenated natural products in five species of antarctic sponges: compounds with POP-like properties? *Environ Sci Technol* **39**:3889–3895.
  190. Vulkan, R., Zhao, F. J., Barbosa-Jefferson, V., Preston, S., Paton, G. I., Tipping, E., & McGrath, S. P. (2000). Copper speciation and impacts on bacterial biosensors in the pore water of copper-contaminated soils. *Environmental Science & Technology*, **34**(24), 5115-5121.
  191. Wackett L., Sadowsky, M., Martinez, B., & Shapir, N. (2002). Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**(1), 39-45.

192. Wang, D., Lin, Z., Wang, T., Yao, Z., Qin, M., Zheng, S., Lu, W. (2016). Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: the nanoparticles, the ions, or a combination of both? *J. Hazard Mater.* 308, 328–334.
193. Wang Z., Lee, Y. H., Wu, B., Horst, A., Kang, Y., Tang, Y. J., & Chen, D. R. (2010). Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 80(5), 525-529.
194. Wang, Y., Kou, S., Jiang, Q., Xu, B., Liu, X., Xiao, J., Tian, Y., Zhou, Ch., Zhang, Ch., Xiao, M. (2014). Factors affecting transfer of degradative plasmids between bacteria in soils. *Appl. Soil Ecol.* 84:254–261.
195. Wang, X., Yang, F., Zhao, J., Xu, Y., Mao, D., Zhu, X., Luo, Y., Alvarez, P. J. J. (2018). Bacterial exposure to ZnO nanoparticles facilitates horizontal transfer of antibiotic resistance genes. *NanoImpact.* 10:61-67.
196. Wei Y., Chen, S., Kowalczyk, B., Huda, S., Gray, T. P., & Grzybowski, B. A. (2010). Synthesis of stable, low-dispersity copper nanoparticles and nanorods and their antifungal and catalytic properties. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(37), 15612-15616.
197. Whitfield F., M. Drew, F. Helidoniotis & D. Svoronos. (1999). Distribution of bromophenols in species of marine polychaetes and bryozoans from eastern Australia and the role of such animals in the flavor of edible ocean fish and prawns (Shrimp). *J Agric Food Chem* 47:4756–4762
198. Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R.E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Prot.* 3 (2), 163.
199. Wilkins, B. M., & Frost, L. S. (2002). Mechanisms of gene exchange between bacteria. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 355-IV). Academic Press.
200. Wozniak, R. A., Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* 8(8):552.
201. Yoon K. Y., Byeon, J. H., Park, J. H., & Hwang, J. (2007). Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373(2), 572-575.

202. Zatyka, M., Jagura-Burdzy, G., & Thomas, C. M. (1994). Regulation of transfer genes of promiscuous IncP $\alpha$  plasmid RK2: repression of Tra1 region transcription both by relaxosome proteins and by the Tra2 regulator TrbA. *Microbiology*, 140(11), 2981-2990.
203. Zatyka, M., & Thomas, C. M. (1998). Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. *FEMS microbiology reviews*, 21(4), 291-319.
204. Zechner, E. L., Lang, S., & Schildbach, J. F. (2012). Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1592), 1073-1087.

