

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE LA BOMBA DE EFLUJO DE CROMATO
EN BACTERIAS NATIVAS Y PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN
PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO**

PAOLA ANDREA VARGAS GALLEGO

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ
2006**

**CARACTERIZACIÓN DE GENES DE LA BOMBA DE EFLUJO DE CROMATO
EN BACTERIAS NATIVAS Y PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN
PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO**

PAOLA ANDREA VARGAS GALLEGO

TESIS DE GRADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA

Directora

JENNY DUSSÁN G.

Directora del Centro de Investigaciones Microbiológicas – CIMIC

Profesora Asociada

Universidad de los Andes

Co-Directora

LUCÍA LOZANO.

Investigadora Asociada

Centro de Investigaciones Microbiológicas – CIMIC

Universidad de los Andes

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ
2006**

*A mi familia por su constante amor, apoyo y compañía
en los buenos y malos momentos en esta etapa de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS...

A Dios por protegerme y por enviar siempre a mi lado a la persona correcta para darme fuerza y aliento en los momentos que más lo necesité.

A mis padres Luz Mary y José Gregorio, por todos sus esfuerzos, por su amor y por hacer de mí, la persona que soy hoy en día.

A la Dra. Jenny Dussán, por creer en mi y en el grupo de metales pesados, por abrirme las puertas de la que fue mi casa durante casi dos años, gracias por su orientación y apoyo en cada momento.

A Lucía Lozano y a Martha Vives, por su paciencia y por los momentos enriquecedores de discusión, no solo de los resultados de este trabajo sino de muchas situaciones de la vida.

A Merceditas, Azucenita y LuzMa por abrir siempre un lugar y por ayudar en mis carreras contra reloj.

A René por su amor, compañía y apoyo incondicional, por sostenerme cuando estuve a punto de caer.

A mis amigas Johanna, Lina, Yira, Dania, Gina G, Cata, Pao B, gracias por cada palabra de ánimo.

A la gente de la EEZ: Alejandro, Euge, Silvia, Javi, Patri, gracias por su ayuda y colaboración hasta el último momento.

A todos los estudiantes vinculados al CIMIC por su apoyo, ayuda y aporte; en especial al grupo de metales pesados, Alejandro Caro, Gina Rodríguez y René Cuéllar; gracias por comenzar este sueño y por luchar por que las cosas salieran bien.

RESUMEN

Se realizó el aislamiento y selección de 7 cepas nativas resistentes a cromo hexavalente, a partir de muestras de suelo y crudo contaminadas con diferentes metales pesados. Según la secuenciación del gen 16S rRNA fueron identificadas como *Arthrobacter* sp, *Bacillus* sp, *Pseudomonas aeruginosa* y cuatro cepas de *Ochrobactrum* sp con perfil bioquímico diferente. La concentración mínima inhibitoria de cromato varió entre 1.5 y 3 mM de dicromato de potasio en medio enriquecido y entre 0,25 y 0,3 mM en medio mínimo de sales; siendo mayor en alguno de los casos a la resistencia reportada para otros microorganismos resistentes a Cr(VI).

Se realizó la caracterización en las cepas nativas de los genes *chrA* y *chrB* relacionados con la bomba de eflujo de cromato; siendo amplificados los dos genes en el morfotipo Cr28 y solo el gen *chrB* en la cepa Cr67.

Al observar la presencia de posibles genes relacionados con el eflujo, se realizó el diseño y construcción de un plásmido biosensor que se basó en la fusión de los genes *chrBA* de *R. metallidurans* CH34 presentes en un fragmento de 2,6 Kb, con el gen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) presente en un plásmido con un amplio origen de replicación como lo es pPROBE-TT'. Sin embargo, los ensayos de construcción no dieron los resultados esperados, debido a la posible presencia de sitios adicionales de corte con las enzimas de restricción *AvaI* y *NdeI*, utilizadas para rastrear la orientación del inserto.

Se realizaron ensayos para construcción de un nuevo plásmido biosensor utilizando como reportero el gen *lacZ* presente en pMP220 y un fragmento de 1,23 Kb que incluía el gen *chrB*, aunque no se obtuvieron resultados positivos esta construcción podría ser más eficaz, al clonar un fragmento más corto y conocer la secuencia del vector utilizado.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	14
3. MARCO TEÓRICO.....	15
3.1. METALES PESADOS.....	15
3.1.1. BIODISPONIBILIDAD.....	16
3.2. CROMO.....	16
3.2.1. CROMO HEXAVALENTE.....	16
3.2.2. CROMO TRIVALENTE.....	17
3.2.3. USOS INDUSTRIALES.....	17
3.2.4. TOXICIDAD DEL CROMO HEXAVALENTE.....	18
3.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A CROMO HEXAVALENTE.....	19
3.3.1. EFLUJO.....	20
3.3.1.1. Eflujo en <i>R. metallidurans</i> CH34.....	20
3.3.2. REDUCCIÓN.....	21
3.4. BIOUSENSORES MOLECULARES BACTERIANOS.....	22
3.4.1. GENES REPORTEROS.....	24
3.4.1.1. Proteína Verde Fluorescente (<i>gfp</i>).....	24
3.4.1.2. Enzima β -galactosidasa (<i>lacZ</i>).....	25
3.4.2. VENTAJAS DEL USO DE BIOUSENSORES.....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
4.1. CEPAS BACTERIANAS DE REFERENCIA.....	28
4.2. AISLAMIENTO DE CEPAS NATIVAS.....	29
4.2.1. SELECCIÓN PRELIMINAR DE CEPAS NATIVAS.....	30
4.3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS NATIVAS RESISTENTES A CROMO HEXAVALENTE.....	31
4.3.1. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS.....	31
4.3.2. APROXIMACIÓN AL PERFIL DE USO DE FUENTES DE CARBONO.....	32
4.4. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE CROMO HEXAVALENTE.....	32
4.4.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	33
4.4.2. CURVA DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE CROMO HEXAVALENTE.....	33
4.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>chrA</i> y <i>chrB</i> ASOCIADOS AL DETERMINANTE DE RESISTENCIA A CROMATO EN <i>R. metallidurans</i> CH34.....	34
4.6. AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>chrR</i> RELACIONADO CON CROMATO REDUCTASAS.....	35

4.7. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO.....	36
4.7.1. DIGESTIÓN DE <i>pPROBE-TT'</i> Y <i>pECD300</i>	36
4.7.2. LIGACIÓN DE <i>pPROBE-TT'</i> CON EL FRAGMENTO <i>EcoRI</i> DE 2.6 Kb.....	37
4.7.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E.coli</i> DH5 α	37
4.7.4. SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES.....	38
4.7.4.1. Verificación del sentido del inserto clonado.....	38
4.8. PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO	39
4.8.1. DIGESTIÓN DE <i>pMP220</i> Y <i>pECD300</i>	39
4.8.2. LIGACIÓN DE <i>pMP220</i> CON EL FRAGMENTO <i>EcoRI-PstI</i> DE 1,23 Kb.....	40
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
5.1. AISLAMIENTO DE CEPAS NATIVAS.....	41
5.2. SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS.....	42
5.2.1. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS.....	42
5.3. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE CROMO HEXAVALENTE.....	45
5.3.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	45
5.3.2. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE CROMO HEXAVALENTE.....	46
5.4. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES <i>chrA</i> y <i>chrB</i>	49
5.5. AMPLIFICACIÓN DEL GENE <i>chrR</i> RELACIONADO CON CROMATO REDUCTASAS.....	51
5.6. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO	52
5.7. PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO	57
6. CONCLUSIONES.....	60
7. ANEXOS.....	62
8. BIBLIOGRAFÍA.....	78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.....	28
Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificación de los genes <i>chrA</i> y <i>chrB</i>	34
Tabla 3. Concentración de las soluciones utilizadas para la amplificación de los genes <i>chrA</i> y <i>chrB</i>	35
Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificación de los genes <i>chrA</i> y <i>chrB</i>	36
Tabla 5. Cebadores utilizados para verificar el sentido de la fusión <i>chrBAC-gfp</i>	38
Tabla 6. Identificación de cepas nativas.....	42
Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria y resistencia a antibióticos de los aislamientos nativos.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Determinante de resistencia a cromato <i>chr₁</i> codificado en el plásmido pMOL28.....	21
Figura 2. Representación general de los vectores para prueba de promotores de la serie pPROBE-TT'.....	29
Figura 3. Crecimiento en erlenmeyers con cromato.....	30
Figura 4. Curvas de crecimiento de Cr20 y Cr28.....	47
Figura 5. Curvas de crecimiento de Cr35 y Cr41.....	48
Figura 6. Curvas de crecimiento de Cr46 y Cr65.....	48
Figura 7. Curvas de crecimiento de Cr67.....	48
Figura 8. Electroforesis de productos de amplificación del gen <i>chrA</i>	49
Figura 9. Electroforesis de productos de amplificación del gen <i>chrB</i>	50
Figura 10. Electroforesis de los productos de PCR de genes relacionados con cromato reductasas.....	52
Figura 11. Digestión con la enzima <i>EcoRI</i> de los plásmidos pPROBE-TT' y pECD300.....	53
Figura 12. Amplificación del gen <i>chrB</i> en las colonias transformadas con la ligación de fragmento de 2,6 Kb de pECD300 y pPROBE-TT' linearizado.....	53

Figura 13. PCR para verificar el sentido del inserto.....	54
Figura 14. Digestión con la enzima <i>AvaI</i> del plásmido vector pPROBE-TT'.....	54
Figura 15. Digestión con la enzima <i>NdeI</i> de los plásmidos pECD300 y pPROBE-TT' y del DNA plasmídico obtenido de las colonias transformantes.....	55
Figura 16. Esquema de la propuesta para la construcción de un plásmido biosensor de cromato utilizando como reportero el gen <i>lacZ</i>	57
Figura 17. Digestión de los plásmidos pMP220 y pECD300 con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i>	58
Figura 18. Amplificación del gen <i>chrB</i> en las colonias transformadas con la ligación de fragmento de 1,23 Kb de pECD300 y pMP220 linearizado.....	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Composición de Medio Mínimo de Sales, MMS.....	62
Anexo 2. Composición de Agar Top 0,6%.....	63
Anexo 3. Composición de Luria-Bertani (Caldo).....	64
Anexo 4. Composición de Medio Mínimo de Sales con Tris, MMS-T.....	65
Anexo 5. Protocolo para la extracción de DNA total.....	66
Anexo 6. Secuencias de proteínas relacionadas con cromato reductasas usadas para el diseño de los cebadores degenerados.....	67
Anexo 7. Protocolo para la preparación de células competentes.....	68
Anexo 8. Protocolo para la transformación de células competentes con DNA recombinado.....	69
Anexo 9. Secuencias de DNA usadas en el diseño de cebadores para verificar la fusión...70	
Anexo 10. Secuencias de 16S rDNA obtenidas para las cepas nativas aisladas.....	71
Anexo 11. Tabla de características bioquímicas de las cepas nativas, usando API20NE.....	75
Anexo 12. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas de estudio.....	76
Anexo 13. Mapa del plásmido vector pPROBE-TT' con el inserto de 2,6 Kb.....	77

1. INTRODUCCIÓN

La preocupación mundial por la conservación del medio ambiente ha ido en aumento y los países desarrollados aplican cada vez más restricciones para el uso y producción de sustancias nocivas para el ambiente. Una de esas sustancias son los metales pesados, los cuales a pesar de ser parte natural del ambiente, pueden estar presentes en una alta concentración debido a su uso indiscriminado en frecuentes actividades realizadas por el hombre. El cromo es un metal pesado ampliamente usado en varios procesos industriales como en curtiembres, minería, electroplateado, refinería de metales, pinturas, entre otros; siendo un contaminante industrial común. El problema ambiental con el cromo, y con los demás metales pesados, es la migración de este en suelos y aguas subterráneas, contaminando cuerpos de agua que puedan ser utilizados para el consumo humano (Desjardín et al, 2002).

El cromo en su estado de oxidación hexavalente (forma oxidada) es altamente soluble en agua, por ende, fácilmente movilizable. Mientras que la forma reducida (Cr(III)) es insoluble en agua, se moviliza con dificultad y por ende no penetra con facilidad las membranas biológicas. Por el contrario, el cromo hexavalente cruza fácilmente las membranas de células eucariotas y procariotas. En bacterias, el cromato puede entrar por el sistema de toma de sulfato; una vez en el citoplasma el Cr(VI) es reducido a Cr(III), el cual puede interactuar con el DNA, teniendo un efecto mutagénico. Dado que el cromato no tiene influencia benéfica para los microorganismos, la resistencia a cromato esta probablemente basada en la interacción de la reducción y el eflujo. Entre los microorganismos reportados por su capacidad de reducirlo se encuentran *Bacillus* sp, *Pseudomonas fluorescens* LB300, *Enterobacter cloacae* HO1, entre otras. La resistencia basada en el eflujo de cromato ha sido reportada en *Alcaligenes eutrophus* CH34 conocida actualmente como *Ralstonia metallidurans* CH34.

El aislar microorganismos que han sido poco a poco seleccionados por este tipo de ambiente extremo, de suelos o efluentes industriales contaminados con metales pesados, hace posible el uso de estos no solo con el fin de poder remediar los ambientes de los cuales

son nativos, sino la posibilidad de mejorar alguno de ellos, con el fin de utilizarlos como biosensores de estos metales y así reducir los costos para las industrias, en los análisis para la determinación de los metales en sus desechos.

Es allí, donde los biosensores surgen como una alternativa biológica, para la determinación de contaminantes en un ambiente; con el fin de permitir un monitoreo rápido, *in-situ*, de bajo costo, y lo más importante, que determine su biodisponibilidad. Una variedad de organismos, sistemas celulares y subcelulares, han sido aprovechados con ese propósito y su utilidad en la detección de compuestos orgánicos e inorgánicos ha sido demostrada. El término biosensor bacteriano, se utiliza para referirse a los microorganismos portadores de un plásmido, con genes que hacen parte de un elemento sensor fusionado a un gen reportero que codifica para proteínas de fácil detección; así bajo las condiciones apropiadas, puede establecerse una relación entre la concentración del contaminante y la intensidad de la señal emitida (Köhler et al, 2000).

Dado que la toxicidad del cromo depende del estado de oxidación en el cual se encuentre; su detección se ha centrado en el estado de oxidación hexavalente. Hasta el momento, se han desarrollado dos plásmidos biosensores de cromato, el primero, es la cepa *A. eutrophus* AE104 portadora del plásmido pEBZ141 con la fusión de genes *chr::luxCDABE*. El segundo es *A. eutrophus* AE2440 con la fusión *chrBΔchrA::luxCDABE*. Los dos biosensores presentaron inducción de la luminiscencia en presencia de diferentes concentraciones de cromato, detectando al menos 1 μM de cromato (Peitzsch et al, 1998; Corbisier et al, 1999).

En el presente trabajo se aislaron cepas nativas colombianas resistentes a cromato a partir de dos muestras contaminadas con este metal; una muestra de suelo en proceso de landfarming en Guaduas y otra muestra de crudo de Tame, Arauca. A las cepas nativas seleccionadas se les realizó una caracterización general de su resistencia a cromato, y la identificación de genes relacionados con eflujo y reducción. Posteriormente, se realizó el diseño de un biosensor de cromato que incluye los genes *chrBA* fusionados con el gen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los genes *chrA* y *chrB* en bacterias nativas como propuesta para la construcción de un biosensor molecular de cromo hexavalente.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aislar bacterias nativas resistentes a cromo hexavalente a partir de muestras contaminadas con metales pesados e identificarlas mediante el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA.

Determinar la mínima concentración inhibitoria de cromato para las bacterias nativas seleccionadas.

Amplificar en las cepas nativas los genes *chrA* y *chrB* de la bomba de eflujo de cromato y el gen *chrR* relacionado con cromato reductasas.

Construir un plásmido biosensor detector de cromo hexavalente utilizando la fusión de genes *chrBA* con la proteína verde fluorescente (GFP)

Desarrollar una propuesta para la construcción de un plásmido biosensor de cromato usando como reportero el gen *lacZ*.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. METALES PESADOS

Los metales pesados son un grupo de elementos que tienen una densidad relativamente alta y cierta toxicidad para el ser humano. Aunque el término no está bien definido, normalmente se emplea el criterio de densidad; es decir, suelen considerarse metales pesados aquellos elementos con una densidad mayor a 4.5 g/cm^3 , aproximadamente.

Desde hace millones de años los metales pesados son elementos comunes en la Tierra y siempre han estado a disposición de los seres vivos. Tal vez en el principio de la Tierra la disponibilidad de los metales en el ambiente era mucho mayor debido seguramente a las características geológicas y climáticas del planeta. A pesar de ser parte natural del ambiente, en algunos casos ciertos iones metálicos pueden estar presentes en alta concentración, lo que causa el aumento de un cuerpo mineral en particular (Hurst et al, 1997). Actualmente, la concentración de estos metales se eleva en su mayoría por la actividad antropogénica, especialmente aquellas que implican el procesamiento de sustancias metálicas (Hurst et al, 1997; Trajanovska et al, 1997).

84 de los 106 elementos conocidos se clasifican como metales, de allí que la posibilidad de contaminación metálica sea alta. Sin embargo, no todos los metales representan riesgos para el ambiente; algunos no son tóxicos mientras que otros, aunque lo sean, son muy escasos o sus compuestos son insolubles. Como resultado solo algunos de ellos (por ejemplo Hg, Cd, Pb, entre otros) se consideran actualmente como contaminantes ambientales (Nies, 1999; Suárez & Reyes, 2002).

En general, los metales pesados no esenciales como aluminio, cadmio, plomo y mercurio, entre otros; se unen con gran afinidad a los grupos tiol (-SH o sulfhidrilos) de las proteínas. La toxicidad resulta de alteraciones en la estructura conformacional de proteínas y ácidos

nucleicos y en la interferencia de la fosforilación oxidativa y el balance osmótico de la célula (Hurst et al, 1997; Bruins et al, 2000)

3.1.1. BIODISPONIBILIDAD

Para que un metal pesado sea tóxico para un ser vivo, éste debe encontrarse disponible para ser captado por el organismo, es decir el metal debe estar biodisponible. Este concepto se encuentra estrechamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente, ya que esto determina la especiación y por lo tanto la concentración de metal libre y lábil (Hurst et al, 1997; Desjardin et al, 2002).

3.2. CROMO

El cromo es considerado un metal pesado y en el ambiente se encuentra presente en varios estados de oxidación de 0 a +6, pero las formas más comunes y estables son el cromo hexavalente (Cr(VI); cromato) y el cromo trivalente (Cr(III)).

3.2.1. CROMO HEXAVALENTE

En solución el cromo hexavalente existe como hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) y dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). La proporción de cada especie iónica en solución depende del pH. En pH neutro y básico predomina en la forma cromato; a medida que el pH disminuye (6 – 6.2) la concentración de hidrocromato aumenta. A pH muy bajo, el dicromato es la especie que más predomina (Grevatt, 1998).

El cromo hexavalente en medio acuático puede existir como complejos de aniones solubles, este es un fuerte agente oxidante y puede reaccionar con la materia orgánica u otros agentes

reductores para formar cromo trivalente; el cual puede ser precipitado como $\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$. Tanto en agua como en el suelo, el cromo hexavalente puede ser reducido a cromo trivalente por la materia orgánica (Grevatt, 1998).

3.2.2. CROMO TRIVALENTE

El cromo en valencia +3 es una de las formas reducidas del cromo. El cromo trivalente es insoluble en agua, lo cual reduce su movilidad de un cuerpo de agua a otro. El cromo trivalente presente en cuerpos de agua y en el suelo, proviene en su mayoría de la reducción del cromo hexavalente por la materia orgánica. La pérdida de cromo trivalente en el suelo se puede presentar principalmente por el transporte aéreo a través de aerosoles y por medio de aguas de escorrentía (Grevatt, 1998). En estado trivalente muy poco cromo es lixiviado del suelo debido a su insolubilidad.

El cromo trivalente es esencial para plantas, humanos y animales; su forma biológicamente activa esta en el factor de tolerancia a la glucosa (GFT, un complejo similar al glutathione dinicotinato de cromo (III)), el cual facilita la interacción de la insulina con su sitio receptor, influenciando de esta manera no solamente el metabolismo de la glucosa, sino de lípidos y proteínas (Demirci & Pometo, 2000; Hayirli et al, 2001; Zetic et al, 2001). Por tal razón la deficiencia de cromo podría causar cambios en el metabolismo de la glucosa y de lípidos, se ha identificado por The National Research Council como seguro y adecuado una ingesta diaria en la dieta de 50 – 200 ug/d, lo que corresponde a 0.71-2.9 ug/Kg/día para un adulto de 70 Kg (Grevatt, 1998).

3.2.3. USOS INDUSTRIALES

El cromo es usado en varios procesos industriales como la manufactura química, curtiembres, minería, electroplateado, refinería de metales, pinturas, entre otros, siendo de

esta forma un contaminante industrial común (Pattanapitpaisal et al, 2001).

Las principales fuentes de cromo hexavalente en la atmósfera son los productos químicos del cromato utilizados como inhibidores de moho en torres de enfriamiento y emitidos como aerosoles, la materia particulada emitida durante la fabricación y uso de cromatos metálicos y los aerosoles de ácido crómico de la industria de galvanoplastia. En el aire, el cromo hexavalente puede reaccionar con partículas de polvo y otros contaminantes para formar cromo trivalente. Estas dos especies de cromo pueden ser removidas del aire por medio de las precipitaciones (Grevatt, 1998).

3.2.4. TOXICIDAD DEL CROMO HEXAVALENTE

La biodisponibilidad del cromo es uno de los factores determinantes en la toxicidad de una fuente específica de este metal y depende principalmente del estado de oxidación en el cual este se encuentre (Desjardin et al, 2002). Teniendo en cuenta que el cromo hexavalente es altamente soluble y por ende, fácilmente movilizable, éste tiende a ser más tóxico para las células. Por su parte, el cromo trivalente posee una solubilidad muy baja y por tanto su biodisponibilidad es menor cuando se encuentra extracelularmente (Cervantes & Silver, 1996).

El cromo hexavalente ingerido es eficazmente reducido a estado trivalente en el tracto gastrointestinal; allí la absorción de Cr(VI) es mas eficiente que la absorción de Cr(III), aunque se estima que la absorción de cromo hexavalente ingerido es menor al 5%. Si la exposición se da por inhalación, el cromo puede ser absorbido en el sistema circulatorio y luego transferido al tracto gastrointestinal por acción de las mucosas, o puede permanecer en el pulmón. La absorción por inhalación, depende de factores como el tamaño, solubilidad y estado de oxidación de las partículas; de la actividad de los macrófagos alveolares y de la interacción del cromo con biomoléculas después de la deposición en el pulmón. El Cr(VI) inhalado puede ser reducido a Cr(III) por el ascorbato y el glutatión. Se

ha encontrado que parte del cromo absorbido puede ser encontrado en el hueso, el hígado, el riñón, y el bazo (Grevatt, 1998).

El cromo hexavalente soluble en agua, cruza fácilmente la membrana de las células por medio del sistema de transporte para el intercambio de aniones como el de fosfato y sulfato (Nies, 1999). Los compuestos con cromo trivalente podrían cruzar la membrana celular pero con muy baja eficiencia. Al cruzar la membrana el Cr(VI) luego de ser reducido a Cr(III), puede interactuar con macromoléculas incluyendo el DNA, produciendo lesiones que pueden ser potencialmente mutagénicas (Cervantes & Silver, 1992; Grevatt, 1998).

3.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA BACTERIANA A CROMO HEXAVALENTE

La exposición prolongada de las células a estos metales pesados ha determinado la posible funcionalidad de estos elementos como componentes importantes para los organismos. No es sorprendente encontrar que aquellos metales más abundantes en el ambiente han sido utilizados por los microorganismos como parte estructural de sus proteínas (e.j. citocromos), o como elementos mediadores en la transferencia de electrones (e.j. quimiolitotrofos) (Ehrlich, 1997; Bruins et al, 2000). Sin embargo, no todos los metales pesados tienen una actividad biológica y por el contrario en altas concentraciones pueden ser tóxicos para las células. Los microorganismos han desarrollado diferentes mecanismos para interactuar con los metales pesados en respuesta a ese ambiente (Konopka et al, 1999); y todas estas actividades microbianas tienen un efecto importante en los ciclos geoquímicos del planeta. Dado que el cromato no tiene influencia benéfica para los microorganismos, estos han debido desarrollar mecanismos por los cuales puedan responder al aumento en la concentración de este metal en el ambiente. La resistencia a cromato está probablemente basada en la interacción de la reducción y el eflujo de cromato (Nies, 1999). Adicionalmente pueden existir otros mecanismos como la inmovilización por medio de la biosorción, bioacumulación, entre otros (Vullo, 2003).

3.3.1. EFLUJO

La resistencia basada en el eflujo de cromato ha sido reportada en *Alcaligenes eutrophus* CH34 (Mergeay et al, 1985) conocida actualmente como *Ralstonia metallidurans* CH34 y en *Pseudomonas aeruginosa* (Alvarez et al, 1999), entre otros. En los dos microorganismos, esta resistencia a cromato esta determinada por plásmidos.

3.3.1.1. Eflujo en *R. metallidurans* CH34

En *R. metallidurans* CH34 el determinante de resistencia a cromato se conoce como *chr* y esta cepa tiene dos determinantes. El primero en caracterizarse, es el conocido como *chr₁* y está presente en el plásmido pMOL28 (genes *chrI*, *chrB₁*, *chrA₁*, *chrC*, *chrE*, *chrF₁*, Figura 1). El segundo (*chr₂*) se encontró luego del análisis de la secuencia genómica obtenida para *R. metallidurans* CH34, y está codificado en el cromosoma (genes *chrB₂*, *chrA₂*, *chrF₂*). La presencia de estos genes en el determinante *chr₂* fue confirmada luego de ser amplificados a partir de extracciones de DNA total de la cepa *R. metallidurans* AE104, la cual carece del plásmido pMOL28 (Nies, Juhnke, et al, 2002).

El gen *chrA₁* codifica para una proteína integral de membrana encargada posiblemente del eflujo de cromato conocida como ChrA de aproximadamente 31.5 KDa. La composición de aminoácidos de ChrA es similar a otros polipéptidos relacionados con el transporte de cromato y/o sulfato; y en particular ésta presenta un 29% de aminoácidos idénticos con la proteína ChrA de *P. aeruginosa* (Cervantes & Silver, 1992; Nies, Koch, et al, 1998).

El gen *chrB₁* codifica para una proteína unida a membrana y actúa posiblemente como proteína regulatoria de la acumulación de cromato y se ha propuesto como responsable de la inducibilidad de la resistencia (Nies, Nies et al, 1990; Nies, Koch et al, 1998). Adicionalmente, los dos genes son inducibles en presencia de cromo hexavalente (Nies, Juhnke, et al, 2002).

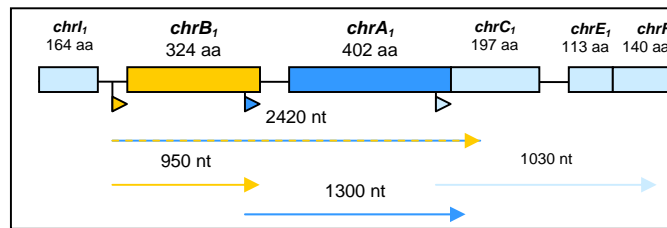


Figura 1. Determinante de resistencia a cromato *chr₁* codificado en el plásmido pMOL28. La posición de los promotores se indica como triángulos, las flechas representan el tamaño determinado de los mRNAs obtenidos a partir de cada promotor. Modificado de Nies, Juhnke, et al, 2002.

La toma de cromato en *R. metallidurans* se da por el sistema de toma de sulfato, de allí que la entrada de cromato a las células se aumente cuando las células presentan deficiencia de sulfato. Una concentración de 30 μM de sulfato en el medio de cultivo permite la inducción del sistema de toma de sulfato; para las células en estas condiciones de deficiencia de sulfato, el cromato puede ser más tóxico que para aquellas cultivadas en altas concentraciones de sulfato (Nies & Silver, 1989; Nies, Juhnke, et al, 2002).

3.3.2. REDUCCIÓN

La capacidad de reducir cromato a Cr(III) no está mediada por plásmidos y probablemente no es un mecanismo primario de resistencia; según los resultados encontrados hasta el momento, la reducción de cromo hexavalente confiere un bajo nivel de resistencia al anión (Cervantes & Silver, 1996).

La reducción de Cr(VI) a Cr(III) ha sido reportada en muchos tipos bacterianos, incluyendo cepas de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Enterobacter* y *Bacillus*, entre otros géneros. La reducción de cromato puede ocurrir aeróbicamente, y anaeróbicamente utilizando el cromato como aceptor final de electrones (Cervantes & Silver, 1992).

En *Pseudomonas* spp., la reducción parece ser una reacción secundaria de una vía metabólica aún desconocida. Hasta el momento se ha logrado caracterizar y purificar parcialmente reductasas de cromato, solubles y dependientes de NADH a partir de *P. putida* y *P. ambigua* (Cervantes & Silver, 1996).

3.4. BIOSENSORES MOLECULARES BACTERIANOS

En general para que una bacteria funcione como un bioreportero microbiano o un biosensor microbiano, ésta debe tener dos elementos génicos unidos: un elemento sensor y un reportero. El primero, sensa la presencia de moléculas blanco y como resultado puede inducir la transcripción del gen reportero, lo cual se evidencia en una señal detectable (Köhler et al, 2000).

En este estudio el término biosensor molecular bacteriano hace referencia a aquellos microorganismos portadores de un plásmido sensor en el cual se combina un elemento detector con un gen reportero (*gfp*) que codifica proteínas fácilmente detectables (Gutiérrez, 2004). El biosensor produce una señal cuantificable en respuesta a un cambio específico o general en el ambiente de un agente físico o químico (Köhler et al, 2000; D`Souza, 2001).

La mayoría de los biosensores se construye removiendo parcial o totalmente los genes involucrados en la respuesta para resistir o degradar un compuesto y remplazándolos o fusionándolos con un gen reportero, que será controlado por el promotor de los genes removidos. La presencia del agente de interés causará la activación del promotor y a su vez la transcripción del gen reportero; por lo tanto la síntesis de proteínas que generaran una señal cuantificable. De esta manera bajo las condiciones adecuadas, se puede establecer una relación entre la concentración del contaminante y la intensidad de la señal emitida (Köhler et al, 2000).

Inicialmente, los biosensores microbianos fueron desarrollados para analizar factores que afectan la expresión génica y luego para diversos fines como diagnóstico médico, para determinación de vitaminas como B-12 y ácido ascórbico, determinación de agentes activos en farmacia (D`Souza, 2001), estudios de fisiología bacteriana en tracto digestivo (Corthier et al, 1998), detección de la disponibilidad de sucrosa (Miller et al, 2001), detección de contaminantes ambientales (Willardson et al, 1998), determinación de metales pesados como plomo, cadmio, cromo, y arsénico (Corbisier, Ji, et al, 1993; Corbisier, van der Lelie et al, 1999; Peitzsch et al, 1998).

Hasta el momento se han desarrollado dos biosensores de cromato. El primero, fue reportado en 1998 por Peitzsch y colaboradores; en su trabajo se construyó un plásmido de amplio rango de hospedero que llevaba la fusión de los genes *chrBA* de *R.metallidurans* con los genes *luxCDABE* de *Vibrio fischeri*; y se usó para transformar cepas de *A. eutrophus* AE104 (actualmente *R. metallidurans*). Se obtuvo la cepa *A. eutrophus* AE104 (pEBZ141) con la fusión transcripcional *chr::lux*; ésta cepa fue usada como biosensor; donde el cromato y el dicromato fueron los mejores inductores de la transcripción a una concentración de 1 uM (Peitzsch et al, 1998).

Corbisier y colaboradores en 1999, realizaron el segundo reporte del desarrollo de un plásmido biosensor de cromato. A diferencia del primer reporte, en el cual usaron un fragmento de 1,6 Kb el cual lleva el gen *chrB* y parte del gen *chrA*; en este estudio utilizaron un fragmento de 1,2 Kb, el cual contiene principalmente la región promotora operadora y el gen *chrB*. Este fragmento fue fusionado con los genes *luxCDABE* y el plásmido resultante se clonó en *A. eutrophus* AE104. La cepa *A. eutrophus* AE2440 con la fusión *chrBAchrA::luxCDABE* presentó inducción de la luminiscencia en presencia de diferentes concentraciones de dicromato.

En los dos estudios, se demostró el posible uso de estos genes (*chrB* y *chrA*) fusionados a genes reporteros como biosensores, dada su respuesta inducible y específica por el cromo en estado hexavalente; con una sensibilidad de aproximadamente 10 uM de cromato. De

esta manera, estos biosensores tienen un uso potencial para la determinación de la biodisponibilidad de este metal en muestras ambientales contaminadas.

3.4.1. GENES REPORTEROS

Hasta el momento los genes reporteros utilizados son los mismos a los utilizados para ensayos de expresión de genes. La mayoría de reporteros tienen como característica principal, el ser fácilmente detectables. Los biosensores se pueden catalogar teniendo en cuenta las señales que generan como calorimétricas, fluorescentes, luminiscentes, quimioluminiscentes o electroquímicas. A pesar de funcionar de forma diferente, su producto final es una señal cuantificable proporcional a la concentración del agente químico o físico al que ha sido expuesto (Köhler et al, 2000; Gutiérrez, 2004).

Algunos genes reporteros requieren de la adición de un sustrato secundario en el ensayo para generar señal lumínica, por ejemplo los genes *luxAB* y *luc*. Para otros genes, como el de la proteína verde fluorescente (GFP) y el uroporfirinógeno III metil transferasa (UMT), la señal se activa por una fuente lumínica externa. Por otra parte, hay genes como los *luxCDABE* cuya señal es auto-inducida y no requiere de activación externa (Köhler et al, 2000).

3.4.1.1. Proteína Verde Fluorescente (*gfp*)

La proteína verde fluorescente fue descubierta por Shimomura et al en 1962, como una proteína acompañante de la aequorina, una conocida proteína quimioluminiscente de la medusa *Aequorea* sp. Esta proteína también se ha encontrado en otros animales, en hidozoos como *Obelia* sp. y *Phialidium* sp. y en un antozoa (*Renilla* sp.). Las GFPs de *Aequorea* y *Renilla*, al parecer tienen el mismo cromóforo, y la misma sensibilidad al pH y tendencia de agregación y renaturación (Tsien, 1998).

El principal atractivo para el uso biotecnológico de la proteína GFP de *Aequorea* es que puede ser expresada en sistemas procariotas y eucariotas sin necesidad de un sustrato o cofactor; además el gen contiene toda la información necesaria para la síntesis post-traducciona del cromóforo y no se necesitan enzimas específicas de la medusa (Tsien, 1998; Köhler et al, 2000).

Actualmente se conocen variantes de la proteína GFP, y puede ser dividida en siete clases con base en el componente distintivo del cromóforo. Cada clase tiene un conjunto distintivo de longitudes de onda de emisión y excitación. En general la diferencia entre estas clases, son algunas mutaciones y cambios generados en la secuencia de aminoácidos. Las clases 1 a 4 son derivadas de polipéptidos con tirosina (Tyr) en la posición 66, mientras que las clases 5 a 7 resultan de triptofano (Trp), Histidina (His) y fenilalanina (Phe) en esa posición (Tsien, 1998).

Dentro de las aplicaciones biológicas de la proteína verde fluorescente (GFP), éstas se pueden dividir en su uso como proteína reportera o como indicadora. Cuando es usado como reportera, la fluorescencia de GFP refleja niveles de expresión de genes o localizaciones subcelulares causadas por dominios blanco o proteínas del hospedero a las cuales GFP es fusionado. Al usarlo como indicador, la fluorescencia de GFP puede ser modulada post-traduccionalmente por su ambiente químico y por interacciones proteína-proteína (Tsien, 1998).

3.4.1.2. Enzima β -galactosidasa (*lacZ*)

Esta enzima cataliza la hidrólisis de los β -galactósidos y está codificada por el gen *lacZ* de *E. coli* y puede ser utilizada tanto en células procariotas como eucariotas. Esta enzima tiene una alta tasa de producción y puede generar fuertes señales usando diferentes sustratos por

ejemplo electroquímicos o quimioluminiscentes. Esta enzima puede ser medida con una sensibilidad de 1 nmol, dependiendo del sustrato utilizado (Köhler et al, 2000)

3.4.2. VENTAJAS DEL USO DE BIOSENSORES

La mayoría de contaminantes ambientales pueden ser detectados y monitoreados por técnicas analíticas tradicionales. En el caso de los metales pesados, pueden ser detectados en muestras ambientales utilizando técnicas clásicas como espectrometría de masas (ICP/MS), absorción atómica por inyección de flujo (FIAAS); o usando métodos electroquímicos que incluyen electrodos selectivos de iones, polarografía y otros electrodos voltamétricos. En general para todos estos métodos, se requiere de un previo procesamiento de la muestra que incluye tratamientos con altas temperaturas, presión o condiciones ácidas (Corbisier et al, 1999).

A pesar de ser técnicas sensibles y precisas, requieren de instrumentos grandes y costosos, entrenamiento técnico, uso de químicos peligrosos y disponibilidad de tiempo, haciendo que sean en general técnicas más costosas (Köhler et al, 2000). Adicionalmente, la cantidad total de contaminante detectada después de una extracción con tratamientos químicos no siempre está relacionada con la toxicidad de la muestra, debido a que la cantidad original de contaminante biológicamente disponible no es tomada en cuenta (Corbisier et al, 1999).

El desarrollo de biosensores, ha provisto un método cuantitativo, confiable y de bajo costo para la detección y monitoreo en menor tiempo (Köhler et al, 2000). Su uso se potencializa, no sólo por el posible ahorro de tiempo y material en comparación a los métodos convencionales, sino porque permite establecer la biodisponibilidad de un contaminante; lo cual es de suma importancia en el caso de los metales pesados ya que su toxicidad para el hombre depende directamente de la concentración en la cual estén biodisponibles.

En la actualidad dentro de los biosensores disponibles comercialmente, están aquellos utilizados para monitorear los niveles de glucosa en los pacientes con diabetes. Estos sistemas se basan en la oxidación de la glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa. Un ejemplo es el Gluowatch G2 de Biographer®, el cual usa una pequeña corriente para extraer la glucosa a través de la piel sobre un cojín que contiene la glucosa oxidasa; el peróxido resultado de la reacción es medido colorimetricamente y así el peróxido total se relaciona con la concentración de glucosa en la sangre (Wilson & Gifford, 2005). Hasta el momento, ninguno de los biosensores moleculares bacterianos desarrollados con el fin de determinar contaminantes ambientales, parece estar disponible comercialmente para usarlos como método de detección.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CEPAS BACTERIANAS DE REFERENCIA

Se utilizaron como control de resistencia a cromato las cepas *R. metallidurans* CH34 y AE126 portadoras del plásmido pMOL28 el cuál contiene el determinante de resistencia *chr* y la cepa *R. metallidurans* AE104 como no portadora del plásmido pMOL28; donadas por el Dr. M. Mergeay del Centro de Investigación Nuclear de Bélgica (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados.

Cepa	Plásmido	Información relevante	Referencia
<i>R. metallidurans</i> CH34	pMOL30 y pMOL28	Resistente a cromato Determinante <i>chr</i>	Mergay et al, 1985
<i>R. metallidurans</i> AE126	pMOL28	Resistente a cromato Determinante <i>chr</i>	Mergay et al, 1985
<i>R. metallidurans</i> AE104	-	Sensible a cromato	Mergay et al, 1985
<i>Pseudomona aeruginosa</i> PAO1	pCRO616	Resistente a cromato Inserto de 2,7 kb Cr ^r	Cervantes et al, 1990
<i>Bacillus</i> sp. QC1-2	-	Resistente a cromato Reductora de cromato	Campos et al, 1995
<i>E. coli</i> DH5a	pECD300	Fragmento <i>EcoRI</i> de 2.6 Kb con el determinante <i>chr</i>	Nies et al, 1989
<i>E. coli</i> DH5a	pPROBE-TT'	Tet ^r , gen <i>gfp</i> corriente abajo del sitio de múltiple clonaje	Miller et al, 2000
<i>E. coli</i> DH5a	pMP220	Derivado de pTJ575, <i>lacZ</i> sin promotor, Tet ^r	Spaink et al, 1987

La cepa *E. coli* DH5a portadora del plásmido pECD300 el cual tiene parte del determinante *chr* en un fragmento de 2.6 Kb (*chrB*, *chrA* y parte de *chrC*), fue donada por el Dr. Dietrich Nies de la Universidad de Martin Luther en Halle, Alemania (Tabla 1).

La cepa *E. coli* DH5a portadora del plásmido pPROBE-TT' fue donada por el Dr. Steven

Lindow del Departamento de plantas y biología microbiana de la Universidad de California. El peso molecular del plásmido pPROBE-TT' es de aproximadamente 6800 – 7000 pb (Figura 3).

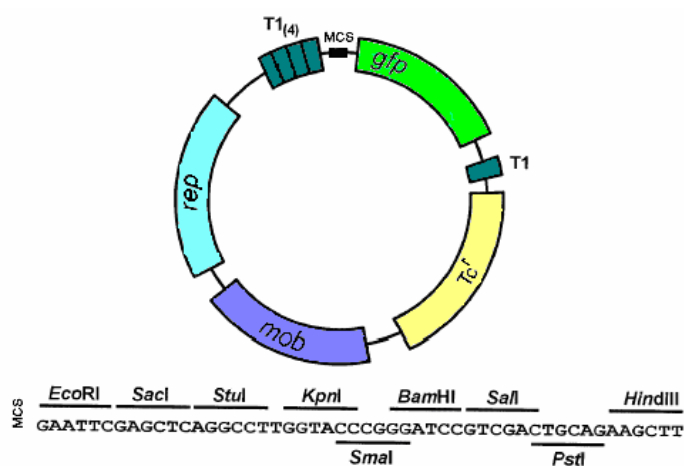


Figura 2. Representación general de los vectores para prueba de promotores de la serie pPROBE-TT'. En la parte inferior se indican los sitios únicos de restricción en la región de múltiple clonaje. Modificado de Miller et al, 2000.

4.2. AISLAMIENTO DE CEPAS NATIVAS

Se utilizó una muestra de crudo (petróleo de Tame, Arauca) y cinco muestras de suelo contaminado con hidrocarburos y metales pesados proveniente de un proceso de landfarming en Guaduas (Cundinamarca) se homogenizaron y se mezclaron 50 g de tierra con 50 ml de agua destilada estéril, se agitó y decanto durante 30 minutos. 5 ml de sobrenadante se inocularon en erlenmeyers de 300 ml con 100 ml de medio mínimo de sales (MMS, Anexo 1) más glucosa al 1% (Malekzadeh et al, 2004) y con concentraciones de 10 mM y 50 mM de ácido crómico (CrO_3) o cromato de sodio (Na_2CrO_4). El crudo se adicionó al mismo medio a una concentración de 1%. Como control de crecimiento de la muestra se utilizó erlenmeyer con la muestra pero sin metal y como controles de medio se utilizó un erlenmeyer sin metal y otro con metal, con el fin de observar posibles cambios

debidos a la composición del medio. Los erlenmeyers fueron incubados a 30 °C durante 15 días y revisados cada 72 horas, realizando descripción de turbidez del medio y viraje de color, de amarillo/naranja a verde (Figura 3). El aislamiento se realizó inoculando 0.1 ml en placas de agar de MMS más 1% de glucosa y 10 mM o 50 mM de cromato de sodio o ácido crómico colocados en superficie, se incubó a 30 °C por 48-72 horas. Al observar crecimiento, se realizó siembra por aislamiento de cada morfotipo para obtener cultivos puros.

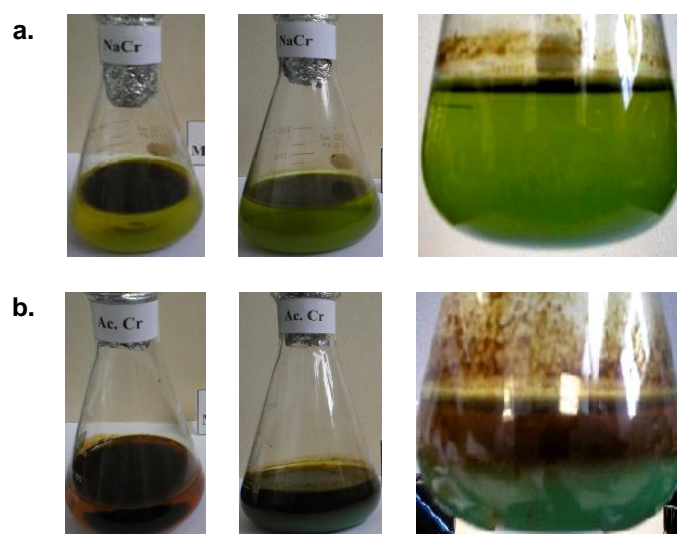


Figura 3. Crecimiento en erlenmeyers con cromato, utilizados para el aislamiento de morfotipos nativos; viraje del medio cultivo: **a.** de amarillo (cromato de sodio) a verde, o **b.** de naranja (ácido crómico) a verde. Muestra utilizada: crudo de Tame, Arauca.

4.2.1. SELECCIÓN PRELIMINAR DE CEPAS NATIVAS

Se realizó una selección preliminar de 21 cepas nativas aisladas, teniendo en cuenta los resultados de tres ensayos generales: prueba de sensidiscos, algunas pruebas bioquímicas generales y perfil de plásmidos de alto y bajo peso molecular.

Se comparó la capacidad de resistir cromo hexavalente utilizando un ensayo de sensidiscos

impregnados en solución de metal (Woodward & de Groot, 1999). Se usaron placas de agar nutritivo como base y 4 ml de agar top 0.6% (Anexo 2), al cual se le adicionó 100 ul de inóculo de cada cepa, ajustado a 10^7 células/ml. En este ensayo el inóculo usado para todos los ensayos se estandarizó según el número de células por colonia en agar nutritivo a 30 °C por 44 horas. Las concentraciones ensayadas de dicromato de potasio y cromato de sodio fueron 0, 10, 50, 100 y 200 uM. Se incubó a 30 °C por 48 horas y se midieron los halos de inhibición.

Como pruebas bioquímicas preliminares se usó prueba de oxidasa, catalasa, producción de ácidos orgánicos estables en aerobiosis y anaerobiosis, ensayo de motilidad, producción de sulfuros, producción de gas y uso de glucosa y lactosa.

Para determinar el perfil de plásmidos de los 21 morfotipos, se realizó el protocolo descrito por Kado & Liu (1981) para extracción de plásmidos de alto peso molecular. La extracción para plásmidos de bajo peso molecular se realizó por el método de lisis alcalina según Sambrook et al, 1989. Las muestras se corrieron en gel de agarosa al 0.8% (peso/vol) en buffer TAE 1X con 0.5 ug/ml de bromuro de etidio, a 90 V durante 90 minutos. El gel se visualizó sobre un transiluminador de luz ultravioleta. Esta preselección permitió reducir el número de cepas de trabajo de 21 a 14, las cuales se utilizaron para los ensayos posteriores.

4.3. SELECCIÓN DE LAS CEPAS NATIVAS RESISTENTES A CROMO HEXAVALENTE

4.3.1. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS

Los 14 morfotipos seleccionados fueron identificados a nivel de género y en algunos casos hasta especie, mediante el análisis de la secuencia del gen codificante para la subunidad 16S del RNA ribosomal (16S rRNA).

Para lo anterior, este gen se amplificó por PCR, primero con los cebadores externos GM3F (5' AGAGTTTGATCMTGGC 3') y GM4R (5' AAGTCGTAACAAGGTA 3') y luego con los cebadores internos 357F (5' ACTCCTACGGGAGGCAGCAG 3') y 1087R (5' GGGTTAAGTCCCGCAACGAG 3'). La secuenciación se realizó en la Estación Experimental del Zaidín con la colaboración de Alejandro Acosta. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias disponibles en la página de internet del Ribosoma Database (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

4.3.2. APROXIMACIÓN AL PERFIL DE USO DE FUENTES DE CARBONO

Según los resultados obtenidos al secuenciar el gen 16S rRNA, se realizó un ensayo de API20NE siguiendo las recomendaciones del fabricante bioMérieux®; para observar los perfiles de uso de fuentes de carbono y de características bioquímicas. Esto permitió discriminar y seleccionar entre aquellos morfotipos donde la identificación con el gen 16S rRNA había sido la misma.

4.4. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE CROMO HEXAVALENTE

Se evaluó el crecimiento en presencia de cromo hexavalente a las cepas nativas seleccionadas después de comparar los resultados obtenidos con la identificación de 16S rRNA y la utilización de fuentes de carbono, y se manejaron como cepas nativas bacterianas diferentes. Con el fin de determinar la resistencia a diferentes antibióticos, las cepas fueron sembradas en placas de agar nutritivo suplementado con los antibióticos: Amp: Ampicilina (150 ug/ml); Tet: Tetraciclina (15 ug/ml); Kan: Kanamicina (50 ug/ml); Cfl: Cloranfenicol (5 ug/ml) y Rif: Rifampicina (100 ug/ml). Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 24 horas, tiempo tras el cual se verificó la ausencia o presencia del crecimiento.

4.4.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

A las 7 cepas seleccionadas se les determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) en medio líquido enriquecido LB (Luria-Bertani, Anexo 3) con diferentes concentraciones de dicromato de potasio, como se describe a continuación. Para cada cepa a partir de un cultivo en LB de 16 horas con agitación, se ajustó el inóculo inicial a una densidad óptica (D.O.) de 0,05 a 660 nm en medio LB, y se colocaron 5 ml en un juego de 8 tubos, a los cuales se les retiró la cantidad de medio correspondiente al volumen de la solución de dicromato de potasio que se colocaría para dar origen a las diferentes concentraciones del ensayo (0, 1,5, 3, 4, 5, 6, 7 y 10 mM de dicromato de potasio). Tras inocular los tubos se verificó la absorbancia a 660 nm y se incubaron a 30 °C con agitación a 180 rpm; monitoreando la D.O. alcanzada cada 24 horas durante 2 días.

Debido a la posibilidad de formación de complejos de la sal metálica con componentes del medio enriquecido utilizado, se determinó la concentración mínima inhibitoria en medio líquido mínimo de sales con Tris según Mergey, et al, 1985 (Anexo 4) y con adición de glucosa 1%; el ensayo se realizó de la misma manera que con el medio enriquecido, pero las concentraciones de dicromato de potasio utilizadas fueron 0, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25 y 0,3 mM. Tras inocular los tubos se verificó la absorbancia a 660 nm y se incubaron a 30 °C con agitación a 180 rpm; monitoreando la D.O. alcanzada cada 24 horas durante 2 días.

4.4.2. CURVA DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE CROMO HEXAVALENTE

Un cultivo en medio LB de 16 horas en agitación a 180 rpm a 30 °C fue utilizado como inóculo para realizar la curva de crecimiento de cada cepa en 30 ml de medio líquido mínimo de sales con Tris MMS-T (Mergey et al, 1985) y adición de glucosa 1%. El volumen necesario para que la D.O. inicial a 660 nm del inóculo fuera 0,03; fue centrifugado y lavado dos veces con MMS-T, antes de ser inoculado. El crecimiento se

evaluó en dos concentraciones de dicromato (0,15 y 0,3 mM) y como control de crecimiento en ausencia del metal. Tras inocular los erlenmeyers se verificó la D.O. inicial a 660 nm y se incubaron a 30 °C con agitación a 180 rpm; monitoreando la D.O. alcanzada cada 24 horas durante 168 horas.

4.5. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *chrA* y *chrB* ASOCIADOS AL DETERMINANTE DE RESISTENCIA A CROMATO EN *R. metallidurans* CH34

Para la amplificación se utilizaron los cebadores reportados por Nies et al. 1990 para los genes *chrA* y *chrB* (Tabla 2). La optimización de las condiciones para la PCR se realizó con la cepa de referencia *R. metallidurans* CH34 la cual tiene el determinante *chr*. Se realizaron extracciones de DNA total según Trajanovska et al, 1997 (Anexo 5) para la cepa de referencia y para las cepas nativas, 3 uL fueron utilizados como muestra de DNA para la amplificación por PCR. Todas las reacciones incluyeron un control negativo de agua estéril.

Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificación de los genes *chrA* y *chrB*.

Gen	Cebador	Secuencia	Longitud de fragmento	Referencia
<i>chrA</i>	<i>chrA1</i> F	5' CTTATACGCTACGCCAACTG 3'	1292 pb	Nies, 1990
	<i>chrA2</i> R	5' GTAATGGCATTTCAGTCGCTTG 3'		
<i>chrB</i>	<i>chrB1</i> F	5' GTCGTTAGCTTGCCAACATC 3'	450 pb	Nies, 1990
	<i>chrB2</i> R	5' CGgAAAGCAAGATGTCGATCG 3'		

Las amplificaciones fueron llevadas en 25 ul de volumen de reacción para 30 ciclos. En la tabla 3 se indica la concentración utilizada de cada reactivo para la amplificación de los genes *chrA* y *chrB*. El programa de temperatura de PCR comienza con un paso de denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos, donde cada uno consiste de una denaturación (95 °C por 45 segundos), anillamiento (por 30 segundos a 58 °C para

chrA y a 57.5 °C para *chrB*) y extensión (72 °C por 45 segundos); con una extensión final de 10 minutos a 72 °C y enfriamiento a 4 °C. La amplificación fue realizada en un termociclador ICycler Bio-Rad®.

Tabla 3. Concentración de las soluciones utilizadas para la amplificación de los genes *chrA* y *chrB*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
DNA	3 ul
Buffer	1X
MgCl ₂	2.5 mM
dNTPs	0.2 mM
Cebadores	0.2 μM
Taq polimerasa	1.5 U
DNA	5 ul
Agua ultrapura	Llevar a 25 ul

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 0.9% y 1.5% teniendo en cuenta el tamaño de los fragmentos esperados (tabla 2) y corridos a 90 V por 90 minutos a temperatura ambiente. El peso molecular de las bandas se calculó por comparación con el marcador de peso 1 Kb DNA ladder (GibcoBRL®). La imagen del gel se obtuvo utilizando el programa Quantity One 4.5 del sistema GELDOC (Bio-Rad®)

4.6. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *chrR* RELACIONADO CON CROMATO REDUCTASAS

El diseño de cebadores degenerados se realizó utilizando las secuencias reportadas para genes relacionados con reductasas de cromato (gen *chrR*) en la base de datos del GenBank, los números de acceso y las secuencias utilizadas se relacionan en el (Anexo 6). Los cebadores fueron diseñados con la colaboración de Gina Rodríguez de la Universidad de Puerto Rico y se indican en la tabla 4.

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificación de los genes *chrA* y *chrB* .

Cebador	Secuencia	Tm	Longitud de fragmento
<i>chrR</i> F	5' TVSTVGGNAGYHWSMGNRMVGVNTCNTWYAA 3'	43 °C	267 pb
<i>chrR</i> R	5' TVAARAAYGCMMTSGAYKKGBBBTC 3'	41 °C	

Se realizaron extracciones de DNA total según Trajanovska et al, 1997 para las cepas nativas y para las cepas que se utilizaron como control positivo, dado que tienen genes de cromato reductasas. 3 uL fueron utilizados como muestra de DNA para la amplificación por PCR. Todas las reacciones incluyeron un control negativo de agua estéril. Las amplificaciones fueron llevadas en 25 ul de volumen de reacción para 30 ciclos. La concentración de las soluciones utilizadas para la amplificación de genes relacionados con cromato reductasas con cebadores degenerados, es la misma a la utilizada para la amplificación de los genes *chrA* y *chrB* de la tabla 3. El programa de temperatura de PCR comienza con un paso de denaturación inicial a 95 °C por 4 minutos; seguido de 30 ciclos, donde cada uno consiste de una denaturación (95 °C por 45 segundos), anillamiento (por 30 segundos y se ensayó un gradiente desde 40 °C a 58 °C) y extensión (72 °C por 40 segundos); con una extensión final de 10 minutos a 72 °C y enfriamiento a 4 °C. La amplificación fue realizada en un termociclador ICycler Bio-Rad®.

4.7. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO

4.7.1. DIGESTIÓN DE *pPROBE-TT'* Y *pECD300*

3 ug del plásmido vector para prueba de promotores *pPROBE-TT'* (Miller et al, 2000) fue linearizado con 5 U/ug de *EcoRI* (Invitrogen) en una reacción de 30 ul incubada a 37 °C durante 4 horas. Para el plásmido *pECD300* se utilizaron las mismas condiciones con el

fin de obtener el fragmento de 2,6 Kb que contiene los genes *chrBA* de *R. metallidurans*. Con el fin de evitar la posible religación del vector sin inserto, el plásmido pPROBE-TT' fue defosforilado con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Roche) bajo las condiciones sugeridas por el fabricante.

Al visualizar los productos de restricción con el programa Quantity One 4.5 del sistema CHEMIDOC (Bio-Rad®), se purificó el fragmento *EcoRI* de 2,6 Kb producto de la restricción del plásmido pECD300, y el plásmido vector pPROBE-TT' (linearizado y defosforilado); a partir del gel de agarosa utilizando el kit “QIA Quick Gel Extraction kit” de QIAGEN.

4.7.2. LIGACIÓN DE *pPROBE-TT'* CON EL FRAGMENTO *EcoRI* DE 2.6 Kb

Los ensayos de ligación del fragmento de 2,6 Kb de *EcoRI* de pECD300 y el vector para prueba de promotores pPROBE-TT' linearizado y defosforilado, se realizaron en una proporción 3:1 equimolar (Davis et al, 1994) y T4 DNA ligasa (MBI Fermentas Life Sciences) en un volumen de reacción de 10 o 15 μ l a 10 °C durante 16 horas.

4.7.3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E.coli* DH5 α

La mezcla de ligación fue empleada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α por cloruro de calcio (Anexo 7 y 8). La identificación de colonias transformantes se realizó por siembra en placas de LB suplementado con tetraciclina 15 μ g/ml y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

4.7.4. SELECCIÓN DE TRANSFORMANTES

Se realizó extracción de DNA plasmídico a las células transformantes obtenidas, usando el método de lisis alcalina (Sambrook et al, 1989). Este DNA fue utilizado, para realizar la amplificación del gen *chrB* según las condiciones descritas en el numeral 4.5.

4.7.4.1. Verificación del sentido del inserto clonado

Con el fin de verificar el sentido del inserto se realizó una digestión del DNA obtenido a partir de las transformantes con la enzima *AvaI* (Promega), de donde se esperaban 3 fragmentos de 2812 pb, 2612 pb y 1385 pb. También se realizó restricción con la enzima *NdeI* (New England, BioLabs) con la cual se esperaban 3 fragmentos: 8113 pb, 1200 pb y 164 pb.

Adicionalmente se diseñó un par de cebadores que permitiera comprobar el sentido del inserto, teniendo en cuenta la región de *chrC* presente en el fragmento de 2,6 Kb y la región inicial del gen de *gfp* (Anexo 9).

Tabla 5. Cebadores utilizados para verificar el sentido de la fusión *chrBAC-gfp*.

Gen	Cebador	Secuencia	Tm	Longitud de fragmento
Fusión <i>chrBAC-gfp</i>	<i>Chrgfp1</i> F	5' AATGAAGCCGCTAGGTTGTG 3'	62 °C	522 pb
	<i>Chrgfp2</i> R	5' GACAAGTGTGGCCATGGAA 3'	62 °C	

Como DNA templado se utilizó el obtenido a partir de las extracciones de DNA plasmídico realizadas; 3uL fueron utilizados para la amplificación por PCR. Todas las reacciones incluyeron un control negativo de agua estéril.

Las amplificaciones fueron llevadas en 25 μ l de volumen de reacción para 30 ciclos. La concentración de las soluciones utilizadas para la amplificación fue la misma a la que se indica en la tabla 3. El programa de temperatura de PCR comienza con un paso de denaturación inicial a 95 °C por 4 minutos; seguido de 30 ciclos, donde cada uno consiste de una denaturación (95 °C por 35 segundos), anillamiento (por 30 segundos y se ensayó un gradiente desde 55 °C a 62 °C) y extensión (72 °C por 40 segundos); con una extensión final de 10 minutos a 72 °C y enfriamiento a 4 °C. La amplificación fue realizada en un termociclador ICycler Bio-Rad®.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.3% teniendo en cuenta el tamaño del fragmento esperado (tabla 5) y corridos a 90 V por 60 minutos a temperatura ambiente. La imagen del gel se obtuvo utilizando el programa Quantity One 4.5 del sistema GELDOC (Bio-Rad®).

4.8. PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO

4.8.1. DIGESTIÓN DE *pMP220* Y *pECD300*

3 μ g del plásmido vector para prueba de promotores *pMP220* (Spaink et al, 1987) fue linearizado con 5 U/ μ g de *EcoRI* y *PstI* (New England, BioLabs) en una reacción de 20 μ l incubada a 37 °C durante 4 horas. Para el plásmido *pECD300* se utilizaron las mismas condiciones con el fin de obtener el fragmento de 1,23 Kb que contiene todo el gen *chrB* y parte de *chrA* de *R. metallidurans* CH34. Con el fin de evitar la posible religación del vector sin inserto, el plásmido *pMP220* fue defosforilado con la enzima fosfatasa alcalina de camarón (Roche) bajo las condiciones sugeridas por el fabricante.

Los productos de restricción se corrieron en gel de agarosa 0,8 % y luego de visualizarlos con el programa Quantity One 4.5 del sistema GELDOC (Bio-Rad®); se purificó el

fragmento *EcoRI-PstI* de 1,23 Kb producto de la restricción del plásmido pECD300 y el plásmido pMP220 linearizado y defosforilado; a partir del gel de agarosa utilizando el kit “QIA Quick Gel Extraction kit” de QIAGEN.

4.8.2. LIGACIÓN DE *pMP220* CON EL FRAGMENTO *EcoRI-PstI* DE 1,23 Kb

Los ensayos de ligación del fragmento de 1,23 Kb de *EcoRI-PstI* de pECD300 y el vector pMP220 linearizado y defosforilado; se realizaron en una proporción 3:1 equimolar (Davis et al, 1994) y T4 DNA ligasa (Roche) en un volumen de reacción de 15 ul a 10 °C durante 16 horas.

Esta mezcla fue empleada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α por cloruro de calcio (Anexo 7 y 8). La identificación de colonias transformantes se realizó por siembra en placas de LB suplementado con tetraciclina 15 ug/ml y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Cada colonia crecida en el medio fue utilizada para realizar PCR directamente de colonia del gen *chrB* bajo las condiciones especificadas en el numeral 4.5., el producto de amplificación fue visualizado en gel de agarosa al 1.2 % con 0,5 ug/ml de bromuro de etidio (Sambrook et al, 1989).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. AISLAMIENTO DE CEPAS NATIVAS

Se aislaron 21 cepas bacterianas nativas capaces de crecer en presencia de cromo (ácido crómico o cromato de sodio); 14 provenientes de la muestra de suelo del proceso de landfarming en Guaduas y 7 de crudo de Tame, Arauca. El número de aislamientos se redujo a 14 evaluando su resistencia a cromo hexavalente utilizando como tamizaje inicial la prueba de sensibilidad impregnados con diferentes concentraciones de dicromato de potasio, descartando aquellos que presentaron mayor halo de inhibición a una concentración de 200 μM de dicromato (datos no mostrados).

Para la selección también se tuvo en cuenta los resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas y el perfil de plásmidos de alto y bajo peso molecular de los aislamientos; utilizando como criterio la similitud de los perfiles plasmídicos para reducir el número de cepas. El perfil plasmídico se utilizó como criterio de selección ya que la mayoría de reportes indica que la resistencia a metales pesados está codificada en plásmidos de alto y bajo peso molecular (Foster, 1983); sin embargo, cabe aclarar, que en cepas nativas que presentaron el mismo perfil de plásmidos no se discriminó si el perfil se debía a la presencia de diferentes plásmidos o la presencia de diferentes conformaciones de un mismo plásmido.

La selección de 14 cepas bacterianas nativas capaces de crecer en presencia de cromato a partir de muestras contaminadas con metales pesados; indica como las poblaciones bacterianas nativas de una región determinada, en presencia de un contaminante ambiental o como en este caso una sal metálica, pueden sobrevivir y permanecer en dicho ambiente. Esas condiciones actúan como presión de selección y como plantea Konopka et al, 1999, un ambiente extremo, creado por el hombre, al cual los microorganismos pueden responder y adaptarse.

5.2. SELECCIÓN DE CEPAS NATIVAS

5.2.1. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS NATIVAS

La identificación por medio de secuenciación del gen 16S rRNA de los 14 aislamientos nativos seleccionados, permitió tener una mejor aproximación acerca de las bacterias presentes en las muestras contaminadas con altas concentraciones de metales pesados. Las secuencias obtenidas (Anexo 10) para las cepas nativas aisladas corresponden a *Ochrobactrum* sp (10 aislamientos: Cr20, 24, 25, 33, 35, 45, 64, 65, 67 y 75), *Arthrobacter* sp (2 aislamientos: Cr28 y 47), *Bacillus* sp (1 aislamiento: Cr41) y *Pseudomonas aeruginosa* (1 aislamiento: Cr46), tabla 6.

Tabla 6. Identificación de cepas nativas por medio de secuenciación de 16S rDNA.

Cepa	Aislamiento de	Longitud secuenciada (pb)	Homologo más cercano*
Cr20	Suelo	941	<i>Ochrobactrum</i> sp
Cr24	Crudo	1090	<i>Ochrobactrum</i> sp
Cr25	Suelo	1070	<i>Ochrobactrum</i> sp
Cr28	Suelo	1090	<i>Arthrobacter</i> sp
Cr33	Crudo	1390	<i>Ochrobactrum</i> sp
Cr35	Crudo	1380	<i>Ochrobactrum</i> sp
Cr41	Suelo	1120	<i>Bacillus</i> sp (posible <i>B. cereus</i>)
Cr45	Crudo	1370	<i>Ochrobactrum</i> sp
Cr46	Suelo	1030	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Cr47	Suelo	1420	<i>Arthrobacter</i> sp
Cr64	Suelo	1360	<i>Ochrobactrum</i> sp
Cr65	Crudo	1100	<i>Ochrobactrum</i> sp
Cr67	Suelo	1390	<i>Ochrobactrum</i> sp
Cr75	Suelo	1368	<i>Ochrobactrum</i> sp
<i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	Cepa usada como control	1400	<i>Wautersia metallidurans</i> / <i>Ralstonia</i> sp

% similitud 97-99%

Dentro de los aislamientos identificados se encuentran habitantes frecuentes del suelo como *P. aeruginosa*, *Bacillus* sp y *Ochrobactrum* sp y *Arthrobacter* sp. Teniendo en cuenta que la mayoría de estas cepas fueron aisladas de muestras de suelo contaminadas con metales pesados provenientes de un proceso de biorremediación, era de esperarse que parte de la microbiota común presente en suelo, responda para adaptarse a las condiciones de estrés generadas (Corbisier et al, 1999). Esta idea se soporta también en estudios de desarrollo de tolerancia a metales realizados por Díaz-Raviña & Bååth (1996), los cuales muestran que bacterias aisladas de ambientes contaminados son frecuentemente tolerantes a altos niveles de metales, en comparación a aquellas aisladas de suelos no contaminados.

Teniendo en cuenta que la identificación de 10 de los 14 aislamientos correspondió a *Ochrobactrum* sp, con el fin de reducir el número de cepas de estudio, se realizó un ensayo de pruebas bioquímicas utilizando API20NE, para tener una aproximación al perfil fenotípico de estas cepas. Los resultados permitieron establecer los perfiles bioquímicos (Anexo 11) y agrupar las cepas según su capacidad metabólica y procedencia, para poder seleccionar entre los grupos un morfotipo. Con esto se redujo el grupo de 14 a 7 cepas, para la evaluación de su crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de cromato.

Dentro del grupo de las cepas identificadas como *Ochrobactrum* sp se reconocieron 4 perfiles bioquímicos generales y diferentes entre sí, escogiendo un representante de cada uno de ellos, correspondiendo a las cepas Cr20, Cr35, Cr65 y Cr67. Las cepas identificadas como *Arthrobacter* sp fueron Cr28 y Cr47, su perfil fue el mismo y de las dos se escogió como cepa de trabajo al morfotipo Cr28. Las cepas Cr41 y Cr46 identificadas como *Bacillus* sp y *P. aeruginosa* respectivamente, completaron el grupo de las cepas de estudio. Las características morfológicas macroscópicas y microscópicas que presentan las cepas nativas seleccionadas se resumen en el anexo 12. En general, cuando las bacterias son cultivadas en presencia de 0,5 uM de dicromato, el tamaño es la característica macroscópica que más varía, ya que las colonias son más pequeñas que en ausencia del metal. No se observó variación en la forma y color de la colonia.

En algunas de las cepas identificadas, hay reportes previos de resistencia a cromato, por ejemplo; en *P. aeruginosa* se ha reportado que el determinante de resistencia a cromato, está codificado en el plásmido pUM505, el cual tiene el gen *chrA* que codifica para una proteína transportadora muy similar a ChrA presente en *R. metallidurans* CH34 (Cervantes et al, 1990; Cervantes & Silver, 1996). De la misma manera se han aislado bacterias resistentes a cromato, a partir de muestras de suelo contaminadas con este metal, pertenecientes al género *Bacillus*. En los estudios con estos aislamientos, demostraron que la resistencia presente se debía a la reducción del cromo hexavalente a cromo trivalente (Camargo et al, 2003; Pal & Paul, 2004).

En el caso de *Arthrobacter* sp, éste hace parte de la microbiota normal de suelo, hasta el momento sólo se encuentra un reporte de una cepa de *A. oxydans*, en la cual se describió que la encargada a la resistencia a cromato, era una proteína de superficie cargada positivamente y una cápsula que actúan en la inmovilización y transformación química del Cr(VI) (Holman et al, sf).

Las bacterias del genero *Ochrobactrum* sp, hacen parte de la microbiota normal del suelo y recientemente se han incrementado los reportes de aislamientos de *O. anthropi* y *O. intermedium* a partir de muestras clínicas; especialmente de pacientes inmunocomprometidos o pacientes con infecciones nosocomiales, catalogándolo como un patógeno oportunista humano (Lebuhn et al, 2000; Teyssier et al, 2003). Hasta el momento se conoce un aislamiento de *O. anthropi* a partir de una muestra contaminada con arsenito (Lebuhn et al, 2000), pero no hay reportes de alguna especie de *Ochrobactrum* aislada de sitios contaminados con cromato.

5.3. EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE CROMO HEXAVALENTE

5.3.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Para las 7 cepas seleccionadas se encontró que la mínima concentración inhibitoria varió entre 1,5 y 3 mM de dicromato de potasio (Tabla 7) en medio enriquecido y entre 0,25 y 0,3 mM en medio mínimo de sales con adición de glucosa. Los valores de resistencia a cromo (VI) determinados son mayores a los valores reportados hasta el momento para cepas ya estudiadas como *R. metallidurans* CH34, cuya mínima concentración inhibitoria es de 300 uM de CrO_4^{2-} (0,3 mM). Todos los ensayos de MIC se llevaron a cabo en presencia de 3 mM de sulfato, ya que según reportes anteriores (Nies & Silver, 1989; Nies, Juhnke et al, 2002), se ha observado que la deficiencia de sulfato incrementa la susceptibilidad y la toma de cromato por la célula haciendo que éste sea más tóxico. Al usar esta concentración de sulfato, se presenta una inhibición competitiva por la entrada a la célula, y en el ensayo de determinación de MIC permite verificar que la toxicidad del cromato se presenta por lo que puede entrar de este después de saturar el sistema de toma de sulfato (Nies & Silver, 1989).

Es evidente la diferencia en el valor del MIC obtenido para las cepas, al realizarlo en un medio enriquecido como LB y un medio mínimo de sales (Tabla 7). El valor del MIC fue mayor en el medio enriquecido, la posible formación de complejos entre la sal metálica y los componentes del medio, hacen que la cantidad real disponible para la célula sea menor, y como resultado puedan resistir a concentraciones aparentemente mayores. El uso de un medio mínimo de sales, debido a su composición ayuda a que la formación de complejos sea menor, lo que permite tener un valor real de la concentración que puede resistir la cepa.

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria y resistencia a antibióticos de los aislamientos nativos.

Cepa	MIC ^a (mM de K ₂ Cr ₂ O ₇)		Resistencia a antibióticos				
	en LB	en MMS	Amp	Tet	Kan	Clf	Rif
Cr20	3	0,25	+	-	+	+	-
Cr28	1,5	0,3	-	+	+	-	-
Cr35	3	0,25	+	-	+	+	-
Cr41	1,5	0,3	+	+	-	-	-
Cr46	1,5	0,3	+	+	+	+	-
Cr65	3	0,25	+	-	+	+	-
Cr67	1,5	0,25	+	-	+	+	-

^a MIC: por sus siglas en inglés de Mínima Concentración Inhibitoria.

+: Resistencia al antibiótico; -: Sensibilidad al antibiótico

Amp: Ampicilina (150 ug/ml); Tet: Tetraciclina (15 ug/ml); Kan: Kanamicina (50 ug/ml);

Clf: Cloranfenicol (5 ug/ml) y Rif: Rifampicina (100 ug/ml)

Una de las implicaciones de la tolerancia y resistencia a metales pesados en el ambiente, es el incremento de una presión selectiva, para mantener algún elemento como por ejemplo, plásmidos, que también pueden tener genes presentes para resistencia a antibióticos (Foster, 1983; Lighthart, 1979). 6 de 7 aislamientos fueron resistentes a ampicilina y a kanamicina, 3 presentaron resistencia a tetraciclina y 5 a cloranfenicol; 3 de las 7 cepas fueron resistentes a tetraciclina y todas fueron sensibles a rifampicina. Estos resultados confirman lo encontrado por otros autores, donde la resistencia a altas concentraciones de una sal metálica, en ese caso cromato, podría estar relacionada con la resistencia a antibióticos (Faisal & Hasnain, 2004).

5.3.2. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE CROMO HEXAVALENTE

Al utilizar dos diferentes concentraciones de cromato se pudo observar que éste tiene un efecto en el crecimiento de las cepas. Las curvas de crecimiento realizadas durante casi 7 días permitieron observar las fases del crecimiento en las cepas. En general el crecimiento

de las cepas es mayor y más rápido en ausencia de dicromato, a medida que aumenta la concentración de éste el crecimiento de la cepa es más lento y además es reducido, ya que en ningún caso (excepto en la cepa Cr46) se llega a obtener la D.O. alcanzada en ausencia del metal; indicando que afecta su crecimiento, pero según el comportamiento observado en las gráficas, puede llegar a crecer bajo las condiciones establecidas.

El crecimiento en 0,3 mM de dicromato fue bajo en las cepas Cr20, Cr 35, Cr65 y Cr67, lo cual era de esperarse ya que su MIC está alrededor de 0,25 mM en MMS; mientras que en 0,15 mM del metal se observó crecimiento aunque lento (figura 4, 5, 6 y 7).

Por otra parte en las cepas Cr28, Cr41 y Cr46; cuyo MIC es 0,3 mM en MMS, es posible observar que si bien la fase lag es mucho más larga, las cepas pueden llegar a fase exponencial y tener crecimiento, aunque en la mayoría de los casos es casi la mitad del obtenido en ausencia del metal. Esto demuestra el efecto tóxico que tiene el cromo hexavalente en el crecimiento de las células a medida que su concentración aumenta. El buen crecimiento observado en estas cepas en 0,3 mM de dicromato, permite proponerlas como candidatas para portar un plásmido biosensor de cromato; ya que podrían resistir concentraciones similares en una muestra contaminada.

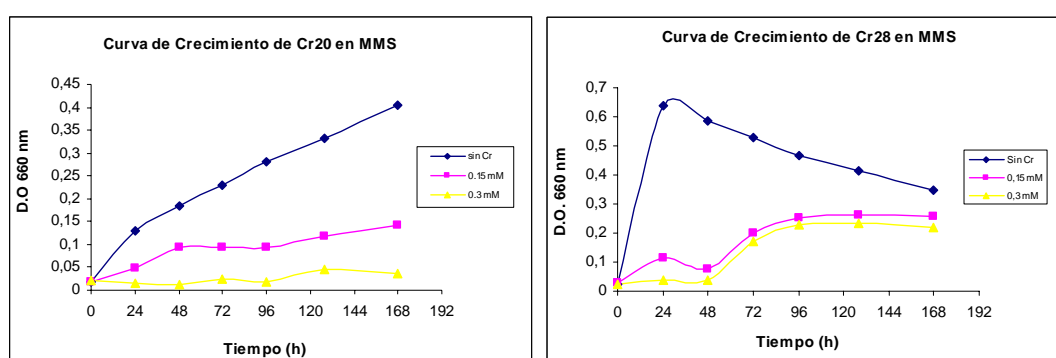


Figura 4. Curvas de crecimiento de Cr20 y Cr28 en ausencia y presencia de dicromato.

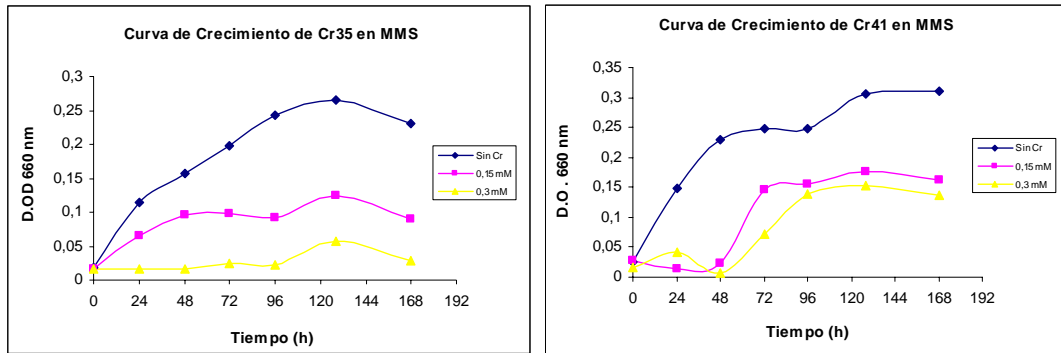


Figura 5. Curvas de crecimiento de Cr35 y Cr41 en ausencia y presencia de dicromato.

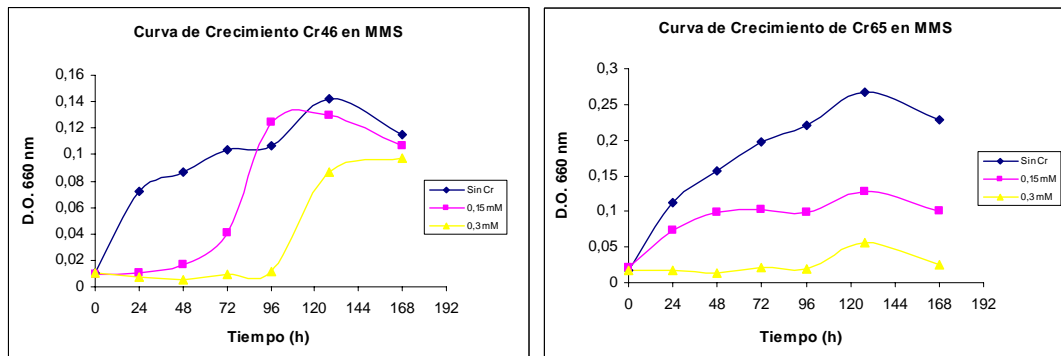


Figura 6. Curvas de crecimiento de Cr46 y Cr65 en ausencia y presencia de dicromato.

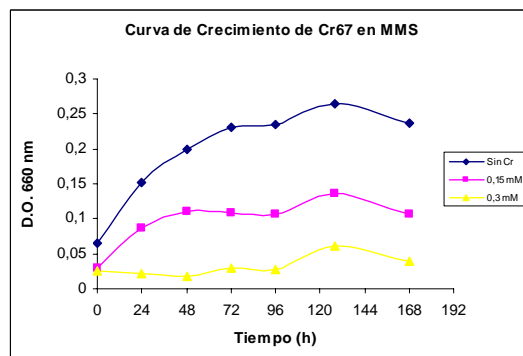


Figura 7. Curvas de crecimiento de Cr67 en ausencia y presencia de dicromato.

5.4. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES *chrA* y *chrB*

Los genes *chrA* y *chrB* (del determinante *chr_I*) no solamente están relacionados con el eflujo de cromato en *R. metallidurans* CH34; se ha observado que el producto génico presenta homología con proteínas relacionadas con la resistencia a cromato en *P. aeruginosa* (homología de 29% entre proteínas ChrA, Cervantes & Silver, 1996) y también en otras bacterias como *Synechococcus*, *Methanococcus* y *Bacillus subtilis* (Nies, Koch et al, 1998). Estos reportes sugieren que probablemente no son genes exclusivos de una especie bacteriana en particular, y que pueden llegar a encontrarse en otras bacterias, permitiendo plantear la búsqueda de éstos en los aislamientos nativos.

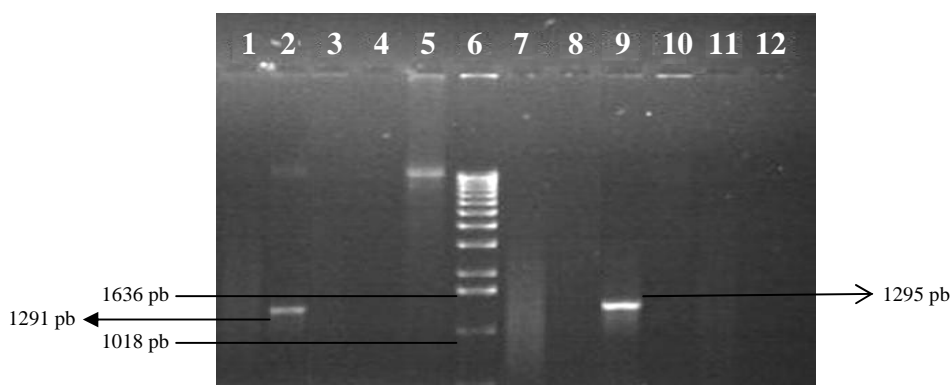


Figura 8. Electroforesis de productos de amplificación del gen *chrA* en gel de agarosa al 0.9%. Distribución de las cepas por carriles: **1.** Cr20; **2.** Cr28; **3.** Cr35; **4.** Cr41; **5.** Cr46; **6.** Marcador de peso molecular (1 Kb Ladder, Gibco); **7.** Cr65; **8.** Cr67; **9.** *R. metallidurans* CH34; **10.** *R. metallidurans* AE104; **11.** Control de cebadores; **12.** *Bacillus* QC1-2 reductor de cromato.

La temperatura de anillaje para los cebadores de *chrA* (determinante *chr_I*) se optimizó a 58 °C, temperatura en la cual se obtuvo una buena amplificación en el control positivo (*R. metallidurans* CH34) observando una banda de aproximadamente 1300 pb. Para el gen *chrA* se obtuvo amplificación de un fragmento del tamaño esperado en 1 de las 7 cepas (Cr28, figura 8). Adicionalmente se observó una banda de mayor peso molecular tanto en la cepa Cr28 como en la Cr46, ese fragmento presenta un peso molecular mayor a la banda superior

del marcador de peso molecular utilizado, haciendo que su determinación no sea real. En el caso de la cepa Cr28, puede que el gen que codifica para la proteína ChrA, o uno muy relacionado, este presente. Para poder afirmar esto haría falta secuenciar dicha región con el fin de establecer si hay homología entre esa región amplificada y genes relacionados con la resistencia a cromato.

Para el gen *chrB* (determinante *chr₁*) la temperatura de anillaje estandarizada fue de 57.5° C, observando amplificación de un fragmento de aproximadamente 450 pb en *R. metallidurans* CH34. En los aislamientos Cr28 y Cr75 se observó un fragmento de amplificación del tamaño esperado (figura 9) aunque la intensidad de la banda es diferente. En las cepas Cr28 y Cr46, se encontró nuevamente bandas de mayor peso molecular.

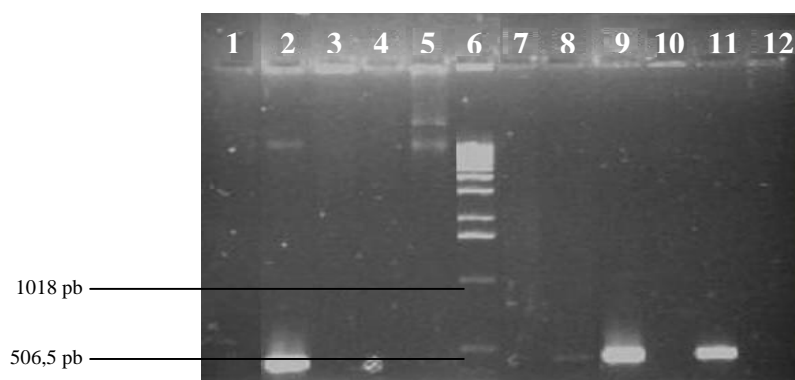


Figura 9. Electroforesis de productos de amplificación del gen *chrB* en gel de agarosa al 1.5%. Distribución de las cepas por carriles y longitud del fragmento amplificado: **1.** Cr20; **2.** Cr28 (440 pb); **3.** Cr35; **4.** Cr41; **5.** Cr46; **6.** Marcador de peso molecular (1 Kb Ladder, Gibco); **7.** Cr65; **8.** Cr67 (455 pb); **9.** *R. metallidurans* CH34 (450 pb); **10.** *R. metallidurans* AE104; **11.** *R. metallidurans* AE126 (450 pb); **12.** Control de cebadores.

Las cepas Cr28 y Cr67 presentan un gen relacionado con *chrB* y probablemente éste está relacionado con la resistencia a cromato que presentan estas cepas. Con el fin de confirmar la homología con el gen *chrB*, se secuenciaron los fragmentos de amplificación de estos

aislamientos; sin embargo, las secuencias obtenidas tenían mucho ruido de fondo lo que impidió realizar un alineamiento y comparación con las bases de datos de genes.

Estos resultados son el primer reporte de amplificación de genes relacionados con eflujo de cromato en bacterias nativas colombianas y según la identificación por secuenciación de 16S rDNA; el primer reporte de ese gen en *Ochrobactrum sp.*

El gen *chrB* codifica para la proteína reguladora ChrB, presente en el determinante *chr1* de *R. metallidurans* CH34. Aparentemente esta proteína de membrana es la encargada de la inducibilidad de la resistencia. Si se tiene en cuenta la conformación de este determinante *chr1*, la proteína realmente encargada de la resistencia es ChrA, ya que es la proteína transportadora de cromato y probablemente la responsable de su eflujo. Por esta razón, a pesar de amplificar el gen que codifica para esta proteína en uno de los aislamientos (Cr28), no se puede afirmar que ésta esté presente o que sea la única responsable de la resistencia; ya que la presencia de un gen no implica su funcionabilidad.

A pesar de que haya o no amplificación de genes relacionados con este sistema de resistencia, no implica que sean el único mecanismo presente y que no puedan estar involucrados otros mecanismos de resistencia-tolerancia como la reducción, o la inmovilización del metal.

5.5. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *chrR* RELACIONADO CON CROMATO REDUCTASAS

Se ensayaron varias condiciones para la amplificación de genes relacionados con cromato reductasas utilizando cebadores degenerados, sin embargo, a pesar de variar la temperatura de anillamiento y las concentraciones de los reactivos utilizados; no se logró amplificar ningún gen relacionado con cromato reductasas, ni en las cepas nativas ni en los controles positivos utilizados (*Bacillus* QC1-2).

Al diseñar los cebadores la temperatura de anillamiento obtenida fue cercana a 40 °C, por tal razón, se realizó un gradiente de temperatura más bajo, sin obtener buenos resultados (datos no mostrados). Se intentó amplificar en los controles positivos y en las cepas nativas aisladas a 45 °C, sin obtener amplificación alguna (figura 10). Esto puede deberse al diseño de los cebadores, ya que la corta longitud del gen (500 pb aproximadamente) y la baja similitud entre las secuencias utilizadas; hizo más difícil su diseño ya que se reducía la posibilidad de tener buenas regiones de homología y blanco para el diseño de los mismos. Para estudios posteriores, en el caso de tener poca homología, se recomienda utilizar un juego de cebadores específicos, con el fin de amplificar diferentes tipos de cromato reductasas.

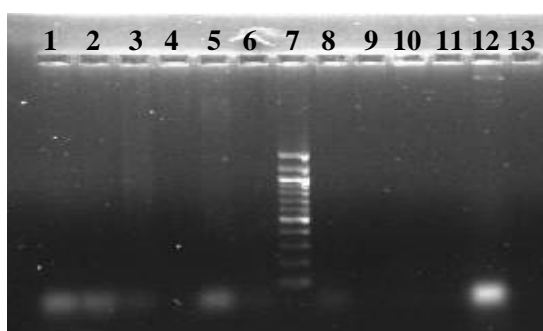


Figura 10. Electroforesis de los productos de PCR de genes relacionados con cromato reductasas (gel de agarosa al 1.5%). Distribución de los cepas por carriles: **1.** Cr20; **2.** Cr28; **3.** Cr35; **4.** Cr41; **5.** Cr46; **6.** Cr65; **7.** Marcador de peso molecular (100 pb); **8.** Cr67; **9.** DNA total *P. aeruginosa*; **10.** DNA plasmídico pCRO616 de *P. aeruginosa*; **11.** DNA total de *Bacillus* QC1-2; **12.** Control negativo de plásmido extraído de *E. coli* **13.** Control de cebadores.

5.6. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO

Se utilizó el plásmido para prueba de promotores pPROBE-TT', para colocar un inserto de 2,6 Kb en el sitio de múltiple clonaje al cortar con *EcoRI*. El fragmento de 2,6 Kb tiene los genes *chrBA* y parte de *chrC* del determinante *chr1* de *R. metallidurans* CH34 (figura 11).

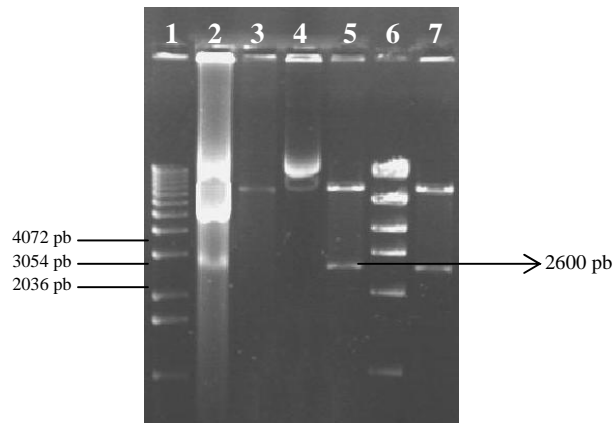


Figura 11. Digestión con la enzima *EcoRI* de los plásmidos pPROBE-TT' y pECD300. Distribución de los carriles: **1.** Marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder, Gibco); **2.** pPROBE-TT' sin digerir; **3.** pPROBE-TT' digerido; **4.** pECD300 sin digerir; **5.** pECD300 digerido; **6.** Marcador de peso molecular (DNA High Mass Ladder, Gibco); **7.** pECD300 digerido.

Bajo las condiciones de ligación y transformación realizadas se obtuvo 13 colonias, a las cuales se les realizó PCR para amplificar el gen *chrB* y determinar si tenían o no el inserto. Se encontró que 7 de las 13 colonias tenían el gen *chrB* y por ende el inserto (figura 12).

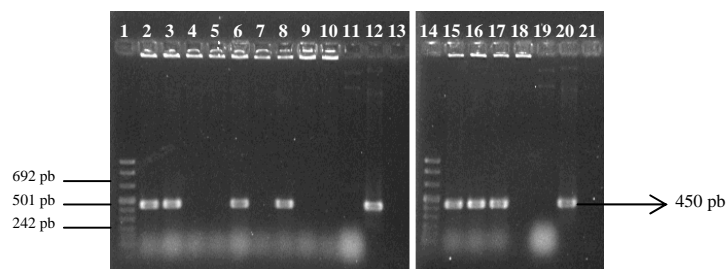


Figura 12. Amplificación del gen *chrB* en las colonias transformadas con la ligación de fragmento de 2,6 Kb de pECD300 y pPROBE-TT' linearizado. Distribución de carriles: **1.** Marcador VIII (Roche); **2.** Colonia Transformante (CT) CT1; **3.** CT2; **4.** CT3; **5.** CT4; **6.** CT5; **7.** CT6; **8.** CT7 ; **9.** CT8; **10.** CT9; **11.** pPROBE-TT'; **12.** pECD300; **13.** Control de cebadores; **14.** Marcador VIII (Roche); **15.** CT10; **16.** CT11; **17.** CT12; **18.** CT13 ; **19.** pPROBE-TT'; **20.** pECD300; **21.** Control de cebadores.

Dado que la restricción se realizó solo con una enzima, era posible que el inserto entrara en dos sentidos; para confirmar la orientación, se diseñaron unos cebadores que permitieran confirmarla (anexo 9), sin embargo, bajo las condiciones ensayadas no se obtuvo amplificación en ninguno de los 7 clones transformantes (figura 13); lo cual indica que probablemente ninguno tenga el inserto en el sentido de interés.

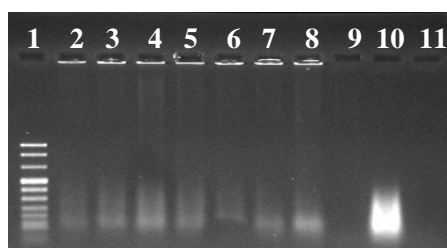


Figura 13. PCR para verificar el sentido del inserto. Distribución de carriles: **1.** Marcador VIII (Roche, banda más intensa corresponde a 501 pb); **2.** Colonia Transformante (CT) CT1; **3.** CT2; **4.** CT3; **5.** CT4; **6.** CT5; **7.** CT6; **8.** CT7 ; **9.** pECD300; **10.** pPROBE-TT'; **11.** Control de cebadores.

También se verificó el sentido del inserto usando enzimas de restricción, se utilizó la enzima *AvaI*, donde se esperaban 3 fragmentos en el vector pPROBE-TT' sin inserto. Sin embargo se observaron 5 fragmentos (2860, 2335, 1435, 980 y 815 pb), de los cuales solo 3 correspondían al tamaño esperado (2812, 2612 y 1385 pb aprox) (figura 14).

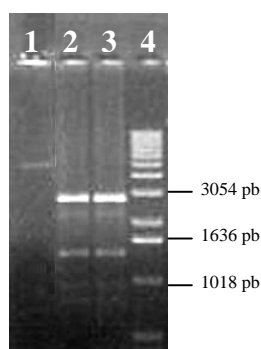


Figura 14. Digestión con la enzima *AvaI* del plásmido vector pPROBE-TT'. Distribución de los carriles: **1.** pPROBE-TT' sin inserto y sin digerir; **2.** pPROBE-TT' sin inserto y digerido; **3.** pPROBE-TT' sin inserto y digerido; **4.** Marcador peso molecular (1 Kb Ladder).

Por tal razón se escogió una segunda enzima de restricción, se utilizó la enzima *NdeI*, la cual presenta dos sitios de corte en pPROBE-TT' sin inserto (posiciones 4066 y 4267 pb) esperando un fragmento de 6900 y otro de 200 pb aproximadamente, siendo el de mayor peso el que se evidenciaría en los geles. Sin embargo, al realizar la restricción se observaba una banda de mayor peso al esperado, aproximadamente 8000 pb. El no corresponder el peso molecular esperado del plásmido con el valor real, en ninguna de las restricciones ensayadas, lleva a pensar que probablemente el plásmido tenga un inserto adicional, esto soportado bajo el hecho de la falta de correspondencia de los pesos moleculares y el otro sitio de corte encontrado en el plásmido con la enzima *AvaI*.

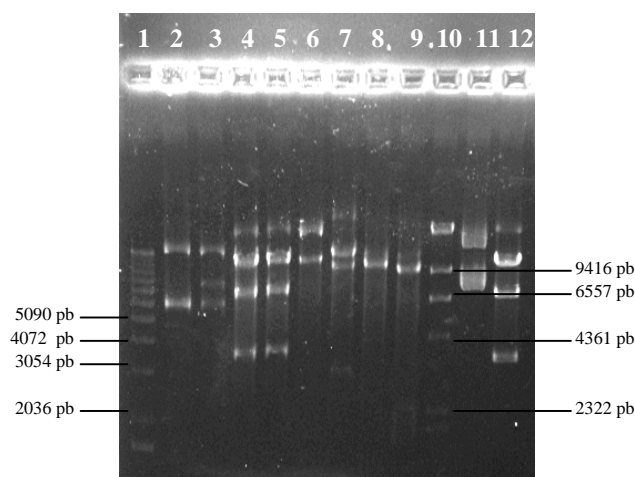


Figura 15. Digestión con la enzima *NdeI* de los plásmidos pECD300 y pPROBE-TT' y del DNA plasmídico obtenido de las colonias transformantes. Distribución de los carriles: **1.** Marcador de peso molecular X (Roche); **2.** pPROBE-TT' sin digerir; **3.** pPROBE-TT' digerido; **4.** CT1; **5.** CT2; **6.** CT4; **7.** CT5; **8.** CT6; **9.** CT7; **10.** DNA de fago λ digerido con *HindIII*; **11.** pECD300 sin digerir; **12.** pECD300 digerido.

El DNA plasmídico de las colonias transformantes fue digerido también con la enzima *NdeI*, con el fin de identificar los fragmentos esperados si el inserto estaba en la orientación correcta. Se esperaban 3 fragmentos de 8113 pb, 1200, pb y 164 pb (Anexo 13); esperando observar los dos primeros en los geles luego de la digestión. Como se aprecia en la figura

15, los clones CT1 y CT2, presentan el mismo patrón de restricción, y a su vez este patrón es similar al obtenido en la digestión de pECD300 (carril 12), lo que hace pensar que durante la ligación o la transformación, las reacciones pudieron contaminarse con DNA plasmídico de pECD300, haciendo que se obtuvieran también transformantes con este plásmido; las colonias transformantes CT1, CT2 y CT3, fueron descartadas por tal razón.

Por otra parte en las colonias 4 a 7, se observa un patrón de restricción diferente, y no se observan los fragmentos esperados. En el caso de CT4 se observa el plásmido probablemente sin ser digerido y con un peso molecular de aproximadamente 10 Kb. En la colonia CT5 se observa una restricción parcial y un banda de aproximadamente 3 Kb. Para las colonia CT6 y CT7, el patrón es más similar, sin embargo se observa una banda de aproximadamente 2,3 Kb en CT7. En general ninguno de los fragmentos obtenidos corresponde con los valores esperados, lo que hace plantear que tal vez el plásmido vector no tiene los dos sitios de corte que se esperan con *NdeI*.

A pesar de tener la secuencia general de uno de los plásmidos de la línea p-PROBE derivados de pBBR1 (Miller et al, 2000), es posible que al no tener la secuencia específica de pPROBE-TT' la determinación de los sitios de corte y por ende, de los fragmentos que se espera obtener sea más difícil. La secuencia disponible de estos plásmidos es la de pPROBE-NT', cuyo marcador de resistencia es kanamicina. Probablemente los sitios de corte adicionales que se encontraron podrían estar presentes en la región de resistencia a tetraciclina, cuya secuencia no se encontró disponible, pero que es el marcador de selección del plásmido pPROBE-TT'.

El no poder garantizar los sitios de corte que tiene el plásmido, así como que su peso molecular no coincida con lo esperado, hace que el uso del vector para prueba de promotores pPROBE-TT' no garantice el que no tenga insertos de otro tipo o características que no son especificadas por los autores. Por tal razón, se planteó una nueva propuesta de trabajo para el desarrollo de un biosensor de cromato.

5.7. PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UN PLÁSMIDO BIOSENSOR DE CROMATO

Con la perspectiva de realizar un plásmido biosensor de cromato, se plantea el nuevo diseño de un biosensor utilizando como gen reportero *lacZ* y clonando delante de éste el gen *chrB* de *R. metallidurans* con su promotor, el cual es inducible con cromato.

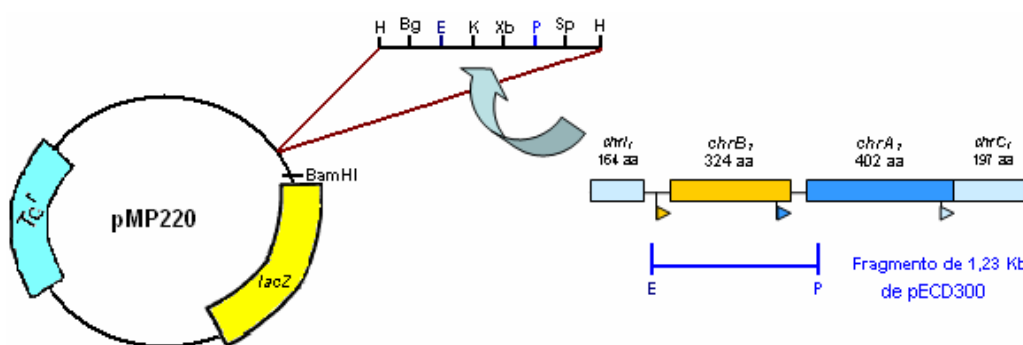


Figura 16. Esquema de la propuesta para la construcción de un plásmido biosensor de cromato utilizando como reportero el gen *lacZ*. Se indican los sitios de corte *EcoRI* (E) y *PstI* (P).

La construcción del nuevo plásmido biosensor se inició con la búsqueda de sitios de restricción; presentes en el plásmido vector (pMP220) y en el plásmido portador de la región de interés (pECD300), que permitieran realizar un clonaje direccionado. Se seleccionaron las enzimas *EcoRI* y *PstI* porque permitían el clonaje del fragmento de 1,23 Kb con el gen *chrB* (del plásmido pECD300) en el sitio de múltiple clonaje del plásmido vector pMP220 (figura 16). Al realizar la digestión de los plásmidos, se obtuvo el peso molecular esperado para pMP220 linearizado (aproximadamente 10 Kb) y para pECD300 los fragmentos del peso molecular esperado: un fragmento de 2,6 Kb (corte con *EcoRI*), un fragmento de 1,23 y otro 1,38 Kb (figura 17).

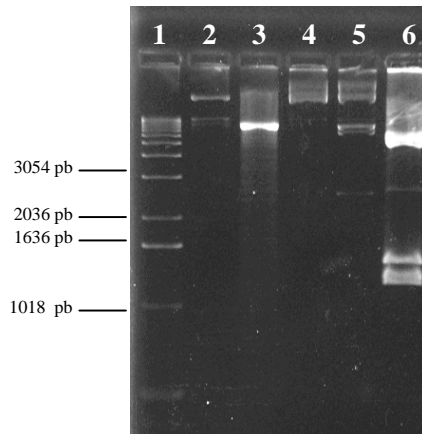


Figura 17. Digestión de los plásmidos pMP220 y pECD300 con las enzimas *EcoRI* y *PstI*. Distribución de los carriles: **1.** Marcador de peso molecular X (Roche); **2.** pMP220 sin digerir; **3.** pMP220 digerido; **4.** pECD300 sin digerir; **5.** pECD300 digerido solo con *PstI*; **6.** pECD300 digerido con *EcoRI* y *PstI*.

Luego de ligar el fragmento de 1,23 Kb en pMP220 y transformar en células de *E. coli* DH5 α , se obtuvo más de 25 colonias transformantes, las cuales se utilizaron para realizar PCR de colonia del gen *chrB*. Sólo una de las colonia era aparentemente positiva (CT6, figura 18), pero al repetir la PCR de un pase de la colonia, no se obtuvo amplificación.

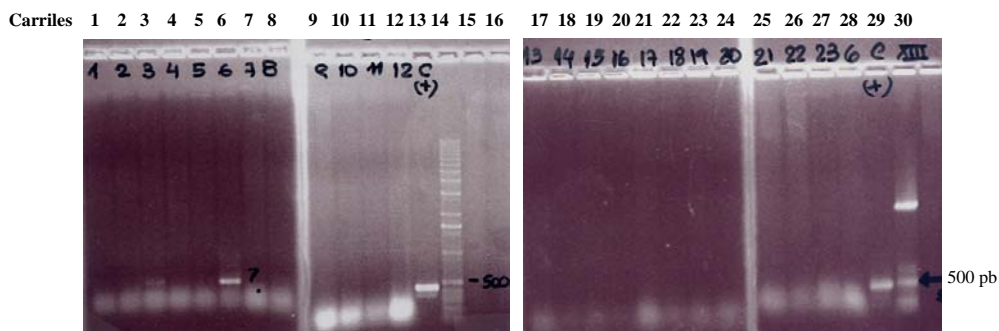


Figura 18. Amplificación del gen *chrB* en 23 colonias transformadas con la ligación de fragmento de 1,23 Kb de pECD300 y pMP220 linearizado. Distribución de carriles: **1 a 12.** Colonia Transformante (CT) CT1 a 12; **13.** pECD300; **14.** Marcador VIII (Roche); **15 y 16.** Control de cebadores; **17 a 27.** Colonia Transformante (CT) CT13 a CT23; **28.** Repetición PCR de CT6; **29.** pECD300; **30.** Marcador XIII (Roche).

A pesar de no obtener ninguna colonia transformante, el plan de clonaje propuesto es válido para la creación de un nuevo biosensor, utilizando como proteína reportera la actividad β -galactosidasa, la cual ha sido ampliamente utilizada para estudio de promotores, y según el sustrato utilizado puede llegar a tener una alta sensibilidad en el momento de su detección. Adicionalmente, al utilizar un inserto en el cual este presente la región promotora del gen *chrB* y el gen *chrB*, cumple con una de las principales características a tener en cuenta en el diseño del biosensor y es su inducibilidad en presencia de cromo hexavalente. Aunque en este ensayo no se obtuvo la construcción, los ensayos realizados y la propuesta son de gran valor para las investigaciones del grupo, ya que abre la posibilidad de plantear nuevos biosensores para la detección de contaminantes o para el estudio de genes y promotores de interés ambiental.

6. CONCLUSIONES

1. Se aislaron y seleccionaron 14 bacterias nativas capaces de crecer en presencia de cromato, a partir de muestras contaminadas con metales pesados; lo cual indica como las poblaciones nativas pueden llegar a responder a un estrés ambiental.
2. La secuenciación del gen 16S rRNA indicó que 10 de los 14 aislamientos corresponden a *Ochrobactrum* sp, 2 a *Arthrobacter* sp., uno a *Bacillus* sp y uno a *P. aeruginosa*.
3. La aproximación al perfil fenotípico de las 10 cepas que correspondían al genero *Ochrobactrum* sp, permitió seleccionar 4 de ellas para los estudios posteriores, reduciendo el grupo de estudio a 7 cepas con características metabólicas diferentes.
4. La mínima concentración inhibitoria de dicromato en medio enriquecido es de 1,5 mM para las cepas Cr28, Cr41, Cr46 y Cr67; y de 3 mM para las cepas Cr20, Cr35 y Cr65.
5. La mínima concentración inhibitoria de dicromato en medio mínimo de sales es de 0,25 mM para las cepas Cr20, Cr35, Cr65 y Cr67; y de 0,3 mM para las cepas Cr28, Cr41, Cr46, siendo mayor a la reportada para la cepa de referencia utilizada *R. metallidurans* CH34.
6. El valor de la mínima concentración inhibitoria obtenida en medio líquido enriquecido es diferente a la obtenida en medio mínimo de sales, esto se puede deber a la formación de complejos de la sal metálica con componentes del medio enriquecido.
7. Al evaluar el crecimiento de las cepas en presencia de dicromato se observó que éste es mayor y más rápido en ausencia del metal, y a medida que aumenta su concentración el crecimiento de la cepa es más lento y además es reducido.

8. Se amplificó el gen *chrA* y *chrB* en la cepa Cr28, lo cual puede sugerir que genes relacionados con la bomba de eflujo de cromato están presentes en esta cepa y que podrían ser los responsables de su resistencia a cromato.
9. Se amplificó el gen *chrB* en la cepa Cr67, esta cepa nativa tiene al menos uno de los genes relacionados con la resistencia a cromato mediada por el eflujo.
10. La amplificación de genes relacionados con la bomba de eflujo de cromato es uno de los primeros reportes realizados en cepas nativas identificadas como *Ochrobactrum* sp.
11. La presencia o ausencia de los genes relacionados con el eflujo en bacterias nativas, no implica que sean el único mecanismo presente y que no puedan estar involucrados otros mecanismos que no fueron evaluados en el presente estudio.
12. No se obtuvo amplificación de genes relacionados con cromato reductasas utilizando cebadores degenerados ni en la cepa control ni en los aislamientos nativos.
13. La digestión del plásmido vector pPROBE-TT' para la prueba de promotores con las enzimas *AvaI* y *NdeI*; indican que esté puede tener algún inserto o la presencia de sitios de corte adicionales con estas enzimas, diferentes a los esperados.
14. La verificación del sentido del clonaje en las colonias transformantes portadoras del inserto de interés, se dificultó debido a los problemas con la restricción del plásmido vector y la falta de correspondencia del peso molecular de los fragmentos esperados.
15. Se obtuvo los fragmentos esperados de la restricción del plásmido pMP220 y pECD300 con las enzimas *EcoRI* y *PstI*; lo que sugiere que la nueva propuesta de clonaje para el desarrollo de un biosensor de cromato pueda tener éxito utilizando este vector y como reportero el gen *lacZ*.

7. ANEXOS

Anexo 1

Composición de Medio Mínimo de Sales, MMS (Malekzadeh et al, 2004)

Componente	Por litro de agua destilada
<i>Solución A</i>	
NH ₄ Cl	2,67 g
Na ₂ HPO ₄	5,35 g
Solución B	6 ml de Solución de sales minerales

<i>Solución B</i> (de Sales minerales)	Por litro de agua destilada
CaCl ₂ H ₂ O	0,01 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	10 g
MnSO ₄ 7H ₂ O	0,07 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,4 g

Anexo 2

Composición de Agar Top 0,6%

Componente	
Triptona	1 %
Extracto de levadura	0,5 %
NaCl	1 %
MgSO ₄	100 mM
Maltosa	0,2 %
Agar	0,6 %

Anexo 3

Composición de Luria-Bertani (Caldo)

Componente	Por litro de agua destilada
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Anexo 4

Composición de Medio Mínimo de Sales con Tris, MMS-T (Mergeay et al, 1985)

Componente	Por litro de agua destilada
Tris/HCl	6,06 g
NaCl	4,68 g
KCl	1,49 g
NH ₄ Cl	1,07 g
Na ₂ SO ₄	0,43 g
MgCl ₂	0,2 g
CaCl ₂	0,03 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	40 mg
FeCl ₃	10 ml de una solución de 48 mg/100ml
Solución SL7	1 ml

<i>Solución SL7</i> (de Sales minerales)	Para 1 litro de solución
HCl 25 %	1,3 ml
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	144 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg
H ₃ BO ₃	62 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	190 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	17 mg
NiCl ₂ ·6H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	36 mg

Anexo 5

Protocolo para la extracción de DNA total (Trajanovska et al, 1997)

- 1.** Cultivar la cepa en 10 ml de LB a 30 °C durante 16 horas (ON) y centrifugar el cultivo para obtener el pellet de células.
- 2.** Resuspender el pellet en 0,5 ml de buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA y pH 7,6) con SDS 0,5%, proteinasa K 10 ug/ml, lisozima 10 ug/ml y RNasaA 10 ug/ml.
- 3.** Incubar a 37 °C durante 2 horas.
- 4.** El lisado es extraído dos veces con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), centrifugando a 12.000 rpm a 4 °C por 20 minutos y recuperando el sobrenadante.
- 5.** El DNA es precipitado con etanol absoluto frío durante toda la noche.
- 6.** Centrifugar a 12.000 rpm a 4 °C por 30 minutos, descartar el sobrenadante y dejar secar el ADN por 20 minutos a temperatura ambiente.
- 7.** Resuspender el pellet en agua ultrapura.

Anexo 6

Secuencias de proteínas relacionadas con cromato reductasas usadas para el diseño de los cebadores degenerados

>P.aeruginosa chromate transport protein (chrA) (>gi|151132|gb|M29034.1|PSECHRA)
MSVANEESYRPSKATDATTEAVPPPMSYPQLFARFLKFGLLAWGGPVAQIDMLRRELVDDEERWISSKRFNKLAVMQVLP
PEAHEICVHLGIRAKGRLGGVLAGLGFMLPGFLLMFALSWLYFQIEFVGTALGAAFLGVQAAVIALIVRAVHRIGEHILLD
RWLWVIAIVCALAAIGRVDFWITLPAGGLVYALLVLNHRASALLVTLAAVALAAAVALWAAPTAKLVEAVVQQAASVLLIF
ASGLKAGLLTFGGAYTAIPFVRNDAVGRGWMTDGQFLDGLALSGVLPAPLIIFATFVGYVAGGPIGAVAMTVGVFLPAFAF
SLIFYDRLEAVVENKRLHAFLDGVAAGVVGLIGATTIDLAQVTAERVPSLTVGMSIFAAGLAFLYAWKNKLNVVVVILAAG
LAGWLVFPNQ

>Bordetella parapertussis 12822 (>gi|33594723:c2414492-2413938)
MSTYKIAVAVVGLSLRAASFNLRLARALEKLAPANFEFEHVSLGDVPLYNQDHENDMAAPAAKQIADAHGILFVTPEHNR
SIPAALKNAIDWGSRPWGHNSWIGKTAGIVGTSPSAAGTAMAQQHLRNILAAEGVNVLTTPPEVFLQFKEGLIDEQFNITNE
DTRKFLQGWLDRYVAWVTRLA

>Bordetella bronchiseptica RB50 (>gi|33598993:c1806889-1806335)
MSTYKIAVAVVGLSLRAASFNLRLARALEKLAPANFEFEHVSLGDVPLYNQDHENDMAAPAAKQIADAHGILFVTPEHNR
SIPAALKNAIDWGSRPWGHNSWIGKTAGIVGTSPSAAGTAMAQQHLRNILAAEGVNVLTTPPEVFLQFKEGLIDEQFNITNE
DTRKFLQGWLDRYVAWVTRLA

>Escherichia coli chromate reductase (chrR) (>gi|14485252:1-567)
MSEKLVVTTLLGSLRKGSGFNGMVARTLPKIAPASMEVNALPSIADIPLYDADVQQEFGFPATVEALAEQIRQADGVVIVTP
EYNYSVPGGLKNAIDWLSRLPDQPLAGKPVLIQTSSMGVIGGARCQYHLRQILVFLDAMVMNKPEFMGGVIQNKVDPQTGE
VIDQGTLDHLTGQLTAFGEFIQRVKI

>Pseudomonas putida KT2440 chromate reductase (chrR) (>gi|14209681:1-561)
MSQVYSVAVVVGSLRKESYNRKVARALSELAPSSLALKIVEIGDLPLYNEDI EAEAPPETWKRFRDEIRRSDAVLFVTPEY
NRSVPGCLKNAIDVGSRPYQSAWSGKPTAVVSVSPGAIGGFGANHAVRQSLVFLDMPCMQMPEAYLGGAASLFDSDGKLN
DKTRPFLQAFVDRFASWVKLNRAV

>Pseudomonas putida MK1 chromate reductase (chrR) (>gi|14209679:102-662)
MSQVYSVAVVVGSLRKESYNRKVARALSELAPSSLALKIVEIGDLPLYNEDVEAEAPPEAWKRFREEIRRSDAVLFVTPEH
NRSVPGCLKNAIDVGSRPYQSAWSGKPTAVVSVSPGAIGGFGANHAVRQSLVFLDMPCMQMPEAYIGGAASLFDSDGKLN
DKTRPFLQAFVDFASWVKLNRAV

>Bacillus subtilis oxidoreductase (ycnD) (>gi|15825441:1-750)
MNEVIKSLTDHRSIRSYPDEPVAQEQLDQIIEAVQSAPSSINGQQVTVITVQDKERKKKISELAGGQPWIDQAPVFLFCA
DFNRAKIALEDLHDFKMEITNGLESVLVGAVDAGIALCTATAAAESLGLGTVPIGAVRGNPQELIELLELPKYVFPVPLSGLV
IGHPADRSACKPRLPQEA VNHQETYLNDQDELTSHIQAYDEQMSEYMNKRTNGKETRNWSQSIASYYERLYPHIREMLEKQ
GFKVEK

>Oceanobacillus iheyensis HTE831 chromate reductase (>gi|23098493|ref|NP_691959.1|)
MKIAALVGSNRKDSYNKLLVKYMKKEYAGKLDIDILPIDELPFYNQDKEMDPPAIVEDLRERIKNSDGIL
FATPEYNASISGMLKNAIDWFSRVDLVMVKNPAMIVGASMGAMGTVKAQIQRLRQILNAPGVGTLTLPGNE
VFGSVQNKMDQGNLTDEQTVQFIDNVVDNYVQWIKRVEA

Anexo 7

Protocolo para la preparación de células competentes (Sambrook et al, 1989)

- 1.** Preparar un preinóculo de *E. coli* en 3 ml de medio LB e incubar durante toda la noche en agitación a 37 °C.
- 2.** Diluir el preinóculo: disponer de un matraz que contenga 100 ml de medio LB y añadir 1 ml del preinóculo. Mantener en agitación hasta una D.O. de 0.4-0.5.
- 3.** Mantener en hielo durante 15 minutos, para detener el crecimiento.
- 4.** Pasar el contenido del matraz a tubos de centrifuga, vertiendo en cada tubo 40 ml.
- 5.** Centrifugar a 10.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en en 0,1M MgCl₂ (la mitad de volumen inicial).
- 6.** Centrifugar a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Resuspender el pellet en la mitad de volumen de 0,1M CaCl₂. Mantener los tubos de centrifuga en hielo al menos 30 minutos.
- 7.** Centrifugar a 5.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Resuspender suavemente el pellet en 1/10 (de volumen inicial) de 0,1M CaCl₂ en glicerol al 20%.
- 8.** Preparar alícuotas de 200 ul en tubos eppendorf y almacenar los tubos en el congelador a -80 °C.

Anexo 8

Protocolo para la transformación de células competentes con DNA recombinado (Inoue et al, 1990)

1. Disponer en baño de hielo los tubos con 200 ul de células competentes y almacenadas a -80 °C, dejarlas durante 10 minutos para que se descongelen.
2. Adicionar el volumen correspondiente a la ligación y mezclar suavemente golpeando el tubo con los dedos.
3. Mantener en hielo durante 30 minutos.
4. Realizar choque térmico calentando el tubo a 42 °C durante 30 segundos.
5. Luego del choque dejar el tubo durante dos minutos más en hielo.
6. Adicionar 1 ml de LB e incubar con agitación 200 rpm a 37 °C durante 1 hora.
7. Centrifugar las células y resuspenderlas en un volumen de aproximadamente 0,5 ml de LB; inocular un volumen de 200 ul y 300 ul en dos placas de agar LB-tetraciclina 15 ug/ml.
8. Incubar a 37 °C durante 20 - 24 horas.

Anexo 9

Secuencias de DNA usadas en el diseño de cebadores para verificar la fusión *chrBA::gfp*

```
>gi|14530742|emb|AJ313327.1|RME313327 Ralstonia metallidurans pMOL28 plasmid chrB1 gene, chrA1 gene and chrC gene
GAATTCCTGTAACTCCATAGGGGCTGGCCATACATCCGCCATCGTCTTACAGACTGCTCGCGAGTTAAGGAGCGAGCACCATGGAGGTAATAA
GTGCTCATACGGCACTTTATGCAATCTCCAAGGCGCCGAAACGTTGATTTTGTAGAGATCTCTACAACATTGAAGTAGCGCATACAGCCCGC
TAAGCTGTCTGCATGAACGCTCTCCCATCTCTCCCGAGACTGCCTGGTACTGCTCGTCTGTTAGCTTGCCAACATCCGCTCCACTGCGCG
CATGCGATTCTGGCGCGGATCAAGGCGCTTGGCGCCACAGCACTGCGGGACGGGGCTATCTACTCCCAATCTGCCAGGACTGCGGGCAC
CTTTGCAGACTGGAACCGATGCGGCCAGTGGAGATGGCAAGGCTCGGATGCTGTCCGTACAGGCCGCTGACGACCAGCAGGAGGCGGAG
TATCGCCGCTTGTTCGACCGGTCCACCAATATGCCGAATGGATGGTGCAGACTCTCCAGCGCCGCTCAACATTGTCCGATTTCGGACGAGGC
GGAGTCTGTCGCGTGGCACGCCGCGACGGTTCGAGGATCGACGCTATCCGCAAGGTCGATTTTTCCCTAACGAGGCGTCCGCCGTGCCG
AATTCAGTGGCGCGACTTCAATGCAGCGATCGACATCTTGCTTTCCGCCGGGAGCGCCAGGAGTAGCCGGCAACATTCCGCGACGTCAC
CGAACCCAGTATCAGGGGCGCAGTGGGCGACCCGCGAGCATCTATGGGTAGACCGTGTGCGCTGGCTTGGTTGATCCGCGCTTTTATCGA
TCCCCATGCCACTTTTCTCTGGCTCGAAGATGTCGCTCAGTGCCTGACGACGCACTTGGATTTCGACTTCGATGGCGCGACGTTTACACACA
TTGGCGACCCGCTTTCGTTTGGAGTGTCTGCTCGCCAGCTTCGGACTAGACGAAGACAAGGGCTCGCCCGCTCGGCCAGATGATCCATGTT
CTGGATGTGCGCGCACACCGGTTGCCGAAGCCAGTGGCTTTGAGGCGAGTGTGGCAGGCGCCCGGGAACGCTCCCTAACGACGACGCACT
GCTGGATGAAGTTCGGCTATGTCCTCGACTCGCTGTACACGCACTTCTCAAGCCCGCGCAACGCTAGTCTGTTGCCAATCAACAAAGAAGCAA
ACTATTCAACAGACACGATGAACCTGCCCCAACCCGATACCACTGCAGCCGGTTCGGTACATACCGCGCCACTTATACGCTACGCCAA
CTGGTGTGATGACTTCTGCGGCTTGGCACCTCGGCTTTGGCGTCCCGTGGCGCTAGCCGGCTACATGCACCGCGCACTCGTCGAGGCAAA
GCAGTGGATCACCGATGCCGACTACAAGGAAGGCTTGGCCCTGGCCAGCTCGCGCCGGGACCGCTTGGCGCTCAACTGGCCATTACCTGG
GATACGTCACCTACCGCATCGTAGGCGCAACGCTGTCGCGCGTGGCCCTTTGTACTGCGCTCGTTTCTCATGGTGTGGCAGCTCGGGTGGCA
TATGTGCGCTTTCGCGGCCCTGACCTGGATGCAGTGGTATTCTATGGCGTAGGCGCAGCAGTATTGGCATCATCGCAATCAGCGGTACAA
GCTGCACAAAAGAGCGTCCGCAACGACAAGTTGCTCTGGTTTATCTATCTGGTGTCTCGTGGCCGTCACGGTCATTACAGAATCGGAAGTGG
CGTGGCTGTTCCTTGGCGCGGCGCTCCTGGTCTGGTTCCTGGCGCGCCCGCGCAAGTGGCTGCGCCAAGGCAAGATGAATGCGTTTCGCTGCG
ACCCCACTGCGCGCGCAAGCGGCATGATGAGTACGTTGGATTGGCCGCTTCTTCCAGATTGGCGTGTCTTTTGCCAAGGCGGGAGCGCTT
CGTTTTCGGGTCCGGACTTGGCCATCGTCCGCTTCTGTACGGTGGTGTGGTGCAGGAGTACCCTGGCTGAACGACAAGCAGTTTGTGATG
CCGTCGCGAGTCCGCATGATACACCCCGCCGGTGGTCACTACCGTGGCTTCAATGGCTACCTCGTCGCGGCCCTGCTGGCGCTTGGCTG
GCTGCGCGCGCAACGCTTCTACCGTGTACTGTTACCGTCCCTACCCGCCCATATTTCAAGAAATACGGAACACTACCTGCGATCCTGCG
CTTTGTGGACGGTGTACCCGCGCGGCCATCGCGCCATTACTGGCGCGGTGATCGTGTGGCGAAGCGGTGATCGTTGATATCCGACAG
CGTTGCTGGCGCTTGTACCGTGCATTGCTTCTGAAGTTCAAGAAGCTGTCCGAGCCCATGATCGTTGCGGGGCGGCCCTTGATTGGTCTG
GTCGCCTATCCGTTGTTGCATCACTGAGATGCCACAGGAGACTCTTATGCTCTACGAAATGAAGCCGCTAGGTTGTGAACCTGCGAAGCTGA
CTGGCCCTTCCGAGAAGCTGATCTTCAGCCACTATGAGAACAATATGCGCGCGGTCGAAGCGACTGAATGCCATTACGGCCACGCTCGCA
GAGCTGGATATGGCAACCGCTCCCGTGTTCACGCTCAACGGACTGAATTC
```

```
>gi|11093863:4069-4785 gen gfp de Promoter probe vector pPROBE-NT', complete sequence
TAACTTTATAAGGAGGAAAAACATATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTACTGGAGTTGTCCCAATTCCTGTTGAATTAGATGGTGTATGTTAA
TGGGCACAAATTTTCTGTCACTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAACACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACACTAC
CTGTTCCATGGCCAACTTGTCACTACTTGTACTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGGATGACTTTTTC
AAGAGTGCCTGCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAAGTATATTTTCAAAGATGACGGGAACACTACAAGACACGCTGCTGAAGTCAAGTTTGA
AGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAACACTTCTTGGACACAAATGGAAATCAACTATA
ACTCACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAGAAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTT
CAACTAGCAGACCATATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATACCTGTCCACACAATCTGCCTT
TTCGAAAGATCCCAACGAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAAGTTTGTAAACAGTGTCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACATATA
AATAG
```

>Fusion probable región final chrA-*chrC*-SMC-*gfp* y utilizada para el diseño de los cebadores

```
CCATTACTGGCGCGTGTATCGTGTGGCGAAGCGGTGATCGTGTGATATCCCGACAGCGTGTGCTGGCGCTTGTACCCGTCGATTGCTTCTG
AAGTTCAAGAAGCTGTCCGAGCCCATGATCGTTGCCGGGCGGCTTGGATTGGTCTGGTGCCTATCCGTTGTTGCATCACTGAGATGCCAC
AGGAGACTCTTATGCTCTACGAATGAAGCCGCTAGGTTGTGAACCTGCGAAGCTGACTGGCCCTCCGAGAAGCTGATCTTCAGCCACTAT
GAGAACAATTTAGCGCGCGGTCGAGCAGTGAATGCCATTACGGCCAGCTGCGCAGAGCTGGATATGGCAACCGCTCCCGTGTTCACGCT
CAACGGACTGAAGCGCGAAGAACTCATCGCGACGAAGAATTTCGAGCTCAGGCCCTTGGTACCAGGATCCGTCGACTGCGAGAACTTAACTT
TATAAGGAGGAAAAACATATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCCTGTTGAATTAGATGGTGTATGTTAAGGCA
CAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAACACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACACTCTGTTTC
CATGGCCAACTTGTCACTACTTTCGACTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGT
GCCATGCCGAAGG
```

TGA = final del gen *chrA*

AGGAG = Sitio de unión del ribosoma propuesto para *chrC*

GAAT...GCTT = SMC, Sitio de Múltiple Clonaje de pPROBE-TT'

AGGAGG = Sitio de unión del ribosoma para *gfp*

AATGAAGCCGCTAGGTTGTG = sitio de unión cebador *Chrgfp1* F

TTCCATGGCCAACTTGTG = sitio de unión cebador *Chrgfp2* R

Anexo 10

Secuencias de 16S rDNA obtenidas para las cepas nativas aisladas

>1 Control *Ralstonia metallidurans* CH34

ctggcggcgtgccttanacatgcaagtcgaacggcagcggactctggcggcagtgaggcgaacgggtgagtaafacatcggaacgtaccctgttgggggataact
agtcgaaagattagctaataaccgatacagctgaggggaaagtgggggaccgaaagcctcacgacgagcggcggatgtctgattagctagttgggggtaaaaggc
ccaccaaggcgacgatcagtagctgtctgagaggacatcagccactgggactgagacacggccagactcctacgggagggcagcagtggggaattggcaatggggg
caacccttgatccagcaatgccgctgtgtgaagaaggcctcggggtgaaagcactttgtccgaaagaatcgcgctggttaatactggcgtggatgacggtaccggaag
aataagcaccggtaactacgtccagcagccgcggaatacgtagggtgcgagcgttaactggggtgaaagcgtgcgcaagcgggtttgtaagacagcggctgaa
atccccggccttaacctgggaattgcctgtgactgcnaggctagagtgctcagagggggtagaattccacgtgtagcagtgaaatgcgtagagatgtggaggaataccga
tggcgaaggcagccccctgggactgactgactcctatgcacgaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctggtagtccacgcccataacgatgcaactagttgtgg
ggattcattttcagtaacgtagctaacgcgtgaagtgaccgctggggagtagctcgaagattaaaaactaaaggaattgacggggaccgcacaagcgggtgatgatgt
ggattaattcgtgcaacgcgaaaaacttactacccttgatcaccacaaagcagagatgcataggtgccgaaagggaagtggacacaggtgctcatgctgctgctc
gtcagctcgtgctgagatgtgggtaagtcgcccaacgagcgaacccctgtctctagtgtctacgcaagagcactctagagagactgccggtgcaaacgggaggaagtg
gggatgacgcaagtcctcatggcccttatgggtgagggcttcacacgtacataatggtgctgacagaggggtccaaccgcgagggggagtaatccgaaaacgcatcgt
agtcggatcgtagctgcaactcgaactcgaagctggaatcgctagtaatcgcgatcagcagcggcgtgaaatcgcttccgggctgtgacacaccgcccgtcacacat
gggagtggggtttccagaagttagcctaaccgcaagg

>2 Cr20

cntggngctaaannccnctnangccnggacctttaaantccaggggnaaaantcccgggggctcaacccccgnactgccttttgatacctggaantcctngagtatg
gaagnaggtgagtnanttccgantntanangtgaattcgtnggataatcnnnnaacnccantggcnaaaggcggctcactggtccactgacgnaaaantcnaaaa
gctggggagcaaacaggattagataccctgtagtcccacgctgaaacgatgaatgtagcctntggggagttactctcgtggcgcagtaaacgcaataaacattccgct
ggggagtagcgtcgaagattaaaactcaaaaggaattgacggggcccgacaaagcgtggagcatgtggtttaattcgaagcaacgcgagaaccttaccagcccttgacat
cccgatcgcggttagtgagacactatcctcagctggctggatcggagacaggtgctgcatgctgctgacgctcgtgctgagatgtgggtaagtcgcccaacgagcgc
aacctcgccttagtgccagcattcagttgggcactcctaaggggactgcccgtgataagccgagaggaagtggggatgacgtaagtcctcatggcccttacggctgggc
tacacagctgataatggtggtagacagtgggcagcagcagcagctgagtaatcctcaaaagccatcagttcggattgcaactcgaagtgcatgaagttgga
atcgtagtaatcgggacagatgccggtgaaatcgcttcccggcctgtacacaccgcccgtcacaccatgggagttggtttaccgaaaggcgtgctgtaaccgcaag
gaggcagcgcaccacgnaggcagcg

>3 Cr24

ttggcaatgggccaagcngatccagccatgccgctggaagtgatgaaggccctagggtgtaaaagctcttaccgggtgaaagataatgacggtaaccggagaagaagcccc
ggtaactcctgtagccagcagccgctgtaatacgaaggngctagcgttggctggattactggcgtaaaagcgcacgtagggcggacttttaagtcaggggtgaaatccggggc
taacccccggaactccttgatactgaaagcttgagatggaagaggtgagtggaattccgagtgtagaggtgaaatcgtagatattcggaggaacaccagtggggaagcgc
gtcactggtccactgacgctgaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggtattagataccctggtagtccacgcccgtaaacgatgaatgttagcctntggggagttactctt
cgtgagcagcaacgcaataaacattccgctggggagtagcgtcgaagattaaaactcaaaaggaattgacggggcccgcacaagcgtggagcatgtgggttaattcga
agcaacgcgcagaaccttaccagcccttgacatcccgatcgcggttagtgagacactatcctcagttcggctggatggagacaggtgctgcatgctgctgacgctgctg
gtgagatgtgggttaagtcgcccaacgagngcaacccctgccttagttggcagcattcagttgggcactcctaaggggactgcccgtgataagccgagaggaaggtggggatg
acgtcaagtcctcatgnccttacggctgggctacacacgtgctacaatggtgtagacagtgggcagcagcagcagcagtgtagtaatcctcaaaagccatcctcagttcgg
attgcaactcgaactgagtgatgaagtggaatcgctagtaatcgcgatcagcagcgggtgaaatcgcttcccggcctgtacacaccgcccgtcacaccatgggagttg
ggtttaccgaaaggcgtgctgtaaccgaaaggagcagcggcaccacgnnaggcagcgc

>4 Cr25

ggcatnccngnncatgatgtangccctnngntnatanagctcttaccggnnangatnangncggnannccggagaanaancnccgcgataactngtncnagcag
ccgcgattaatcagacnngcctagcgttggctgattactggcgtaaaagcgcncnngggcggactataagtcaggggtgaaatccggggcctcaacccccggaactgcctt
tgatactggaagtctgagatggaagagngagtggaattccgagtgtagaggtgaaatcgtagatattcggaggaacaccagtggcgaagcggcctcactggcactactg
acgctgaggtgcgaaagcctggggagcaaacaggtattagataccctgtagtccacgcccgtaaacgatgaatgtagccgttggggagttactctcgtggcgcagcctaac
gcattaacattccgctggggagtagctcgaagattaaaactcaaaaggaattgacggggcccgcacaagcgggtggagcatgtgggttaattcgaagcaacgcgcagaac
cttaccagcccttgacatcccgatcgcggttagtgagacactatcctcagttcggctggatcggagacaggtgctgcatggctgctgacgctcgtgctgagatgtgggttaa
gtcccgaacgagcgaacccctgccttagttggcagcattcagttgggcactcctaaggggactcccgtgataagccgagaggaaggtggggatgacgtaagtcctcatg
gnccttacggcgtgggctacacacgtgctacaatggtgtagacagtgggcagcagcagcagtgtagtaatcctcaaaagccatcagttcggattgcaactcgaactc
gagtgatgaagttggaatcgctagtaatcgcgatcagcagcgggtgaaatcgcttcccggcctgtacacaccgcccgtcacaccatgggagttggtttaccgaaaggc
gctgtgtaaccgaaaggagcagcggcaccnccgnaggcagcgtc

>5 Cr28

aatggcgaaagcctgatcagcagcggcgtgaaaggatgacggccttcgggtgtaaacctttcagtaggggaagaagcagagtgacggtactcgcagaagaagcgc
cggtaactacgtgccagcagccgcgtaatacgtagggcgaagcgttatccggaattatggcgtaaaagcctcgtagggcgtttgtcgcgtcgtgtgaaaggccaggg
ctcaacccgtgtctcagtggttacgggcagacttgatgtagggagagactggaattcctggtgtagcgggtgaaatgcgagatatacagaggaaaccgatggcgaag

gcaggctctgggcattaactgacgctgagagcgaagcatggggagcgaacagcagattagatacctggtagtccatgccgtaaacgtgggactaggtgtggggacattc
cacgtttccgcccgtgactaacgcaatgagccccgctggggagtagccgcaagcctaatacaaggaattgacggggcccgcaagcggcggagcatgcg
gattaattgatgcaacgcgaagaacctaccagcctgacatgaccggaccggcgagagatgctctccctcgggctggtcacaggtgtgcatggtgtcagct
cgtgtcgtgagatgtgggttaagctcccgaacgagcgaacccctgctccatgttgccagcgcgtaattggcgggactcatgggagactgccgggtcaactcggaggaagct
ggggagcagcgaatcatcatccccctatgctgggctcagcagctgctcaatggccgggtacaaagggtgcaactgtgaggtggagcctaaccgaaagccggctca
gttcgattgggtctgcaactgacccatgaagtgagtcgctagtaatcgagatcagcaacgctcgggtgaatcgtccggcctgtacacaccgccgtaagtc
cgaaggtgtaacaccgaagcgggtggcctaaccctgtgggagggagcttcnagttgagntgc

>6 Cr33

ccacctggcggcgcttacacatgctagtcgagcggccgcaagcgnagcggcagacgggctgagtaacgcgtgggaatctaccattgtctacggaacaacagtggaaacg
actgtaataccgtatgtgcccttgnngncnntattatcgcaaatgatgagcccgttggattagctagttggggtaaggcctaccaagcgcacgatccatagctgtc
tgagaggatgacggcacactgggactgagacacggcccagactctacgggagcagcagtggggaatattggcaatggcgcaagcctgaatccagccatgccgctg
agtgatgaagccctagggtgtaaaagctctttaccgggtaagataatgacggtaaccggagaagaagccccggtaactctggtccagcagcccggttaatacgaagggg
ctagcgtgttcggattactgggctaaagcgcacgtagcggacttttaagtcaggggtgaaatccccgggctcaacccccgaactgctttgatactggaagcttgatg
aagaggtgagtggaattccgagtgtagaggtgaaatctgtagatattcggaggaacaccagtgccgaagcggctcactggtcattactgacgctgaggtgcgaaagcgtg
ggagcaaacagcgaattacacctgtgtagtccagccgtaaacgatgtagcgttgggggaggttactctcgggtggcgcagtaacgattaacattccgctggggga
gtacgtcgcgaagtaaaactcaaaaggaaftgacggggcccgcaaacgggtggagcagtggttaattcgaagcaacgcgagaacctaccagccctgacatccgat
cggggttagtgagacactatctcagttcggctggatcggagacaggtgctcatggtctgctcagctcgtctgtgagatgtgggttaagctccgcaacgagcgaacct
cgcccttagttgccagcattcagttggcacttaaggggactccggtgataagccgagaggaaggtggggatgacgtcaagctcctatggcccttacgggctgggctacaca
cgtgctacaatggtgtgacagtgggcagcagcagcagctgtgagtaatctccaaagccatctcagttcggattgcaactctcaactcagtgatgaagttggaatcgt
gtaatcgggagcagatcccggtgaaatcgttccggcctgtacacaccgccgacacatgggagttggtttaccggaagcgtgtgtaaccgcaagggagcga
ggcaccacggagtcagcg

>7 Cr35

ctggcggcgcttacacatgctagtcgagcggccgcaanggggagcggcagacgggctgagtaacgcgtgggaatctaccattgtctacggaacaacagtggaaacgactg
ctaataccgtntgtgcccttgnngncnntattatcgcaaatgatgagcccgttggattagctagttggggtaaaagcctaccaagcgcacgatccatagctgtctga
gaggatgacagccactgggactgagacacggcccagactctacgggagcagcagtggggaatattggcaatggcgcaagcctgatccagccatgccgctgag
gatgaagccctagggtgtaaaagctctttcacnngtgaagataatgacggtaaccggagaagaagccccggtaactctggtccagcagccggtaatacgaaggggct
gcgtttcggattactggcgtaaaagcgcacgtagggcggacttttaagtcaggggtgaaatccccgggctcaacccccgaactgctttgatactggaagcttgatg
gaggtgagtggaattccgagtgtagaggtgaaatctgtagatattcggaggaacaccagtgggcgaagcgggctcactggtccattatgacgtgaggtgcgaaagcgtggg
agcaaacagcgaattagataacctggtatccacggcgaatgatgtagttagcgttggggatcttactctcgggtggcgcagtaacgattaacattccgctgggagtac
ggtcgaagataaaactcaaggaattgacggggcccgcaaacgggtggagcagtggttaattcgaagcaacgcgagaacctaccagccctgacatccgatcgg
gttagtgagacactatctcagttcggctggatcggagacaggtgctcatggtctgctcagctcgtctgtgagatgtgggttaagctccgcaacgagcgaancctcggc
cttagttccagcattcagttggcacttaaggggactccggtgataagccgagaggaaggtggggatgacgtcaagctcctatggcccttacgggctgggctacacagtg
ctacaatggtgtgacagtgggcagcagcagctgtagctaatctccaaagccatcagttcggattgcaactctcaactcagtgatgaagttggaatcgttagta
tcgctgatcagatcccggtgaaatcgttccggcctgtacacaccgccgacacatgggagttggtttaccggaagcgtgtgtaaccgcaagggagcagc
gaccacggagtcagcgtc

>8 Cr41

ctgtngaaactccccantnacnaaantctgncggcngcancgccgngagtgatgcaagccttcgggtcgtaaaactctgtttaggggaagaacaagtgctagtga
ataagctggccacttgacggtacctaaccgaaagccacggcctaactacgtgccagcggcgtaatactgtaggtggcaagcgttatccggaattattggcgtaaaagcgcg
cgaggtggtttcttaagctgatgtaaaagccacggctcancctgaggggctcattggaactgggagactgagtcagaagagaaagtggaattccatgtgtagcgtga
aatcgtagagatagaggaacaccagtgccgaagcgcactttctgtctgtaactgacactgagcgcgaaagcgtggggagcaaacagcgaattagatacctgtagtcca
cgccgtaaacgatgagtgtaaggttagaggggttccgccccttagtgcgtaagtaaacgattaagcactccgctgggagtagcggcgaagcgtgaaactcaaggaattg
acggggggcccaaacgctggagcagctgtggttaattcgaagcaacgcgaagcaactaccagctctgacatcctctgacaacctagagataggctctctcctgggagc
agagtgacaggtggtcatggcaggtgtgtcagccngtctgtgagatgtgggttaagctccgcaacgagcgaacctgatcttagttgccatcattagnggggca
ctcaaggtgactcgggtgacaaacgggaggaaggtgggatgacgtcaaatcatctcccttatgactgggctacacagctgctacaatggagcgtacaagaagcgtgca
agaccgcgaggtgagcctaactcataaaaccgttctcagttcggattgtagctgcaactcctacatgaagcgtggaatcgtagtaacgcgatcagcatcccggtg
acgttccggcctgtacacaccgccgacacacagagattgtaacaccgaaagcgtggggaactttttgagccagccg

>9 Cr45

ggtgattacacatcnagtcgagcggccgcaaggggagcggcagacggggtgagtaacgcgtgggaatctaccattgtctacggaacaacagtggaaacgactgtaatacc
gtatgtgcccttgggggaaanattatcgcaaatgatgagcccgttggattagctagttggggtaaaagcctaccaagcgcacgatccatagctggtctgagaggatga
tcagccacactgggactgagacacggcccagactctacgggagcagcagtggggaatattggcaatggcgcaagcctgatccagccatcccgctgagtgatgaagg
ccctagggtgtaaaagctttaccggtgaagataatgacggtaaccggagaagaagccccggtaactctggtccagcagccggtaatacgaaggggctagcgttttc
ggattactggcgtaaaagcgcacgtagcggcacttttaagtcaggggtgaaatccccgggctcaccgggaactgctttgatactggaagctctgagatggaagangtgag
ggaattccgagtgtagaggtgaaatctgtagatattcggaggaacaccagtgccgaanccggcctcactggtccattactgaagctgaggtgcgaaagcgtggggagcaaacag
ggattagatacctgtagtccacggcgaatgatgtagcgttggggagttactctcgggtggcgcagcctaaccgattaacattccgctggggagtagcgtgcga
gattaataactcaaggaattgacggggcccgcaaacgggtggagcagctggttaattcgaagcaacgcgagaaacctaccagccctgacatccgatccggttagtg
agacatctctcagttcggatcggagacaggtgctgcatggcttctgtcgcagctcgtctgtgagatgtgggttaagctccgcaacgagcgaacctcgccttag

ttgccagcattcagttgggactcctaagggactcccggtgataagccgagaggaagggtgggatgacgtcaagtcctcatggcccttacgggctgggtacacacgtgtaca
atgggtgtgacagttgggagcgcagcgcagcaggtgtgagctaactcctccaaaagccatcctcagctcgattgacactctgcaactcagtgcatgaaagttggaatcgtagtaacgc
ggatcagcatccgcggtgaatacgttccggcctgtacacaccgccgtcacaccatgggagttgtttaccgaaagcgcgtgtgtaaccgcaaggagcagcggcagct

>10 Cr46

ggcggcctacacatgcaagtcgagcggatgaaggagcgtgctcctgattcagcggcgagcgggtgagtaatgcctaggaaatcgtctggtgtagtggggataacgtccggaa
acggcgctaataccgatactcctgagggagaaagttggggatcttcgacacacgctatcagatagcctaggtcggattagtagttggtgggtgaaagccaccag
gcgacatccgtaactggtcgtgagggatgacagcactggaactgagacacggctcagactcctacggagcagcagttgggaaatattgacaatggcgaaagcct
gatccagccatccgcggtgtgaaaggtcttcgattgaaagcacttaagttggggagaaagggcagtaagtaaaccttgcgtttttgacgttaccacgaataagcacc
ggctaactctgagcagccggtgagcagctgagctagagtagaggggtgcaagcgttaactggaattcctgtgtagcgggtgaaagcgcgtaggtggtcagcaagttggtgaaatccccgggc
tcaactctgggaactgacnnaaactactgagctagagtagagtagaggggtggaattcctgtgtagcgggtgaaatgctgagatagangaacaccagttggcgaaagcgc
accactggactgatactgaggtgcgaaagcgtgggagcaaacaggtatagatccctgtagtccacgccgtaaacgatgtgactagcctgtggatccttgaga
tctagtggcgagcagtaacgcgataagtcgaccgctggggagtagcgcgcaaggttaaacctaaatgaaatgacggggcccgcaaacggtggagcagttggttaatt
cgaagcaacgcaagaacttacctggccttgacatgctgagaactttccagagatgattggtgccttcgggaactcagacacaggtgctgcatgcttcnccnctnccg
gagnt

>11 Cr47

tggcggcgtgnntaacacatgcaagtcgaacgatgaagcctagcctgtggtgggtgattagtgccgaacgggtgagtaaacgtgagtaacctgccctgactctgggataagcct
gggaaactgggtctaataccggatagcaccattgcccgatgggtggtggtggaagccttttgggttttgatggactcggccctatcagcttgggtgagtaaggtcctac
caagcgcagcagcggtagccgctgagagggtagccggccacactgggactgagacacggccagactcctacgggagcagcagttgggaaatattgacaatggggc
aaagcctgatgagcagcaccgctgagggatgacggccttcgggttgaacctcttcagtagggaaagcagagtgacgggtacctgcagaagaagcggcgtaact
acgtgccagcagccggttaatactgagggcgaagcgnntatccggaattattgggcgtaaaagctcctagcgggttctgcctgctgtgaaagccaggnctcaacc
tgncttgcagttgggtacgggcaactgagtgatgtagggagactggaattcctgtgtagcgggtgaaatgctgagatagcagaggaacaccagttggcgaagcaggtctc
tgggcattactgagctgagggagcgaagcatggggagcgaacaggattagatccctgtagtccatgccgtaaacgttgggactaggtgtggggacattccactttcc
gcccgttagtaacgcaatagttgccccgctggggagtagcggccgcaaggttaaacctcaaggaattgacggggcccgcaaacggcgagcagctgggtaattcg
atgcaacgcgaagaacctaccagccttgacatggaccggaccggcgagagatgccttccccttcgggctggttcacaggtggtgcatggtgtctccagctgtgctg
tgagatgtgggttaagtcggcaacgagcgaacctcgttccatggtgccagcgcgtaagtgccggggactcatgggagactcgggggtcaactcggggaaggtggggac
gactgcaaatcatatgccccatgctttgggtcctacgctgacaaatggccggtacaaagggtgatactgtgaggtggagctaatcccaaaagccggtctcagttcggta
ttgggtctgcaactcagccccaggtgagctgctagtaacgcagatcagcagcagctgcggtggaatcgttccccggcctgtacacaccgccctcaagttcagcaaaagt
ggtaacaccgaaagcgtggcctaacccttggggagggagcctnccnccnccnccnccgaccg

>12 Cr64

acctggcggcggctnfacacatgctagtcgagcggccccgagggcagcggcagcggntgantaaacgcgtggantctaccattgctacggaacaacagttggaagcact
gctaatacctgatgtccccttgggnatntatttatcgcaaatgatgagccccggttgattagnatgttgggtgggtaaaaggccctaccagggcagcagcagctgctga
gaggatgatcagccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggagcagcagcagttgggaaatattgcaaatggcgcaagcctgatccagcctgccgctgagtg
atgaagcccttaggttgaagcctttaccgggtgaagataatgacggaacccgagaaagcccggctaaactcgtccagcagccgggtaaacgaaggngctag
cgttttcggattactggcgtaaagcgcacgtagcggacttttaagtcaggggtgaaatcccgggctcaaccccggaaactgcctttagactggaagcttgatagggna
gaggtgagtgaaatccgagtgtagagtgaaatctgtagatattcgagggaacaccagtgcgaaagccgctcactggtcattactgacgctgaggtgccnaagcctggg
gagcaaacaggttagatccctgtagtccacgccgtaaacgatgaatgttagccgttggggagttactcttcgtggcgacgtaacgcaataaacattccgctggggagta
cggctgcaagattaaaactcaaggaatgacggggcccgcacaagcgggtgagcagctggtttaattcgaagcaacgcgagacactaccagccctgacatccgatccg
ggttagtgagacactatcctcagttcggtgtagcggagacaggtgctcagcctgctgtagcagcctgctgtagatggtgggttaagggcaacgagngcaaccctgc
ccttagttccagcattcagttggcactcctaaaggactcggggtgataagccgagaggaaggtgggatgacgcaagtcctcatgnccttacgggctgggctacacagc
gctacaatggtgtgacagttggcagcagcagcagcagctgtagctaatcctcaaaagccatcagttcggattgactctgcaactcagtgatgaggtggaatcgtagta
atcgggatcagcatccgggtgaatacgttccggcctgtacacaccgccgtcacaccatgggagttggtttaccgaaagcgcgtgtgtaaccgaaagggcga

>13 Cr65

ttggcaatggcgcgaagcgtgaatccagccatccgcgtagtgatgaagcccttaggttgaagcctttaccgggtgaagataatgacggtaaccggagaagaagccccc
ggctaactcgtgccaagcagcggcggtaatacgaaggggctagcgttcttcgattactggcgtaaagcgcagcagtagcggacttttaagtcaggggtgaaatcccgggc
tcaaccgggaactgcctttagactggaagctttagatggaagaggtgagtggaattccgagtgtagaggtgaaatctgtagatattcggaggaacaccagtggcgaagcgc
gctcactggtccactgacgctgaggtgcgaaagcctggggagcaaacaggattagatccctgcaaacaggattagataaccctgtagtccacgccgtaaacgatgaatgt
agccgttggggagttacttctcgtggcgagcactaacatcaccctcgcctgggagtagcggcgaagattaaaactcaaggaatgacggggccccgcacaagcgg
tggagcagctgtttaaactgaagcagcgcgagaacttaccgccccgatccacagctggcgttagtgagacactatcctcagctggctggatcgagacaggtgctgc
atggtctgctcagcactgntcgtgagatgtgggttaagtcctccgaacgagcgaacacccttagtngccagcattcagttgggcaactaaagggactcgggtgataag
ccgagaggaaggtgggtagcgtcaagctcctatggcccttacgggctgtacacacgtgctcaaatggtgtagacgtggcgagcagcagctgtagtaact
ccaaaagccatcagttcggattgactctgcaactcagtgatgaagttggaatcgtagtaacgcggatcagatcggcgtgaatacgttccccggcctgtacacacc
ccccgtcacaccatgggagttggtttaccgaaagcgcgtgctaacccgaaaggagcagcggcaccac

>14 Cr67

cctggcggcnattacacatgcaagtcgagcggccccnangggcagcggcanacggntnntaaacgcgtggaaatcaccatttctacggaacaacagttggaagcactg
ctaatacctgatgtccccttggggaataatattatcgcaaatgatgagccccggtgaattagnatgtgnnggggtanngccntaccaaggnnccgatccatagctgntcn

gagnatnancagccactgggactgagacacgccnagactcctacgggagcagcagtgggggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatccagccatgccgcgtga
gtgatgaagccctagggtgtaaaagctcttcaccggggaagataatgacggtaaccggagaagaagccccggctaactcgtgccagcagccgcgtaatacgaagggggc
tagcgtgttcggattactggcgtaaaagcgcacgtagcggacttfaagtcaggggtgaaatccccggggctcaacccggaactgccttgatactggaagcttgagtatgga
agaggtgagtggaattccgaggtagaggtgaaattcgtagatattcggaggaaacaccagtgccgaaagcggctcactggtccactactgacgtgaggtcgaaagcgtggg
gagcaaacaggggattagataccctggtagtcacacccgtaaacgatgaatgtagccgttggggagttactctcggggcgagtaaacgattaacattccgctggggagt
acggtcgcaagattaaaactcaaggaattgacggggcccgcaaacgggtgagcatgtggttaattcgaagcaacgcgcagaacctaccagccctgacatccgatcg
cggtagtgagacactatcctcagttcggctgacggagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgtgggtaagtcgcccaacgagcgcaacctcg
cccttagtgccagcattcagttggcactctaaggggactgcccgtgataagccgagaggaaggtggggatgacgtcaagtccatgncctaccggctgggctacacag
tgctacaatggtgtgacagtgggcagcgagcacgcgaggtgagctaattcctcaaaaaccatcagttcggattgcactctgcaactgagtgcatgaagttggaatcgctagt
aatcgcgatcagcatgccgcgtgaaatagttcccggcctgtacacaccgccgtcacaccatgggagttggtttaccgaaaggcgtgtgtaaccgcaaggagcaggg
cgaccncgnaaggcgagcgt

>15 Cr75

cacatcnagtcgagcggcccgnagngcagcggcagaacggntgantaacgcgtgganctaccatttgctacggaacaacagttggaaacgactgtaataccgtatgt
gcccttgggaaaatattatggcaaatgatgagcccgcgttgattagntagttggtgggtanagccctaccaagncgacgatccatagctgctgagaggtgancagc
cacactgggnactgagacacgcccagactcctacgggagcagcagtggggaatattgcacantggcgcaagcctgatccaccttgccgcgtgagtgatgaagccccta
ggttgtaaaagctcttcccgggtaagataatgacggtaaccggagaagaagccccggctaactcgtgccagcagccgcgtaatacgaaggggtagcgtgttcggattt
actggcgtaaaagcgcacgtagcggacttfaagtcaggggtgaaatccccggggctcaacccggaactgccttgatactggaagcttgagtatggaagaggtgagtggaat
tccgaggtgtagaggtgaaattcgtagatattcggaggaaacaccagtgccgaaagcggctcactggtccactactgacgctgaggtgcgaaagcgtggggagcaaacaggatta
gataccctggtagtcacccgtaaacgatgaatgttagccgttggggagttactctcggggcgagtaaacgattaacattccgctggggagtagcgtcgcaagattaa
aactcaaggaattgacggggcccgcaaacgggtgagcatgtggttaattcgaagcaacgcgcagaacctaccagccctgacatccgatcgcggttagtgagaca
ctatcctcagttcggctgagcggagacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgtgggtaagtcgcccaacgagcgcacacctcgcccttagttgccagc
attcagttgggactcgaaggggactgcccgtgataagccgagaggaaggtggggatgacgtcaagtcctatggcccttacgggctgggctacacagctgctacaatggtggt
gacagtgggcagcgagcacgcgaggtgagctaattcctcaaaaaccatcagttcggattgcactctgcaactgagtgcatgaagttggaatcgtagtaatcgcgatcagc
atgccgcgtgaaatagttcccggcctgtacacaccgccgtcacaccatgggagttggtttaccgaaaggcgtgtgtaaccgcaaggagcagggcaccacggag

Anexo 11

Tabla de las características bioquímicas de las cepas nativas, usando API20NE

Cepa	Sitio/lugar de aislamiento	Habitat	Características Bioquímicas API 20NE																					
			Enzimas										Asimilación											
			NO3	TRP	GLU	Argini	URE	ESC	GEL	BGAL	OX	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	
Cr20	Proceso de landfarming Guaduas	suelo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Cr24	Tame, Arauca	crudo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Cr25	Proceso de landfarming Guaduas	suelo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Cr28	Proceso de landfarming Guaduas	suelo	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Cr33	Tame, Arauca	crudo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Cr35	Tame, Arauca	crudo	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Cr41	Proceso de landfarming Guaduas	suelo	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Cr45	Tame, Arauca	crudo	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Cr46	Proceso de landfarming Guaduas	suelo	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Cr47	Proceso de landfarming Guaduas	suelo	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Cr64	Proceso de landfarming Guaduas	suelo	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Cr65	Tame, Arauca	crudo	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cr67	Proceso de landfarming Guaduas	suelo	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Cr75	Proceso de landfarming Guaduas	suelo	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-

Fuentes de Carbono:

MNE	Manosa
MAN	Manitol
NAG	N-acetil-glucosamina
MAL	Maltosa
GNT	Gluconato
CAP	Caprato
ADI	Adipato
MLT	Malato
PAC	Fenil-acetato

Anexo 12

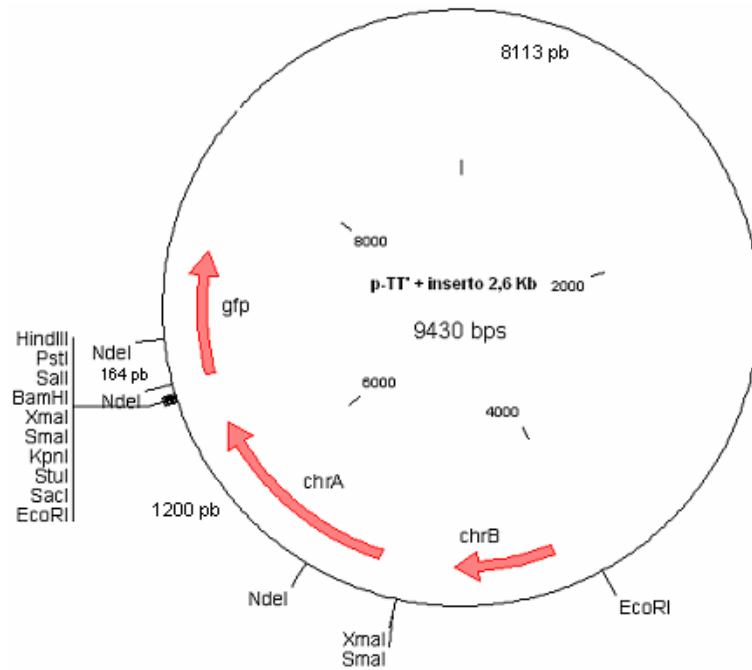
Características macroscópicas y microscópicas de las cepas de estudio.

Cepa	Características				
	Macroscópicas*			Microscópicas	
	Color	Forma	Tamaño	Forma	Gram
Cr20	Blanca	Redonda	Mediana	Bacilo corto	Negativo
Cr28	Amarilla	Redonda	Pequeña	Bacilo corto	Variable
Cr35	Blanca	Redonda	Mediana	Bacilo corto	Negativo
Cr41	Crema	Spreader	-	Bacilo	Positivo
Cr46	Pigmento verde difusible	Redonda	Pequeña	Bacilo corto	Negativo
Cr65	Blanca	Redonda	Mediana	Bacilo corto	Negativo
Cr67	Blanca	Redonda	Mediana	Bacilo corto	Negativo

* Luego de 30 horas de incubación a 30 °C, en ausencia de cromo hexavalente.

Anexo 13

Mapa del plásmido vector pPROBE-TT' con el inserto de 2,6 Kb (*chrBA*) en la orientación correcta.



Se indican los sitios de corte con la enzima *NdeI* y la longitud de los fragmentos esperados de la digestión con esta enzima.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, A., Moreno-Sánchez, R. & Cervantes, C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181:7398-7400.
- Bruins, M., Kapil, S. & Oehme F. (2000). Microbial resistance to metals in the environment [Version electrónica]. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45:198-207.
- Camargo, F.A.O., Bento, F.M., Okeke, B.C. & Frankenbe, W.T. (2003). Chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from soils contaminated with dichromate [Version electrónica]. *J. Environ. Qual.* 32:1228–1233.
- Campos, J., Martinez-Pacheco, M. & Cervantes, C. (1995). Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain. *Antonie van Leeuwenhoek.* 68:203-208.
- Cervantes, C. & Silver, S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid.* 27:65-71.
- Cervantes, C. & Silver, S. (1996). Sistemas de Resistencia a metales en *Pseudomonas*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.* 38:45-64.
- Cervantes, C., Ohtake, H., Chu, L., Misra, T. & Silver, S. (1990). Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression of the Chromate Resistance Determinant of *Pseudomonas aeruginosa* Plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* 172: 287-291.
- Corbisier, P., Ji, G., Nuyts, G., Mergeay, M. & Silver, S. (1993). *luxAB* gene fusions with the arsenic and cadmium operons of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 [Version electrónica]. *FEMS Microbiol. Lett.* 110:231-238.
- Corbisier, P., van der Lelie, D., Borremans, B., Provoost, A., de Lorenzo, V., Brown, N., Lloyd, J., Hobman, J., Csöregi, E., Johansson, G. & Mattiasson, B. (1999). Whole cell- and protein-based biosensors for the detection of bioavailable heavy metals in environmental samples [Version electrónica]. *Anal. Chim. Acta.* 387:235-244.
- Corthier, G., Delorme, C., Ehrlich, D. & Renault, P. (1998). Use of luciferase genes as biosensors to study bacterial physiology in the digestive tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2721-2722.
- Davis, L., Kuehl, M. & Battey, J. (1994). Basic Methods in Molecular Biology. (2nd Ed.). Connecticut, EE.UU.: Appleton & Lange.

- Demirci, A. & Pometto, A. (2000). Enhanced organically bound chromium yeast production [Version electrónica]. *J. Agric. Food Chem.* 48:531-536.
- Desjardin, V., Bayard, R., Huck, N., Manceau, A. & Gordon, R. (2002). Effect of microbial activity on the mobility of chromium in soils. *Waste Management.* 22:195-200.
- Díaz-Raviña, M & Bååth, E. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2970-2977.
- D'Souza, S.F. (2001). Microbial biosensors [Version electrónica]. *Biosens. Bioelectron.* 16:337-353.
- Ehrlich H.L. (1997). Microbes and metals [Version electrónica]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:687-692.
- Faisal, M. & Hasnain, S. (2004). Microbial conversion of Cr(VI) in to Cr(III) in industrial effluent [Version electrónica]. *Afr. J. Biotech.* 3:610-617.
- Foster, T.J. (1983). Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria [Version electrónica]. *Microbiol. Rev.* 47:361-409.
- Grevatt, P. (1998). Toxicological review of hexavalente chromium. Washington, D.C., EE:UU.: Environmental Protection Agency. CAS No. 18540-29-9.
- Gutiérrez, G. (2004). Evaluación de un plásmido biosensor de hidrocarburos aromáticos transformado en bacterias ambientales colombianas. Tesis de Magíster en Microbiología, no publicada. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Hayirli, A., Bremmer, D., Bertics, S., Socha, M. & Grummer, R. (2001). Effect of chromium supplementation on production and metabolic parameters in periparturient dairy cows [Version electrónica]. *J. Dairy Sci.* 84:1218–1230.
- Holman, H.Y., Lin, Z., Asatiani, N.V., Kalabegishvili, T.L., Sapojnikova, N.A., Martin, M.C., McKinney, W.R., Perry, D.L. & Tsibakhashvili, N.Y (sf). Evidence links the survival strategy of *Arthrobacter* to the dynamic fine-grain formation of chromium-ligands in aerobic environments. En *Environmental & Planetary Sciences*. Recuperado el 5 de octubre de 2006, de http://infrared.als.lbl.gov/wirms/paper_5088.htm
- Hurst, C., Knudsen, G., McInerney, M., Stetzenbach, L. & Walter M. (1997). *Manual of Environmental Microbiology*. Washington, D.C., EE.UU.: ASM Press.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96:23-28.

- Kado, C.I. & Liu, S. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 145:1365-1373.
- Köhler, S., Belkin, S. & Schmid, D. (2000). Reporter gene bioassays in environmental analysis [Version electrónica]. Fresenius, *J. Anal. Chem.* 366:769-779.
- Konopka, A., Zakharova, T., Bischoff, M., Oliver, L., Nakatsu, C. & Turco, R. (1999). Microbial biomass and activity in Lead-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2256-2259.
- Lebuhn, M., Achouak, W., Schloter, M., Berge, O., Meier, H., Barakat, M., Hartmann, A. & Heulin, T. (2000). Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots, and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. [Version electrónica]. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:2207-2223
- Lighthart, b. 1979. Enrichment of cadmium-mediated antibiotic-resistance bacteria in a Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) liter microcosm [Version electrónica]. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:859-861.
- Malekzadeh, F., Faramand, A., Ghafourian H., Shahamat, M., Levin, M., & Colwell, R. (2004). Uranium Accumulation by a bacterium isolated from electroplating effluent. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18:295-302
- Mergeay, M., Nies, D.H., Schlegel, H.G., Gerits, J., Charles, P. & Van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy Metals. *J. Bacteriol.* 162:328-334.
- Miller, G., Brandl, M., Quiñónez, B. & Lindow, S. (2001). Biological Sensor for Sucrose Availability: Relative Sensitivities of various reporter genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1308-1317.
- Miller, G., Leveau, J., & Lindow, S. (2000). Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors [Version electrónica]. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1243-1250.
- Nies, A., Nies, D.H. y Silver, S. (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid-encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus* [Version electrónica]. *J. Biol. Chem.* 265:5648-5653.
- Nies, D.H. (1999). Microbial Heavy-metal resistance [Version electrónica]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:730-750.

- Nies, D.H., Juhnke, S., Peitzsch, N., Hübener, N. & Grobe, C. (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34 [Version electrónica]. *Arch. Microbiol.* 179:15-25.
- Nies, D.H., Koch, S., Wachi, S., Peitzsch, N. & Saier, Jr. M. (1998). CHR, a novel family of prokaryotic proton motive force-driven transporters probably containing chromate/sulphate antiporters. *J. Bacteriol.* 180:5799-5802.
- Nies, D.H. & Silver, S. (1989). Metal Ion uptake by a plasmid-free metal sensitive *Alcaligenes eutrophus* strain. *J. Bacteriol.* 171:4073-4075.
- Pal, A. & Paul, A.K. (2004). Aerobic chromate reduction by chromium-resistant bacteria isolated from serpentine soil [Version electrónica]. *Microbiol. Res.* 159:347-354.
- Pattanapitpaisal, P., Brown, N. & Macaskiel, L. (2001). Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from Cr(VI)-contaminated site [Versión electrónica]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:257-261.
- Peitzsch, N., Eberz, G. & Nies, D.H. (1998). *Alcaligenes eutrophus* as a bacterial chromate sensor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:453-458.
 Ribosoma Database. Recuperado el 8 de mayo de 2006, de <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. (2nd Ed.). New York, EE.UU.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Spaink, H. P., Okker, R. O. J., Wijffeman, C. A., Pees, E. & Lugtenberg, B. J. J. (1987). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant. Mol. Biol.* 9:27-39.
- Suárez, P. & Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. [Versión electrónica]. *Interciencia.* 27:160-164.
- Teyssier, C., Marchandin, H., De Buochberg, M.S., Ramuz, M. & Jumas-Bilak, E. (2003). Atypical 16S rRNA Gene Copies in *Ochrobactrum intermedium* Strains Reveal a Large Genomic Rearrangement by Recombination between *rrn* copies. *J. Bacteriol.* 185:2901-2909.
- Tsien, R. (1998). The Green Fluorescent Protein [Versión electrónica]. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-544.
- Trajanovska, S., Brito, M. & Bhave, M. (1997). Detection of heavy metals ion resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site [Version electrónica]. *Biodegradation.* 8:113-1124.

Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*. Vol. 2. No 3, Recuperado el 14 de Junio del 2006, en <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/metales/metales.htm>

Wilson, G. & Gifford, R. (2005). Biosensors for real-time in vivo measurements [Version electrónica]. *Biosens. Bioelectron.* 20:2388-2403.

Willardson, B., Wilkins, J., Rand, T., Schupp, J., Hill, K., Keim, P. & Jackson, P. (1998). Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1006-1012.

Woodward, B. & de Groot, R. (1999). Tolerance of *Wolfiporia cocos* isolates to copper in agar media. *Forest. Prod. J.* 49:87-94.

Zetic, V., Stehlik-Tomas, V., Grba, S., Lutlisky, L. & Kozlek, D. (2001). Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass [Versión electrónica]. *J. Biosci.* 26:217-223.