



# **GENÓMICA ESTRUCTURAL Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS SIMBIONTES RESISTENTES A METALES PESADOS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
ACADÉMICO DE: MAESTRA EN  
BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

Biol. REBECA PÉREZ MARTÍNEZ

Director: Dr. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ

Comité Tutorial

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CeIB, UAEM)  
Dr. Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CeIB,  
UAEM) Dra. Paloma Lara Figueroa (IBT, UNAM)  
Dra. María de Lourdes Girard Cuesy (CCG,  
UNAM)

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 06 de agosto del 2020

**COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS**

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. Paloma Lara Figueroa (IBT UNAM)

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy (CCG UNAM)

Tesis: **Genómica estructural y caracterización molecular de bacterias simbiotes resistentes a metales pesados.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Rebeca Pérez Martínez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

EDGAR DANTAN GONZALEZ | Fecha:2020-08-07 19:45:35 | Firmante  
P21DzlooTgIU2wnKW3jPSXN3gPmXDfrYFj4DY29n+A1sd07LBWOHXcoMEoqzGt0X/A9Nl53/8db7D1crEk2nbml/3B32DJWTNkcoL1lcGdn072PMzjPYdTofJNDryk6mu8qeWyDYuaAAc8CSIyyCqwS9cr7HmUlOdEaD9bwtpo1xt+FNMhPGdjlGRzySH2r+GskBsBJOqhDT3NeA6EuUaAaZSqtWj4MM1u89qOTX63M+wGXPjmPcGM7hV1bn/LthYyF+Q1iGqtGY+Q1YqsCzmUuaY6oScmzUHnKPWw6gdyP0esUcF4jqGIYvcjsbc4YzZ8gLWalGeWjmlQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



9dPGhK

<https://efirma.uaem.mx/hoRepudio/WNlIU4lcXYKesZg82WHmaLG1LHBSzc>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 06 de agosto del 2020

**COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS**

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. Paloma Lara Figueroa (IBT UNAM)

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy (CCG UNAM)

Tesis: **Genómica estructural y caracterización molecular de bacterias simbiotes resistentes a metales pesados.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Rebeca Pérez Martínez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ** | Fecha:2020-08-07 20:37:13 | Firmante  
oQ07L8iQCwGvsiQR4AeCcelDxNGynTdY8eN3HCbO8CG35+L73KDfvXYAAeqz27+B6lhurdh3gZLGF1yHBPfczf9prR0R9gBD/N5oXy3EOTFVjrj29Hpty/lyWcUaRtdR1JnFRGts  
a+yg8/txMw5FFSoAuzYwkhN9RyQ1Be6c9rgZMTCXmBlPKVtWqcTNNdfAwtlNIXdq6uaA2/IIImqbxw9nOalGWJHiCTz9bh+3v28AanWhnRwDI6C3JjsDEm2kcxV/NEveCB16cqd  
KulH6sbllhhaKOIBDdzTtbzPDaYcSWyQQAyHI6K/ppIOzq4B7JFKq1MaFafQ7HeYd0g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



60iiUw

<https://efirma.uaem.mx/hoRepudio/WLDelwTHTYGuThngIS7uOz1pJ7U8kLM>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 06 de agosto del 2020

#### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. Paloma Lara Figueroa (IBT UNAM)

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy (CCG UNAM)

Tesis: **Genómica estructural y caracterización molecular de bacterias simbiotes resistentes a metales pesados.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Rebeca Pérez Martínez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

#### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

\_\_\_\_\_  
DR. ALEXIS JOAVANY RODRÍGUEZ SOLÍS



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

ALEXIS JOAVANY RODRIGUEZ SOLIS | Fecha:2020-08-07 19:50:22 | Firmante  
WDvOSfWPoP6pBimX1fNkTWP/CGctE7MIXO+eiwmoWiKIZhMyyp9gE7yNpnrsLqrOpYDcAtaulHwxmsuUQcyRDIJPaLflku/UbJCeUICo8wz6j320JWBW5/G23VMvHQ3fSDsF  
erhSNj+3+3cdMJUUh2Dsp5LpALber/nkJfFAOe+MxA07pfFwwJ05MU4Bw6j46uyRLyBvQWwczS0JorWzEF6AwixYITuO1QZJHTF4BddPfhAW67c87hqB5OnxHIXbSkVtunSX07  
ZullvKrnFO1RGXUnD1CdDjbVIYdXqz1b+3uOgdO0cbT7nM70swhNPcAHSBL0OTYOHcYXFLFUg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



mzMDZ1

<https://efirma.uaem.mx/hoRepudio/seiizqmqDBCIsKHjrcfqPDA6WZvLifUn>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 06 de agosto del 2020

**COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS**

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. Paloma Lara Figueroa (IBT UNAM)

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy (CCG UNAM)

Tesis: **Genómica estructural y caracterización molecular de bacterias simbiotes resistentes a metales pesados.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Rebeca Pérez Martínez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

**VOTO**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

\_\_\_\_\_  
DRA. PALOMA LARA FIGUEROA





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

#### Sello electrónico

**PALOMA LARA FIGUEROA** | Fecha:2020-08-24 10:20:56 | Firmante  
HOqtKfSYwTrQpNPp7HBsXQswXzLzY6UkdK4bolGKOQy3RjSu9sntdceMc917BAWF3hgOojKvg9HhZMQtzEfkaf2h/D8kgYYcUdmR0aGxlEnZ6c+FZFKQz/E1NRwKqs6OBsA  
MHQQ++n8Wrq9RNIYccaaAvQ2Uq1i30K3o5FjA0Yav/ZCVIXNWPuZ39aD7GijHuwJmePjN5pi6pU0RHJeflyepXN6Uhpwr4ISA0Wd8dRnflFv1tNjF7amldOmpfIXEvhNNw9P  
wbRLSLZ63wXoMxbmq5Zr6Oa2ekSwzvf6auwggySIB5FB/Mh05n1/BIZZaSh+R2u7bU0FDg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**B39wTi**

<https://efirma.uaem.mx/hoRepudio/hc8Esw3hzF7kHHanEeb5ePOTA0Eo7qpP>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, a 06 de agosto del 2020

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Edgar Dantán González (Tutor principal, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís (CEIB UAEM)

Dra. Paloma Lara Figueroa (IBT UNAM)

Dra. María de Lourdes Girard Cuesy (CCG UNAM)

Tesis: **Genómica estructural y caracterización molecular de bacterias simbiotes resistentes a metales pesados.**

Alumno que lo presenta a revisión: **Rebeca Pérez Martínez**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA DE LOURDES GIRARD CUESY



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

**Sello electrónico**

MARIA DE LOURDES GIRARD CUESY | Fecha:2020-08-12 18:33:15 | Firmante  
m/urYCEwTuMs7HhzhzJ1hixEZf6BquA3JcKEuym1LweRbvCh7WX9Zkw2YaL0FyzPFsTvD19glbTc8wSgq4qixB22tysWMWDlunLy/QQfgwcEJ5gd6V/SXCgrEqWWyF0YhtbpBzL  
ZWaE76PZ0urHmhBTAOTkwXW2YVfbbJ+JVfQJKtGHYgcvBDcV3E3yMlw1wWVlxyq/Y5rzsxBQMLv4IFMBWFKvMoaUkO52jgUqI7LYnsAnnffYdo+/+fo6jJCZeJ+miahrZXUAka  
2Bwa/qDLP9el/8mJk0cVMRefDUUVBzFRHFpGhyy+doqNn8tyBhAy1gowORojUDgnKa13Gw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



yYPE3Z

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kws50b0lmHnbl3NdEYnUEGNOQSpGsm>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023

**Dedicatoria:**

A mi madre, siempre incondicional...

A mis abuelos, por siempre confiar...

A mi hermano, por siempre estar...

A mi misma, por ser perseverante...

## **AGRADECIMIENTOS**

Inicio la redacción de esta tesis, agradeciendo a cada una de las personas que fueron parte fundamental en cada paso que realice para culminar algo tan esperado, titularme...

Principalmente a mi director de tesis el Dr. Edgar Dantán que confió en mí como alumna y me guio durante estos dos años, teniendo paciencia en los momentos difíciles e incluso ayudarme a enfrentar mis miedos.

A la Dra. Lourdes Girard que me aceptó en su laboratorio y siempre tuvo la disposición de ayudarme, enseñarme y guiarme.

Al posgrado en biotecnología del Centro de Investigación en Biotecnología (CeIB, UAEM) por permitirme realizar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mi estancia en el posgrado.

A los doctores, Dra. Paloma Lara, Dr. Ramón Suárez Rodríguez y al Dr. Alexis Joavany Rodríguez Solís que con sus atinadas sugerencias hicieron de este proyecto y de mi aprendizaje algo satisfactorio.

A mis compañeros y hermanos de laboratorio: Dra. Rosalba Salgado, Dr. Abraham Rivera, Dr. Fernando Martínez, David López, Brandon Hernández, Marilú Mass, Roberto Bahena, Carlos Arcos y a todo el Laboratorio de Estudios Ecogenómicos (LEE) que siempre han estado en los momentos buenos y difíciles, por darme sugerencias, por ayudarme y enseñarme.

A la Dra. Dulce Arias, el M. en B. Esaú Leyva y el Lic. Erick Salgado por su apoyo incondicional durante la etapa más crítica del posgrado. ¡Sin ustedes no lo hubiera logrado!

1.-	INTRODUCCIÓN	18
2.-	ANTECEDENTES	25
3.-	HIPÓTESIS	27
4.-	OBJETIVO GENERAL	27
5.-	OBJETIVO PARTICULAR	27
6.-	ESTRATEGÍA METODOLÓGICA	29
7.-	METODOLOGÍA	30
7.1.-	Secuenciación, ensamble y anotación de los genomas de <i>Microvirga sp AF16</i> , y <i>Stenotrophomonas sp AC44</i>	30
7.2.-	Búsqueda de genes	31
7.3.-	Análisis del pan-genoma	31
7.4.-	Análisis filogenético	32
7.5.-	Prueba de cualitativa de susceptibilidad a antimicrobianos	32
7.6.-	Promotores de crecimiento	33
7.7.-	Transformación de <i>Stenotrophomonas sp. AC44</i> y <i>Microvirga sp. AF16</i> con el vector pSEVA537R-pBBR1	34
7.7.1.-	Preparación de electrocompetentes y electrotransformación en <i>Stenotrophomonas sp. AC44</i> .	34
7.7.2.-	Conjugación de <i>Microvirga AF16</i> y <i>E. coli S17</i>	35
7.8.-	Extracción de DNA plasmidico	36
7.9.-	Desinfección de semillas de <i>P. vulgaris</i>	36
7.10.-	Prueba de nodulación en <i>P. vulgaris</i>	37
7.10.1.-	<u>Prueba de nodulación en matraz</u>	<u>37</u>
7.10.2.-	<u>Prueba de nodulación en maceta</u>	<u>38</u>
7.11.-	<u>Esterilización de nódulos y aislamiento de los endosimbiontes</u>	<u>39</u>
7.12.-	<u>Identificación de las cepas aisladas de nódulos</u>	<u>39</u>
7.13.-	Determinación de la concentración mínima inhibitoria	40
8.-	<u>RESULTADOS</u>	<u>41</u>
8.1.-	<u><i>Stenotrophomonas AC44</i></u>	<u>41</u>

8.2.-	<i>Microvirga</i> AF16	45
8.3.-	<u>Búsqueda de genes de resistencia a antibióticos y a metales pesados</u>	<u>49</u>
8.4.-	Análisis del pan-genoma del género <i>Microvirga</i> sp54	
8.5.-	<u>Ensayo de susceptibilidad a antimicrobianos</u>	<u>62</u>
8.6.-	Promotores de crecimiento	64
	8.6.1.- Interacción simbiótica Planta-Bacteria	65
8.6.2.-	Prueba de nodulación en <i>Acacia</i> sp.	65
8.6.3.-	Prueba de nodulación en <i>Phaseolus vulgaris</i>	66
8.7.-	Transformantes de <i>Stentrophomonas</i> sp. AC44 y <i>Microvirga</i> sp. AF1667	
9.-	Efecto de los metales pesados en la germinación de semillas de <u><i>P. vulgaris</i></u>	70
10.-	Conclusión	72
11.-	Perspectivas	73
12.-	Bibliografía	74
13.-	Apéndice I	81
14.-	Apéndice II	83

## RESUMEN

Los cambios en la disposición del suelo, junto con los efectos tóxicos de los metales pesados, representan una condición estresante en el establecimiento de la cubierta vegetal, ya que, debido a estas características inapropiadas, se ha observado un efecto negativo en la fisiología y un obstáculo para la germinación y el crecimiento en las plantas causado principalmente por un desequilibrio bioquímico y daño genético. En la última década, se ha demostrado que los microorganismos simbióticos permiten a la planta huésped mejorar su crecimiento en condiciones de estrés por metales pesados. Este fenómeno ocurre estimulando el crecimiento de plantas indirectamente a través de la inducción de mecanismos de defensa contra fitopatógenos y / o directamente a través de la solubilización de nutrientes minerales (nitrógeno, fosfato, potasio) o la producción de fitohormonas que promueven crecimiento como: auxinas, giberelinas y etileno. También pueden cambiar la biodisponibilidad del metal en el suelo a través de diversos mecanismos como la acidificación, precipitación, quelación, complejación y reacciones redox que pueden aliviar la fitotoxicidad del metal y estimular crecimiento de la planta.

En este estudio, se aislaron 111 bacterias endosimbióticas de dos especies de Acacia, predominantes en dos jales mineros ubicados en el área minera del pueblo de Huautla, Morelos. A partir de una prueba cualitativa de resistencia a metales pesados mediante la técnica de inhibición de disco. Se seleccionaron los aislamientos AF16 y AC44, por su capacidad de resistir a metales pesados: 45 mM Pb, 207 mM Mn, 7200 uM Cd y 84 mM de Zn además de ser multirresistentes a antibióticos. Los dos aislamientos se caracterizaron por métodos filogenéticos basados en datos de secuencia multilocus revelando que la cepa AF16 se agrupa con el género *Microvirga* sp. y cepa AC44 con la especie *Stenotrophomona maltofila*. Con base a esto, el genoma de estos dos aislamientos fue secuenciado y ensamblado para estudiar la evolución y las bases genómicas de resistencia a metales pesados, identificando bombas de eflujo, ATPasas tipo P y enzimas reductoras oxidantes.

En cuanto a la interacción de estas dos cepas con plantas leguminosas, se transformaron con el vector pSEVA537R-pBBR1 que lleva una proteína roja fluorescente y se llevaron a cabo pruebas de nodulación con *P. vulgaris* en matraz, para visualizar la ubicación de la bacteria en la planta. Actualmente, se está evaluando la producción de promotores de crecimiento para conocer el papel que desempeñan las bacterias simbiotas en el establecimiento de *P. vulgaris* en condiciones de estrés.



## ABSTRACT

The changes in the soil arrangement, together with the toxic effects of heavy metals, represent a stressful condition in the establishment of the vegetation cover, since, due to these inappropriate characteristics, a negative effect on the physiology and an obstacle to germination and growth in plants caused mainly by a biochemical imbalance and genetic damage. In the last decade, it has been shown that symbiotic microorganisms allow the host plant to improve its growth under conditions of heavy metal stress. This phenomenon occurs by stimulating plant growth indirectly through the induction of defense mechanisms against phytopathogens and / or directly through the solubilization of mineral nutrients (nitrogen, phosphate, potassium) or the production of phytohormones that promote growth such as: auxins , gibberellins and ethylene. They can also change the bioavailability of the metal in the soil through various mechanisms such as acidification, precipitation, chelation, complexation, and redox reactions that can alleviate the phytotoxicity of the metal and stimulate plant growth.

In this study, 111 endosymbiotic bacteria were isolated from two species of Acacia, predominant in two mining tailings located in the mining area of the town of Huautla, Morelos. From a qualitative test of resistance to heavy metals using the disc inhibition technique. Isolates AF16 and AC44 were selected for their ability to resist heavy metals: 45 mM Pb, 207 mM Mn, 7200 uM Cd and 84 mM Zn, in addition to being multi-resistant to antibiotics. The two isolates were characterized by phylogenetic methods based on multilocus sequence data revealing that the strain AF16 is grouped with the genus *Microvirga* sp. and strain AC44 with the species *Stenotrophomona maltofila*. Based on this, the genome of these two isolates was sequenced and assembled to study the evolution and genomic bases of resistance to heavy metals, identifying efflux pumps, P-type ATPases and oxidative reducing enzymes.

Regarding the interaction of these two strains with leguminous plants, they were transformed with the vector pSEVA537R-pBBR1 that carries a red fluorescent protein and nodulation tests were carried out with *P. vulgaris* in flask, to visualize the location of the bacteria in the plant. Currently, the production of growth promoters is being evaluated to understand the role of symbiotic bacteria in the establishment of *P. vulgaris* under stress conditions.

## 1.- INTRODUCCIÓN

El suelo, capa superficial de la corteza terrestre, constituye uno de los recursos naturales más importantes, que desde el punto de vista edáfico, está formado por la progresiva alteración física y química de la roca madre a lo largo del tiempo, bajo condiciones climáticas y topográficas determinadas y sometido a la actividad de organismos vivos (Ortiz-Bernad *et al.*, 2007).

A lo largo de su evolución el suelo se va formando por componentes orgánicos, inorgánicos (arena, limo y partículas arcillosas), agua, gases y organismos vivos (lombrices, insectos, algas, bacterias, hongos etc.) entre los que se produce un intercambio continuo de moléculas. Esta estructura le da al suelo un estado de equilibrio que lo define como un elemento natural dinámico y vivo que constituye la interfaz entre la atmósfera, la litosfera, la biosfera y la hidrosfera además de mantener su capacidad de productor biológico. Este equilibrio en el suelo puede verse perturbado por diversas acciones, entre las que destaca la contaminación por actividades antropogénicas que inducen la dispersión de herbicidas, pesticidas, hidrocarburos y metales pesados (MP) (García *et al.*, 2002; Ortiz-Bernad *et al.*, 2007; Galán y Romero, 2008).

Si bien, los suelos pueden tener un aporte natural de MP proveniente de la roca madre (Ross 1994), el contenido natural de los MP en los suelos puede verse excedido a causa de la acelerada tasa de industrialización, derrames petroleros, la agricultura intensiva y la minería. Estas cantidades anómalas causan cambios en la estructura física, química y biológica del suelo como son: afectaciones a los ciclos biogeoquímicos, compactación del suelo, escasa disponibilidad de agua, bajo

contenido de materia orgánica, pH ácido y salinidad lo que da como resultado un cambio en las comunidades microbianas y por ende una disminución en la fertilidad del mismo (Pang *et al.*, 2003; Galán y Romero, 2008).

Como se mencionó anteriormente, los MP son contaminantes ambientales persistentes que causan una presión de selección (a largo plazo) en el microbioma del suelo. Esto da como resultado la adquisición de elementos génicos que contrarrestan los efectos tóxicos de los MP y que asegura la adaptación de los microorganismos en este entorno hostil (Seiler y Berendonk, 2012).

La resistencia a MP es el resultado de la intervención de múltiples mecanismos. Algunos de estos mecanismos están ampliamente distribuidos y contribuyen en la defensa elemental de la célula a diferentes elementos tóxicos, otros están muy especializados y se encuentran sólo en algunas especies bacterianas, que sólo les confiere la capacidad de resistencia a MP (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

Hay cuatro mecanismos generales que dan como resultado una resistencia a MP: (1) la formación de complejos o el secuestro de metales tóxicos reduciendo al mínimo las concentraciones libres en el citoplasma. Por ejemplo, el operón *copABCD* de *Pseudomonas putida* que codifica una serie de proteínas de unión y captura del  $\text{Cu}^{+2}$  para su homeostasis, o la chaperona *CopZ* de *Bacillus subtilis* y la metalotioneína *SmtA* dependiente de S-adenosilmetionina en *Escherichia coli*, que son captadores de  $\text{Cu}^{+2}$  en el citoplasma celular (Yamanaka *et al.*, 1995; Adaikkalam y Swarup, 2005); (2) la biosorción de MP tóxicos por las membranas celulares, las paredes celulares y la sustancia polimérica extracelular (EPS) de las

biopelículas (Seiler 7 Berendonk, 2012); (3) la transformación a un estado menos tóxico, por

ejemplo la reducción del Hg (II) a su forma volátil y menos tóxica Hg (0) por la enzima mercurio reductasa codificada por el gen *merA* (Ní Chadhain *et al.*, 2006) o la enzima cromato reductasa (*ylieF*) que elimina la toxicidad del Cr (VI) al reducirlo a Cr (III), disminuyendo su solubilidad (Liu *et al.*, 2015) y (4) la exclusión de iones tóxicos por los sistemas de flujo de salida como facilitadores de difusión de cationes (CDF), ATPasas tipo P y los transportadores compuestos por miembros de la familia de resistencia, nodulación, división celular (RND) (Marrero-Coto *et al.*, 2010).

Muchos de estos mecanismos de resistencia se encuentran en elementos génicos móviles (por ejemplo plásmidos y transposones) que no sólo están conferidos para dar resistencia a MP si no también a antibióticos (Seiler y Berendonk, 2012). Estos mecanismos se pueden acoplar fisiológicamente por resistencia cruzada y genéticamente por co-resistencia. La resistencia cruzada es el mecanismo que brinda tolerancia a más de un agente tóxico como los antibióticos y MP (Chapman, 2003). Un ejemplo son las bombas de flujo que intervienen en la disminución de la susceptibilidad hacia los antibióticos y los MP mediante la extrusión rápida de las toxinas fuera de la célula (Martínez *et al.*, 2009) y la co-resistencia que se define como dos o más genes de resistencia vinculados genéticamente, lo que significa que los genes responsables de dos o más resistencias se encuentran en un mismo elemento genético móvil (Chapman, 2003). Un ejemplo del acoplamiento de elementos génicos que confieren co-resistencia son el gen *tcrB* de resistencia a  $\text{Cu}^{+2}$  y el gen *vanA* de resistencia a glucopéptidos y macrólidos de *Enterococcus faecium* aislado de animales de granja, en el que se detectó una resistencia

conjunta al  $\text{Cu}^{+2}$  y a antibióticos (Hasman y Aarestrup, 2002). Por lo tanto, la contaminación

del suelo por MP puede ser un reservorio de bacterias patógenas multi-resistentes (Seiler y Berendonk, 2012).

### **Interacción planta-microorganismos en suelos contaminados con MP**

Los cambios en la disposición del suelo, aunado a los efectos tóxicos de los MP, representan una condición estresante en el establecimiento de la cubierta vegetal, ya que, debido a estas características inapropiadas, se ha observado un efecto negativo en la fisiología y una obstaculización en la germinación y crecimiento en la planta causado principalmente por un desajuste bioquímico y daño genético (Pang *et al.*, 2003; de Santiago-Martín *et al.*, 2013).

En la última década, la ecología microbiana ha proporcionado nuevos conocimientos sobre la asociación simbiótica entre microorganismos (bacterias y hongos) que colonizan la rizosfera (que rodea inmediatamente a la raíz) y la endosfera (compartimentos dentro de la raíz) y las plantas, así como, del papel que estos microorganismos juegan en el establecimiento de las plantas por diferentes mecanismos, incluidos la fijación de nitrógeno, la movilización de nutrientes (fósforo) y la producción de factores de crecimiento. Además de su capacidad bioquímica y fisiológica para degradar o resistir contaminantes, pueden estimular el crecimiento de plantas en suelos perturbados (de Santiago-Martín *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2015).

Recientemente, se ha demostrado que los microorganismos simbióticos permiten a la planta hospedadora mejorar su crecimiento bajo condiciones de estrés por MP (Visioli *et al.*, 2015). Este fenómeno se da principalmente por una serie de procesos

que desintoxican el tejido de la planta tales como: la salida de iones metálicos fuera del citoplasma y la biotransformación de metales tóxicos a formas menos tóxicas, o bien, pueden ayudar en la compartimentación de metales dentro de las vacuolas celulares o la adsorción/desorción de metales, especialmente en las paredes celulares (Teng *et al.*, 2015; Visioli *et al.*, 2015).

En la última década se han aislado y caracterizado bacterias rizobiales simbióticas o de vida libre con capacidad de resistir altas concentraciones de MP y fungir como promotores de crecimiento en plantas (Visioli *et al.*, 2015).

Zribi *et al.*, (2012) aislaron una colección de rizobios de nódulos de *Medicago sativa* que presentaron tolerancia y actividad bioacumuladora de MP, además de tener el potencial de nodular en condiciones de estrés. Estas muestras provenientes de tres sitios mineros y un sitio agrícola ubicados al norte de Túnez, que presentaban textura arcillo-limosa con niveles altos de elementos nutritivos (fósforo y potasio) y materia orgánica para suelo agrícola y alto nivel de salinidad y bajo contenido de materia orgánica en suelos mineros. A partir de estas muestras, realizaron el análisis de la composición de metales pesados. Los suelos mineros mostraron diferentes concentraciones de cadmio (Cd), plomo (Pb) y zinc (Zn) con niveles por arriba de  $26 \text{ mg kg}^{-1}$ ,  $2050 \text{ mg kg}^{-1}$  y  $4050 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente.

Los aislados de los nódulos de *M. sativa* fueron seleccionados de acuerdo a su nivel de tolerancia a MP. Las cepas S532 y S412 originarias de suelo minero fueron capaces de crecer en presencia de 2.5 mM de Zn, 0.3 mM de Cd, 1 mM de Cu y 2 mM de Pb, niveles de tolerancia superiores a los presentados por la cepa S112



proveniente del suelo agrícola. Los tres aislados fueron identificados dentro del género *Sinorhizobium sp.*

Posteriormente, probaron la actividad de bioacumular MP en las tres bacterias, con el fin de comprender mejor el mecanismo de tolerancia a metales, presentando datos contrastantes para cada MP. La cepa S112 fue quien presentó una mayor bioacumulación total de Cd y Zn, con respecto a la cepa S532, sugiriendo la posibilidad de que ambas cepas estén presentando distintos mecanismos de tolerancia y que la cepa S532 esté haciendo uso de mecanismos de permeabilidad y/o exportación reducidos del metal.

En la prueba de nodulación, observaron un mejor crecimiento en plantas inoculadas que en las no inoculadas, ambas expuestas a condiciones estresantes con MP. No obstante, el crecimiento fue aún menor en comparación con las plantas sembradas en suelo agrícola. Con base en estos resultados, los autores concluyen que la tolerancia y la actividad de biosorción de MP en rizobios es un factor importante en la eficacia simbiótica que ayuda a la planta hospedadora a establecerse en suelos perturbados con MP. Además de que la caracterización de rizobios con este potencial es de gran interés, ya que ayudan a la regeneración y el enriquecimiento de suelos contaminados.

Posteriormente, Ghnaya *et al.*, (2015) evaluaron la utilidad de una de las cepas anteriormente descritas, identificada como *Sinorhizobium meliloti*, en la fitoextracción de Cd por *M. sativa*. Determinaron el efecto en plantas inoculadas y no inoculadas expuestas a 50 mg/kg<sup>-1</sup> y 100 mg/kg<sup>-1</sup> de Cd. Observaron que en ausencia de Cd, las plantas inoculadas exhibieron un mejor desarrollo que las

plantas no inoculadas. Con el suministro de Cd, se redujo significativamente el crecimiento de la planta, este efecto fue proporcional a la concentración de Cd. La exposición a Cd indujo síntomas de toxicidad (clorosis y necrosis). Estos síntomas fueron más severos en las plantas no inoculadas (especialmente a 100 mg/kg) que en las inoculadas. Sin embargo, sí se observó un aumento en la biomasa y una mejor adquisición de nutrientes en plantas inoculadas.

La nodulación en *M. sativa* inducida por *S. meliloti* mejoró el potencial de la fitoextracción de Cd en estas plantas. En presencia de 50 mg/kg<sup>-1</sup> de Cd (en el suelo) las cantidades de Cd extraídas en los brotes fueron de 58 y 178 µg en plantas no inoculadas e inoculadas, respectivamente. Los autores consideran que el aumento en la absorción de metales por *M. sativa* inoculada podría ser inducido por la mejora de la biodisponibilidad del metal en el suelo por parte de la bacteria.

Dado que la cepa seleccionada es tolerante a MP y mejora el crecimiento de plantas, la absorción de Cd y la translocación a los brotes de *M. sativa*, concluyen que la asociación entre *S. meliloti* y *M. sativa* podría ser una herramienta eficiente para la rehabilitación de suelos contaminados con Cd por medio de la fitoextracción. Datos que concuerdan con lo anteriormente reportado por Zribi *et al.*, 2012.

Los antecedentes descritos coinciden en que la acción sinérgica de cepas rizobiales mejoran el crecimiento de plantas expuestas a MP, además de potencializar su actividad en la fitorremediación, posicionando a estas bacterias como un modelo de estudio excelente para entender cómo se da la interacción de plantas con bacterias rizobiales en condiciones de estrés y el papel que estos

microorganismos juegan en el establecimiento de plantas en suelos contaminados,  
ya sea de forma

independiente y en comunidad. Se sabe que los rizobios estimulan la supervivencia y la acción de otras bacterias con capacidad de bioacumular y biotransformar MP, además de biodegradar otros contaminantes orgánicos presentes en el suelo, lo que hace más eficiente el crecimiento de plantas (Teng *et al.*, 2015; Ojuederie *et al.*, 2017).

## **2. - ANTECEDENTES**

En el laboratorio de Estudios Ecogenómicos (LEE), llevamos a cabo el aislamiento de bacterias endosimbióticas de dos especies de *Acacia*, predominantes en dos jales mineros localizados en la zona minera del poblado de Huautla, perteneciente al municipio de Tlaquiltenango, al sur del estado de Morelos (18°25'24" N y 99°01'44" O (Pérez-Martínez, 2017)).

A partir de nódulos de las dos especies de *Acacias* se aislaron un total de 111 cepas. Realizamos una hibridación tipo *southern blot* del gen *nifH* y la visualización del perfil plasmídico de las cepas por medio de geles tipo *Eckhardt* (Hynes y McGregor, 1990). De acuerdo a estas características así como a su capacidad de nodular y fijar nitrógeno con alguna de las dos especies de *Acacia*, se seleccionaron cinco aislados que fueron identificados por el 16s rRNA (Tabla 1).

**Tabla 1.** Caracterización de bacterias de nódulos de *A. cocliacantha* y *A. farnesiana*

Cepa	Planta	Número de <i>nifH</i>	Prueba de	Prueba de
------	--------	--------------------------	-----------	-----------

Posteriormente, realizamos una prueba cualitativa de resistencia a metales pesados por medio de la técnica de inhibición por discos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Concentración mínima inhibitoria a MP

Cepa	Concentración
------	---------------

En este trabajo se concluyó que las bacterias aisladas de nódulos de plantas expuestas a suelos contaminados presentaron un patrón diferente en la resistencia a MP. Lo que las hace un excelente modelo de estudio para conocer los diferentes mecanismos moleculares de resistencia a MP, además del papel que juegan las bacterias simbiotes en el establecimiento de *Acacia sp.* en condiciones de estrés.

### **3.- HIPÓTESIS**

Las bacterias *Microvirga sp.* AF16 y *Stenotrophomonas sp.* AC44 provenientes de nódulos simbióticos, que presentan resistencia a metales pesados, pueden formar asociaciones benéficas con plantas leguminosas para contribuir en procesos biológicos que favorezcan su establecimiento en sitios perturbados con metales pesados .

### **4.- OBJETIVO GENERAL**

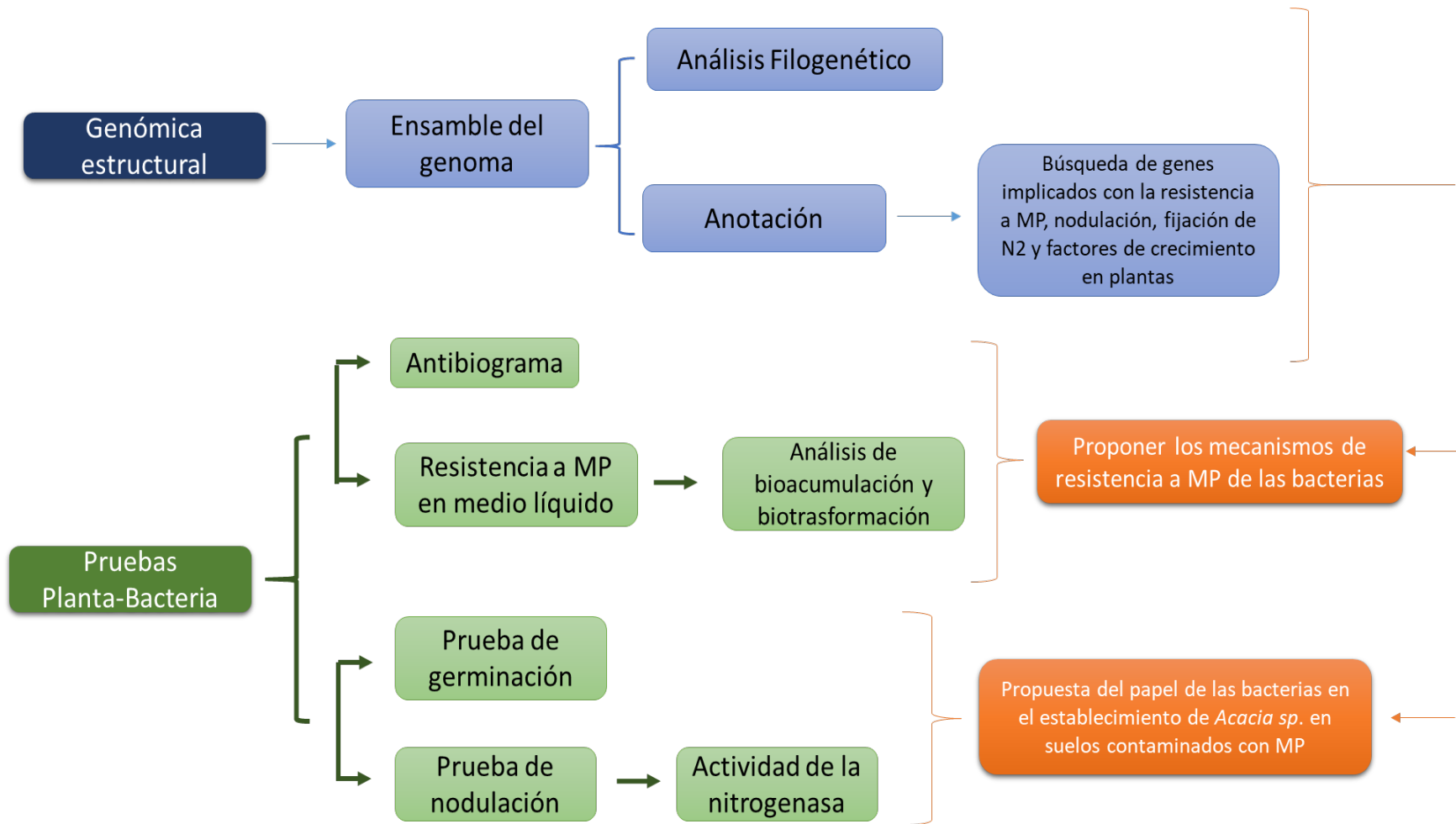
Caracterizar a nivel genómico y molecular las cepas *Microvirga sp.* AF16 y *Stenotrophomona sp.* AC44 en la resistencia a metales pesados y los efectos que producen al establecer relaciones simbióticas con plantas leguminosas.

### **5.- OBJETIVOS PARTICULARES**

- Analizar la respuesta de las cepas *Microvirga sp.* AF16 y *Stenotrophomona sp.* AC44 a presencia de metales pesados.
- Evaluar el efecto de *Microvirga sp.* AF16 y *Stenotrophomona sp.* AC44 en la germinación de semillas de *P.vulgaris* en presencia de metales pesados.
- Determinar la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno de las cepas *Microvirga sp.* AF16 y *Stenotrophomona sp.* AC44 con *P.vulgaris* en presencia y ausencia de metales pesados.
- Proponer los genes candidatos implicados en la resistencia a metales pesados en las cepas *Microvirga sp.* AF16 y *Stenotrophomona sp.* AC44.

- Proponer el papel ecológico de las cepas *Microvirga* sp. AF16 y *Stenotrophomona* sp. AC44 en asociación con *P.vulgaris*.

## 6.- ESTRATEGIA METODOLÓGICA





## 7.- METODOLOGÍA

### 7.1- Secuenciación, ensamble y anotación de los genomas de *Microvirga sp. AF16* y *Stenotrophomonas sp. AC44*

A partir de un cultivo fresco de *Microvirga sp. AF16* y *Stenotrophomonas sp. AC44* en medio PY con antibiótico (fosfomicina cálcica 100 µg/mL) purificar el DNA total con el kit *Bacteria DNA preparation* (Jena Bioscience). Evaluar la calidad de la extracción del DNA total con la técnica de electroforesis y la pureza con el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop™ 2000 (Thermo SCIENTIFIC).

Secuenciar con el dispositivo TrueSeq PCR-Free con la plataforma NexSeq500 con una corrida Paired-End (lecturas dobles o pareadas) con una longitud de 75 pares de bases. Ensamblar las lecturas *de novo* con el programa SPAdes 3.11.1 (Bankevich *et al.*, 2012) y Velvet (Zerbino, 2010) con la finalidad de obtener una mejor calidad en el ensamblado y un menor número de contigs y scaffolds. Realizar la anotación automática de forma jerárquica, primero anotar los rRNAs con el programa RNAmmer 1.2, luego los tRNAs y tmRNAs con tRNAscan-SE v. 2.0 y los péptidos señal con el programa SignalP. Posteriormente anotar los marcos de lectura abiertos (ORFs, Open Reading Frames) utilizando el servidor RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Brettin *et al.*, 2015). Curar la anotación manualmente utilizando las bases de datos: BLAST+, para la búsqueda de genes en base de datos de proteínas, Pfam para para la búsqueda de familias de proteínas basadas en UniProt Reference Proteomes y NCBI's CDD.

## 7. 2.- Búsqueda de genes

A partir de la anotación automática identificar los genes de resistencia a antibióticos, metales pesados, nodulación, fijación de nitrógeno y promotores de crecimiento vegetal en los genomas de *Microvirga sp* AF16 y *Stenotrophomonas* AC44 usando la información de los genomas de referencia. Refinar la búsqueda usando las bases de datos CARD (McArthur *et al.*, 2013), ResFinder (Zankari *et al.*, 2012), antiSMASH (Medema *et al.*, 2014) y PlasmidFinder (Carattoli *et al.*, 2014). Analizar las secuencias con el programa BLASTN.

## 7.3.- Análisis del pangenoma

Bajar los genomas en formato fasta disponibles en refseq de la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) del género *Microvirga*. Filtrar el número de genomas bajo los siguientes criterios: a) Hábitat de la cepa, b) Número de contig menor a 300. Anotar los genomas con el programa Prokka, y utilizar el archivo de salida GenBank (Apéndice II).

Utilizar `get_homologues` (Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013) para calcular grupos de genes ortólogos de las secuencias de los genomas de entrada. Indicar a `get_hologues` computar los grupos de genes ortólogos bajos tres algoritmos: bidirectional best-hit (BDBH), Clusters of Orthologous Groups—triangles (COGtriangles) y OrthoMCL (Markov Clustering of orthologs, OMCL) como se describe en el manual (eead-csic-compbio.github.io/get\_homologues/manual/manual.html).

Para *Microvirga* usar los parámetros por default (75% de cobertura de alineación) y habilitar la exploración de dominios usando la base de datos de PFAM. Finalmente calcular el genoma core consenso y los clústeres del pan-genoma.

#### **7.4.- Análisis filogenético**

Calcular el genoma core con get\_homologues. Lanzar los resultados al software get phylomarkers para evaluar el rendimiento filogenético con dos algoritmos: FastTree (FT; v2.1.10) y IQ-TREE (IQT; v1.6.3) (Vinuesa *et al.*, 2008; Guindon *et al.*, 2010).

#### **7.5.- Prueba de cualitativa de susceptibilidad a antimicrobianos**

Realizar el perfil de susceptibilidad a antibióticos de acuerdo al protocolo propuesto por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), con modificaciones.

Inocular las cepas *Microvirga sp* AF16 y *Stenotrophomonas sp* AC44 en placas con medio PY suplementadas con los antibióticos: Estreptomicina (100 µg/mL), Gentamicina (15 µg/mL), Kanamicina (30 µg/mL), Ampicilina (100 µg/mL), Carbenicilina (20 µg/mL), Trimetoprim (50 µg/mL), Fosfomicina cálcica (150 µg/mL), Ácido nalidíxico (10 µg/mL), Cloranfenicol (20 µg/mL), Enrofloxacin (5 µg/mL), Tetraciclina (10 µg/mL) y Sulfadoxin (250 µg/mL) e incubar a 37 °C por 16-24 hrs. Utilizar la cepa *R. etli* NXC12 como control. Al término del período de incubación proceder al análisis del crecimiento bacteriano.

## **7.6.-Promotores de crecimiento**

### **7.a) Solubilización de fosfatos**

A partir de una asada de la cepa de interés inocular 5 mL de medio PY e incubar por 12 h a 37°C. Ajustar el cultivo bacteriano a un densidad óptica ( $D.O_{600}$ ) de 0.2.

Posteriormente, inocular por triplicado en medio de cultivo NBRIP (apéndice 1) e incubar a 30 ° C durante 3 días. Después de este período, medir el tamaño de los halos alrededor de las colonias (Caballero-Mellado *et al.*, 2007).

### **7.b) Producción de sideroforos**

A partir de un cultivo fresco inocular placas de medio CAS-M9 (apéndice 1) e incubar a 30 ° C durante 3 días. Los halos anaranjados formados alrededor de las colonias son indicativos de la producción de sideróforos (Alexander *et al.*, 1991).

### **7.c) Producción de celulosa**

Determinar la producción de celulosa siguiendo el protocolo descrito por Robledo *et al.* 2012.

Inocular una asada de la cepa de interés el 5 mL de medio PY e incubar por 12 h a 37°C. Ajustar el cultivo bacteriano a un densidad óptica ( $D.O_{600}$ ) de 0.5 e inocular placas de agar nutriente (NA) suplementada con el colorante rojo congo. Incubar a 37°C por 3 días y finalmente evaluar el color de las colonias.

## 7.7.- Transformación de *Stenotrophomonas sp. AC44* y *Microvirga sp. AF16* con el vector pSEVA537R-pBBR1

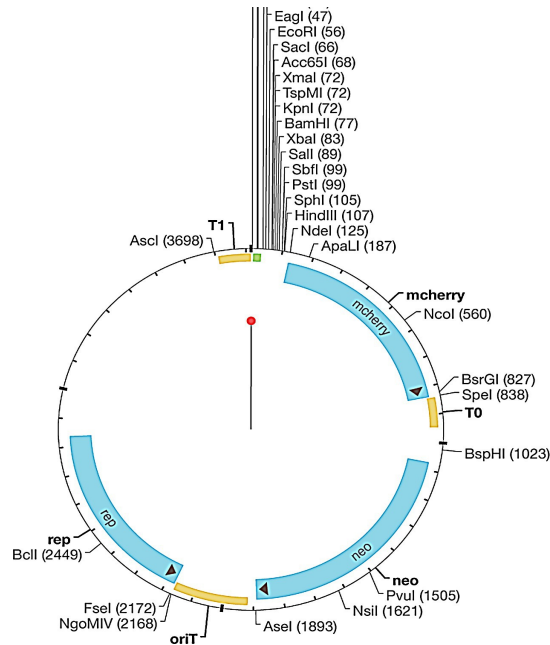


Fig 1.- Mapa del vector pSEVA537R-pBBR1

### 7.7.1.- Preparación de electrocompetentes y electrotransformación en *Stenotrophomonas sp. AC44*.

A partir de un glicerol almacenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  inocular 5 mL de medio PY con una asada e incubar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a 180 rpm por 18 h. Transferir 1.5 mL del cultivo a 2 tubos de microcentrifuga y centrifugar a 13,200 rpm por 3 min. Trancurrido el tiempo, desechar el sobrenadante y lavar las células 3 veces con 1 mL de Sacarosa a 300 mM. Finalmente resuspender las células en 100  $\mu\text{L}$  de la misma solución. Mezclar de 100-500 ng de DNA del vector de interés con 50  $\mu\text{l}$  de las células. Transferir la mezcla a una cubeta de electroporación y aplicar un pulso eléctrico de 1,800 V por

6 ms. Recuperar las células en 500  $\mu$ L de medio SOC e incubar a 37 °C a 180 rpm por 2 h. Finalmente, plaquear 100  $\mu$ L en medio PY con tetraciclina al 25 y 50  $\mu$ g/mL.

### **7.7. 2.- Conjugación de *Microvirga* AF16 y *E. coli* S17**

#### **Preparación de las células donadoras**

Inocular con una asada de la cepa *E. coli* S17 que porta el vector pSEVA537R-pBBR1 5 mL de medio LB con tetraciclina (15  $\mu$ g/mL). Incubar a 37 °C con agitación (180 rpm) por 18 h. Inocular 100 mL de medio LB sin antibiótico con 1 mL del cultivo e incubar a 37 °C con agitación a 180 rpm hasta que el cultivo alcance una D.O<sub>600</sub> de 1.0. Posteriormente, centrifugar 3 mL del cultivo a 5,000 rpm por 3 min. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla celular 3 veces con medio LB. Resuspender en 500  $\mu$ L del mismo medio.

#### **Preparación de células receptoras**

A partir de un glicerol almacenado a -70 °C de la cepa *Microvirga* sp. AF16 inocular 5 mL de medio PY con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e incubar a 37 °C a 180 rpm por 18 h. Inocular con 1 mL del cultivo 100 mL de medio PY sin antibiotico e incubar a 37 °C a 180 rpm por 8 h o hasta que el cultivo alcance una D.O<sub>600</sub> de 1.0. Centrifugar 3 mL del cultivo a 5,000 rpm por 3 min. Desechar el sobrenadante y lavar la pastilla celular 3 veces con medio PY. Resuspender en 500  $\mu$ L del mismo medio.

Para llevar a cabo la conjugación, mezclar gentilmente 50  $\mu$ L de células donadora y 50  $\mu$ l de células receptoras. Tomar todo el paquete celular y sembrar en medio sólido PY sin antibiótico. Incubar a 37 °C por 18 h.

Levantar el tapete de células de la caja con 1 mL de medio líquido PY, mezclar en vórtex y hacer diluciones seriales de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Plaquear 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones en cajas de medio PY con tetraciclina (50  $\mu$ g/mL) y ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e incubar a 37 °C por 72 h.

### **7.8.- Extracción de DNA de plásmido**

Inocular una asada de las células transformadas y de la cepa *E. coli* S17 en 5 mL de medio PY con tetraciclina (15  $\mu$ g/mL) incubar a 37 °C por 16 h. Realizar la purificación del DNA de plásmido con el kit *ZymoPURE plasmid miniprep* como lo describe el fabricante. Visualizar el DNA obtenido por electroforesis en geles de agarosa al 1 % (1gr agarosa, 100 ml de buffer TAE 1X y 5  $\mu$ l de bromuro de etidio). **7.9.- Desinfección de semillas de *P. vulgaris***

Realizar la esterilización de la parte superficial de las semillas siguiendo el protocolo propuesto por Talbi (2011) con algunas modificaciones:

1. Sumergir las semillas en etanol al 96% (v/v) durante 30 segundos.
2. Lavar con abundante agua estéril y adicionar hipoclorito de sodio al 6% durante 15 minutos. Desechar el hipoclorito de sodio.
3. Lavar abundantemente con agua destilada estéril.



## a) Germinación de semillas

1. Colocar las semillas en placas Petri con agar-agua al 1 %.
2. Incubar en la oscuridad a 30°C por 60 hrs o hasta que las radículas presenten una longitud aproximada de 1-2 cm.

Una vez que la radícula alcanzó la longitud deseada, sembrar en vermiculita y cultivar en condiciones controladas (ver más adelante).

### 7.10.- Prueba de nodulación en *P. vulgaris*

Efectuar la prueba de infectividad en *Phaseolus vulgaris* utilizando como control positivo la cepa *Rhizobium etli* NXC12 (Santamarina, *et al.*, 2017).

#### 7.10.1 .- Prueba de nodulación en matraz

Colocar las plántulas de *P. vulgaris* (previamente desinfectadas y germinadas como se describió anteriormente) en matraces de 250 mL con 200 mL de medio sólido Fahreus (ver apéndice 1).

#### 10.1.a) Inoculación de plantas

1. Inocular las bacterias de interés en 50 mL de medio PY líquido (con antibiótico) por 12 hrs a 37 °C. Posteriormente, ajustar a una  $D.O_{600}$  de 0.2.
2. Centrifugar las células a 10,000 g por 5 min y resuspender en  $MgSO_4$  10 mM.
3. Inocular cada semilla colocada en los matraces con 1 mL de cultivo (aproximadamente  $10^5$  células/mL) en condiciones de esterilidad.

Trasladar los matraces a un cuarto de crecimiento con fotoperiodo de 12 h luz 12 h oscuridad a 27-29 °C durante 21 días. Revisar las plántulas cada 5 días, para evaluar el proceso de nodulación.

#### **7.10.2.- Prueba de nodulación en maceta**

Inocular las bacterias de interés en medio PY sólido por 24 hrs a 37 °C o hasta obtener una suspensión bacteriana de  $10^8$  células por mL. Estimar la cantidad de células calculando el número de UFCs.

Inocular cada semilla germinada con 1 mL (aproximadamente  $10^8$  células/mL) colocadas en macetas con vermiculita estéril en condiciones de esterilidad (como se mencionó anteriormente). Trasladar las macetas a una cámara de ambiente controlado (14/10 h ciclo luz / oscuridad, 22/16 °C, flujo de fotón fotosintético  $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y humedad relativa del 60 al 70%) y regar alternativamente con una solución nutritiva de nitrógeno libre ( Fahraeus, 1957 ) y agua. Verificar la formación de nódulos después de 21 días.

Evaluar los siguientes parámetros:

##### **a) Peso seco en plantas y nódulos**

Secar las plántulas con nódulos en una incubadora a 60 °C por 48 h y determinar el peso seco en una balanza (Brouat y Crouzet, 1965).

##### **b) Actividad de la Nitrogenasa**

Determinar la actividad de la nitrogenasa mediante un ensayo de reducción de acetileno (ARA) en raíces noduladas según lo descrito por Hardy *et al* (1968 ).

Colocar en frascos de 100 mL cuatro raíces con nódulos y tapar con tapón de goma. Inyectar 1 mL de acetileno. Incubar por una hora a temperatura ambiente y realizar la cuantificación de etileno empleando un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de flama (columna Porapak R: largo 1.8 m, diámetro 3.2 mm; arrastre de N<sub>2</sub> gas con un nivel de flujo de 36 mL/min; temperatura del horno: 80 °C). Con una jeringa tomar alícuotas de 0.5 mL del gas del interior del frasco e inyectar al cromatógrafo cada 10 min.

#### **7.11.- Esterilización de nódulos y aislamiento de los endosimbiontes**

Posterior al cultivo, sacar las plantas y lavar las raíces con agua estéril. Recolectar los nódulos e incubar en etanol al 70 % durante 1 min, enjuagar con agua estéril y sumergir en hipoclorito de sodio al 5 % durante 5 min. Volver a lavar al menos 6 veces con abundante agua estéril (Villalobos-López, comunicación personal). Para asegurar que la esterilización es efectiva, tomar un nódulo con una pinza estéril y rodarlo en una caja Petri con medio PY sólido.

Triturar los nódulos con una varilla de vidrio y añadir una gota de agua estéril. Tomar asadas del nódulo machacado y estriar en cajas Petri con medio PY sin antibiótico e incubar a una temperatura de 37 °C. Observar el crecimiento de las colonias después de 24-48 horas.

#### **7.12.- Identificación de las cepas aisladas de nódulos**

Extraer el DNA de los aislados con el kit *Bacteria DNA preparation* de Jena Bioscience (como lo describe el fabricante) y amplificar del fragmento del gen 16S rRNA, mediante PCR. Preparar la reacción de PCR en un volumen total de 25 µL:

2.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs a una concentración 0.5 mM de cada uno, 1.5  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos específicos, 0.5  $\mu\text{L}$  de DNA genómico (30 ng aproximadamente), 0.25  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polymerasa (unidades) y 7  $\mu\text{L}$  de agua inyectable. La amplificación se lleva a cabo con un régimen de ciclos que consisten en una desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 40 seg de desnaturalización a 94 °C, un alineamiento a 58 °C durante 1 min, seguida de una extensión a 72 °C durante 1 min 30 seg, y finalmente, una extensión a 72 °C por 10 min.

El fragmento 16S rRNA obtenido se analiza por electroforesis en geles de agarosa al 1 % (1gr agarosa, 100 mL de buffer TAE 1X y 5  $\mu\text{l}$  bromuro de etidio). Purificar del gel el producto obtenido, con el kit comercial *QIAquick Gel Extraction* (QIAGEN). Secuenciar la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### **7.13.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria a MP**

Cultivar las bacterias de interés durante 12 hrs a 37°C en 50 mL de medio mínimo con niveles bajos de fosfato (para evitar la precipitación de los metales) y con concentraciones ascendentes  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{MnSO}_4$  y  $\text{CdSO}_4$ . A partir de ese cultivo realizar diluciones seriadas. Tomar 10  $\mu\text{L}$  y extender sobre placas Petri con medio PY sólido e incubar a 37°C por 12 h y determinar las unidades formadoras de colonia (UFCs) de cada cultivo.

## 8.- RESULTADOS

### 8.1.- *Stenotrophomonas AC44*

La cepa AC44 fue aislada de nódulos de *Acacia cochliacantha*, una especie de leguminosa que predomina en los jales mineros de Huautla, Morelos. Debido a su capacidad de resistencia a metales pesados y a su potencial como promotora de crecimiento vegetal en suelos contaminados se decidió hacer el análisis del genoma completo de la cepa AC44. El genoma fue secuenciado con el dispositivo TrueSeq PCR-Free de la plataforma NexSeq500 mediante una corrida Paired-End y ensamblado de novo con el programa SPAdes 3.11.1.

El ensamblado final del genoma de la cepa AC44 fue de 47 contigs y consiste de un cromosoma de 4,704,177 pb con un contenido de G+C promedio de 66.4% que cae dentro del contenido de G+C que representa al género *Stenotrophomonas sp.* (Patil *et al.*, 2016). No se observó la presencia de plásmidos. Figura 2. La anotación fue realizada con el servidor RAST y manualmente curada usando los programas y bases de datos anteriormente mencionados. Las principales características del ensamble del genomas de la cepa AC44 se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Características del genoma de la cepa AC44

Replicón	Tamaño	No. de contigs	GC%	N50	L50	CDSs	RNA <sub>t</sub>
Cromosoma	4,704,177	47	66.4	837,753 pb	2	4,415	66

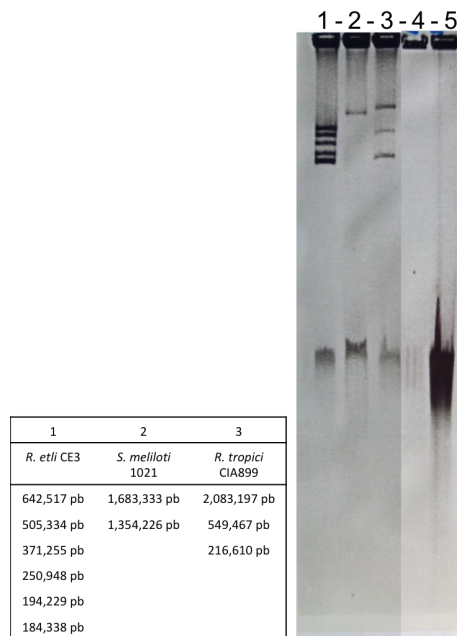


Fig 2.- Perfil de plásmidos en geles tipo Eckhardt. Carriles: (1) *R.etli* CE3, (2) *S. melloti* 1021, (3) *tropici* CIAT899 y (4) *Stenotrophomonas* sp. AC44

R.

La secuencia completa del gen 16S rRNA de las cepa AC44 mostró una alta identidad con especies del género *Stenotrophomonas* sp., por lo tanto, se realizó la inferencia filogenética de dicha cepa con el criterio de máxima verosimilitud en PhyML3 ( Guiondon *et al.*, 2010), utilizando las secuencias del marcador molecular 16S rRNA del género *Stenotrophomonas* sp., encontradas en las bases de datos de NCBI. El árbol filogenético muestra que la cepa AC44 efectivamente se agrupa con el género *Stenotrophomonas* sp. específicamente con la especie *Stenotrophomonas maltophilia* (Figura 3).

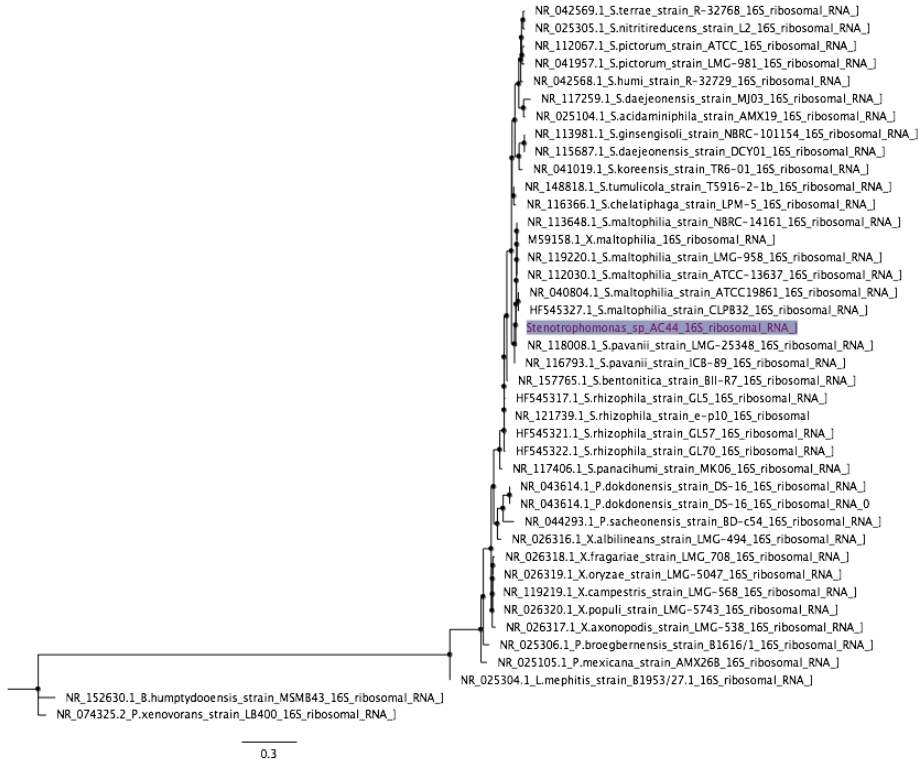


Fig 3.-Inferencia filogenética de la cepa AC44 basada en la secuencia del gen 16S rRNA. La historia evolutiva se infirió utilizando el método máxima verosimilitud. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método JC con 0,03 sustituciones por posición de nucleótido.

Teniendo en cuenta la baja tasa de evolución del gen 16S rRNA y la poca resolución a nivel de infraespecie (Vinuesa *et al.*, 2018), se realizó una inferencia filogenética usando otros marcadores, de forma concatenada, ya reportados en el estudio de la taxonomía de la especie *Stenotrophomonas*.

Se eligieron tres genes para inferir la estructura filogenética de *Stenotrophomonas*: *recA* (esencial para la reparación y el mantenimiento del DNA en respuesta al sistema S.O.S), *atpD* (codifica para la subunidad B ATP sintasa) y *gapA* (codifica para la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) (Cerezer *et al.*, 2014). Las secuencias concatenadas se alinearon y se construyó el árbol por el criterio de máxima verosimilitud (Figura 4). El filograma indica que la cepa AC44 se agrupa

con especies de habitat y estilo de vida variado, que en su mayoría son patógenos de humanos, por ejemplo: *Stenotrophomonas maltophilia* R551-3 bacteria simbionte de raíz (Niu *et al.* 2017), *S. maltophilia* ISMMS2 cepa multi-resistente a antibióticos aislado de una paciente con Meningitis bacteriémica (Park *et al.*, 2015),

*S. maltophilia* K279a aislada de pacientes con fibrosis quística (Crossman *et al.*, 2008) y *S. maltophilia* Ab55555 aislada de un paciente infectado de *G. intestinalis* (Sassera *et al.*, 2013). Sin embargo, debido a la estrecha relación que existe entre las cepas de esta especie se pretende realizar la reconstrucción filogenética con genes ortólogos, o con la matriz del pangenoma (Vinuesa *et al.*, 2018).

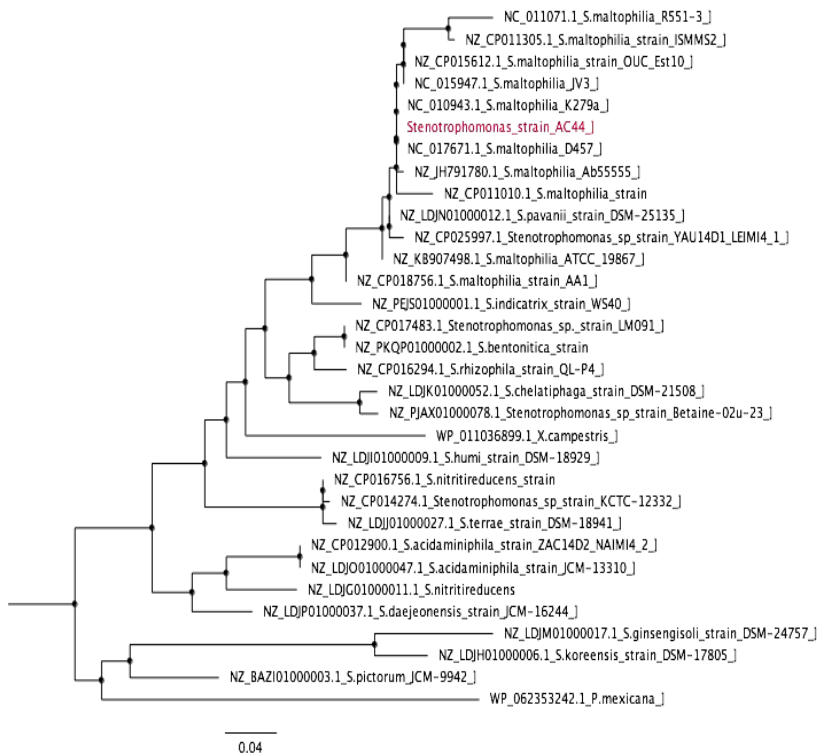


Fig 4.- Inferencia filogenética de la cepa AC44 basada en secuencias concatenadas. La historia evolutiva se infirió utilizando el método máxima verosimilitud. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método JC con 0,04 sustituciones por posición de nucleótido.



## 8.2.- *Microvirga* AF16

El ensamblado final de la cepa AF16 presentó las siguientes características: fueron secuenciados alrededor de 9,630,811 pb representados en un ensamble final de 146 contigs, con un contenido de G+C de 61.30%, una N50 de 364,821 pb el contig mas largo fue de 944,906 pb. La anotación de genes fue realizada con el servidor RAST Un total de 10,659 genes fueron anotados, la anotación fue manualmente curada usando los programas y bases de datos antes mencionadas (Tabla 6).

Tabla 6. Características del genoma de la cepa AF16

Replicón	Tamaño	No. de contigs	GC%	N50	L50	CDSs	RNA <sub>t</sub>
Cromosoma	9,631,911 pb	142	61.30	364,821 pb	9	10,659	67

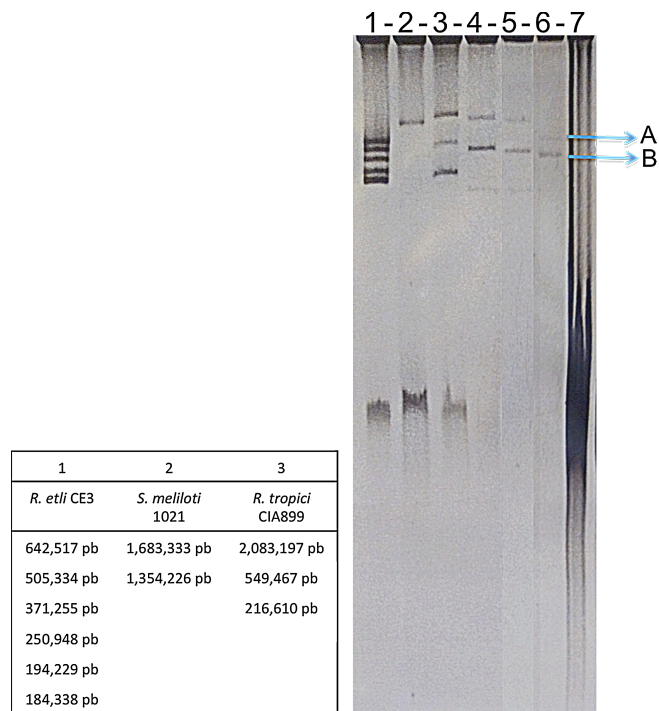


Fig 5.- Perfil plásmidico de la cepa AF16 obtenido por el procedimiento Eckhardt (1978). Carriles: 1) *R. etli* CE3, 2) *S. meliloti* 1021, 3) *R. tropici* CIA899 y 6) *Microvirga* AF16

Como primer acercamiento en la identificación bacteriana se utilizaron las secuencias de los genes 16S rRNA de todas las cepas del género *Microvirga sp.* (incluida la cepa de interés) encontradas en la base de datos de NCBI, éstas se alinearon usando el programa MUSCLE. La inferencia filogenética se realizó bajo el criterio de máxima verosimilitud en PhyML3 ( Guiondon *et al.*, 2010) con un Bootstrap de 1,000 replicas. La topología de los arboles filogenéticos se muestran en la Figura 6.

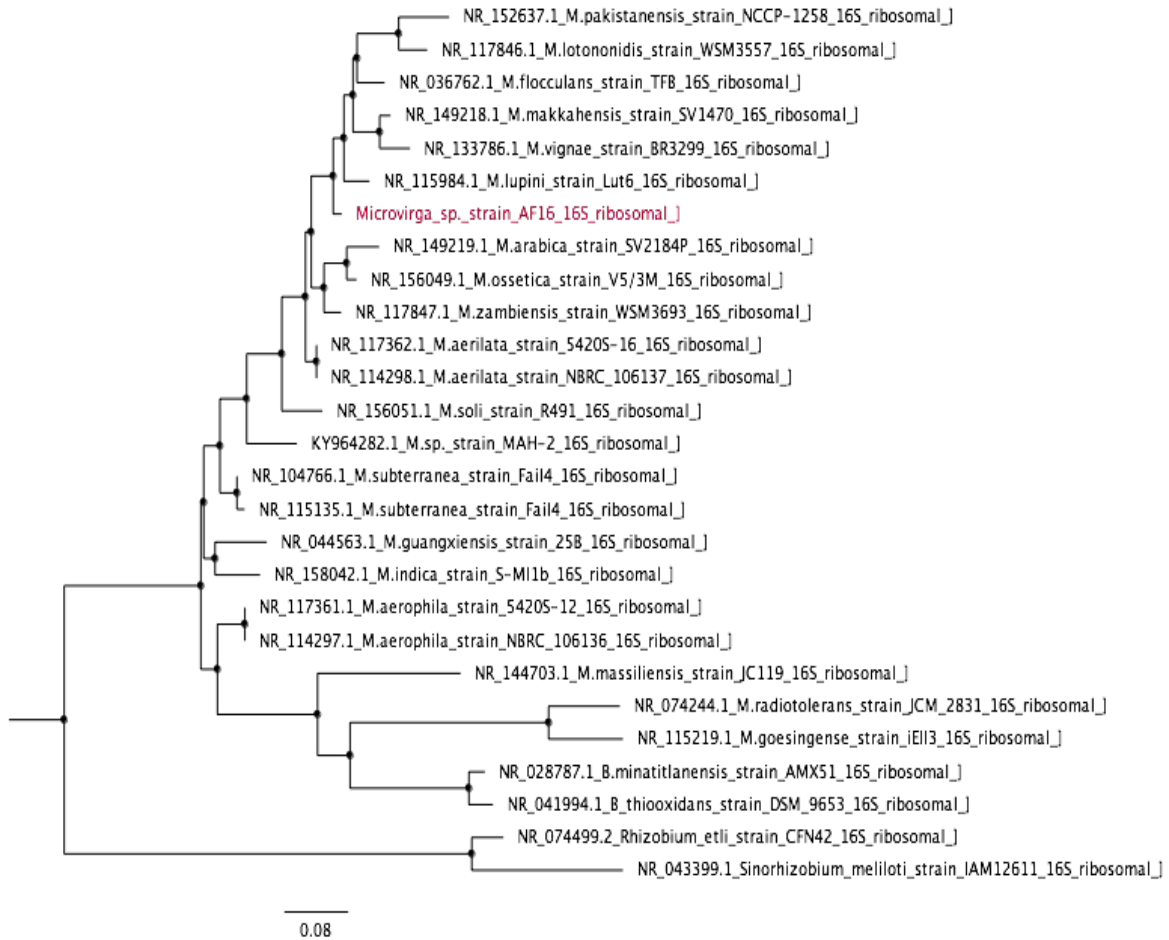


Fig 6.- Árbol filogenético de la cepa AF16 basada en la secuencia del gen 16S rRNA. La historia evolutiva se infirió utilizando el método máxima verosimilitud. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método JC con 0.08 sustituciones por posición de nucleótido.

Para analizar con mayor profundidad la relación filogenética de la cepa AF16, se realizaron árboles filogenéticos basados en genes housekeeping concatenados: *rpoB* (codifica para la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa), *parE* (DNA topoisomerasa subunidad B), *dnaK* (codifica para una chaperona implicada en el choque térmico), *recA* (esencial para la reparación y el mantenimiento del DNA en respuesta al sistema S.O.S) (Arshia-Amin *et al.*, 2016; Vera-Safronova *et al.*, 2016) bajo el criterio de máxima verosimilitud en PhyML3 (Guiondon *et al.*, 2010)

con un Bootstrap de 1,000 replicas. Los resultados mostraron que, efectivamente la cepa

AF16 se agrupa con cepas del género *Microvirga* sp. específicamente con las cepas de *Microvirga lupini* Lut6, *Microvirga* sp CCBAU-65841 y *Microvirga lotononidis*. Las cepas *M. lotononidis* y *M. lupini* Lut6 son cepas aisladas de nódulos de *Listia angolensis* y *Lupinus texensis* respectivamente, ambas con capacidad de nodular y fijar nitrógeno ( Andam y Parker, 2007; Ardley *et al.*, 2012). En el caso de la cepa *Microvirga* sp CCBAU-65841 es un aislado de suelos expuestos a un ambiente árido y que presentan cierta concentración de metales pesados. Esta cepa tiene capacidad de fijar carbono y nitrógeno en vida libre (Bailey *et al.*, 2014).

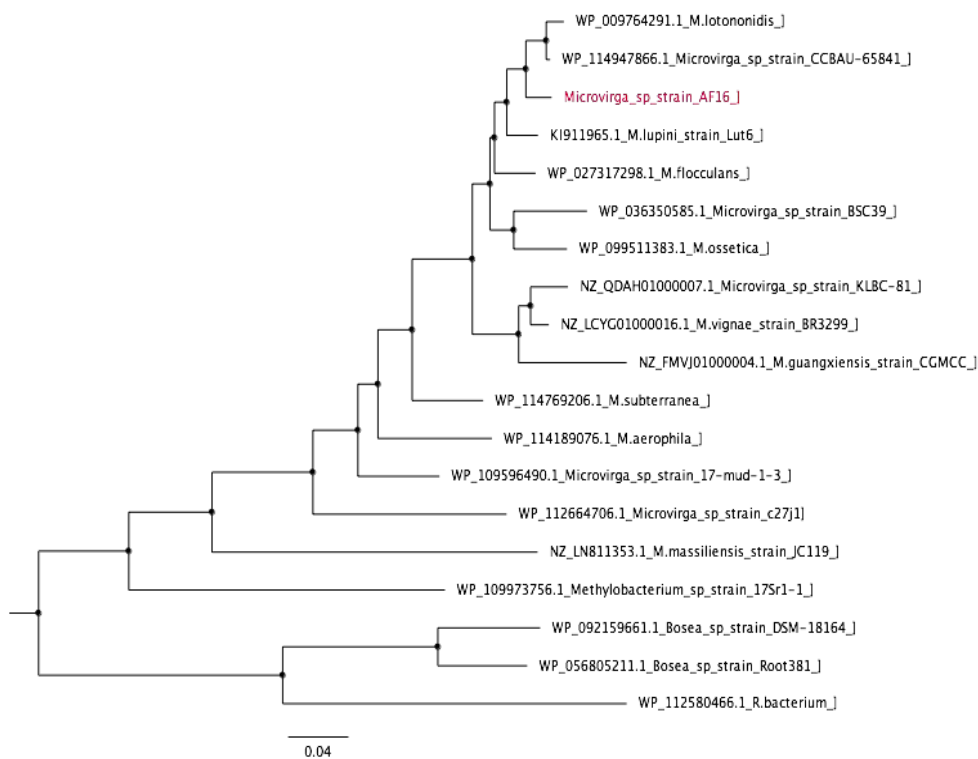


Fig 7.- Inferencia filogenética de la cepa AF16 basada en la secuencia concatenada de genes housekeeping. La historia evolutiva se infirió utilizando el método máxima verosimilitud. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método JC con 0,04 sustituciones por posición de nucleótido.

### **8.3.- Búsqueda de genes de resistencia a antibióticos y a metales pesados**

Se realizó el análisis *in silico* de los genomas de *Microvirga sp.* AF16 y *Stenotrophomonas sp.* AC44 (previamente ensamblados) para identificar los genes implicados en la resistencia a antibióticos y metales pesados, así como genes relacionados con la promoción del crecimiento vegetal, nodulación y fijación de nitrógeno. A partir de la anotación de los genomas realizado por RAST, se buscaron los genes de interés por palabra clave. Este análisis se detalló haciendo una búsqueda a partir de secuencias con el uso de plataformas en línea que ofrecen datos de referencia como NCBI, UniProt y Pfam. Finalmente, se utilizaron los servidores en línea CARD, ResFinder y AntiSMASH. El porcentaje de identidad de todas las secuencias de aminoácidos encontradas se analizó usando la herramienta BLAST. Los genes rastreados en los genomas se resumen en las Tablas 7, 8, 9, 10.

El análisis de los genes implicados en la resistencia a antibióticos y a metales pesados indica que las cepas AC44 y AF16 comparten genes implicados en la formación de bombas de eflujo. Se identificaron bombas de eflujo pertenecientes a la familia MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusión*), familia SMR (*Small Multidrug Resistance*) y familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*), así como las bombas tripartitas de la familia RND (*Resistance Nodulation and cell Division*) y EMrAB- TolC.

Si bien, este análisis nos ha dado indicios de los posibles mecanismos compartidos y únicos de las cepas *Stenotrophomonas sp.* AC44 y *Microvirga sp.* AF16 implicados en la resistencia a antibióticos y metales pesados, aún falta detallar la búsqueda.

Tabla 7. Genes implicados en la resistencia a antibióticos presentes en el genoma de *Stenotrophomonas* AC44

Gen	% de I.D	Locus	Descripción	Resistencia
<i>smeD</i>	97.97	-		
<i>smeA</i>	99.58	-		
<i>smeC</i>	99.75	-		
<i>smeR</i>	97.38	-	Bomba de	Tetraciclina; Fluoroquinolona; Fenicoles;
<i>smeB</i>	99.81	-	Nodulación y división	aminoglucosidos;
<i>smeS</i>	99.79	-	celular	cefalosporina; cefamicina; Macrolidos
<i>smeF</i>	98.26	-		
<i>smeE</i>	99.04	-		
<i>adeF</i>	60.06	-		
<i>aph(3')-Ic</i>	97.91%		Aminoglucósido-fosfotransferasa	Aminoglucosidos
<i>Beta-lactamasa A</i>	98%	-	Hidrolasas que utilizan serina	Penicilinas y las cefalosporinas
<i>sugE</i>	100%	633782.. 634099	Familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR, small multidrug resistance) (SMR)/ compuestos de amonio cuaternario	Estreptomicina y Sulfonamidas
<i>bcr</i>	100%		Superfamilia del facilitador mayor (MFS)	Bicyclomycin
			membrana/RND	

Tabla 8. Genes implicados en la resistencia a metales pesados en *Stenotrophomonas* AC44

Gen	% de I.D	Locus	Descripción	Resistencia
<i>ctpA</i>	99%		ATPasa tipo P1B de translocación de cobre	
<i>czcA</i>	99%	-	Bomba de	Cobre
<i>cutA</i>	100%		intracelular de cationes divalentes	
<i>cutC</i>	93%	561701...562432	proteína homeostática del cobre	Cobre
<i>corA</i>	96%	1290411...1289389	proteína transmembrana transportadora de magnesio / cobalto	Magnesio /Cobalto
	97%	565965...568466	ATPasa transportadora de metales pesados tipo P	
<i>sul1</i>	89%	780304...778496	multicobre oxidasa	Cobre
<i>zupT</i>	88%	-	transportador de zinc	Zinc
	74%	-	transportador transmembrana de arsenito	
<i>arsH</i>	95%	-	metil arsenito oxidasa Reduce el arseniato [As (V)] al arsenito [As (III)] utilizando glutatión y	Arsenico
<i>arsC</i>	90%	-	glutaredoxina como fuentes de equivalentes reductores	



Tabla 9. Genes implicados en la resistencia a antibióticos en *Microvirga* AF16

Gen	% I.D	Locus	Descripción	Resistencia
<i>adeF</i>	69.93%	-	Bomba de eflujo/Resistencia nodulación y división celular	Tetraciclina/ Fluoroquinolona
<i>MATE</i>	78%	83988...815598	proteínas de extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos (MATE)	-
<i>bcr/cfiA</i>	95%	-	Bomba de eflujo/ Superfamilia de Facilitadores Principales (MFS)	-
<i>ampC</i>	76%	-	serina hidrolasas pertenecientes a la familia de peptidasas	Penicilinas / Cefalosporinas
<i>sunT</i>	89%	-	transportador ABC que contiene el dominio de la peptidasa exporta bacteriocina	Cloranfenicol/ ofloxacina

Tabla 10. Genes implicados en la resistencia a metales pesados en *Microvirga AF16*

Gen	% I.D	Locus	Descripción	Resistencia
<i>copA</i>	91%	-	ATPasas de tipo P que transportan cobre	Cobre
<i>Sulf1</i>	97%	-	Oxidasa multicobre con tres dominios de cupredoxina	
<i>arsC</i>	86%	-	Arsenato reductasa	Arsenico
<i>merT</i>	77%	-	proteína de membrana integral de transporte mercuríco	
<i>merP</i>	79%	-	proteína de unión al mercurio periplasmático	Mercurio
<i>merA</i>	90%	-	Mercurio reductasa	
<i>cbtA</i>	81%	-	Proteína transportadora de cobalto permeasa del transportador	Cobalto
<i>fbpB</i>	84%	-	ABC de hierro	Hierro
<i>zupT</i>	89%	-	Transportador de zinc	Zinc
<i>copC</i>	57%	-	Proteína de unión al cobre	Cobre
<i>rcnA</i>	64%	-	proteína de salida de níquel / cobalto	Níquel/Cobalto
<i>zunB</i>	87%	-	Sistema de transporte ABC tipo Mn <sup>2+</sup> / Zn <sup>2+</sup> , componente de permeasa	Magnesio/ Zinc
			Sistema de transporte ABC tipo Mn <sup>2+</sup> / Zn <sup>2+</sup> , componente ATPasa	
			Sistema de captación de Zn de tipo ABC	Zinc
			transportador de cationes de la familia del facilitador de difusión de cationes (CDF)	Zn, Cd, Ni, Co, Mn y Cu
			bomba de eflujo de metales pesados dirigida por protones específica para Zn (II)	

#### **8.4.- Análisis del pan-genoma del género *Microvirga sp.***

Con el objetivo de entender las variaciones genómicas y su conexión con el fenotipo y estilo de vida del género *Microvirga sp.*, se realizó genómica comparativa a gran escala (pan-genóma) con todos los genomas publicados del género (hasta el momento) y se anexó el genoma ensamblado de la cepa AF16. Los archivos en formato genbank fueron procesados con el software get\_homologues, al cual se le indicó que computara todos los genes ortólogos utilizando tres algoritmos: BDBH, COG y OrthoMCL con una cobertura de alineación del 80%, como lo describe el manual en línea (Apéndice II).

Como resultado, los tres algoritmos predijeron 1,072 genes que pertenecen al genoma núcleo del género, ya que, contiene las secuencias de copia única compartidas por todos los genomas de entrada, los cuales codifican proteínas de mantenimiento central de una célula, como: la traducción, replicación, reparación y biogénesis de la pared celular, entre otras.

El trabajo pionero del análisis de pangenomas Tettelin *et al.* (2005) reveló que los genomas bacterianos son contenedores dinámicos que albergan genes esenciales y también elementos accesorios, que pueden ser únicos para cada comunidad y que la cantidad de genes compartidos y específicos dependen del número de cepas que se tomen en cuenta.

Por lo tanto, para estimar el número de genes presentes en cada cepa de *Microvirga sp.* (genoma del núcleo), se extrapolaron el número de genes compartidos encontrados por los tres algoritmos (BDBH, COG y OrthoMCL) y se ajustó con las funciones propuestas por Willenbrock *et al.* (2007) y Tettelin *et al.* (2005).

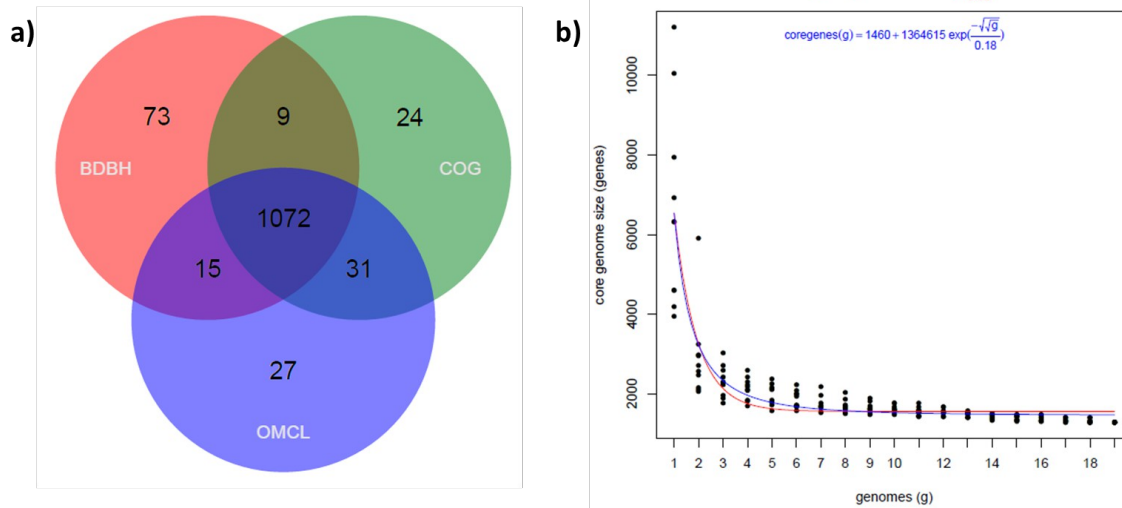


Fig 9.- (A).Diagrama de Venn de los genomas centrales generados por los logaritmos BDBH, COG y OMCL. (B) Estimación del tamaño del genoma del núcleo con los ajustes de Tettelin (azul) y Willenbrock (rojo)

En la Figura 9 (B) se observa una disminución en el número de genes compartidos con la adición de nuevas secuencias y las funciones ajustadas convergen en 1,558 y 1,460 genes cuando se utilizaron los ajustes de Willenbrock *et al.* (2007) y Tettelin *et al.* (2005), respectivamente. Lo que indica que el tamaño del genoma núcleo permanecerá relativamente constante, incluso cuando se anexasen más genomas al análisis.

Para determinar el repertorio genético global (pan-genoma), se estimó el número de nuevos genes agregados por cada secuencia genómica predichos por los algoritmos OMCL y COG (40,666 genes) y se ajustó con una exponencial en descomposición (Tettelin *et al.*, 2005; Contreras-Moreira y Vinuesa, 2013). La Figura 10 (B) converge a un crecimiento lineal lo que sugiere que el pan-genoma de *Microvirga sp.* está abierto y que su tamaño aumenta con el número de genomas secuenciados (Tettelin *et al.*, 2008). Además los modelos de

get\_homologues indicaron un pangenoma muy extendido, con un núcleo pequeño y un componente

accesorio considerablemente alto (Figura 10(C)). Por lo tanto, la alta diversidad pangénomica nos indica que las especies del género *Microvirga* tienen altas capacidades sustanciales para adaptarse a diversos entornos.

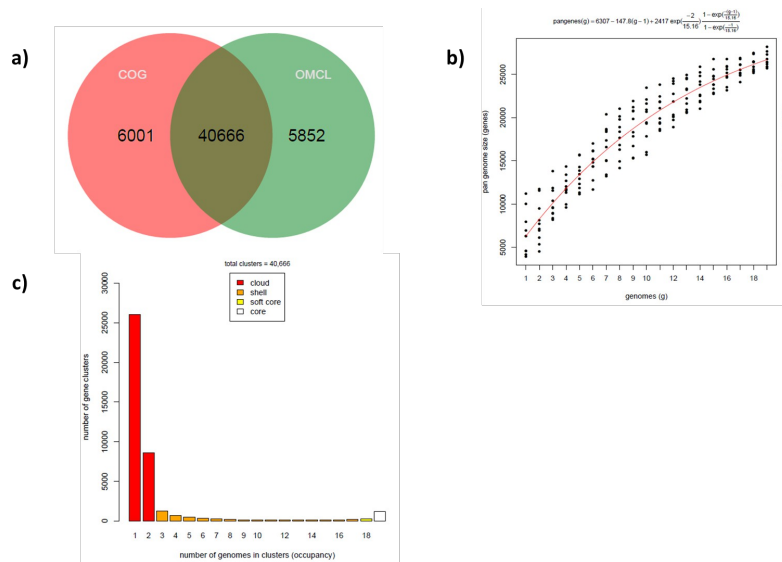


Fig 10.- (A) Análisis de Venn de pangenomas generados por COG y OMCL. (B) Estimación del tamaño del pangenoma con el ajuste de Tettelin *et al.*, 2005. (C) Partición de la matriz pangénomica de OMCL en compartimentos de core, soft core, shell y cloud.

Una limitación de las filogenias del genoma central es que se estiman a partir de la pequeña fracción de genes de copia única que comparten todos los organismos en estudio. Los genes que codifican rasgos adaptativos relevantes para la diferenciación de nicho y los sucesivos eventos de especiación típicamente muestran una distribución específica de linaje. Por lo tanto, para determinar si la variabilidad en los genes accesorios corresponde a la divergencia filogenética de los clados de *Microvirga sp.*, se generó una matriz pangénomica de presencia o ausencia de genes, para calcular el árbol de máxima verosimilitud pangénomico que se muestra en Figura 11. Dicha filogenia refleja mejor las afinidades genéticas de

las especies de *Microvirga* sp. en función de su composición (presencia o ausencia de genes homólogos) y, por lo tanto, su potencial fenotípico que, las filogenias de especies convencionales estimadas a partir de alineaciones concatenadas de genes del genoma central o productos genéticos. La inferencia filogenética indica que la cepa AF16 se agrupa con las especies *Microvirga ossetica* V5/3M, *Microvirga lotononidis* WSM3557, *Microvirga lupini* Lut6 y *Microvirga* sp. CCBAU 65841 las cuales presentan estilos de vida simbióticos, ya que, son bacterias asociadas a *Vicia alpestris*, *Listia angolensis*, *Lupinus texensis* y *Lupinus micranthus*, respectivamente (Reeve *et al.*, 2013; Msaddak Abdelhakim *et al.*, 2017; Safronova V. *et al.*, 2017). Para fines de comparación, también se calculó un árbol de máxima verosimilitud a partir de alineamientos concatenados de 725 genes centrales ortólogos con mejor puntuación seleccionados por get\_phylomarkers. Esta es una filogenia altamente resuelta. Todas las biparticiones tienen una probabilidad posterior a  $p \geq 0.77$ . En ambas filogenias, las especies aparecen como entidades monofiléticas y la cepa AF16 se agrupa con la especie *M.lupini* Lut6. Sin embargo, la comparación de las relaciones entre las especies en las dos filogenias revela algunas diferencias.

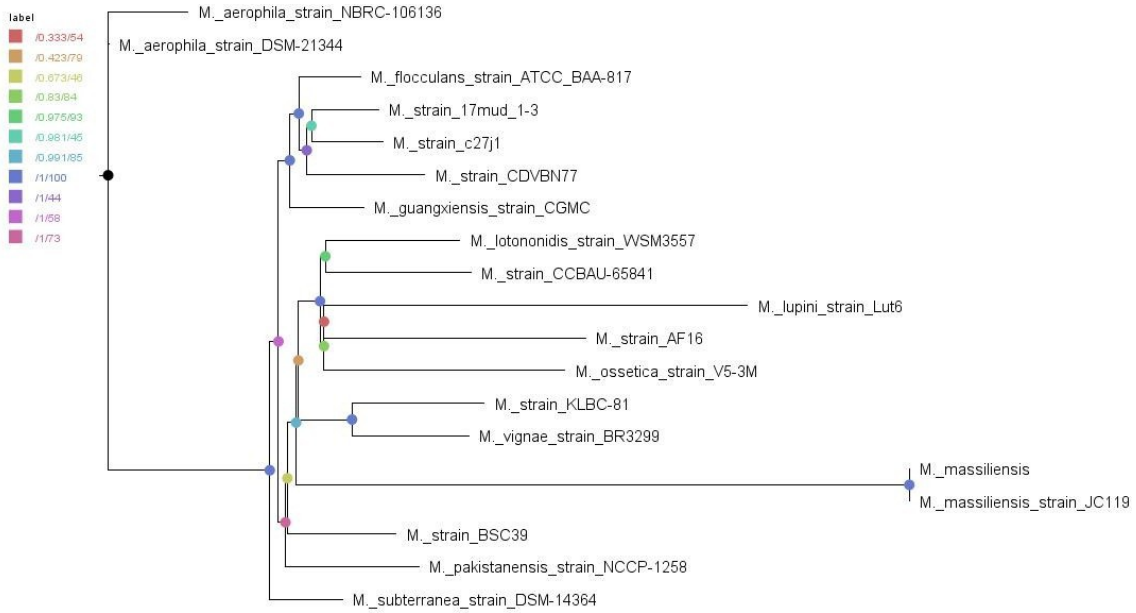


Fig 11.- Arbol de máxima verosimilitud de la matriz pangenómica de consenso COG y OMCL

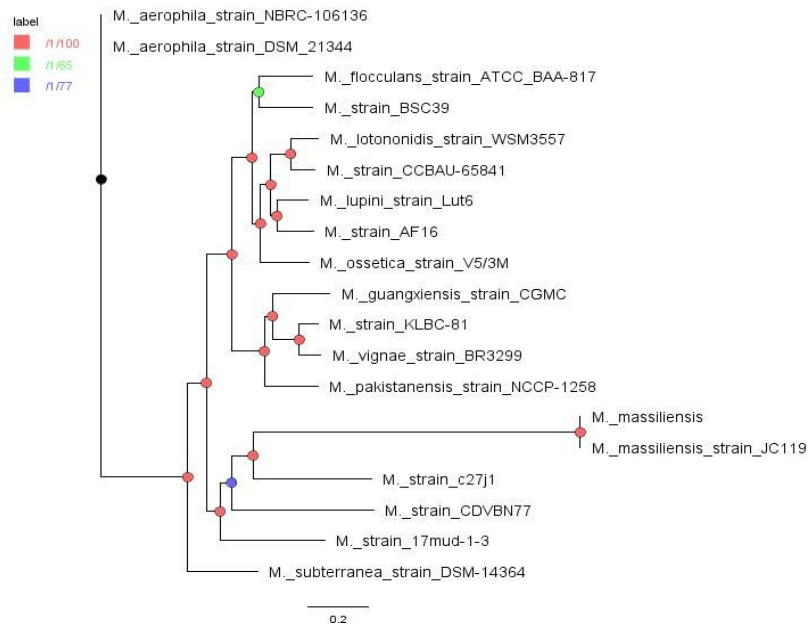


Fig 12.- Árbol de máxima verosimilitud a partir de alineamientos concatenados de genes centrales ortólogos



El objetivo final de cualquier estudio geno-taxonómico es identificar grupos similares a especies. Deben consistir en grupos monofiléticos identificados en árboles genómicos que muestren valores promedio de identidad genómica (gANI) > 94%, basados en un valor de corte ampliamente aceptado ( Rosselló-Móra y Amann, 2015

).

Tabla 11. Cálculos de identidad de nucleótidos promedio (ANI) basada en BLAST + (ANiB) y MUMmer (ANIm) entre genomas del género *Microvirga* sp.

Consulta	Genoma de referencia	ANiB > 95%	ANIm > 95 %	DDH >= 70%
M._AF16	M._aerophila_strain_DSM-21344	77.87	84.99	23.1
M._AF16	M._aerophila_strain_NBRC-106136	77.58	85.13	23.4
M._AF16	M._floculans_strain_ATCC_BAA-817	82.18	85.92	26.9
M._AF16	M._guangxiensis_strain_CGMC	78.59	85.17	24.1
M._AF16	M._lotoonidis_strain_WSM3557	83.09	86.96	29.7
M._AF16	M._lupini_strain_Lut6	84.55	88.35	33
M._AF16	M._massiliensis	72.5	83.72	20.8
M._AF16	M._massiliensis_strain_JC119	72.31	83.71	20.8
M._AF16	M._ossetica_strain_V5-3M	82.26	87.04	29.3
M._AF16	M._pakistanensis_strain_NCCP-1258	79.14	85.26	24.2
M._AF16	M._strain_17-mud_1-3	77.07	84.7	22.2
M._AF16	M._strain_BSC39	81.38	85.87	26.6
M._AF16	M._strain_c27j1	76.21	84.71	22
M._AF16	M._strain_CCBAU-65841	83.65	87.19	30.1
M._AF16	M._strain_KLBC-81	79.71	85.78	25.3
M._AF16	M._subterranea_strain_DSM-14364	78.14	85	23.4
M._AF16	M._vignae_strain_BR3299	79.48	85.46	24.8
M._AF16	M._strain_CDVBN77	74.26	83.92	21

Para descubrir los grupos genómicos dentro de los clados de *Microvirga* sp., se realizaron comparaciones genómicas completas utilizando cálculos de identidad de nucleótidos promedio (ANI) basada en BLAST + (ANiB) y MUMmer (ANIm) (Tabla 11). Las comparaciones de los resultados de ANIm con respecto a ANiB fueron

similares utilizando el mismo conjunto de genomas. Revelaron un amplio rango de variación de nucleótidos entre los 19 genomas, con pocos grupos genómicos estrechamente relacionados definidos por los siguientes criterios: ANIm > 96%,  $G_{cov} > 90\%$ ; También había muchos genomas individuales separados por ANIm < 96%.

Finalmente, para buscar grupos de especies dentro del complejo taxonómicamente problemático de *Microvirga* sp. Nuestras filogenias centrales y pangénomicas identificaron consistentemente clados de especies potenciales que agrupaban exactamente con las mismas cepas. Además, realizamos un análisis de grupos de valores de ANI del genoma central calculados a partir de las alineaciones BLASTN por pares (cgANIb) utilizadas para definir los grupos del genoma central de OMCL para los 19 genomas *Microvirga* sp. que fueron representados en un mapa de calor (Figura 13 )

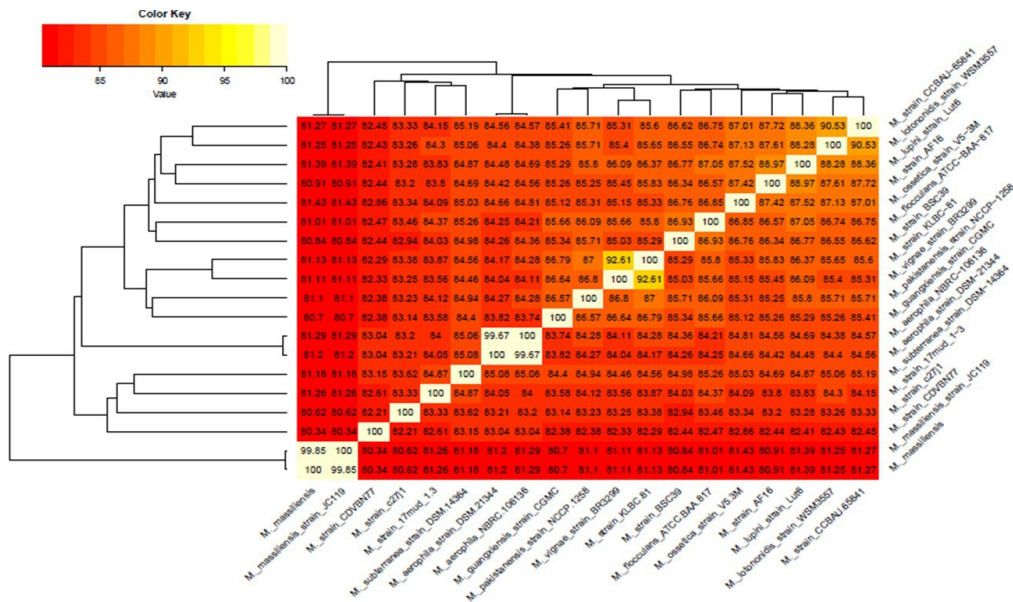


Fig.-13. Mapa de calor derivado de una matriz de Identidad de Nucleótido Promedio (ANI) calculada con get\_homologues.pl.

Los valores de ANI entre la secuencia del genoma de *M. AF16* con *M. lupini* Lut6, *M. ossetica* V5/3M, *M. lotononidis* WSM3557, y *M. CCBAU* 65841 fueron de 88.97,

87.42, 87.61 y 87.62% respectivamente. Teniendo en cuenta el valor umbral de ANI recomendado para la delimitación de especies es >94% ( Rosselló-Móra y Amann, 2015) estas comparaciones respaldan claramente la clasificación de la cepa AF16 como una nueva especie del género *Microvirga* .

La matriz cgANIb resultante se convirtió en una matriz de distancia (cgANDb = 100% -cgANIb) y se agrupó con la ayuda del script plot\_matrix\_heatmap.sh del paquete get\_homologues. La Figura 14 muestra el cladograma resultante, que resuelve 8 grupos dentro del género con un valor de corte conservador de cgANDb del 5% (cgANIb = 95%). A este nivel de distancia, la cepa AF16 cae dentro del grupo de las especies asociadas a plantas. En resumen, el rango de números razonables de grupos propuestos por el estadístico ASW (  $k = 13$  to  $k = 19$ ) corresponde a los valores de cgANDb en el rango de 5.7–4.5% (rango de cgANIb: 94.3–95.5%), que encaja bien con el nuevo estándar de oro para la delimitación de especies (gANI> 94%), establecido en obras influyentes (Konstantinidis y Tiedje, 2005 ;Richter y Rosselló-Móra, 2009).

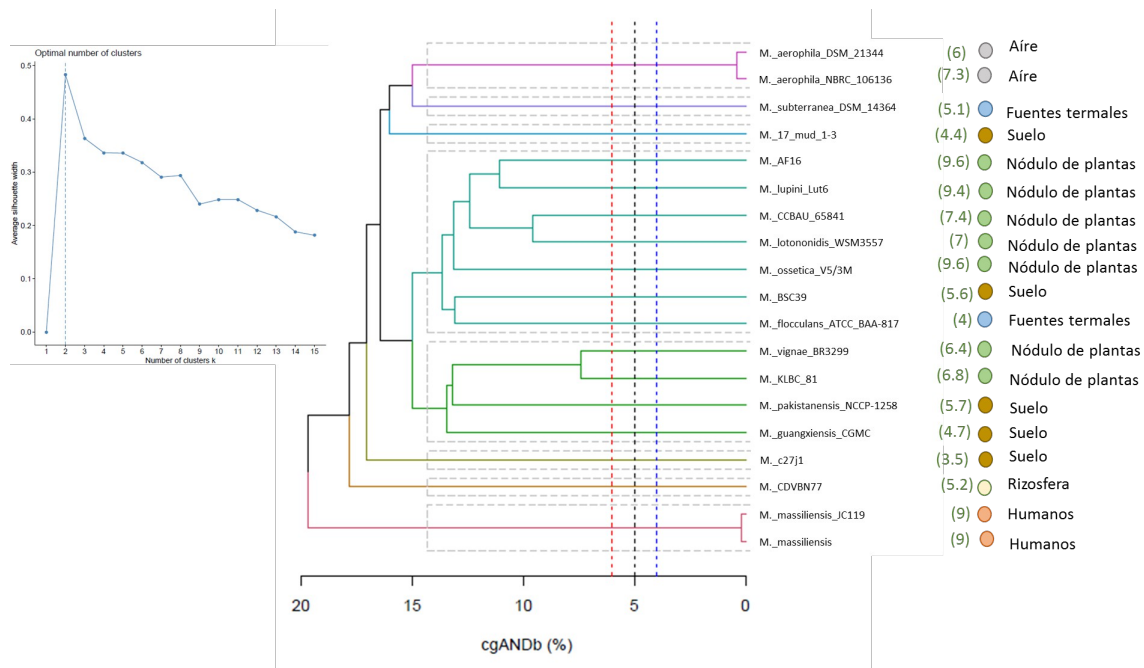


Fig.-14. Aplicación de un enfoque de aprendizaje no supervisado a la matriz de distancia cgANIb para identificar grupos similares a especies estadísticamente consistentes. La matriz cgANIb se convirtió en una matriz de distancia (cgANDb) y se agrupó utilizando el algoritmo Ward.D2.

## 8.5.- Ensayo de susceptibilidad a antimicrobianos

El perfil de resistencia cualitativa a antimicrobianos de las cepas *Microvirga* AF16 y *Stenotrophomonas* AC44 está esquematizado en la Tabla 12.

Las cepas fueron analizadas con el esquema de antibióticos que propone el *National Commitee for Clinical Laboratory Standars* (por sus siglas en inglés, NCCLS). Por lo tanto, y de acuerdo con la definición de resistencia a antimicrobianos y la familia de antibióticos a los que fue sometida, las tres cepas se les puede considerar como cepas multi-drogas resistentes, ya que presentaron resistencia a más de 6 antibióticos que pertenecen al menos a 4 familias diferentes (Magiorakos *et al.*, 2012). Se pretende realizar la prueba cuantitativa para corroborar el resultado.

Tabla 12. Perfil de susceptibilidad a antibióticos

Agentes antimicrobianos		MIC (ug/mL)	<i>Stenotrophomona</i> sp. AC44	<i>Microvirga</i> sp AF16	<i>Rhizobium</i> <i>etli</i>	NXC12
			R/I/S			
Aminoglucosidos	Estreptomina	100	R	S		S
	Gentamicina	15	R	R		S
	Kanamicina	30	R	R		S
B-lactamasas	Ampicilina	100	R	R		R
	Carbenicilina	20	R	S		S
Diaminopirimidinas	Trimetoprim	50	R	R		R
Epoxidos	Fosfomicina calcica	150	R	R		R
Quinolonas	Ácido nalidíxico	10	R	R		R
Fluoroquinolonas	Cloranfenicol	20	S	I		S
	Enrofloxacin	5	R	R		S
Tetraciclinas	Tetraciclinas	10	R	I		S
Sulfonamida	Sulfadoxin	250	R	R		R
Total			R(11); S(1)	R(8); I(2); S(2)		R(5);S(7)

## 8.6.- Promotores de crecimiento vegetal

Se determinó la capacidad de solubilizar fosfatos, producción de sideroforos y de celulosa en la cepa AF16, se utilizó como control las cepas *R.etli* NXC12, *Photorhabdus luminescens* HIM3 y *Pseudomonas aeruginosa* NA04 que han sido caracterizadas como solubilizadoras de fosfato y productoras de sideroforos. Observamos que la cepa AF16 tiene la capacidad de producir celulosa y sideroforos (Figura 15 y 16)

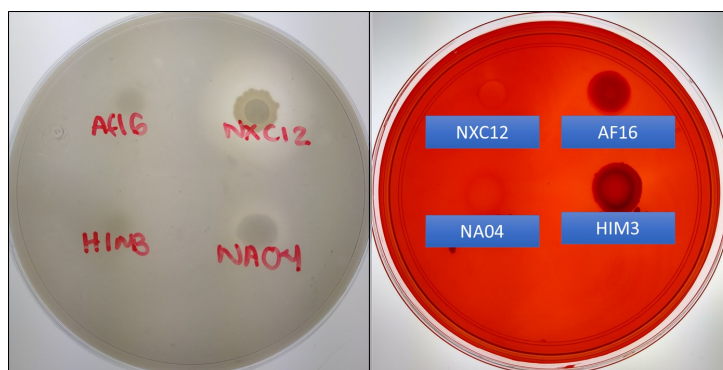


Fig.15.- Evaluación de la capacidad de solubilizar fosfatos y producir celulosa de la cepa AF16. Se utilizó como control las cepas *R.etli* NXC12, *Photorhabdus luminescens* HIM3 y *Pseudomonas aeruginosa* NA04

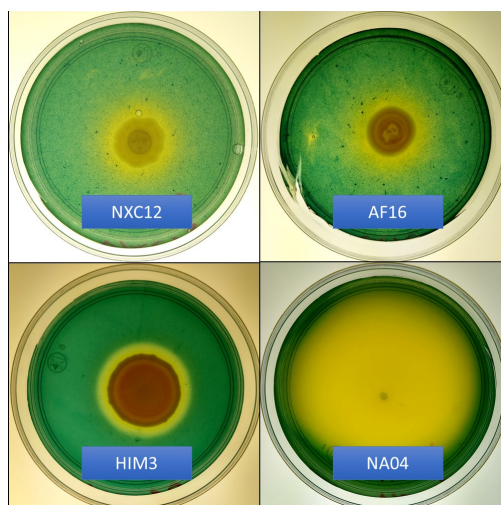


Fig.16.- Evaluación de la capacidad de producir sideroforos de la cepa AF16. Se utilizó como control las cepas *R.etli* NXC12, *Photorhabdus luminescens* HIM3 y *Pseudomonas aeruginosa* NA04

## **8.7.- Interacción simbiótica planta-bacteria**

### **8.7.1.- Prueba de nodulación en *Acacia* sp.**

El objetivo de este experimento, fue evaluar la efectividad simbiótica de nuestros aislados en respuesta a las dos especies de Acacias como hospedador, utilizando como control a *Rhizobium etli* NXC12. Para llevar a cabo la prueba de nodulación, las semillas germinadas como se describió en materiales y métodos fueron sembradas en macetas con vermiculita estéril. *Acacia cochliacantha* se inoculó con AC44; mientras que *A. farnesiana* con AF16. Las plantas fueron cultivadas en el invernadero por 60 días. Plantas de aproximadamente 15 cm, fueron extraídas de las macetas para su análisis.

Como resultado observamos que los sistemas radiculares de *A. farnesiana* inoculadas con (*Microvirga* sp AF16) y *A. cochliacantha* (inoculada con *Stenotrophomonas* sp AC44) no estaban nódulos. No obstante, en las plantas control inoculadas con la cepa *R. etli* NXC12 si se observaron nódulos.

Para comprobar la presencia de la cepa *R. etli* NXC12 en los nódulos, aislamos las bacterias de los mismos y se analizaron de la siguiente manera: se estriaron en placas con medio PY adicionadas con ácido nalidíxico (10ug), y se analizó su perfil de plásmidos utilizando como control la cepa *R. etli* NXC12.

Como se muestra en la Figura 13, todos los aislados de nódulos presentan un patrón de plásmidos característico de la cepa *R. etli* NXC12, indicándonos que el sistema montado en el presente estudio si presentó las condiciones adecuadas para dar inicio a la nodulación planta-bacteria.

A)

B)

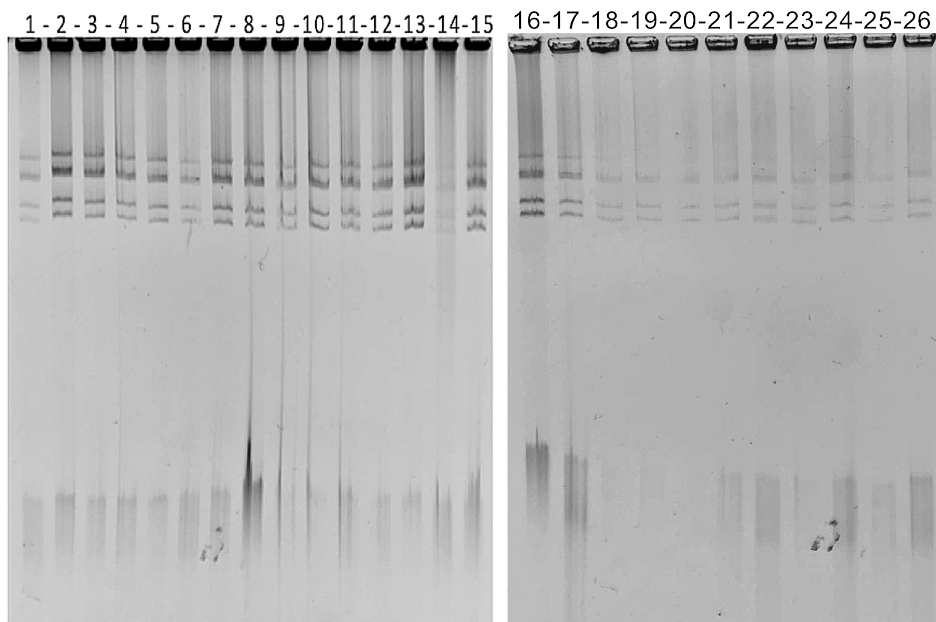


Fig 17.- Perfil de plásmidos de los aislados de nódulos de *Acacia cochliacantha* y *A.farnesiana* inoculadas con *R. etli* NXC12. Carriles: 1) *R.etli* NXC12, 2-15 aislados de *A. cochliacantha*, 16-26 aislados de *A. farnesiana*.

### 8.7.2.- Prueba de nodulación en *Phaseolus vulgaris*

Para evaluar la eficiencia simbiótica de las dos bacterias en presencia de otros hospederos, se realizó un experimento de nodulación en matraz. Se inocularon plantas de *P. vulgaris*, independientemente, con las cepas de interés y se utilizaron como control plantas inoculadas con *R. etli* NXC12 y plantas sin inocular. Las plantas fueron monitoreadas a lo largo del proceso de nodulación: 10, 15 y 21 días después de su inoculación. En cada uno de estos tiempos fue examinado la presencia de nódulos.

No se observó formación de nódulos en las plantas inoculadas con *Microvirga* sp. AF16 y *Stenotrophomonas* sp. AC44 hasta los 21 días después de la inoculación.



Sin embargo, si se observaron nódulos en las plantas inoculadas con *R. etli* NXC12. Este resultado nos confirma que las cepas *Microvirga* sp. AF16 y *Stenotrophomonas* sp. AC44 no son capaces de inducir la formación de nódulos en plantas de *P. vulgaris*.

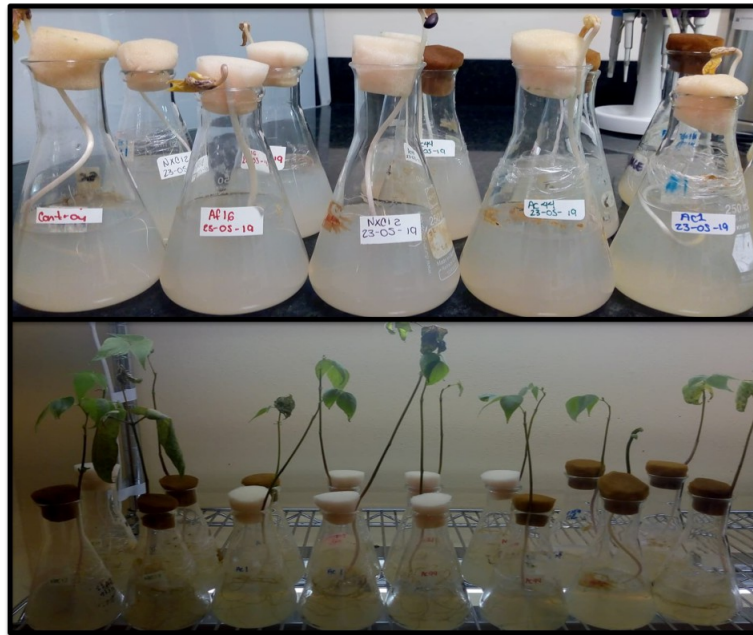


Fig 18.- Prueba de nodulación en matraz. La imagen representa plantas inoculadas y cultivadas por 21 días.

### 8.8.- Transformantes de *Stenotrophomonas* sp. AC44 y *Microvirga* sp. AF16

Con el objetivo de visualizar la localización de las bacterias en la planta, las cepas *Stenotrophomonas* AC44 y *Microvirga* AF16 se transformaron con el vector pSEVA537R-pBBR1 el cual porta un cassette de resistencia a tetraciclina (Tc) y una proteína roja florecente (mCherry). En *Stenotrophomonas* AC44 el vector fue transferido por electroporación y plaqueadas en medio PY suplementado con tetraciclina a una concentración de 25 y 50 µg/mL. En el caso de *Microvirga* AF16 fue transformada por el método de conjugación utilizando como donadora la cepa *Escherichia coli* S17- pSEVA537R-pBBR1 y fueron plaqueadas en cajas con

medio PY con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y tetraciclina (25 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), con la finalidad de

descartar a la cepa donadora. Posteriormente, fueron incubadas por 48 hrs a 37°C. Todas las colonias capaces de crecer en el medio selectivo fueron consideradas transconjugantes.

Después de la purificación de las clonas se realizó extracción de DNA del plásmido y la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína florecente, con la finalidad de corroborar la presencia del vector. Se utilizó como control las cepa *E. coli* S17- pSEVA537R-pBBR1 y nuestras cepas *Microvirga* AF16 y *Stenotrophomonas* AC44 silvestres (Figura 15 y 16, respectivamente). Finalmente se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta a una longitud de onda de

400 nm para verificar su fluorescencia (Figura 17).

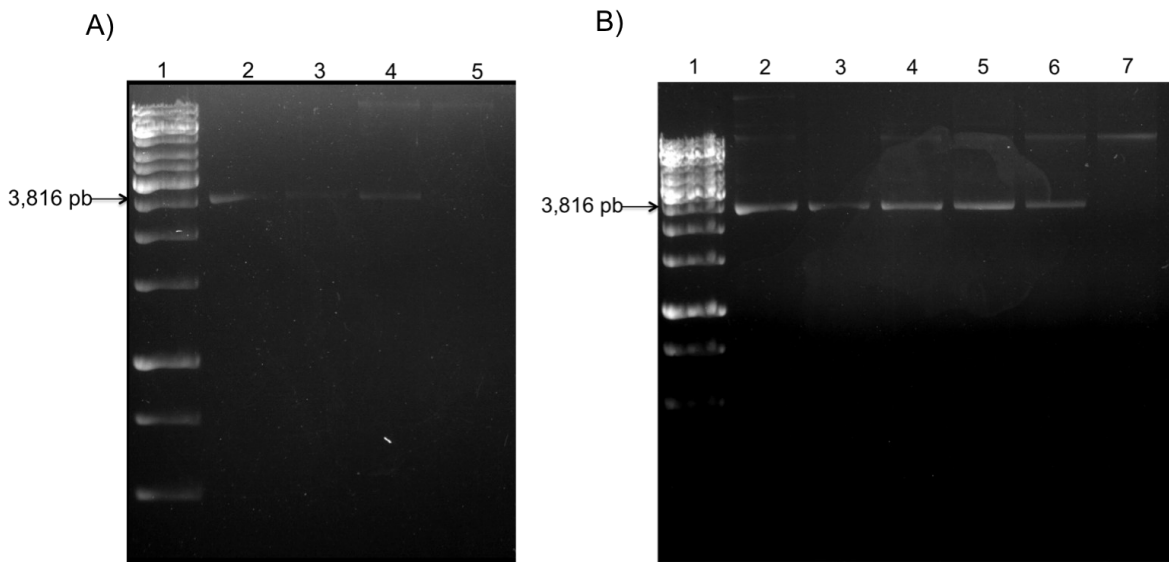


Fig 19.- Análisis de transformantes. A) Plásmidos purificados de transconjugantes de la cepa *Microvirga* sp. AF16: 1) Marcador de peso molecular, 2) pSEVA537R-pBBR1, 3) *E. coli* S17- pSEVA537R-pBBR, 4) *Microvirga* sp. AF16- pSEVA537R-pBBR1 y 5) *Microvirga* sp. AF16. B) Plásmidos purificados de transformantes de la cepa *Stenotrophomonas* sp. AC44: 1) Marcador de peso molecular, 2) pSEVA537R-pBBR1, 3) *E. coli* S17- pSEVA537R-pBBR, 4) *Stenotrophomonas* sp. AC44- pSEVA537R-pBBR1, 5) *Stenotrophomonas* sp. AC44- pSEVA537R-pBBR1 y 6) *Stenotrophomonas* sp. AC44

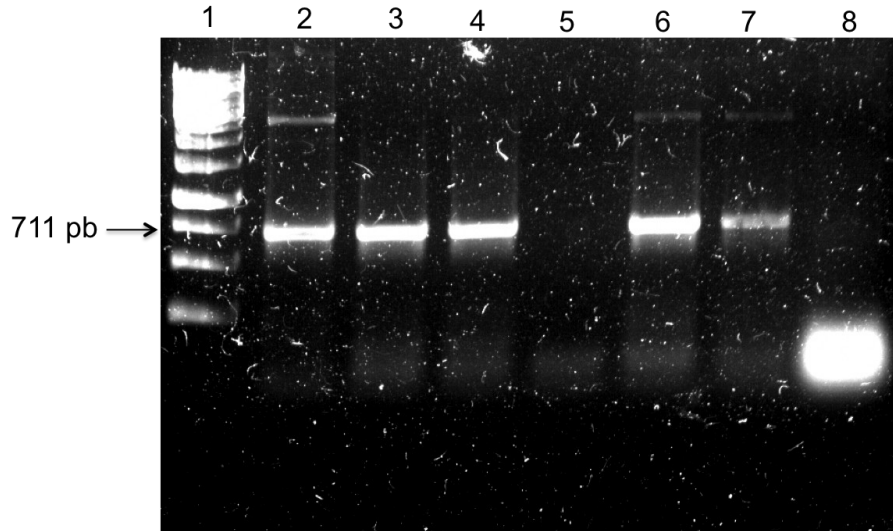


Fig 20.- Amplificación por PCR del gen que codifica la proteína mCherry. 1) Marcador de peso molecular 1 kb, 2) pSEVA537R-pBBR1, 3) *Microvirga* sp. AF16-pSEVA537R-pBBR1, 4) *Microvirga* sp. AF16- pSEVA537R-pBBR1, 5) *Microvirga* sp. AF16, 6) *Stenotrophomonas* sp. AC44-pSEVA537R-pBBR1, 7) *Stenotrophomonas* sp. AC44-pSEVA537R-pBBR1 y 8) *Stenotrophomonas* sp. AC44

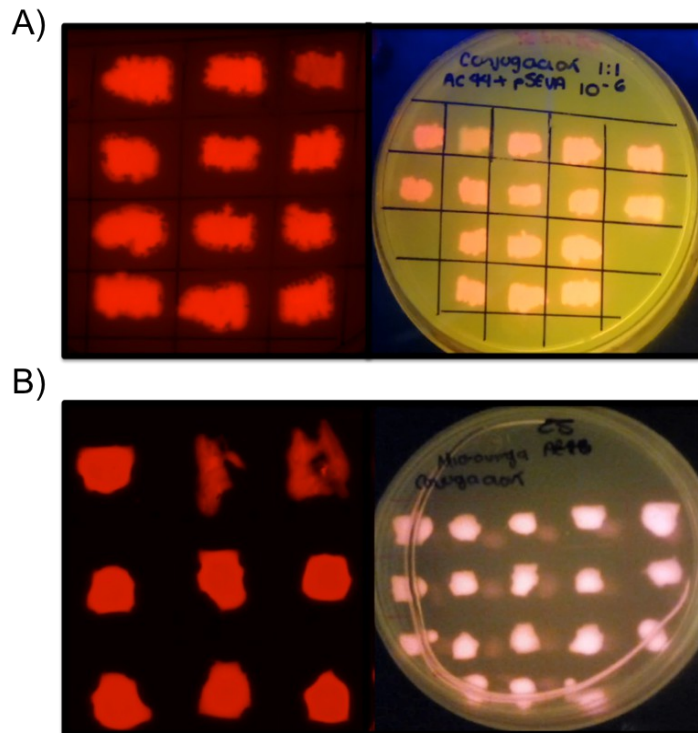


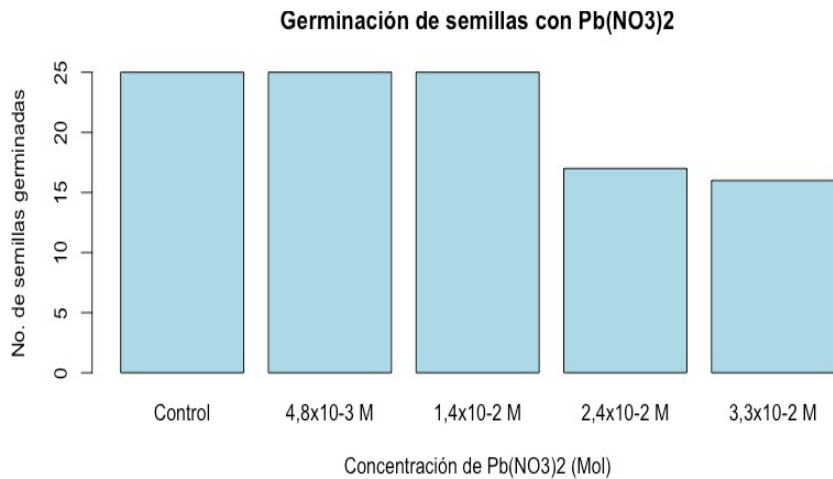
Fig 21.- A y B representación de la florecencia de las cepas *Stenotrophomonas* sp. AC44-pSEVA537R-pBBR1 y *Microvirga* sp. AF16-pSEVA537R-pBBR1, respectivamente. La florecencia fue observada en un transiluminador con luz ultravioleta a una longitud de onda de 400 nm.

## 8.9.- Efecto de los metales pesados en la germinación de semillas de

### *P.vulgaris*

Con la finalidad de obtener la concentración de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  que permita la germinación del 50% de las semillas, 25 semillas de *P. vulgaris* fueron desinfectadas fueron germinadas en placas con agar-agua al 1% con concentraciones variables de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . Las semillas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  y se registró el porcentaje de germinación después de 96 h. Los datos de la Figura 18 son resultado de dos repeticiones. La Figura 18A muestra el efecto del Pb en la germinación de *P. vulgaris* con respecto al control. Se observa una germinación del 100% en las concentraciones:  $4,8 \times 10^{-3}$  M y  $1,4 \times 10^{-2}$  M pero con una disminución en el crecimiento del embrión ( Figura 18B).Sin embargo, con el aumento en la concentración de Pb (a partir de  $2,4 \times 10^{-2}$  M) hay una inhibición del 50 % en la germinación.

A)



B)

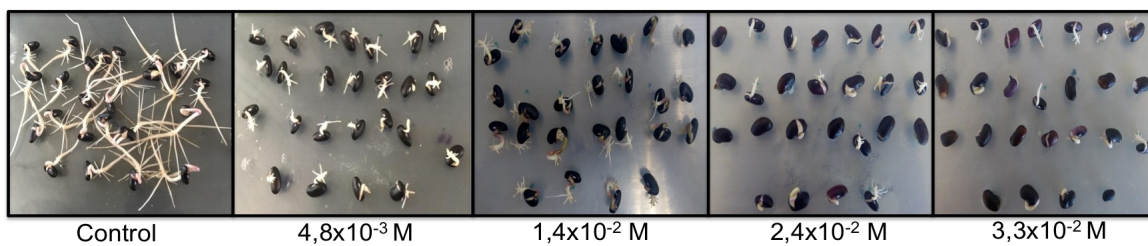


Fig 22.- (A) Número de semillas germinadas en presencia de distintas concentraciones de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. (B) Fenotipo observado en la germinación.

## CONCLUSIÓN

- Los análisis genotaxonomicos presentados en este estudio para el género *Microvirga* sp. respaldan la descripción como una nueva especie a *M.\_strain\_c27j1* (*M. flavescens* ), *M.\_strain\_CDVBN77* (*M. brassicacearum*) y *M.\_strain\_AF16*.
- Nuestras filogenias del pangenoma y del genoma núcleo identificaron al menos 3 subgrupos que están relacionados por su estilo de vida dentro de la clasificación del género *Microvirga* sp.
- Dentro del análisis pangenómico del género *Microvirga* sp. se encontraron genes de transformación de As y de resistencia a Zn y Cu y, específicamente en la cepa AF16 genes implicados en la transformación de Hg y de resistencia a Cd, Mn y Zn características que postulan a *Microvirga strain AF16* como removedora de metales pesados en suelos.
- Si bien, se determinó que la cepa *Stenotrophomonas* sp. AC44 no establece nodulación con *P.vulgaris*, aún no se descarta su actividad como promotora de crecimiento vegetal en condiciones de estrés con metales pesados.

## **PERSPECTIVAS**

- Conocer la localización de *Microvirga sp.* AF16 en el nódulo y/o raíz
- Analizar la respuesta de las cepas *Microvirga sp.* AF16 en presencia de metales pesados.
- Conocer los efectos que producen al establecer relaciones simbióticas de *Microvirga sp.* AF16 con plantas leguminosas en presencia a metales pesados.



## Bibliografía

- Adaikkalam V., Swarup S. (2005). Characterization of copABCD operon from a copper-sensitive *Pseudomonas putida* strain. *Can J Microbiol.* Vol. 51(3):209-16.
- Alexander D.B., Zuberer D. A (1991). Use of Chrome Azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils.*12:39–45. doi: 10.1007/BF00369386.
- Andam, C. P., & Parker, M. A. (2007). Novel alphaproteobacterial root nodule symbiont associated with *Lupinus texensis*. *Applied and environmental microbiology*, 73(17), 5687-91.
- Ardley, J. K., Parker, M.A., De Meyer, S. E., *et al.* (2012). *Microvirga lupini* sp. nov., *Microvirga lotononidis* sp. nov. and *Microvirga zambiensis* sp. nov. are alphaproteobacterial root-nodule bacteria that specifically nodulate and fix nitrogen with geographically and taxonomically separate legume hosts, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 62 (pg. 2579-2588)
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <http://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bailey, A. C., Kellom, M., Poret-Peterson, A. T., Noonan, K., Hartnett, H. E., & Raymond, J. (2014). Draft Genome Sequence of *Microvirga* sp. Strain BSC39, Isolated from Biological Soil Crust of Moab, Utah. *Genome announcements*, 2(6), e01197-14. doi:10.1128/genomeA.01197-14
- Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomason JA, Stevens R, Vonstein V, Wattam AR, Xia F . 2015. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. *Sci Rep*.
- Boyle, V. J., Fancher, M. E., & Ross, R. W. (1973). Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 3(3), 418-24.
- Caballero-Mellado J., Onofre-Lemus J, Estrada-De Los Santos P, Martínez-Aguilar L (2007) The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing Burkholderia Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (16): 5308–19.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., ... Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of

plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3895-903.

Cerezer, V. G., Bando, S. Y., Pasternak, J., Franzolin, M. R., & Moreira-Filho, C. A. (2014). Phylogenetic Analysis of *Stenotrophomonas* spp. Isolates Contributes to the Identification of Nosocomial and Community-Acquired Infections. *BioMed Research International*, 2014, 151405. <http://doi.org/10.1155/2014/151405>

Chapman J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 51, 271–276

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772. doi:10.1038/nmeth.2109

Crossman, L. C., Gould, V. C., Dow, J. M., Vernikos, G. S., Okazaki, A., Sebahia, M., Saunders, D., Arrowsmith, C., Carver, T., Peters, N., Adlem, E., Kerhornou, A., Lord, A., Murphy, L., Seeger, K., Squares, R., Rutter, S., Quail, M. A., Rajandream, S., Sassera D, Leardini I, Villa L, Comandatore F, Carta C, Almeida A, do Ceu Sousa M, Gaiarsa S, Marone P, Pozio E, Caccio SM. Draft genome sequence of *Stenotrophomonas maltophilia* strain EPM1, found in association with a culture of the human parasite *Giardia duodenalis*. *Genome Announc.* 2013;1(2):e00182–13.

de Santiago-Martín, A., Cheviron, N., Quintana, J.R. *et al.* *Arch Environ Contam Toxicol.* (2013). Metal Contamination Disturbs Biochemical and Microbial Properties of Calcareous Agricultural Soils of the Mediterranean Area. 64: 388. <https://doi.org/10.1007/s00244-012-9842-8>

Escalante-Campos, S., Rodríguez-Dorantes, A., Vásquez-Murrieta, M. S., Rodríguez-Tovar, A.V., Guerrero-Zúñiga, L.A., Pérez, N.O., Franco-Hernández, M.O. y Ponce-Mendoza, A. (Evaluación del efecto de cadmio sobre la germinación y elongación radical de semillas bacterizadas de *axonopus affinis* y *festuca rubra*. *Polibotanica*. Núm. 34, pp. 205-221.

Fahraeus G. (1957;). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J Gen Microbiol* 16: 374—381

Galán-Huertos, E. y Romero-Baena, A. (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola. Facultad de Química. 48-60.

- García, J., Moreno, J.L., Hernández, Ma. T. y Polo, A. (2002). Metales pesados y sus implicaciones en la calidad del suelo. *Ciencia y Medio Ambiente-CCMA-CCMA*. 125-137
- Ghnaya, T., Mnassri, M., Ghabriche, R., Wali, M., Poschenrieder, C., Lutts, S. y Abdelly, C. (2015). Nodulation by *Sinorhizobium meliloti* originated from a mining soil alleviates Cd toxicity and increases Cd-phytoextraction in *Medicago sativa* L. *Front. Plant Sci.* V.6-863. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00863>.
- Guindon, Stéphane; Dufayard, Jean-François; Lefort, Vincent; Anisimova, Maria; Hordijk, Wim; Gascuel, Olivier (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3):307-321
- Hasman H., Aarestrup F. M. (2002). *tcxB*, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1410– 1416
- Hardy R. W. , Holsten R. D. , Jackson E. K. , Burns R. C. . (1968;). The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. . *Plant Physiol* 43: 1185—1207
- Hynes, M.F., McGregor, N.F. (1990). Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Microbiol.* 4: 567-574.
- K. Leary J, Singleton P W, Scowcroft P G y Borthakur D. (2006). Symbiotic diversity in the Cosmopolitan genus *Acacia*. *Symbiosis* 41, 107117p
- Konstantinidis, K. T., and Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2567–2572. doi: 10.1073/pnas.0409727102
- Kotrba, P., Dolečková, L., de Lorenzo, V. y Ruml, T. (1999). Enhanced Bioaccumulation of Heavy Metal Ions by Bacterial Cells Due to Surface Display of Short Metal Binding Peptides. *Appl. Environ. Microbiol.* March. vol. 65 no. 3 1092-1098.
- Kumar, V., Singh, S., Singh, J. *et al.* *Bull Environ Contam Toxicol.* (2015). Potential of Plant Growth Promoting Traits by Bacteria Isolated from Heavy Metal Contaminated Soils. 94: 807. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1523-7>
- Lloret, L. y Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Revista Latinoamericana de Microbiología (ALAM)*. Vol. 47. No. 1-2. pp 4360

Liu, X., Wu, G., Zhang, Y., Wu, D., Li, X., & Liu, P. (2015). Chromate Reductase YieF from *Escherichia coli* Enhances Hexavalent Chromium Resistance of Human HepG2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(6), 11892–11902. <http://doi.org/10.3390/ijms160611892>

McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A. M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M. R., O'Brien, J. S., Pawlowski, A. C., Piddock, L. J., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A. D., Tang, I., Taylor, P. L., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T., ... Wright, G. D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), 3348-57.

M. A., Harris, D., Churcher, C., Bentley, S. D., Parkhill, J., Thomson, N. R., ... Avison, M. B. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome biology*, 9(4), R74. doi:10.1186/gb-2008-9-4-r74

Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., *et al.* (2012). Multidrug-resistant,

extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert

proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 268–281.

Martinez J. L., Sánchez M. B., Martínez-Solano L., Hernandez A., Garmendia L., Fajardo A., *et al.* (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 430–449  
10.1111/j.1574- 6976.2008.00157.x

Marrero-Coto J., Díaz-Valdivia A., & Coto-Pérez O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 41, No. 1, pp. 67- 78

Medema, M. H., Cimermancic, P., Sali, A., Takano, E., & Fischbach, M. A. (2014). A systematic computational analysis of biosynthetic gene cluster evolution: lessons for engineering biosynthesis. *PLoS computational biology*, 10(12), e1004016. doi:10.1371/journal.pcbi.1004016

Ní Chadhain S.M., Schaefer J.K., Crane S., Zylstra G.J. & Barkay T. (2006). Analysis of mercuric reductase (merA) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. *Environ Microbiol.* Vol. 8(10):1746-52.

- Niu, B., Paulson, J. N., Zheng, X., & Kolter, R. (2017). Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(12), E2450-E2459.
- Ojuederie, O. B., & Babalola, O. O. (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(12), 1504. <http://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
- Ortiz-Bernad I., Sanz-García, J., Dorado-Valiño, M.y Villar-Fernández, S. (2007). Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Dirección General de Universidades e Investigación. Universidad de Alcalá Dirección General de Universidades e Investigación.
- Patil, P. P., Midha, S., Kumar, S., & Patil, P. B. (2016). Genome Sequence of Type Strains of Genus *Stenotrophomonas*. *Frontiers in microbiology*, 7, 309. doi:10.3389/fmicb.2016.00309
- Pang J1, Chan GS, Zhang J, Liang J, Wong MH. (2003). Physiological aspects of vetiver grass for rehabilitation in abandoned metalliferous mine wastes.. *Chemosphere*. Volume 52, Issue 9, September 2003, Pages 1559-1570
- Pak, T. R., Altman, D. R., Attie, O., Sebra, R., Hamula, C. L., Lewis, M., Deikus, G., Newman, L. C., Fang, G., Hand, J., Patel, G., Wallach, F., Schadt, E. E., Huprikar, S., van Bakel, H., Kasarskis, A., ... Bashir, A. (2015). Whole-genome sequencing identifies emergence of a quinolone resistance mutation in a case of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(11), 7117-20.
- Pérez-Martínez, R. (2017). Análisis comparativo de bacterias fijadoras de nitrógeno asociadas a *Acacia* sp procedentes de los jales mineros de Huautla, Morelos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Richter, M., and Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 19126–19131. doi: 10.1073/pnas.0906412106
- Reyes-Gonzalez, Alma, Talbi, Chouhra, Rodriguez, Susana, Rivera, Patricia, Zamorano-Sanchez, David and Girard, L.. (2016). "Expanding the regulatory network that controls nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*: elucidating the role of the two-component system hFixL-FxkR". *MICROBIOLOGY-SGM*. 162(6):979-988. [doi:10.1099/mic.0.000284]
- Robledo M., Rivera L., Jiménez-Zurdo J.I., Rivas R., Dazzo F., Velázquez E., Martínez-Molina E., Hirsch A., Mateos P.F. (2012). Role of *Rhizobium*

endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microb. Cell Fact.* 2012;11:125. doi: 10.1186/1475-2859-11-125.

Rosselló-Móra, R., and Amann, R. (2015). Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Syst. Appl. Microbiol.* 38, 209–216. doi: 10.1016/j.syapm.2015.02.001

Santamaría, R. I., Bustos, P., Pérez-Carrascal, O. M., Miranda-Sánchez, F., Vinuesa, P., Martínez-Flores, I., González, V. (2017). Complete Genome Sequences of Eight Rhizobium Symbionts Associated with Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). *Genome Announcements*, 5(30), e00645–17. <http://doi.org/10.1128/genomeA.00645-17>

Seiler, C., & Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3, 399. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>

Solís Miranda, B. M. (2016). Aislamiento de bacterias de jales mineros y análisis de su potencial para la remediación de sitios contaminados con metales pesados. Centro de Investigación en Biotecnología

Talbi, C., Argandoña, M., Salvador, M. *et al.* *Plant Soil* (2013) *Burkholderia phymatum* improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. 367: 673. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1499-6>

Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z. y Luo, Y. (2015). Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. *Front. Plant Sci.* V. 6-32. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00032>

Vinuesa, P., Rojas-Jiménez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S. K., Prasad, B. N., Moe, H., Selvaraju, S. B., Thierfelder, H., ... Werner, D. (2008). Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the asiatic continent. *Applied and environmental microbiology*, 74(22), 6987-96.

Vinuesa, P., Ochoa-Sánchez, L. E., & Contreras-Moreira, B. (2018). GET\_PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*. *Frontiers in microbiology*, 9, 771. doi:10.3389/fmicb.2018.00771

Visioli, G., D'Egidio, S. y Sanangelantoni A.M. (2015). The bacterial rhizobiome of hyperaccumulators: future perspectives based on omics analysis and advanced microscopy. *Front. Plant Sci.* V. 5-752. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00752>

- Yamanaka K., Ogura T., Niki H., & Hiraga S. (1995). Characterization of the *smtA* gene encoding an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* Vol. 133(1-2):59-63.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., ... Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(11), 2640-4.
- Zerbino D. R. (2010). Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Current protocols in bioinformatics*, Chapter 11, Unit 11.5.
- Zribi, K., Djéballi, N., Mrabet, M. *et al.* *Ann Microbiol.* (2012). Physiological responses to cadmium, copper, lead, and zinc of *Sinorhizobium* sp. strains nodulating *Medicago sativa* grown in Tunisian mining soils. 62: 1181. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0358-7>



## APENDICE I

### PY

Peptona de Caseina	5.0 g
Extracto de Levadura	3.0 g
H <sub>2</sub> O detilada	1 L
Agar (si es sólido)	15 g
CaCl <sub>2</sub> (a partir de una stock 0.7 M esterilizado en autoclave)	7mM

### Procedimiento Eckhardt (1978)

- 1.- Inocular una asada de la cepa en medio PY líquido, incubar de 16 a 24 h a 37 °C en agitación.
- 2.- Preparar un gel horizontal de agarosa al 0.75 % (ver Apéndice I) y dejar gelificar.
- 3.- Retirar el peine y llenar la cámara con buffer TBE al 1X hasta que toque el gel SIN QUE CUBRA LOS POZOS.
- 4.- Agregar a cada pozo 25 µL de SDS 10 % - Xilencyanol. Precorrer el gel a 100 Volts durante 20 min con los polos invertidos.
- 5.- Llevar la DO del cultivo a 620 nm y tomar 0.2 U de DO (1mL de 0.2 DO). Centrifugar 3 min a 14,000 rpm a 4 °C y retirar el sobrenadante.
- 6.- A la pastilla celular agregar 0.5 mL de H<sub>2</sub>O destilada y resuspender con vórtex.  
Adicionar 1 ml de N-lauroyl sarcosine (Sarkosyl) al 0.3 % frío y mezclar por inversión.
- 7.- Centrifugar 3 min a 14,000 rpm a 4 °C y extraer inmediatamente el sobrenadante.
- 8.- Incubar 10 min -20 °C
- 9.- Agregar a la pastilla 40 µL de ficoll al 20 % (en TE 10/1)
- 10.- Adicionar 10 µL de solución de lisis (ver Apéndice I)
- 11.- Cubrir completamente el gel con buffer TBE 1X
- 12.- Resuspender la pastilla con las dos soluciones anteriores (ficoll y solución de lisis) y cargar 25 µL de muestra en cada pozo
- 13.- Colocar los polos en su lugar, correr por 1 hora a 40 Volts posteriormente, correr a 100 Volts entre 10 a 13 horas.
- 14.- Teñir el gel con bromuro de etidio y observar en un transiluminador con luz UV.

## 1.1- Solución nutritiva

### Macroelementos (por litro de agua)

---

$\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	68 mg
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	44 mg
$\text{SO}_4\text{Mg} \times 7\text{H}_2\text{O}$	123 mg
$\text{K}_2\text{SO}_4$	174 mg
$\text{SO}_4\text{Ca}$	173 mg
EDTA férrico	25 mg

### Microelementos (por litro de agua)

$\text{MoO}_4\text{Na} \times 2\text{H}_2\text{O}$	0.11 mg
$\text{BO}_3\text{H}_3$	2.85 mg
$\text{SO}_4\text{Mn} \times 4\text{H}_2\text{O}$	3.07 mg
$\text{SO}_4\text{Zn} \times 7\text{H}_2\text{O}$	0.55 mg
$\text{SO}_4\text{Cu} \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.20 mg

## APÉNDICE II

Especie	Cepa	Hábitat		Tamaño	Plásmidos	
<i>Microvirga flocculans</i>	ATCC BAA-817	Fuente termal	Prefectura de Gunma en Japón	Scaffold	4,029,781	-
<i>Microvirga subterranea</i>	DSM-14364	Fuente termal	Gran cuenca artesiana en Queensland, Australia	Scaffold	5,147,802	-
<i>Microvirga massiliensis</i>	JC119	Heces humanas	Dielmo, Senegal	Scaffold	9,172,134	-
<i>Microvirga massiliensis</i>	URMITE CNRS UMR 6236 IRD 198	Heces humanas	Dielmo, Senegal	Contig	9,043,523	-
<i>Microvirga guangxiensis</i>	CGMCC	Suelo de un campo de arroz	Guangxi, China	Scaffold	4,721,732	-
<i>Microvirga</i> sp.	17 mud 1-3	Lodo irradiada con rayos gamma	Boryeong, Corea del Sur	Genoma completo	4,403,107	-
<i>Microvirga</i> sp.	BSC39	Corteza del suelo	Moab, Utah	Contig	5,655,736	-
<i>Microvirga Flavescens</i> ?	c27j1	Suelo forestal	Guangdong, China	Contig	3,531,066	-
<i>Microvirga pakistanensis</i>	NCCP-1258	Suelo desértico	Cholistán, Pakistán	Scaffold	5,764,046	-
<i>Microvirga Brassicacearum</i> ?	CDVBN77	Raiz de <i>Brassica napus</i>	Salamanca, España	Scaffold	5,219,891	

<i>Microvirga aerophila</i>	DSM-21344	Aire	Suwon de la República de Corea	Contig	6,003,377	-
<i>Microvirga aerophila</i>	NBRC 106136	Aire	Suwon de la República de Corea	Contig	7,363,484	-

<i>Microvirga</i> sp.	KLBC-81	Nódulos de <i>Crotalaria palida</i>	Yunnan, China	Scaffold	5,764,046	-
<i>Microvirga calopogonii</i> ?	CCBAU-65841	Nódulos de <i>Calopogonium mucunoides</i>	Yunnan, China	Scaffold	7,413,381	-
<i>Microvirga lupini</i>	Lut6	Nódulos de <i>Lupinus texensis</i>	Texas, USA	Scaffold	9,425,314	-
<i>Microvirga</i> sp.	AF16	Nódulos de <i>Acacia farnesiana</i>	Morelos, México	Scaffold	9,631,911	2
<i>Microvirga ossetica</i>	V5/3M	Nódulos de <i>Vicia alpestris</i>	Osetia del norte (Cáucaso)	Genoma completo	9,631,051	5
<i>Microvirga lotononidis</i>	WSM3557	Nódulos de <i>Listia angolensis</i>	Sur de Autralía	Scaffold	7,082,538	-
<i>Microvirga vignae</i>	BR3299	Nódulos de <i>Vigna unguiculata</i>	Brasil	Scaffold	6,472,445	-

