



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS
RESISTENTES A MERCURIO DE SUELO DE IDRIJA,
ESLOVENIA”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MIRIAM REBECA HERNÁNDEZ RAMÍREZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN CAMPOS GUILLÉN

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
BACTERIAS RESISTENTES A MERCURIO DE SUELO DE
IDRIJA, ESLOVENIA “**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

MIRIAM REBECA HERNÁNDEZ RAMÍREZ

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN CAMPOS GUILLÉN

SINODALES

**Dr. JUAN CAMPOS GUILLÉN
DIRECTOR**

**Dr. ANDRÉS CRUZ HERNÁNDEZ
SINODAL**

**Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
SINODAL**

**M. en C. BEATRIZ ÁLVAREZ MAYORGA
SINODAL**

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Mercurio	1
1.2 Ciclo del mercurio	1
1.3 Toxicidad del mercurio	4
1.4 Bacterias resistentes a mercurio	8
1.5 Idrija, Eslovenia.	13
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 General	17
3.2 Específicos	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1 Materiales	18
4.1.1 Muestra de suelo	18
4.1.2 Medios de cultivo	18
4.1.3 Identificación de aislados mediante PCR	18
4.2 Métodos	19
4.2.1 Obtención de aislados	19
4.2.2 Pruebas de resistencia a mercurio.	20
4.2.3 Extracción de plásmidos.	20
4.2.4 Identificación de aislados mediante amplificación y secuenciación de PCR 16S.	21
4.2.5 Detección por PCR del gen merR	21
4.2.6 Electroforesis en gel de Agarosa	22
4.2.7 Prueba de Volatilización	22

4.2.8	Resistencia a otros metales	22
4.2.9	Resistencia a antibióticos	23
4.2.10	Análisis bioinformático	23
5.	RESULTADOS	24
5.1	Aislados	24
5.2	Resistencia a mercurio	24
5.3	Extracción de plásmidos	25
5.4	PCR 16 S	25
5.5	Volatilización	27
5.6	PCR merR	28
5.7	Resistencia a metales	29
5.8	Resistencia a antibióticos	30
5.9	Secuenciación de genoma	30
6.	DISCUSIÓN	33
7.	CONCLUSIÓN	34
8.	REFERENCIAS	36
	ANEXOS	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro:		Página
1	Antibióticos y sus concentraciones	23
2	Resultados BLAST de secuencias 16S	27
3	Crecimiento de los aislados ante diferentes metales y concentraciones	29
4	Resistencia del aislado 35' ante diferentes concentraciones de antibióticos.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ciclo del mercurio	3
2	Estructura 3D de MerR	10
3	Mecanismo de activación de transcripción de merR	11
4	Mecanismo molecular del operón mer de amplio espectro.	13
5	Aislado 27 en agar EMB	25
6	Electroforesis en gel de agarosa de extracción de plásmidos del aislado 35'	26
7	PCR 16S en gel de Agarosa.	26
8	Placa de volatilización	27
9	PCR merR en gel de agarosa	28

RESUMEN

En la ciudad de Idrija, Eslovenia se encuentra la segunda mina productora de mercurio más grande a nivel mundial. Su explotación provocó la liberación de alrededor de 40 mil toneladas del metal al ambiente, depositadas actualmente en suelo, aire y agua de la región. El presente trabajo, en colaboración con el grupo de la Dra. Tatjana Dizdarevič, se inició con la finalidad de estudiar los microorganismos presentes en el suelo de la región minera de Idrija. En total se obtuvieron 54 aislados bacterianos, siete de los cuales se identificaron mediante la comparación del gen 16S rDNA. Usando el método X-ray se detectó la capacidad de los aislados de volatilizar el mercurio, y por amplificación del gen merR detectamos la presencia del operón responsable. Estas bacterias, además, fueron capaces de resistir a diferentes metales, como Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} . El genoma de un aislado bacteriano fue secuenciado a través de Illumina HiSeq 2000, ensamblado con SPAdes, versión 3.0, obteniéndose un tamaño de 4.2 Mpb., con un contenido de G+C del 40.36%. Se identificó como *Proteus idrijaensis* a través del análisis del gen 16S rDNA. Dentro del genoma se identificaron los genes merR, merT, merP, merA y merB, así como las bombas de flujo MexB y MexD. De igual forma, los genes czcA y czcD quienes confieren resistencia a Co^{2+} , Zn^{2+} , y Cd^{2+} , y genes que confieren resistencia a antibióticos. La caracterización de las bacterias reductoras de mercurio abre paso a nuevas investigaciones para comprender su función en estos suelos.

1. ANTECEDENTES

1.1 Mercurio

El mercurio es un metal de transición, con número atómico 80, peso molecular de 200.59 g y punto de ebullición de 356.58°C. Es considerado el tercer elemento más tóxico del planeta (Rice 2014). Puede encontrarse estable en la naturaleza en tres estados de oxidación: Hg^0 , Hg^{2+} y Hg_2^{2+} , los cuales pueden formar varios compuestos, orgánicos e inorgánicos, con ciertas propiedades que afectan de distinta forma a los seres vivos y al entorno. A temperatura y presión ambientales se halla mayormente en su forma elemental en la atmósfera como vapor (Gaona, 2004).

Es depositado naturalmente en el medio debido a erupciones volcánicas, actividades geotérmicas, erosión de suelo, ciclo hidrológico e incendios. (Dash y Das, 2012). Su forma predominante en la corteza terrestre es como roca (HgS) llamada cinabrio, de la cual es extraído para utilizarlo con distintos fines, como termómetros de vidrio, interruptores eléctricos, obturaciones dentales, algunos equipos médicos, extracción de oro, pilas, desinfectantes, entre otros. (Gaona, 2004).

En suelos no contaminados está presente en cantidades muy pequeñas, de alrededor de 100 ppm (partes por millón). En rocas la concentración es de 10 y 20,000 ppm. Se ha calculado que aproximadamente del total de mercurio presente en el medio ambiente, sólo un tercio es por emisión natural, y dos tercios, por antropogénica. (Weinberg, 2010).

1.2 Ciclo del mercurio

Como todos los elementos químicos, el mercurio va transformándose de un estado a otro de manera cíclica debido a la modificación que sufre por la influencia de varios factores, como la temperatura, pH, presión y transformación por organismos.

Sin embargo, a pesar de encontrarse en un ciclo continuo, algunos compuestos pueden ser retenidos en un determinado sitio, provocando su acumulación hasta llegar a contaminarlo.

La mayor parte de mercurio se encuentra en estado gaseoso. Gracias a su estabilidad, puede permanecer en la atmósfera entre seis meses y dos años, ya que es poco soluble en agua. (Weinberg, 2010). La atmósfera contiene aproximadamente 15 mg/m^3 de Hg, mayoritariamente en forma de vapor, superando el límite normativo por 300 veces (0.05 mg/m^3). (Gaona, 2004). Sin embargo debido a la reacción del mercurio con O_3 y agua se forman nuevos compuestos de mercurio reactivo, es decir, es oxidado a la forma Hg_2^{2+} , muy inestable naturalmente, y Hg^2 . En este estado su residencia oscila entre horas y meses, pues es más soluble en agua, facilitando su precipitación y acumulación en el suelo. (Dash y Das, 2012)

Una vez depositado en éste, las condiciones de pH, temperatura, contenido de ácido húmico y materia orgánica favorecen la formación de compuestos inorgánicos como cloruro de mercurio (HgCl_2), sulfuro de mercurio (HgS) y dihidróxido de mercurio ($\text{Hg}(\text{OH})_2$); y compuestos orgánicos como metil y dimetilmercurio (CH_3HgCl , CH_3HgOH , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) en menor cantidad. Algunos de ellos son bastante solubles, por lo cual forman parte de los agregados de materia orgánica y arcilla del suelo, limitando su movilidad y provocando su acumulación. Otros son prácticamente inertes, como el HgS , debido a la gran afinidad del mercurio con el azufre. (Gaona, 2004).

Otra parte de las precipitaciones caen en los ríos y lagos, en donde una fracción de mercurio se revolatiliza y la otra queda unida al sedimento, el cual es transportado por las corrientes marinas a mares y océanos. En este ambiente también se forman compuestos orgánicos que son ingeridos por los animales acuáticos, provocando su bioacumulación, ya que estos animales tienen mayor capacidad para retener el metal. (Weinberg, 2010).

Las moléculas orgánicas, principalmente las metilmercuriales tienen gran capacidad para unirse a otros compuestos, por lo tanto tienen mayor afinidad a las partículas del suelo y agua, con las cuales se agregan fácilmente y reducen su movilidad, lo que ocasiona un incremento en su concentración dentro de un área determinada. (Weinberg, 2010).

A pesar de la poca movilidad de los compuestos de mercurio, la fuerza de gravedad provoca su lixiviación a través del suelo en dirección lateral y vertical, llegando hasta ríos y mantos acuíferos, posteriormente estos vierten sus aguas al mar y arrojan las partículas lixiviadas. Con esto no sólo se contaminan más regiones, sino que los rastros de mercurio llegan al humano mediante la pesca y el agua de riego. Siguiendo la cadena trófica, los humanos acumulan todo el metal presente en los organismos menores que consume, lo cual puede ocasionar distintas enfermedades tales como daños en el riñón, pulmones y disfunciones en el cerebro, hasta ocasionar la muerte. (Figura 1). (Weinberg, 2010).

Finalmente, tanto en agua como en suelo, el mercurio vuelve a reducirse a su estado elemental gracias a la acción de diferentes factores, como la reacción con ácidos húmicos, la luz solar o la acción de bacterias que tienen la capacidad de reconocer moléculas tanto orgánicas como inorgánicas de éste. Una vez reducido, puede volatilizarse de nuevo y comenzar el ciclo. (Gaona, 2004).

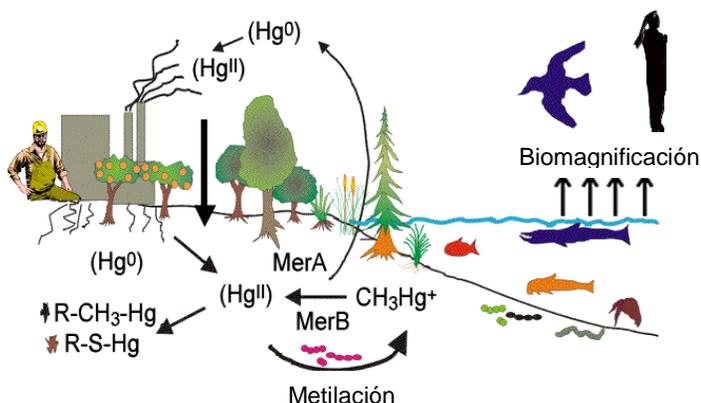


Figura 1. Ciclo del mercurio. (Pilon y Pilon, 2000).

1.3 Toxicidad del mercurio

Como ya se ha mencionado, cada molécula de mercurio con diferente estado de oxidación tiene propiedades diferentes, por lo que también tiene una reacción diferente en las células del cuerpo humano.

Antiguamente las distintas formas de mercurio (líquido, cinabrio, bermellón) eran utilizadas con fines diversos, como pintura, ungüentos e incluso existía la creencia de que tenía efectos afrodisiacos. A pesar de que ya había reportes de los efectos adversos causados por mercurio, fue hasta 1953 cuando, a nivel mundial, se empezó a sospechar de su alta toxicidad debido a que en la bahía de Minamata, Japón, comenzaron a presentarse varios casos de una enfermedad extraña que atacaba principalmente a marineros y sus familias. Las personas y los animales habitantes de la bahía tenían comportamientos extraños, perdían el control de sus músculos, presentaban convulsiones, su capacidad de concentración y razonamiento disminuía, sus huesos se deformaban y, finalmente, morían. (Gaona, 2004; Yarto y col., 2004).

En 1968, quince años después a este suceso y posterior a la realización de varios estudios, las autoridades admitieron que todo se debía a los desechos industriales arrojados al mar por una empresa productora de plásticos. Durante su fabricación se formaban altas cantidades de metilmercurio. Una vez en el mar, el éste era ingerido y acumulado por los peces, los cuales eran consumidos por los humanos. (American University, 2008).

En otra región de Japón se hicieron análisis para determinar la concentración de mercurio encontrada en los peces, obteniendo datos de 5 hasta 50 ppm, superando los límites tolerables normativos, inferiores a 0.01 ppm. Se calcula que entre 1932 y 1968, año de cambio en el proceso de obtención de plástico en la empresa por otro

menos contaminante, se vertieron a la bahía 26 toneladas de mercurio. (American University)

Durante esos quince años se registraron 111 víctimas y más de 400 casos con problemas neurológicos. Madres que no presentaban ningún síntoma a pesar de consumir pescado contaminado daban a luz a niños gravemente afectados.

Ahora es sabido que todas las formas del mercurio son dañinas para el cuerpo; sin embargo, el mercurio elemental líquido es relativamente inofensivo (Battistel y col., 2012), pues gracias a su estabilidad no es absorbido fácilmente por las células y su nivel tóxico es muy reducido. Según datos obtenidos en pruebas con animales, menos del 0.01% ingerido es absorbido en las células del estómago e intestinos. (OMS, 2012).

No obstante, si ingresa al organismo puede ser transformado en mercurio inorgánico, facilitando su unión a los órganos y provocando daños en el sistema digestivo como náuseas, vómitos y diarrea; daños otorrinolaringológicos, oculares, entre muchos otros. (OPS, 2014).

En forma elemental también puede encontrarse como vapor el cual llega a ser tóxico si hay una prolongada exposición a éste, ya sea en bajas o altas concentraciones, pues entra a los pulmones y se filtra al torrente sanguíneo, causando dolor de pecho, neumonitis intersticial, disnea, hemoptisis daños neuronales, como pérdida de control motriz, pérdida de memoria, tristeza y ansiedad (Gaona, 2004; Rice, 2014).

Debido a la gran afinidad entre grupos orgánicos, el metilmercurio presenta uno de los mayores riesgos de intoxicación, pues el cuerpo humano lo retiene en más de 90% del total ingerido. Es peligroso, además, porque no sólo es retenido en el organismo, sino que forma complejos con residuos de cisteína, facilitando su transporte a través de los tejidos y penetración a las células. (Weinberg, 2010). De esta forma se incorpora en las células sanguíneas, viaja dentro del cuerpo y se deposita principalmente en el Sistema Nervioso Central y Periférico. En este punto

es más difícil de eliminarse, a diferencia de en torrente sanguíneo, donde su vida media es de 45 a 60 días. (OPS, 2014)

Debido a que el metilmercurio tiene la capacidad de atravesar la placenta y afectar al feto, el sistema nervioso en desarrollo es más susceptible a sufrir daños irreversibles, incluso mucho más nocivos que el de un adulto. En personas adultas, el daño al sistema nervioso central causa pérdida de memoria, inhabilidad para concentrarse, alucinaciones, temblor en las manos, cabeza, labios, mandíbula y párpados; pérdida de peso, baja temperatura corporal, somnolencia, dolores de cabeza, insomnio y fatiga. (Rice, 2014).

En un estudio se observó que mujeres embarazadas intoxicadas con metilmercurio en bajos niveles, tenían hijos con daños cerebrales severos, como parálisis cerebral, retraso mental, dificultad en la alimentación, daño renal, salpullido, hipertensión, daño pulmonar y déficit motor en alto grado. En algunos casos, los recién nacidos pueden no presentar síntomas sino hasta la maduración de su sistema nervioso central. (Gaona, 2004; OMS, 2012; EPA, 2007).

En 2012 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó los síntomas de la intoxicación por metilmercurio absorbido por todas las vías. Aunque la cutánea es la más limitada, si se distribuye uniformemente en el organismo, deteriora un gran número de órganos, causando efectos severos e irreversibles (en el caso del sistema nervioso) y crónicos en los demás órganos, ya que su eliminación del cuerpo es muy lenta.

El daño causado por el metilmercurio dentro del Sistema Nervioso Central es irreversible, debido a que interactúa con la tubulina de los axones de las neuronas, bloqueando la polimerización e impidiendo y desensamblando la formación de microtúbulos, esenciales para llevar a cabo la sinapsis. (Pendergrass y col., 1997)

Dentro del sistema endócrino reduce la capacidad de unión entre hormona-receptor e inhibe enzimas claves para el funcionamiento correcto del sistema. Las hormonas más afectadas son insulina, estrógeno, testosterona y adrenalina. Puede unirse a la

insulina de manera que impide su ingreso a las células y causa una irregularidad en niveles de glucosa en sangre (Rice, 2014).

Reduce la fertilidad tanto en hombres como en mujeres. En hombres tiene efectos adversos en la espermatogénesis y disminuye el peso testicular, además de causar disfunción eréctil. En mujeres provoca disfunción en ovarios, menstruación irregular y dolorosa, menopausia prematura y malformación del útero. (Rice, 2014).

Es absorbido a través de las células epiteliales cuando se ingiere. Inhibe la producción de tripsina, quimiotripsina y pepsina digestivas, provocando dolor abdominal, indigestión, inflamación del intestino, úlceras y diarrea con sangre. Provoca también daño renal como necrosis tubular aguda, glomerulonefritis, enfermedad renal crónica y síndrome nefrótico. Genera enfermedades autoinmunes, hace al organismo susceptible a enfermedades crónicas como artritis, autismo, esclerosis lateral, esquizofrenia y epilepsia. (Rice, 2014).

Otro compuesto orgánico, el dimetilmercurio, es mucho más tóxico que el metilmercurio. Éste es capaz de causar la muerte al estar en contacto con solamente una pequeña cantidad, al grado de microlitros, incluso si el contacto es indirecto. No está comprobado que el mercurio pueda causar cáncer, pero se sabe que causa daño en el DNA, por lo que se considera un agente cancerígeno. (Rice, 2014).

Actualmente existe un gran problema de exceso de mercurio a nivel mundial causado por su extracción y tratamiento. Aproximadamente 200 000 toneladas han sido emitidas desde 1890 hasta 2003, de las cuales 95% se encuentran en suelo, 3% en agua oceánica y 2% en la atmósfera (Gaona, 2004).

Debido a la alta contaminación de mercurio, muchos investigadores están a la búsqueda de nuevas técnicas de biorremediación que ayuden a disminuir su concentración tanto en suelo como en agua, y así aminorar los daños generados en la flora y fauna del medio y en los humanos.

1.4 Bacterias resistentes a mercurio

Las grandes concentraciones de mercurio que se han depositado en la atmósfera a través de los años han llevado a la necesidad de encontrar una manera que ayude a disminuir su entrada a los organismos. Por esta razón existen diversos mecanismos en las que las moléculas de mercurio pueden ser degradadas y éste, ser reducido de su forma iónica, Hg(II), a su forma elemental. Una de ellas es la acción de la luz UV-A y UV-B, reducción por los ácidos fúlvicos y húmicos del suelo y la reducción en bacterias por reacción con hidroperoxidasas, (Barkay y col., 2003).

No obstante, la forma más rápida, barata y eficiente de combatir este problema es mediante el uso de fuentes naturales, como algas, plantas y bacterias. Éstas últimas resultan ser más ventajosas pues son más fáciles de mantener, crecen más rápido y pueden acumular metales pesados bajo una amplia variación de condiciones, además de que tienen la capacidad de reconocer varios metales a la vez. (Dash y Das, 2012).

A pesar de que las bacterias pueden reducir el mercurio por varios métodos, la forma más eficiente de hacerlo es mediante una serie de genes que han ido desarrollando para sobrevivir al ambiente tóxico provocado por las altas concentraciones del metal. Esta reducción es 10 veces mayor que cualquier otra (Barkay y col., 2003).

Actualmente se conocen una amplia gama de bacterias tanto Gram positivas como negativas que cuentan con la capacidad de crecer en ambientes contaminados. Moore reportó por primera vez en 1960 una bacteria resistente a compuestos de mercurio orgánicos e inorgánicos en una muestra clínica de *Staphylococcus aureus*, que también era resistente a penicilina. A partir de este descubrimiento, varios estudios han demostrado que ambas resistencias están presentes, en la mayoría de los casos, en plásmidos. También se descubrió que el operón de

resistencia a mercurio generalmente forma parte de transposones que tienen integrones con resistencia a antibióticos. (Barkay y col., 2003).

Esta resistencia está dada por una serie de genes llamados mer, que varían en número dentro del operón del mismo nombre. Existen dos tipos de resistencia: de amplio y de corto espectro. La de corto espectro contiene los genes principales que confieren la resistencia: merR, merT, merP y merA; mientras que la de amplio espectro, además de los ya mencionados, contiene merB y merD. Aunque hasta la fecha se han reportado más de diez distintos genes (Schelert y col., 2013), no es indispensable la presencia de todos ellos en una misma bacteria para que ésta sea capaz de resistir al mercurio. Incluso algunos pueden ser sustituidos por otros, como las proteínas de transporte merE y merF, que sustituyen a merT y merP, aunque con menor eficiencia en la toma de mercurio, tal es el caso del plásmido pMER237/419 de *Pseudomonas fluorescens* (Wilson y col, 2000).

A pesar de que hay una gran variedad de genes mer, como ya se dijo, varios de ellos tienen la misma función. El funcionamiento de los genes merG, merH y merI no se conoce en su totalidad, pero se asume que tienen funciones de transporte. (Schelert y col., 2013). merB en cambio es el único gen que confiere a la bacteria la capacidad de ingresar compuestos organomercuriales, gracias a que rompe el enlace C-Hg para formar Hg(II) y CO₂ o CH₄. (Bogdanova y col., 1998).

El mecanismo de acción de resistencia a compuestos de mercurio es similar en las distintas especies de hongos y bacterias. Principalmente se basa en la reducción de Hg²⁺ a Hg⁰ llevada a cabo por una enzima de tipo flavoproteína, llamada mercurio reductasa o merA. Ésta ha sido caracterizada en diversos tipos de bacterias, como *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (Nascimento y Chartone, 2003).

La expresión del operón mer está regulada por la proteína MerR, y en algunas ocasiones, por MerD. Ambas responden a la concentración de Hg (II) en el ambiente. La primera es la encargada de regular la expresión positiva y negativa de los demás genes del operón. En ausencia de mercurio, la transcripción es

reprimida, pero en presencia de él, promueve su transcripción. (Osborn y col, 1997) La segunda, MerD, funciona como antagonista de MerR, cuando el Hg ha sido removido y la transcripción debe detenerse. Sin embargo, en algunas bacterias como *Streptomyces*, *Sulfolobus* y *Solfataricus*, MerR sólo actúa como un inhibidor de la síntesis del operón mer en ausencia de Hg. (Allen, 2013).

MerR es una proteína homodimérica que, en ausencia de metal, se encorva sobre el DNA del promotor gracias a su conformación HTH (helix-turn-helix) (Figura 2), impidiendo que el operón se transcriba. (Liu y Sheing, 2010; Joshi y col., 2012). Cuando hay presencia de éste, la bacteria lo introduce al citoplasma, se une a MerR provocando un cambio en su conformación para liberar, pero no separarse, al DNA y se da inicio a la transcripción (Figura 3) (Reyes y col., 2011; Joshi y col., 2012). Esta proteína de regulación tiene una característica poco usual, pues a pesar de que impide el paso a la RNA polimerasa al promotor, tiene la estrategia de formar un complejo estable con ella para activar una respuesta instantánea ante la presencia de mercurio en el citosol. (Barkay y col., 2003).

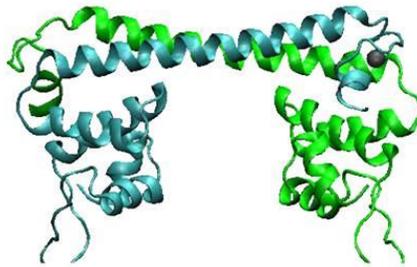


Figura 2. Estructura 3D de MerR. (Liu y Sheing 2010)

A pesar de que MerR es altamente específica para Hg(II), también tiene la capacidad de unirse a otros metales de transición, como Cd(II), Cu(II) y Zn(II) (Bontidean y col, 2000, Joshi y col, 2012).

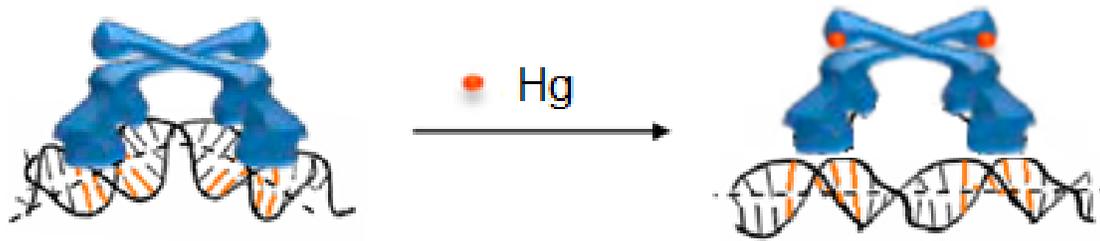


Figura 3. Mecanismo de activación de transcripción de merR.
(Joshi y col, 2012)

Aunque no siempre está presente, MerD es un adyuvante de MerR ya que agiliza la unión de MerR de nuevo al promotor para reprimir la transcripción una vez que el Hg(II) ha sido removido del medio. Su presencia no es estrictamente necesaria, pero su función es importante pues MerR, como otras flavin oxidoreductasas en ausencia de sustrato, tiene actividad de oxidasa que resulta en la producción de peróxido de hidrógeno, además ayuda a detener el gasto de energía innecesario. (Barkay y col., 2003; Joshi, 2012).

La proteína periplasmática MerP es la primera proteína que reconoce al mercurio en el ambiente. (Figura 4). Se une a él mediante dos residuos de cisteína que interactúan con MerT y libera el mercurio en la primera de sus tres hélices. En la membrana interna se encuentra otro par de cisteínas, en la tercera hélice de MerT, donde se deposita otra vez al mercurio. A partir de este punto, el Hg(II) puede ser removido gracias a la interacción de glutatión o por otras cisteínas de la mercurio reductasa. (Barkay y col., 2003). Ésta lleva a cabo la reducción, pasando de Hg(II) a Hg(0). Una vez reducido, el mercurio elemental (Hg⁰) se volatiliza al ambiente debido a la baja solubilidad que tiene en el agua (6µg/100 ml) y a su alta presión de vapor (0.3 constante de Henry) (Zeroual, 2003), además de que, al ser liposoluble, puede difundir a través de la membrana celular sin necesidad de un sistema de flujo. (Barkay y col., 2003; Nascimiento y Chartone, 2003; Barkay y Wagner, 2005).

Otros genes, como merF y merC pueden sustituir la ausencia de merT. Ambas proteínas son las encargadas de transportar el mercurio a través de la membrana,

pero lo hacen con menor eficiencia. (Barkay y col., 2003). De igual forma, merE tiene funciones de transporte, pero su funcionamiento no se conoce con exactitud. (Barkay y Wagner, 2005).

MerG se encarga de tomar moléculas organomercuriales para ingresarlas a la célula. Posiblemente su función es reducir la permeabilidad en la membrana para impedir la entrada de fenilmercurio. (Barkay y col., 2003).

Como ya se mencionó, la resistencia a compuestos de mercurio orgánicos, como metil, etil y fenilmercurio, está dada por el gen merB, cuya enzima cataliza la protonólisis del enlace C-Hg, (Allen, 2013). MerB no se encuentra en todas las bacterias. (Osborn y col., 1997).

El motor principal de la resistencia al mercurio es la proteína MerA, flavoproteína homodimérica, dependiente de NADPH que reduce Hg(II) a Hg(0). Su acción es tan rápida que es imposible medir la acumulación de mercurio en la célula. A diferencia de otras proteínas de la misma familia, MerA tiene una estructura que ayuda a evitar la inhibición por Hg(II). En su extremo N-terminal presenta un sitio con alrededor de 70 aminoácidos homólogos a MerP, los cuales también se encuentran en otras proteínas encargadas del movimiento de metales como Cu, Zn y Cd. (Barkay y col., 2003).

Todos los operones mer tienen el gen merR, merP y merT, empero, existen algunos transposones, como Tn21, que contienen el gen merC adicional, pero no esencial para resistir al mercurio. Otros operones pueden perder a merP, lo cual disminuiría su resistencia, pero merT, o en su caso, merF y merC. Una posible razón a la ausencia de algunas proteínas de transporte es que el mercurio puede atravesar la membrana sin necesidad de un sistema de bombeo, como se encontró en una cepa de *E. coli* que contenía solamente merA y merB pero que aun así contenía resistencia. (Dash y Das, 2012).

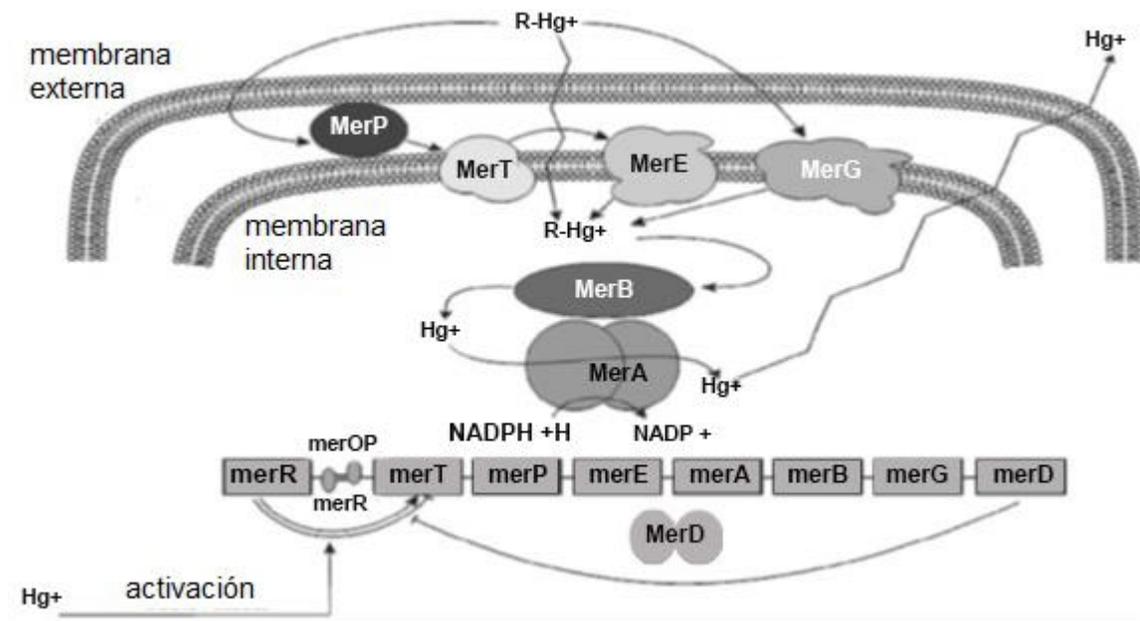


Figura 4. Mecanismo molecular del operón mer de amplio espectro. (Dash y Das, 2012)

1.5 Idrija, Eslovenia.

Idrija es una ciudad ubicada a 37 kilómetros de la capital Eslovena. Su altitud es de 329 msnm y la temperatura va desde cinco grados bajo cero hasta rebasar los 25 grados centígrados, según la época del año. (Portal oficial informativo del Turismo en Eslovenia, consulta 2013).

En este poblado se encuentra la segunda mina de extracción de mercurio más grande del mundo. Esta mina operó durante más de 500 años, iniciando a finales del siglo XV y concluyendo sus actividades de forma definitiva en el año 2009. (Dizdarevič y col, 2012). Durante este periodo, fueron extraídas 107 692 toneladas del metal, lo que representa el 13% de la producción total de mercurio a nivel mundial. Se estima que alrededor de 45 mil toneladas de mercurio fueron emitidas al ambiente debido al proceso de fundición, ocasionando la contaminación de la región en suelo, agua y aire. (Gosar, 2008; Cigale, 2012). Este proceso fue la

principal fuente de contaminación en el poblado, pues alcanzaba a viajar varios kilómetros más allá del sitio de la mina. (Gosar y Šajn, 2001).

Debido a la extensa vida media del mercurio (dos años como metilmercurio), su concentración en agua y suelo no ha disminuido significativamente a pesar de haber transcurrido más de quince años desde la suspensión de su extracción — anterior al cierre total de la mina— provocando contaminación en los alimentos (Dizdarevič y col, 2012). Este dato también fue corroborado de acuerdo a monitoreos realizados a lo largo del río Idrija cada 5 años a partir de 1991, los cuales no demuestran una disminución en la concentración. (Gosar, 2008). Sin embargo, en últimos estudios realizados a mujeres embarazadas, no se encontró riesgo elevado de exposición a mercurio en los niños. (Kobal y col 2007).

Otro factor que contribuye a la acumulación de mercurio en la zona es el tipo de suelo, ya que está compuesto principalmente por arcilla y partículas carboníferas impermeables, por lo cual, la migración natural en los alrededores es limitada. (Gosar, 2008). Teršič y Gosar (2009) realizaron un estudio donde evaluaron la concentración de Hg a partir de 73 muestras de suelo y tres perfiles ubicados en la región de Pšenk, unos kilómetros río abajo de Idrija. El contenido de mercurio en las muestras varía desde 5.5 hasta casi 9,000 mg/kg. En los perfiles de suelo alcanza hasta 37,020 mg/kg, mostrando un decrecimiento con la profundidad. (Teršič y Gosar, 2012).

En otro poblado, junto a Pšenk, llamado Frbježene se realizó un estudio similar, con 63 muestras de suelo. Los resultados obtenidos arrojan un máximo de 37,000 mg/kg en la capa orgánica y 19,900 mg/kg en el suelo. Del 35 al 40% del mercurio de la muestra no es procedente de cinabrio, es decir, se considera potencialmente biodisponible. (Teršič y Gosar, 2012).

Žibret y Gosar (2012) Tomaron muestras de sedimentos aluviales río arriba de Idrija para determinar la concentración de mercurio. Contrario a lo esperado, el metal estaba en un alto nivel, particularmente en un perfil de suelo, donde la máxima concentración se encontró a 160 cm de profundidad. Una posible explicación a esto

es que la planta fundidora está situada en lo alto de una montaña, causando que los vapores expulsados por la chimenea fueran dispersados por el viento.

A las muestras anteriores también se les realizaron una serie de análisis, como contenido de otros elementos, solubilidad de mercurio en suelo, especies de Hg en el suelo (provenientes o no de cinabrio), fracción de Hg bioaccesible (listo para su absorción en el estómago) y determinación de fases minerales de metales por microscopio electrónico de barrido combinado con espectrómetro de energía dispersa. Este análisis permite delimitar las características químicas, mineralógicas y morfológicas de las partículas, lo que ayuda a diferenciar la fuente de procedencia del metal, ya sea natural o antropogénica. (Žibret y Gosar, 2012).

A pesar de la especificidad de mercurio en la mina de Idrija, en el suelo no sólo hay presencia de este metal. Mediante un análisis del contenido de metales presentes en desechos de lombrices se detectaron en altas cantidades, aunque menores que el mercurio, los siguientes elementos: Ca (0.61-6.3%), Cd (0.20-1.2 mg/kg), Mo (0.80-83 mg/kg), Pb (26-91 mg/kg) y U (0.60-12 mg/kg) (Žibret y Gosar, 2012).

2. HIPÓTESIS

Los aislados bacterianos del suelo de Idrija, Eslovenia, presentan mecanismos reductores de mercurio y contribuyen a la volatilización de este metal.

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Aislar y caracterizar bacterias resistentes a mercurio de suelo de Eslovenia contaminado con mercurio.

3.2 Específicos

- Aislar e identificar bacterias resistentes a mercurio a través de la amplificación por PCR del gen 16S rDNA, secuenciación y análisis en bases de datos de genes ribosomales.
- Determinar la capacidad de resistencia de los aislados bacterianos a los metales Hg^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{2+} , As^{3+} y Zn^{2+}
- Determinar la capacidad de las bacterias para volatilizar el mercurio utilizando el método X-ray.
- Identificar los genes responsables de la resistencia a metales a través de la secuenciación del genoma de al menos un aislado bacteriano.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Muestra de suelo

El suelo fue donado por la Dra. Tatjana Dizdarevič (Idrija Mercury Mine, Ltd.). Se hizo una muestra compuesta a partir de cuatro muestras aisladas recolectadas en la mina de la ciudad de Idrija, Eslovenia.

4.1.2 Medios de cultivo

Cinco medios de cultivo fueron seleccionados para favorecer el crecimiento de distintas bacterias: Mac Conkey (Por litro: 17 g digerido pancreático de gelatina, 3 g peptona, 10 g lactosa, 1.5 g sales biliares No. 3, 5 g Cloruro de sodio, 15 g agar, 0.03 g rojo neutro y 1 mg cristal violeta), Terrific Broth (Por litro: 12 g Caseína digerido pancreático de caseína, 24 g extracto de levadura, 94 g fosfato potasio dibásico, 2.2 g fosfato potasio monobásico, 15 g agar), LB (por litro: 10 g triptona, 5g extracto de levadura, 10 g cloruro de sodio, 15 g agar) y EMB (Por litro: 10 g digerido pancreático de gelatina, 10 g lactosa, 2 g fosfato potasio dibásico, 0.4 g Eosin Y, 65 mg azul de metileno, 15 g agar). (Difco™, 2009)

4.1.3 Identificación de aislados mediante PCR

Para identificar los aislados se utilizó la técnica de PCR para el gen conservado 16S con los primers rD1 y fD1 diseñados a partir de los publicados por Weisburg y col., (1991) con las siguientes secuencias:

- fD1: 5' CCGAATTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'
- rD1: 5' CCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC 3'

Como mezcla de reacción se utilizó Phusion High-Fidelity PCR Master Mix de la marca comercial Thermo Scientific®, la cual contiene la ADN polimerasa Phusion Flash II.

4.1.4 PCR gen merR

La detección del gen merR en los aislados bacterianos se realizó mediante la amplificación de dicho gen a través de una PCR utilizando primers específicos, de acuerdo a los ya reportados (Alvarado, 2010), cuyas secuencias son las siguientes:

- 991: 5' CTAAGGCATAGCCGAACCTGCC 3'
- 5702: 5' GGAAGGAGATATACATATGGAAAACAATTTGGAGAACC 3'

4.2 Métodos

4.2.1 Obtención de aislados

Para la extracción de bacterias se pesó un gramo de suelo, añadiendo 5ml de buffer de fosfatos estéril (PBS) ($8 \text{ gL}^{-1} \text{ NaCl}$, $0.2 \text{ gL}^{-1} \text{ KCl}$, $1.44 \text{ gL}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ y $0.24 \text{ gL}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$). Posteriormente se homogeneizó mezclando en vórtex ligeramente. El extracto se diluyó 1/10 con el fin de obtener colonias fácilmente identificables. Se inocularon 100 μl en cajas Petri en los cinco medios de cultivo sólidos previamente seleccionados mediante la técnica de extensión en superficie, cada uno de los medio contenía 0 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ y 100 $\mu\text{g/ml}$ HgCl_2 , el primero como control positivo. Los cultivos fueron incubdos a temperatura ambiente (20-25 °C) durante 24 horas. Una vez que hubo desarrollo en placas, cada colonia con fenotipo distinto fue inoculada por estriado en nuevas cajas Petri con los mismos medios y mismas concentraciones de cloruro de mercurio, para obtener cultivos puros. Nuevamente se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente. Una vez obtenidas, se conservaron en medio Terrific líquido con 15% de glicerol

contenido en criovales por duplicado a -80°C para mantenerse en el cepario del laboratorio.

4.2.2 Pruebas de resistencia a mercurio.

La capacidad que tienen los aislados para resistir el mercurio fue probada cultivándolos en sus respectivos medios, a distintas concentraciones de HgCl_2 , desde 50, 100, 200, 300 hasta 350 $\mu\text{g/ml}$. Esta prueba fue cualitativa, por lo que sólo se consideró si las bacterias se desarrollaron en los medios.

4.2.3 Extracción de plásmidos.

La detección de plásmidos en los aislados bacterianos se realizó con el método descrito por Birboim y Doly (1979), implementando ligeras modificaciones mencionadas a continuación:

Se tomaron 500 μl del cultivo y centrifugar a 14 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 150 μl solución I, dejando reposar por diez minutos. Se agregó 200 μl de solución II, invirtiendo el tubo suavemente y se incubó en hielo por tres minutos. Se agregaron 150 μl de Solución III y nuevamente se invirtió el tubo. Se incubó en frío 15 minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue recuperado (aproximadamente 500 μl) para tratarlo con 5 μl de ARNasa A (20 $\mu\text{g/ml}$), se dejó incubando a 37°C por 25 minutos. Un volumen de fenol:cloroformo fue añadido y se homogeneizó con vortex. Se centrifugó a 12 000 rpm por dos minutos. Se transfirió el sobrenadante en un nuevo tubo, añadiendo dos volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitando a -80°C por 15 minutos. Se centrifugó diez minutos a 14 000 rpm, el sobrenadante fue decantado y se añadieron 500 μl de etanol frío al 70% al tubo. Posteriormente, se centrifugó a 14 000rpm por 10 minutos. El etanol fue decantado se dejó el tubo para que la parte líquida se secase. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 25 μl de agua miliQ estéril.

4.2.4 Identificación de aislados mediante amplificación y secuenciación de PCR 16S.

Para caracterizar las bacterias por la prueba de 16S se realizó una PCR de acuerdo a especificaciones del reactivo Phusion High-Fidelity PCR Master Mix: 9µl de esta mezcla, 7µl de agua DEPC estéril, 1µl primer fD1, 1 µl primer rD1 (ambos con una concentración final de 20 ng/µl) y 1 µl de la extracción de DNA, obtenida con fenol:cloroformo, de acuerdo al protocolo descrito por Yokoyama y col. (1999).

El programa de amplificación incluye las siguientes condiciones: 98°C/5 min, 98°C/30 seg, 55°C/45 seg, 72°C/45 seg con 32 repeticiones y una etapa final a 72°C/1 minuto. Una vez obtenidas las amplificaciones, fueron mandadas a secuenciar a la compañía MacroGen® en Seúl, Corea del Sur, mediante la secuenciación de Sanger, para su posterior identificación.

4.2.5 Detección por PCR del gen merR

Antes de realizar la mezcla de reacción, las bacterias con veinticuatro horas previas a su utilización fueron sometidas a choque térmico a 65°C por 5 minutos y a -80°C por 3 minutos. Nuevamente se utilizó la mezcla de reacción con la enzima Phusion High-Fidelity PCR Master Mix junto con los primers 991 y 5702. La constitución de la mezcla fue: 5 µl de la enzima High-Fidelity, 0.8 µl de cada primer, 0.5 µl de extracto celular y 3 µl de agua DEPC estéril. Los ciclos para amplificación se hicieron de la manera: 96°C/2 min, 94°C/40 seg, 45°C/40 seg, 72°C/45 seg, repitiendo el ciclo por 30 veces más una amplificación final a 72°C/4 min. Estas amplificaciones también fueron analizadas por MacroGen® mediante la secuenciación de Sanger.

4.2.6 Electroforesis en gel de Agarosa

El producto de las extracciones de plásmidos y las PCRs fueron observados mediante la técnica de electroforesis de DNA. Las muestras se cargaron 1:2 μ l con colorante GelRed y se corrieron en geles de agarosa al 0.8%, a 80V por 40 minutos.

4.2.7 Prueba de Volatilización

Se usó la metodología descrita por Nakamura y Nakahara (1988) para identificar los aislados que tienen la capacidad de volatilizar el mercurio. Esta técnica detecta el mercurio volátil mediante el uso de una placa de nitrato de plata, el cual reacciona con el mercurio gaseoso y forman nitrato de mercurio. Esta reacción de oxidación da como resultado una coloración oscura en la placa, visible al momento de revelarla. Para realizar la prueba se sembraron todos los aislados en sus respectivos medios, con 50 μ g/ml Hg, por 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, cada uno de ellos se inoculó en una placa de 94 pozos, la cual se dejó incubando 6 horas en completa oscuridad. Una vez concluido este tiempo, la placa fue revelada en las mismas condiciones.

4.2.8 Resistencia a otros metales

Ocho aislados fueron seleccionados, de acuerdo al ensayo de volatilidad, para probar si son capaces de resistir a los metales Pb, Co, Cu, Cd, Cr, As y Zn, algunos de los cuales, como Cadmio y Plomo también están presentes en el suelo de donde fueron extraídas (Žibret y Gosar, 2012). Las bacterias se inocularon en medio líquido LB 50 y se incubaron por 24 horas en agitación, a temperatura ambiente. Posteriormente, 100 μ l de cada cultivo se extendieron en placas de LB 50 sólido. Cada metal fue probado en cuatro concentraciones distintas: 50, 100, 150 y 200 μ g/ml, excepto As y Zn, que fueron solamente probados a 100 μ g/ml ya que en estos metales el ensayo

se realizó en estudios anteriores dentro del laboratorio, encontrando que mayores concentraciones no afectan el crecimiento de estas bacterias. De cada concentración de las soluciones con cada uno de los metales se colocaron 8 µl sobre las placas con las bacterias previamente inoculadas y se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente.

4.2.9 Resistencia a antibióticos

La cepa identificada como 35' se identificó como una bacteria patógena del tracto urinario en humanos (*Proteus*), por lo que se realizó una prueba de resistencia a antibióticos. Para esto se utilizó la técnica de halo de inhibición.

Los antibióticos y las concentraciones en las que se administraron se enlistan en el cuadro 1:

Cuadro 1. Antibióticos y sus concentraciones

Antibiótico	Concentración (µg/ml)		
Espectromicina	25	50	75
Kanamicina	5	20	50
Polimexina	0.5	2	5
Tetraciclina	20	40	80
Carbenicilina	50	100	150
Rifampicina	20	40	80
Eritromicina	25	40	80
Cloranfenicol	5	25	50

4.2.10 Análisis bioinformático

Con la ayuda de la herramienta BLAST de la página web National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando la

base de datos de 16S Ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea), se identificaron siete aislados bacterianos.

El genoma del aislado 35' fue secuenciado por la compañía Macrogen®, en Seúl, Corea del Sur, mediante el secuenciador Illumina HiSeq 2000.

5. RESULTADOS

5.1 Aislados

Los aislados bacterianos se caracterizaron en principio de acuerdo al fenotipo y medio de cultivo en donde desarrollaron. De acuerdo al medio selectivo, se observaron las siguientes características: todas las bacterias crecidas en agar Mc Conkey (de la tres a la 21), son capaces de fermentar lactosa, pues presentaron un característico color rosado, observándose también el vire en el medio de cultivo.

En el medio de cultivo EMB todas las bacterias mostraron un color rosado y varias presentaron una apariencia de mucosa, lo que indica que son fermentadoras de lactosa o sacarosa. El aislado número 27 fue el único que presentó un color verde metálico, lo que nos dice que probablemente es una bacteria coliforme, que también fermenta lactosa o sacarosa. (Figura 5).

Las bacterias inoculadas en los medios Terrific y LB presentaron sólo se caracterizaron de acuerdo a morfología, sin considerar reacciones bioquímicas. El aislado 35' fue inoculado en medio Terrific.

De los 54 aislados obtenidos, fueron seleccionados ocho en base a la resistencia y capacidad de volatilizar el mercurio. Éstos fueron identificados como 10, 35', 36, 37, 38, 39, 39' y 40.

5.2 Resistencia a mercurio

Los 54 aislados crecieron en todas las concentraciones de mercurio evaluadas. En comparación con los controles (0 µg/ml) no hubo un cambio en la cantidad ni

tiempo de crecimiento cuando fueron inoculadas desde 50 hasta 200 $\mu\text{g/ml}$ Hg. Solamente presentaron una disminución a partir de 300 $\mu\text{g/ml}$ Hg, en donde crecieron aproximadamente 30% menos que en las concentraciones anteriores. En la máxima concentración (350 $\mu\text{g/ml}$), mostraron una reducción de crecimiento de más del 50%, en comparación con el control.



Figura 5. Aislado 27 en agar EMB. El cambio de coloración a verde metálico indica que la bacteria fermenta lactosa o sacarosa

5.3 Extracción de plásmidos

Los ocho aislados seleccionados previamente presentaron únicamente plásmidos con un peso mayor a 10 kb, excepto el aislado 35' que mostró, además, dos bandas de aproximadamente 2000 y 5000 pb, basándose en el marcador de peso molecular. Por esta razón fue seleccionado para ser secuenciado. (Figura 6).

5.4 PCR 16 S

Se obtuvo la amplificación de la región 16S de siete aislados, los cuales fueron los siguientes: 4, 6, 8, 11, 12, 20 y 25.

Las bandas obtenidas, de acuerdo a la electroforesis en gel de agarosa, tienen un tamaño aproximado de 1600 pb (de acuerdo al marcador molecular), correspondiente a la parte conservada del gen 16S. (Figura 7). Las secuencias

fueron comparadas en Gen Bank mediante la herramienta BLAST. Las cepas se identificaron como se muestra en el cuadro 2.

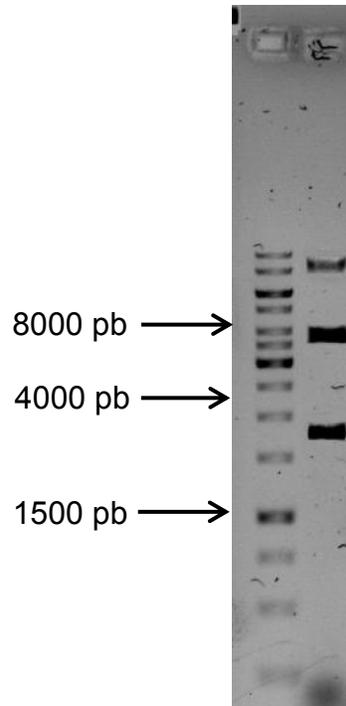


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de extracción de plásmidos del aislado 35'.

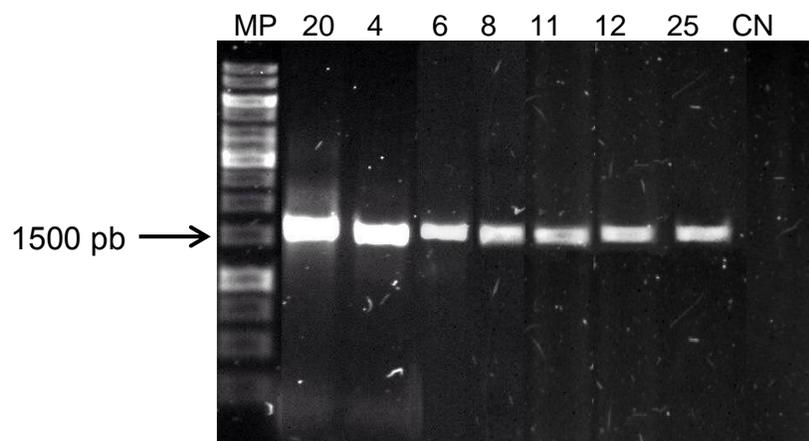


Figura 7. PCR 16S en gel de Agarosa al 0.8%. MP: Marcador de peso. CN: Control Negativo. Todas las bandas tienen un peso de 1600 pb aproximadamente.

Como se puede observar en la tabla, la mayoría de bacterias pertenece al género *Pseudomonas*, las cuales se caracterizan por la facilidad que tienen en adaptarse al medio, y que han sido ampliamente identificadas como resistentes a mercurio y otros metales. (Furukawa y Tonomura, 1971; Canstein y col., 1999; Pepi y col, 2011).

Cuadro 2. Bacterias identificadas mediante la herramienta BLAST en Gen Bank, de acuerdo a la alineación de la secuencia 16S ribosomal.

Aislado	Bacteria	No. Bases secuenciadas	Identidad
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1134	95%
6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1392	92%
8	<i>Paenibacillus sp</i>	1388	90%
11	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	1634	97%
12	<i>Pseudomonas sp</i>	1608	98%
20	<i>Pseudomonas sp</i>	1311	96%
25	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1793	83%

5.5 Volatilización

De acuerdo al protocolo de Nakamura y Nakahara (1988), de las 54 bacterias obtenidas, 13 fueron capaces de volatilizar el mercurio. A pesar de que la prueba es solamente cualitativa, puede apreciarse que hay ciertas bacterias con mayor capacidad de hacerlo que otras, por ejemplo la 24, 39 y 40, que corresponden a las posiciones E3, F10 y F11, respectivamente.

En menor medida también están la 10, 15, 22, 33, 35', 36, 37', 37, 38 y 41. La posición G2 corresponde al control negativo. (Figura 8).

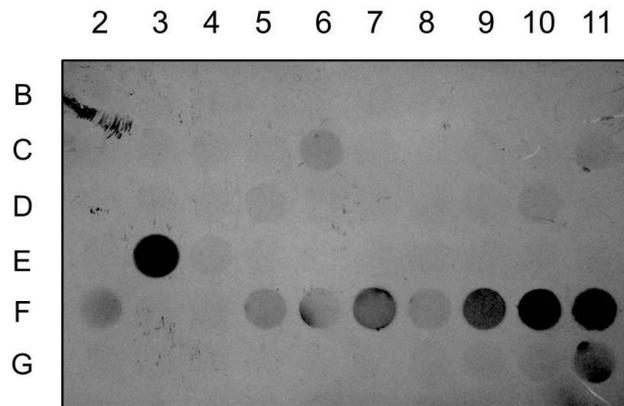


Figura 8. Placa de volatilización de mercurio. La mancha obscura indica la oxidación de nitrato provocada por la reacción con mercurio volátil (Hg^0). Las bacterias con

Este resultado sugiere que las bacterias que volatilizaron el mercurio cuentan con el gen que codifica la enzima responsable para ello (MerA) en su genoma. Sin embargo, contrario a lo esperado, un gran número de ellas no posee esta capacidad, lo cual podría indicar que cuentan con un mecanismo diferente de resistencia.

5.6 PCR merR

En base a secuencias previamente reportadas del gen merR (Gen Bank, NC_004998.1), la amplificación de este gen debe dar como resultado una banda con un peso aproximado a 500 pb. Los aislados 36, 37', 38, 39 y 40 presentaron una banda cercana a este peso. Sin embargo, utilizando los mismos primers, en las cepas 35' y 10 se amplificaron bandas de entre 750 y 1000 pb. Para la cepa 39' inclusive hubo una doble amplificación, de 1000 y 1500 pb. (Figura 9).

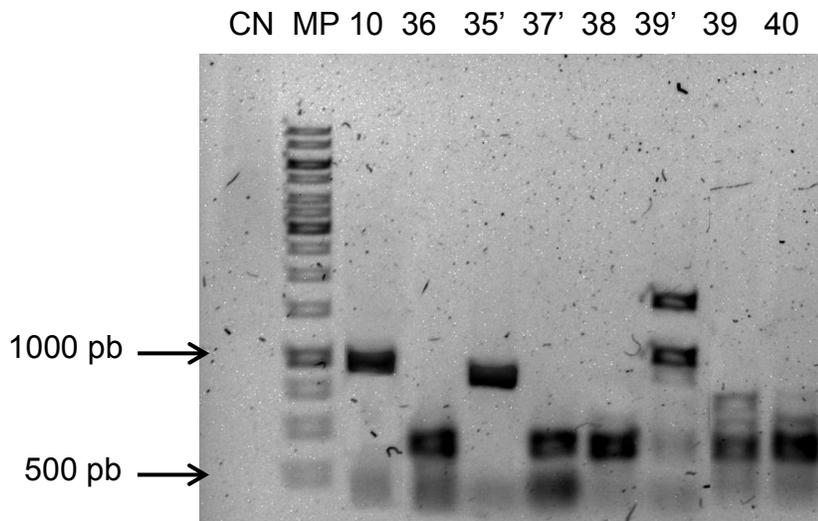


Figura 9. PCR merR en gel de Agarosa. CN: control negativo. MP: Marcador de peso. La segunda banda más pequeña corresponde a 500 pb, mientras que la cuarta, a 1000 pb.

De las ocho muestras secuenciadas, solamente se contempló aquella del aislado 35', la cual tuvo un peso de 757 pb. Sin embargo, al ser comparada con la herramienta BLAST de la página NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), el resultado arrojado no concuerda con el resultado esperado. Las demás amplificaciones presentaron interferencias en la secuenciación, o el número de bases era muy bajo, por lo cual no pudo obtenerse un resultado concreto.

5.7 Resistencia a metales

Los ocho aislados también tienen la capacidad de resistir a otros metales, aunque con mayor sensibilidad. Los metales que tuvieron mayor efecto en el crecimiento de las bacterias fueron cobre y cadmio. El cobre afectó el crecimiento de seis, mientras que el cadmio inhibió el desarrollo de las bacterias a partir de 150 µg/ml.; mientras que aquél afectó. El cobalto inhibió el crecimiento de cuatro de ellas, mientras que arsénico y zinc no generó repercusión. La bacteria 35' presentó sensibilidad a la mayoría de metales en altas concentraciones, no obstante su desarrollo no se vio afectado a bajas concentraciones. Todas las bacterias resistieron a concentraciones menores a 150 µg/ml de todos los metales, solamente el aislado 36 disminuyó su crecimiento en presencia de Co a 100 µg/ml. (Cuadro 3).

5.8 Resistencia a antibióticos

Debido a que el aislado 35' es una cepa del género *Proteus*, una bacteria enteropatógena, se realizó una prueba de resistencia ante diferentes antibióticos.

De ocho antibióticos probados, la bacteria fue resistente a cinco (KM, TC, CB, RIF, ER Y CL). Este hecho también sugiere que la resistencia a metales puede estar ligada a la resistencia a antibióticos, como ha sido reportado en otros estudios (Barkay y col., 2003) (Tabla 4).

5.9 Secuenciación de genoma

El genoma de *Proteus idrijaensis* se ensambló con SPAdes, versión 3.0; tiene un tamaño aproximado de 4.2 Mbp, su contenido de G+C es de 40.36%. Utilizando el servidor RNAmmer 1.2 y tRNAscan-SE se detectaron 2250 secuencias codificantes y 62 RNAs estructurales (58 tRNAs y 4 rRNAs)

Con base en el análisis de RNA ribosomal, la cepa 35' está más estrechamente relacionada a *P. hauseri* (99%). En él, los genes merB, merA, merP, merT y merR fueron encontrados, al igual que sistemas de bombeo para flujo de antibióticos (MexB y MexD). De igual forma, sdeY, un gen para bomba de flujo de la familia de proteínas de resistencia, nodulación y división celular (RND) y otras bombas de la misma familia, como TtgDEF (capaces de expulsar tolueno), fueron identificados. Genes czcA y czcD, quienes proporcionan resistencia a Co^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} ; así como transportadores ABC involucrados en la toma de Fe, sideróforos, azúcares y vitamina B12; sistemas de transferencia de conjugación secreción tipo IV y sistema protéico para la estabilización de plásmidos de la familia RelE/ParE.

Cuadro 3. Crecimiento de los aislados ante diferentes metales y concentraciones. Casi el 100% de los aislados resiste a concentraciones menores a 200 µg/ml. S= susceptible, I= intermedio, += resistente.

	µg/ml	10	35'	36	37'	38	39	39'	40
Pb	50	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	+	+	+	+	+	+	+
	200	+	I	I	+	I	S	+	I
Co	50	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	I	+	+	+	+	+
	150	+	I	I	+	I	+	+	+
	200	+	S	S	S	S	+	+	+
Cu	50	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	I	+	I	I	+	+	+
	200	I	S	I	S	I	+	I	+
Cd	50	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	I	I	I	I	I	I	I	I
	200	S	S	S	S	S	S	I	S
Cr	50	+	+	+	+	+	+	+	+
	100	+	+	+	+	+	+	+	+
	150	+	I	+	+	+	+	+	+
	200	I	S	I	+	I	+	S	S
As	100	+	+	+	+	+	+	+	+
Zn	100	+	I	+	+	+	+	+	+

Cuadro 4. Resistencia del aislado 35' ante diferentes concentraciones de antibióticos. S= susceptible, R= resistente, I= intermedio.

Antibiótico	Abreviación	Concentración (µg/ml)		
		25	50	75
Estreptomina	STP	S	S	S
Kanamicina	KM	R	R	R
Polimexina	PX	0.5	2	5
		I	S	S
Tetraciclina	TC	20	40	80
		S	S	S
Carbenicilina	CB	50	100	150
		R	R	R
Rifampicina	RIF	20	40	80
		R	R	R
Eritromicina	ER	25	40	80
		R	R	R
Cloranfenicol	CL	5	25	50
		R	R	R

DISCUSIÓN

Se lograron aislar bacterias resistentes a mercurio a partir de suelo de Idrija, Eslovenia, de las cuales, trece tienen la capacidad de volatilizar el mercurio a su forma menos tóxica (Hg^0). Pocas investigaciones han reportado bacterias que alcancen resistir a concentraciones tan altas como las aquí obtenidas (350 μg Hg/ml). (Marin y Walther, 2010; Deng y Wang, 2012; Allen, 2013).

El género *Pseudomonas* es una de las bacterias que ha sido ampliamente identificada como portador de genes resistentes a varios metales, incluido el mercurio. De igual manera, se conoce que el género *Proteus*, junto con otras bacterias entéricas, tiene la capacidad de resistir a algunos antibióticos y ciertos metales, como Co, Ni, Cd y As. (Summers, 1972).

A pesar de que *Proteus Idrijaensis* contiene el gen *czcA*, a partir de 150 μg Co/ml no mostró resistencia, debido posiblemente a que este gen confiere una baja resistencia a cobalto, por lo cual no es capaz de crecer en altas concentraciones del metal. Este gen también confiere resistencia a zinc y cadmio, pero en menor medida. (Interpro, 2014).

Otro mecanismo que permite resistir a metales, por ejemplo, al Zn, es mediante las mismas proteínas de resistencia a mercurio. Está comprobado que, principalmente este metal, puede unirse a cualquier otra proteína de regulación de metales aunque no sea afín a ella, debido a que las proteínas de regulación de Zn y Co pertenecen a la misma familia que MerR. No obstante, la respuesta que genera es de menor eficiencia que la comparada con el metal específico de esa proteína (Reyes y col., 2011).

Aunque no fue posible analizar por secuenciación el gen *merR* en las ocho bacterias estudiadas, el amplicón obtenido en la mayoría de ellas corresponde al tamaño del gen reportado en Gen Bank (NC_004998.1). Este resultado, junto con

los genes de transferencia genética encontrados en *Proteus idrijaensis*, y la prueba de volatilización, sugiere la alta probabilidad de que las demás bacterias que también volatilizaron el mercurio, contengan la maquinaria de genes mer, ya que la proteína MerA difiere de otras reductasas específicas a diferentes metales (Allen, 2013). Estas bacterias juegan un rol muy importante en la descontaminación de suelos, ya que son las que retiran el mercurio de él, evitando que se acumule y genere moléculas orgánicas tóxicas para los organismos.

El hecho de que no todas las bacterias lograron volatilizar el mercurio, probablemente se deba a que su capacidad de respuesta es menor y la concentración del metal era muy alta para la cantidad de bacteria contenida. Aunque posiblemente también se deba a que tengan otro mecanismo de resistencia a mercurio, como bombeado de fluidos, reducción enzimática y biometilación con su consecuente eliminación. (Gaona, 2004)

La secuencia obtenida de la amplificación del gen merR mostró cierta similitud con el gen reportado en Gen Bank, sin embargo su tamaño es mucho más pequeño, por lo que se piensa que hubo un error en la amplificación y los primers reconocieron una secuencia parecida a la buscada.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se caracterizaron por primera vez las bacterias presentes en el suelo de Idrija, Eslovenia y se encontró que presentan la capacidad de resistir a altas concentraciones de mercurio.

Se identificó por primera vez la bacteria *Proteus idrijaensis*, la cual no sólo contiene la maquinaria necesaria para resistir al mercurio sino a también para otros metales, como Co, Cu, Cd, Cr, Pb, As y Zn, al igual que a los antibióticos Km, Cb, Rif, Er, Cm y Pb. Por esta razón puede ser utilizada para biorremediación de suelos contaminados.

Otras bacterias, principalmente del género *Pseudomonas* también fueron identificadas, y otras más, presentaron la habilidad de volatilizar el mercurio, lo cual también ayuda a la remediación de suelos de la región.

Conocer la microbiota de un suelo es importante pues permite saber qué reacciones se llevan a cabo en él, además de que los mecanismos bacterianos pueden ser utilizados para acelerar la descontaminación del mismo.

La presencia de estas bacterias en la región de Idrija acelera su descontaminación, ya que permite que el mercurio continúe en constante ciclo y evita que se biomagnifique en una determinada zona. Además, ayuda a prevenir la formación de moléculas orgánicas que puedan ser fácilmente absorbidas por la población.

La secuenciación y análisis del genoma de *Proteus idrijaensis* abre paso a realizar investigaciones más detalladas para tener una mayor comprensión de sus mecanismos de defensa para aprovechar sus características y utilizarlas con fines biotecnológicos.

7. REFERENCIAS

Allen R, Tu Y, Nevarez M, Bobbs A, Friesen J, Lorsch J, McCauley J, Voet J, Hamlett N. The mercury resistance (mer) operon in a marine gliding flavobacterium, *Tenacibaculum discolor* 9A5. *FEMS Microbiol Ecol.* **2013**; 83: 135-148.

Alvarado O, Diseño y construcción genética con posibilidad de uso en un sistema biosensor a mercurio. Tesis de Licenciatura. FCN-Universidad Autónoma de Querétaro. **2010**. Santiago de Querétaro, Qro.

American University. Minamata disaster. [serie en internet] [consultado en septiembre 2014]. Disponible en: <http://www1.american.edu/ted/MINAMATA.HTM>

Barkay T, Miller S, Summers A. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *Microbiol Reviews.* **2003**;27: 355-384.

Barkay T, Wagner I. Microbial transformations of Mercury: potentials, challenges and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Advances in Appl Microbiol.* **2005**; 57.

Battistel D, Baldi F, Marchetto D, Gallo M, Daniele S. A rapid electrochemical procedure for the detection of Hg(0) produced by mercuric-reductase: application for monitoring Hg-resistant bacteria activity. *Environ Sci Technol.* **2012**; 46: 10675-10681.

Birboim H, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **1979**;7(6): 1513-1523.

Bogdanova E, Bass I, Minakhin L, Petrova, M, Mindlin S, Volodin A, Kalyaeva E, Tiedje J, Hobman J, Brown N, Nikiforov V. Horizontal spread of mer operons among Gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiol.* **1998**; 144: 609-620.

Bontidean I, Lloyd J, Hobman J, Wilson J, Csöregi E, Mattiasson B, Brown N. Bacterial metal-resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals. *Journal of inorganic biochemistry.* **2000**; 79: 225-229.

Canstein H, Li Y, Timmis K, Deckwer W, Wagner I. Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. *App and Environ Microbiol.* **1999**; 65 (12):5279-5284.

Cigale, M. Foreword by the director of Idrija Mercury Mine. Environmental influences of mercury ore processing: case studies selected at Slovenian, Mexican, Hungarian group. Idrija, Eslovenia. Geological Survey of Slovenia, **2012**: II.

Interpro. Cobalto czcA. Cation efflux system CzcA/CusA/SilA/NccA/HelA/CnrA (IPR004763) (protein sequence, analysis & classification). [serie en internet] [consultado el 26 agosto 2014]. Disponible en: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR004763>.

Dash H, Das S. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. Inter biodeterioration & biodegradation ELSEVIER. **2012**; 75: 207-213.

Deng X, Wang P. Isolation of marine bacteria highly resistant to mercury and their bioaccumulation process. Biores tech ELSEVIER **2012**; 121: 342-347.

Difco™ & BBL Manual. Manual of Microbiological Culture Media. Segunda Edición. **2009**. Estados Unidos Americanos.

Dizdarevič T, Režun B, Repinc U. Monitoring and assessment of mercury pollution in the Idrija mining area. Influences of ancient ore processing sites in surroundings of Idrija on the mercury dispersion in soil. Environmental influences of mercury ore processing: case studies selected at Slovenian, Mexican, Hungarian group. Idrija, Eslovenia. Geological Survey of Slovenia, **2012**: 1-7.

Furukawa K, Tonomura K. Enzyme system involved in decomposition of phenyl mercuric acetate by mercury-resistant *Pseudomonas*. Agric Biol Chem. **1971**; 36(13):2441-2448.

Gaona X. El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. **2004**.

Gen Bank. merR gene. NP_862967.1 putative transcriptional regulator MerR [Escherichia coli] NCBI 2014. [consultado el 2 agosto 2014].

Gosar M. Mercury in River sediments, floodplains and plants growing thereon in drainage area of Idrija mine, Slovenia. Polish J of Environ Sud. **2008**; 17 (2): 227-236.

Gosar M, Šajn R. Mercury in soil and attic dust as a reflection of Idrija mining and mineralization (Slovenia). *Geologija*. **2001**; 44(1): 137-159.

Joshi C, Panda D, Martell D, Andoy N, Chen T, Gaballa A, Helmann J, Chen P. Direct substitution and assisted dissociation pathways for turning off transcription by a merR-family metalloregulator. *PNAS*. **2012**; 109 (38): 15121-15126

Kobal A, Krsnik M, Prezelj M, Sešek A, Horvat M, Gibičar D, Knap Č, Osredkar J. The impact of mercury on pregnant women in Idrija. V. *Epidemiology of toxic metals – problems and solutions: international symposium*. **2007**; 24.

Liu y Sheing. RBS (B0034) + MerR (mercury-responsive transcription factor). iGEM [serie en internet] 2010 [consultado 2014 agosto 20]. Disponible en: http://parts.igem.org/Part:BBa_K346001.

Marin I, Walther D. Isolation and molecular analysis of mercury-resistant bacteria from alehigh valley wastewater treatment plant. [serie en internet] Lafayette College. 2010. [consultado 2014 agosto 14]. Disponible en <http://sites.lafayette.edu/marini/files/2010/02/Isolation-and-Molecular-Analysis-of-Mercury-Resistant-Bacteria-from-a-wastewater-treatment-plant.pdf>.

Nakamura y Nakahara,.Simplified X-Ray Film Method for Detection of Bacterial Volatilization of Mercury Chloride by *Escherichia coli*.*Applied and environmental microbiology*.**1988**; 54(11).

Nascimento A, Chartone E. Operon mer: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. *Genetics and Molecular Research* **2003**; 2 (1): 92-101.

Organic Mercury. Enviromental protection agency (EPA). [serie en internet] 2007 [consultado en mayo 2014]; 1-26. Disponible en: <http://www.epa.gov/teach/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). El mercurio y la salud. [serie en internet] 2012. Nota descriptiva N° 361. [Consultado en Agosto de 2013]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/es/>.

Organización Panamericana de la Salud. Mercurio (OPS) [serie en internet]. 2014 [consultado en julio 2014]; Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8158&Itemid=39767&lang=es.

Osborn A, Bruce K. Strike, P. and Ritchie, D.A. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon. *FEMS Microbiol Rev.* **1997**.Rev.19: 239-262.

Pendergrass J, Haley B, Vimy M, Winfield S, Lorscheider F. Mercury vapor inhalation inhibits binding of GTP to tubulin in rat brain: similarity to a molecular lesion in Alzheimer diseased brain. *Neurotoxicol.* **1997**; 18(2):315-324.

Pepi M, Gaggi C, Bernardini E, Focardi S, Lobianco A, Ruta M, Nicolardi V, Volterrani M, Gasperini S, Trinchera G, Renzi P, Gabellini M, Focardi S. Mercury-resistant bacterial strains *Pseudomonas* and *Psychrobacter* spp. Isolated from sediments of Orbetello Lagoon (Italy) and their possible use in bioremediation processes. *International Biodeterioration & Biodegradation.* **2011**; 65(1): 85–91

Pilon E, Pilon M. Breeding mercury-breathing plants for environment clean-up. *trends in Plant sciences,* **2000**; 5(6): 235-236.

Portal Oficial del Turismo en Eslovenia. [En línea]. Fuente Slovenian environment Agency. URL: http://www.slovenia.info/?_ctg_vreme=0&lng=7 [Consultado en Agosto de 2013].

Reyes H, Campanello G, Giedroc D. Metalloregulatory proteins: metal selectivity and allosteric switching. *Biophys Chem.* **2011**; 156:103-114.

Rice K, Walker E, Wu M, Gillette C, Blough E. Environmental mercury and its toxic effects. *J Prev Med Public Health.* **2014**; 47:74-83

Schelert J, Rudrappa D, Johnson T, Blum P. Role of MerH in mercury resistance in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Microbiol.* **2013**; 159:1198-1208.

Summers A, Silver S. Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* **1972**; Vol. 112, No. 3:1228-1236.

Teršič T, Gosar M. Preliminary results of detailed geochemical study of mercury at the ancient roasting site Pšenk (Idrija area, Slovenia). *Applied Geochemistry.* **2009**; 3:1-10.

Teršič T, Gosar M. Influences of ancient ore processing sites in surroundings of Idrija on the mercury dispersion in soil. Environmental influences of mercury ore processing: case studies selected at Slovenian, Mexican, Hungarian group. Idrija, Eslovenia. Geological Survey of Slovenia, **2012**: 12-17.

Teršič T, Gosar M. Elemental contents in earthworm casts at mercury contaminated site. Environmental influences of mercury ore processing: case studies selected at Slovenian, Mexican, Hungarian group. Idrija, Eslovenia. Geological Survey of Slovenia, **2012**: 18-22.

Weisburg W, Barns S., Pelletier D., Lane D..16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*. **1991**; 173(2):697-703.

Wilson J, Leang C, Morby A, Hobman J, Brown N. MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters? *FEBS Lett*. **2000**; 472: 78-82.

Yarto M, Gavilán A., Castro J. La contaminación por mercurio en México. *Gaceta ecológica*. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales México. **2004**; 72.

Weinberg J. Introducción a la contaminación por mercurio para las ONG. Editorial IPEN. **2010**.

Žibret G., Gosar M. Mercury in river sediments and voreholes through the Idrija River alluvial sediments. Environmental influences of mercury ore processing: case studies selected at Slovenian, Mexican, Hungarian group. Idrija, Eslovenia. Geological Survey of Slovenia, **2012**: 23-27.

Yokoyama K, Song J, Geltinger C, Sun K, Knazawa I. Direct lysis method for the rapid preparation of plasmid DNA. *Anal Biochem*. **1999**; 271:89-91.

ANEXOS

Secuencias 16S

>4b_RD1.ab1 1134 pb

gggggggaagggggtgggcatagggcgagtgcggcgactcaccagtcgtgaatcactccgtggaaccgtcc
tccgaagggtcccattaaatcttctggtgcaaccactcccattggtgtgacggggtgtggacaaggcccgggaac
gtattaccgcgacattctgattcgcgattactagcgattccgactcacgcagtcgagttgcagactgcatccggac
tacgatcgggtttgtgggattagctccacctcgcggcttggaaccctctgtaccgaccattgtagcacgtgttagccc
aggccgtaagggccatgatgactgacgtcatcccaccttctccggtttgtcaccggcagtccttagagtgccca
ccatgacgtgctggaactaaggacaagggttgcgctcgttacgggacttaaccaacatctcacgacacgagctg
acgacagccatgcagcacctgtctcaatgtctccgaaggcaccaatccatctctggaaagttcattggatgtcaagg
cctggaaggttctcgcgttctcgaattaaaccacatgctccaccgcttgcggggccccgtcaattcattgagttt
taacctgcgccgtactccccaggcggtaactaatgcttagctgcgccactaagagctcaaggctcccaacgg
ctagttgacatcgtttacggcgtggactaccagggtatctaactctgttctccccacgcttccacactcagtgctcag
atcagtcagggtggtcgcctcggcactggtgttctctctatactacgcatttcaccgctacacaggaaattccacca
ccctctaccatactctagcttggcagtttgaatgcagttccagggtgagccggggctttcacatccaattaacaaccact
acggcgttacgccagtaatccgataacgctgcacctctgtataaccggctgctggccagattagccgtgctgatctgt
cgtaactcaaacactacgtataggaatgccttctcccacttaagtgttacaatcggagactttctccacacgcggat
gggtggacaggggtcccatggcaaatccaa

>6_RD1.ab1 1392 pb

gggttcaggcgggacgagtcggacagcggggaccaagctctaggaggtgatccatctgcgaggaagcgtgctc
ccgtgagttaggctcacactctgatggcggaccactcccattggtgtgacggggtgtgtacaggccccgggaac
gtattaccgcgacattctgattcacgattactgccgattccgactcacgcagtcgagttgcacactgcatccgga
ctacaatcggcttctgtgggattatctccacctctcggcttggaaccctctgtacctacgattgtagcacgtgttagccc
aggccgtaagggccatgatgactgacgtcatcccaccttctccggtttgtcaccggcagtccttagagtgccca
ccatgacgtgctggaactaaggacaagggttgcgctcgttacgggacttaaccaacatctcacgacacgagctg
acgacagccatgcagcacctgtctcaatgttcccgaaggcaccaatccatctctggaaagttcattggatgtcaagg
cctggaaggttctcgcgttctcgaattaaaccacatgctccaccgcttgcggggccccgtcattcattgagttt
aaccttgcggccgtactccccaggcggtaacttaatgcttagctgcgccactaagagctcaaggctcccaacgg
ctagttgacatcgtttacggcgtggactaccagggtatctaactctgttctccccacgcttccacactcagtgctcag
atcaggtggtcgcctcggcactggtgttctctctatactacgcatttcaccgctacacaggaaattcaccacctct
acatactctagcttgcagtttgaatgcagttccagggtgagccggggctttacatccacttaacaaccactaccgcgt
tacgccagtaattcgataacgctgcacctctgtataaccgcgctgctgcacagagtagccgtgctattctgtcgtacg
aaaactacgtataggaatgccttctcccactaaatgcttacatccgagacttccacacgcggatgctggacagctt
cgccatgcaaatccactgtgctccgaagatcgtacgtgtcagtcagttgatgacatctcaacagtagcatctccctg
ggagcactactccactactatccactaggcactgaagcaaggccaagtcctgttccccagggaatcggataagtctta

aagttccctcaaggaatcaagtatacccgccccgataaagaacctgtccccattgtagtcccgtaaggggaaga
aaacatattgagagggggaagcgtaaccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaataacct

>8_RD1.ab1 1388 pb

cgaatgcagatccgatacggctacctgttacgacttcacccaatcatctatcccaccttcggcggctggctcctgc
ggtaccccaccgacttcgggtgtataaacctctcgtggtgtgacgggcggtgtgtacaagaccgggaacgtattca
ccgcgcatgctgatccgcgacttagcaattccgacttcagcaggcgagttgcagcctgcaatccgaactgaga
ccggctttgtggaattggtccctccccggatttcccacccccggtgcccggccatggaagtacgtggtagcccagg
ccataaggggattgagaatttgacgccttcccccttccctcgggttgccccggcagcccctttaaagggccacc
cgaagtgtggcaactaaataaggggtgcgctcgttgcgggacttaaccaacatctcacgacacgagctgacg
acaacctgcaccacctgtctcctggtcccgaaggaaagaccatctctgtaccgatcaaagggatgtcaagacctg
gtaaggttctcgcggtgcttgaattaaaccacatactccacggctgtgcggttccccgcaattcctttgagttcagc
cttgcgaccgtactcccaggcggagtgcttaatgtgtaacttcggcaccaagggtatcgaaaccctaacaccta
gcattcatcgtttacggcgggaactaccagggtatctaaccggttgccccacagcttccgcgctcagcgtcagttac
agcccagagagtccttcgacactgggtgctcctcaatatctaccatttcccgctaccgggggaatccactcccccttctgc
tctaagtcccagttccaggcgatccgggtgaccccgggattaacaccaaattaatgaccctgccccgcttacgc
caaatccggaacggtgcccctcgtttaccgggctgtggccgtattagccgggcttttccaggaccgcactgaaa
cattactccaagcttttctggaacaaacttacaatcaaaaacttctcatcccggcatgctcgtaggttcccattgggaa
atccaatgtctccgaagatttgccgtccagccagtggcgaccccctcagtcgtacgatcggcctgggagcgtacc
ccaaaactaagcccagcctccaaggaaatgcccctccgtcttcggaaaaacaatcggaaccattccggatt
ccactggggggtcccggttaccgcccccaatcaaaaagcttttacccttggtaaggccggtctgggagaactag
gggagggggggggggggagggggggggggaggggaaaaaccctaaccctgttccccctttga

>11_RD1.ab1 1634 pb

gaagggccggatcgtctagatggctgcgacttcaccccagtcagatcaacaccgtggaaccgtcctcccgaag
gttagactagctacttcatggtgcaaccactcccaggtgtgacgggcggtgtgtacaaggccgggaacgtattca
ccgagacattctgattcgcgacttagcagattccgacttcacgcagtcgagttgcagactgcgatccggactacgat
cggttttgtgggattagctccacctcgcggcttggaaccctctgtaccgaccattgtagcagctgtgtagcccaggcc
gtaaggccatgatgacttgacgtatccccaccttccctcgggttgcaccggcagtcctcttagagtcccaccatg
acgtgctggaactaaggacaagggtgctcgttacgggacttaaccaacatctcacgacacgagctgacgac
agccatgcagcacctgtctcaatgttcccgaaggcaccaatccatctctggaaagttcattggatgtcaaggcctggt
aaggttctcgcggtgcttgaattaaaccacatgctccaccgcttgcgggccccgcaattcattgagtttaacct
tgcgccgtactcccaggcggtaacttaatgcgttagctgcgccaactaagagctcaaggctcccaacggctagtt
gacatcgtttacggcgtggactaccagggtatctaactcctgttgcctcccacgcttccgacacctcagtgatcag
ccagggtgctccttcgcaactggtgttccctctatatctacgcattcaccgctacacaggaaattccaccacctcta
ccatactctagctcgacagtttgaatgcagttcccaggtgagccccgggatttcacatccaacttaacgaaccacct
acgcgctttacgccagtaattccgattaacgcttgcaccctctgtattaccgcggtgctggcacaaggttagccg
gtgcttattctgctggaacgtcaaaaacaataacgtattagggttaatgcccttccctccaactaaagtctttacaatccg
aagaccttctcaaccacgcggcatggctggatcaggcttccgcccattgtccaatattccccactgctgcctcccgta

ggaatctgggacgggggttcaggtcccagtgactgatcatccttcaaaacagtttacggatcgctccgcctggggg
agcgattacctccccacttacctatccgaactaaggccatcttgaaaggcaaaggcccaaaggggtccccggtttcc
cccagggaaaataagcgggaataaaggggcggttctgaaaagttttccccctaccaggaatctcccagggat
atccaacaggttgggctgagtcacaaaaaaaccaccctgatcgggccgacaatgaaggggtagggcgcg
cgggctgttcttagagggggaaaagaaatccgaactgagaggaggaaaaagaaacccaaaaaacctcccc
cccctctccccccccctccccccccccccctcccctcccctttccccctcccccccccccccccccccccccc

>12_RD1.ab1 1608 pb

ggcgggtggctgcatacggctacattgttgcgacttcaccccagtcataatcacaccgtgtaaccgtctcccgaag
gttagactagctacttcatggtgcaaccactcccattggtgtgacgggcggtgtgtacaaggcccggaacgtattca
ccgacgacattctgattcgcgattactagcgttccgacttcaacgcagtcgagttgcagactgcgatccggactacgat
cggttttggtgggattagctccacctcgcggcttggaaccctctgtaccgaccattgtagcacgtgtgtagcccagggc
gtaagggccatgatgacttgacgtcatccccaccttctccggtttgtaccggcagtccttagagtgccaccatg
acgtgctggttaactaaggacaaggggtgcgctcgttacgggacttaaccaacatctcacgacacgagctgacgac
agccatgcagcacctgtctcaatgttcccgaaggcaccaatccatctctggaaagttcattggatgtcaaggcctggt
aaggttctcgcgttcttgaattaaaccacatgctccaccgcttgcgggccccgcaattcattgagtttaacct
tgccggcctactccccagggcggtcaacttaatgcgttagctgcgccactaagagctcaaggctcccaacggctagtt
gacatcgtttacggcgtggactaccagggatctaatcctgtttgtccccacgcttgcacacctcagtgatcagttcag
ccaggtggtcgccttcgccactggtgttctctctatctacgcattcaccgctacacaggaaattccaccaccctcta
ccatactctagcttgcagtttgaatgcagttcccagggtgagcccggggcttcacatccaacttaacaaccaccta
cgcgcgctttacgcccagtaattccgattaacgcttgcaccctctgtattaccgcggtgctggcacagagttagccgg
tgcttattctgctggtaacgtcaaaactaacgtattaggttaatgcccttctcccaactaaagtgtttacaatccga
agaccttctcaaacacgcggcatggctggatcaggcttgcgccattgtccaatattccccactgctgcctcccgtag
gaatctggaccgtgtctcagttccagttggactgatcctctcaaaccagttacggatcgtcgcctggggagccttt
cctccccaaactagctaattccgacctagggccatttgatacgcgaaggccaggggccccgtgttttcccctaggagata
acggagtaaaggttcttttaaaagtgtcccccatcaagggaattctagggattataaccgctccccgctaataaa
agaaaaacctctgcacccccattctaagttttgatggcccccgtaaaaaggaaagaggaaggaactagtaatg
gataggggaaggaaggcccccccccccccccccccccccccccccaaggaaaacgggccccccccccccac
gcccccccccccccgctcccccccgcccccccccccc

>MH20_RD1.ab1 1311 pb

gggggacatcttaggtctacattgttacgacttccccagggcgtgaatcacaccgcggaaccgtctcccgaaggt
tagactagctacttctggcgcaaccactcccattggtgtgacgggcggtgtgtacaaggcccggaacgtattcacc
gcgacattctgattcgcgattactagcgttccgacttcaacgcagtcgagttgcagactgcgatccggactacgatcg
gtttgtgggattagctccacctcgcggcttggaaccctctgtaccgaccattgtagcacgtgtgtagcccagggcgt
aagggccatgatgacttgacgtcatccccaccttctccggtttgtaccggcagtccttagagtgccaccataac
gtgctggttaactaaggacaaggggtgcgctcgttacgggacttaaccaacatctcacgacacgagctgacgacag
ccatgcagcacctgtctcaatgttcccgaaggcaccaatccatctctggaaagttcattggatgtcaaggcctggtaa
ggttctcgcgttcttgaattaaaccacatgctccaccgcttgcgggccccgcaattcattgagtttaaccttgc

ggccgtactccccaggcgggtcaactaatgcgtagctgcccactaagagctcaaggctccaacggctagttgac
atcgtttacggcgtggactaccaggtatctaactctgtttgctccccacgcttcgcacctcagtgatcagttca
ggtggtcgccttcgcccactggtgttcctctatatctacgcattccaccgctacacaggaaattccaccacctctacca
tactctagctgtcagttttgaatgcagttcccaggtgagccccgggctttcacatccaacttaacaaaccacctacgc
gcgctttacgcccagtaattccgattaacgcttgaccctctgtattaccgcggtgctggcacagagttagccgggtgct
tattctgtcggtaacgtcaaaacactaaacgtattaaggtaatgcccttctcccaactaaagttgctttacaatccca
aaaaccttctttccaccacccgggcatgggcttgatcagggtttcgccctttggccaaaattccccactggtggccc
ccccgaaggaatctgggacccgggctccaatttccacggtgggagtgataatcctttccagacacagtttccggaac
gctcccccttggtagggccatttttccccacaaaaaattaat

>25_RD1.ab1 1793 pb

aagggactggagaccgtaggaaccgaggtcctcctgaataatcggggcccccaagcctctaagggtagtgtagatt
cccatccttcgaggaacacgcgatgccatccacagtgaagctctaggacatcaaacacacctgcaagtgtcgcg
aaacccacgttctcactggggtgtgtacggggactggatgttgataccaagggactccagagcgaactgtaa
tcagcgcgcgaacatttctgaattttcgccgaaattacctaggcccgatcttccgaacctttcaccgcagttcggaa
ggtttggcagacctgcggaattccgggaacattacgaattcgggggtttttggggggaatttagctccccactc
cttcgccccggcctttgggccaacccccctcctggttaaccggaaccaatttggtagccaccgttggtaaggcccc
caggccccgggtaagggggcccatgaaatgaactggaacgtcaattccccaccctttcccctccgggtttgggtca
ccggggcaggtcctccccttagaaggtgccccaccaatgaacgggtgcttggggtaaaactaagggaacaag
ggtttgcgccctcgggttacgggggaaacttaacccaaaacatcctcccacgaacacggaggcctgaacgaaca
gccccatggcaggcacctggtctcaaatgtttccccgaaagggcacccatcccattctctgggaaaaagttcattgg
gatggtcaaaggcctgggtaaaggtttcttcgcggttggttccgaaattaaaccacctggctcccaccggcc
ttgttccggggcccccccgtaaatctcattttgaggttttaaaacctttggcgccgggtacctcccccaaggcgggt
caaaccttaaatgccgtaagcttgcgccacctaaaggagctcaaggcctcccccaaccgggctagtttgacatccg
tttacgggccgtgggacctaccaggggtaatcctaaccctggttggctccccaccgcttttcgccacctcaagt
gtccagttattcaagtccaggggtgggtcgcccttcgcccactgggtgttccctctctatatcctacgccattttcaccgc
tacacaaggaaaattccaccacctctaccatacttaacctgtcagttttgaatgcagtttccaaggtgaacccc
ggggctttcacatccaacttaacaaaccacctacgcgcgctttacgccccagtaattccgaattaacgctgcac
cctctgtattaccgcggtgctggcacagagttagccggtgcttattctgtcggtaacgtcaaaattgcaaaaatattaat
ctacaaccttctcccaacttaagtgctttacaatccgaagaccttctcaacacgcggcatggctggatcaggctt
cgccattgtccaaattcccactgctgcctccgtaggatctggaccgggctcagttcagtgactgacatctctagaca
gttcggatctcccctgggaaccttactcccaactactaaaccaactaggtcactaaagccaaggccgaggccctgttt
ccctagaagatcggataaagctttaaattccccccagaaatctaggtttccgctccccgaaatagaaacctcc
cccattgttttgcgccccttattaagaagaaaaaataatggaaggccgggggggggcaaaaaa