

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Escuela Superior de Apan

TESIS DE LICENCIATURA

Inferencia genómica del resistoma de cobre de *Methylobacterium radiotolerans*
MLP1 y diseño de mutaciones en los genes *copA1* Y *copA2*

Para obtener el título de
Licenciada en Ingeniería en Biociencias

P R E S E N T A

Sherline Miguel Nicolás

Director

Dr. Alejandro García de los Santos

Codirector

Dr. Martín Peralta Gil

Apan, Hidalgo, México a 02 de Junio de 2026.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Genética del Centro de Ciencias Genómicas perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelos, bajo la dirección del Dr. Alejandro García de los Santos y codirección del Dr. Martín Peralta Gil.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Escuela Superior de Apan

Campus Apan

Número de control: ESAP-Bio-020-2026

Asunto: Autorización de impresión de tesis

Miguel Nicolás Sherline P.D.L.I.B.C.

PRESENTE

Por este medio le comunico que, el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias **Miguel Nicolás Sherline (420451)**, a quienes les presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis con el título **“Inferencia genómica del resistoma de cobre de *Methylobacterium radiotolerans* MLP1 y diseño de mutaciones en los genes *copA1* y *copA2*”**, después de la revisión ha autorizado la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Martín Peralta Gil

SECRETARIO: Dr. Alejandro García de los Santos

PRIMER VOCAL: Dr. Víctor Hugo Pérez España

SEGUNDO VOCAL: Dra. Teresa Romero Cortes

TERCER VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

SUPLENTE 1: Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros

SUPLENTE 2: Dr. Alejandro Morales Peñaloza

ATENTAMENTE

“Amor, Orden y Progreso”

Chimalpa, Apan, Hgo., México a 30 de abril de 2026.



Dra. María Magdalena Armendáriz Ontiveros
Coordinador de Ingeniería en Biociencias

“Amor, Orden y Progreso”

Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900
Teléfono: 7717172000 Ext. 50901
esap@uaeh.edu.mx



2025



uaeh.edu.mx



Asunto: Constancias de Asesoría de Tesis.

A quien corresponda

P R E S E N T E

Por medio de la presente, se hace constar que la **Maestra en Ciencias Araceli Elvira Dávalos Rodríguez**, integrante del Laboratorio de Ingeniería Genómica del Centro de Ciencias Genómicas (CCG), participó como asesora externa en el desarrollo del trabajo de tesis de la estudiante **Sherline Miguel Nicolás**. Quien presentó su examen profesional en el mes de junio de 2026, en la Escuela Superior de Apan-UAEH, defendiendo la tesis titulada: **"Inferencia genómica del resistoma de cobre de *Methylobacterium radiotolerans* MLP1 y diseño de mutaciones en los genes *copA1* Y *copA2*"**. Para optar por el grado de Licenciada en Ingeniería en Biociencias, bajo la dirección del **Dr. Alejandro García de los Santos**, del CCG, y la codirección del **Dr. Martín Peralta Gil**, de la Escuela Superior de Apan de la UAEH.

La participación de la Mtra. Dávalos Rodríguez fue fundamental en el desarrollo experimental y la elaboración de la tesis. Su asesoría incluyó la capacitación en técnicas como el diseño de oligonucleótidos y mutaciones, la mutagénesis, la PCR, la purificación de plásmidos, la preparación de células competentes, las conjugaciones bacterianas y los análisis bioinformáticos, así como en el análisis e interpretación de los resultados obtenidos. Durante la redacción de la tesis, contribuyó a la estructura del documento, a la revisión e integración de la información científica, a la discusión de los resultados y a las conclusiones. Además, brindó apoyo en la preparación de la defensa mediante la revisión de la presentación y la orientación para responder a las preguntas del jurado.

La presente se extiende para los usos y fines que convengan a la interesada.

ATENTAMENTE

AMOR, ORDEN Y PROGRESO
Apan, Hidalgo; 02 de junio de 2026

M.C.E. Enrique Espinosa Aquino
Director de la Escuela Superior
de Apan

Dr. Martín Peralta G
Codirector de la tesis
Profesor Investigador T.C. "C", SNII



Carretera Apan - Calpulapan Km. 8, Colonia Chimalpa
Tlalayote, Apan, Hidalgo, México C.P. 43900
Teléfono: 7717172000 Ext. 50901
esap@uaeh.edu.mx

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a quienes creyeron en mi visión
incluso antes de que yo misma lo hiciera.

A Dios,

por guiarme, darme fuerza e iluminar mi camino durante
cada paso.

A mis amados padres,

por su apoyo y amor incondicional.

A mi abuelo Elías,

nunca se va del alma quien está en el corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro García de los Santos por brindarme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación. Su disposición para abrirme las puertas del laboratorio, así como permitirme aprender y colaborar en este proyecto que ha sido fundamental para mi formación profesional. Gracias por su confianza, apoyo y orientación durante ese tiempo.

Al Dr. Martín Peralta Gil por creer en mi potencial y brindarme su confianza incondicional. Aprecio profundamente la guía constante que me ofreció a lo largo de este proceso y le agradezco las herramientas y oportunidades que me permitieron alcanzar este objetivo.

A la maestra Araceli Dávalos, por recibirme, apoyarme y guiarme desde mi primer día en el laboratorio. Aprecio profundamente el conocimiento compartido, su paciencia inagotable y la fe que depositó en mi trabajo.

A mis padres, no existen palabras suficientes para agradecer todo el amor, esfuerzo y sacrificio que han hecho por mí. Gracias por sostenerme en los días difíciles, por celebrar conmigo cada logro por pequeño que sea y nunca dejar de creer en mis sueños. Todo lo que soy se lo debo a ustedes, a sus enseñanzas, su ejemplo de lucha y la inmensa fortaleza que siempre me transmitieron. Este logro no es solo mío, es nuestro, los amo.

A mi abuelo Elías, quien desde el cielo sigue guiando mis pasos. Agradezco tus enseñanzas, consejos, amor y el que seas una luz que ilumina constantemente mi vida. Deseo que dondequiera que estes te sientas orgulloso de la persona en la que me he convertido.

A mi hermano, Kaleb, es un orgullo verte crecer a mi lado, espero que este logro te sirva de recordatorio que con esfuerzo puedes alcanzar cualquier meta que te propongas.

A mis abuelos Julieta, Concepción y Pascasio, por su inmenso apoyo y amor. Gracias por cada consejo, cada palabra de aliento y sin duda por esos abrazos que

curan todo, por ser mis raíces y mi guía; su presencia en mi vida es de los regalos mas grandes. Con profundo amor, gratitud y admiración les dedico este trabajo.

A mis amigos, con quienes he compartido alegrías, desvelos y aprendizajes los cuales hicieron más ligera cada parte de esta etapa, los aprecio mucho y les deseo éxito en todo lo que se propongan.

A Sherline del pasado, por empezar este viaje llena de dudas y miedos, gracias por no rendirte, por perseguir tus metas y por demostrarte de lo que eres capaz cuando confías en ti.

RESUMEN

Methylobacterium radiotolerans MLP1 es una bacteria Gram negativa con alta tolerancia a cobre, aislada de la mina inactiva “La Prieta”, en Chihuahua, México. Aunque se han descrito diversos mecanismos bacterianos de homeostasis y resistencia al cobre, los mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia de esta cepa aún no han sido completamente esclarecidos. El objetivo de este trabajo fue inferir genómicamente el resistoma de cobre de *M. radiotolerans* MLP1 y evaluar la participación de los genes *copA1* y *copA2* en los mecanismos de tolerancia al cobre mediante estrategias de mutagénesis y complementación heteróloga. Para ello, se realizó un análisis bioinformático del genoma completo de la cepa, identificando genes asociados a homeostasis metálica, particularmente ATPasas tipo P1B-1 (Cu-ATPasas), además de proteínas accesorias como *copZ* y el regulador transcripcional *cueR*. Posteriormente, se llevaron a cabo dos tipos de mutagénesis, aleatoria mediante Tn5 y sitio-dirigida por inserción de vector en los genes *copA1* y *copA2*, así como ensayos de complementación heteróloga en cepas sensibles al cobre.

Los resultados mostraron que *M. radiotolerans* MLP1 presenta una elevada tolerancia al cobre en comparación con otras cepas de referencia, alcanzando una concentración letal media de 4.5 mM de CuCl₂. En contraste, la mutante generada por interrupción del gen *copA1* presentó una disminución significativa en la tolerancia, registrando una concentración letal media de 0.14 mM de CuCl₂. Asimismo, la expresión heteróloga de los genes *copA1* y *copA2* en cepas filogenéticamente relacionadas permitió incrementar la resistencia al cobre, evidenciando su papel funcional en la detoxificación metálica.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que los genes *copA1* y *copA2* participan de manera importante en el sistema de homeostasis y resistencia al cobre de *M. radiotolerans* MLP1, contribuyendo a la capacidad adaptativa de esta bacteria frente a ambientes con altas concentraciones de metales pesados. Estos hallazgos

aportan información relevante para la comprensión de los mecanismos bacterianos de tolerancia a metales y representan una base potencial para futuras aplicaciones biotecnológicas orientadas a procesos de biorremediación.

ABSTRACT

Methylobacterium radiotolerans MLP1 is a Gram-negative bacterium with high copper tolerance, isolated from the inactive “La Prieta” mine in Chihuahua, Mexico. Although several bacterial mechanisms involved in copper homeostasis and resistance have been described, the molecular mechanisms associated with copper tolerance in this strain have not yet been fully elucidated. The aim of this study was to genomically infer the copper resistome of *M. radiotolerans* MLP1 and evaluate the involvement of the *copA1* and *copA2* genes in copper tolerance mechanisms through mutagenesis and heterologous complementation strategies. To achieve this, a bioinformatic analysis of the complete genome of the strain was performed, identifying genes associated with metal homeostasis, particularly P1B-1-type ATPases (Cu-ATPases), as well as accessory proteins such as *copZ* and the transcriptional regulator *cueR*. Subsequently, random mutagenesis using Tn5 and site-directed mutagenesis by vector insertion into the *copA1* and *copA2* genes were carried out, along with heterologous complementation assays in copper-sensitive strains.

The results showed that *M. radiotolerans* MLP1 exhibits high copper tolerance compared to other reference strains, reaching a median lethal concentration of 4.5 mM CuCl₂. In contrast, the mutant generated by disruption of the *copA1* gene exhibited a significant decrease in tolerance, showing a median lethal concentration of 0.14 mM CuCl₂. Likewise, heterologous expression of the *copA1* and *copA2* genes in phylogenetically related strains increased copper resistance, demonstrating their functional role in metal detoxification.

Overall, the obtained results indicate that the *copA1* and *copA2* genes play an important role in the copper homeostasis and resistance system of *M. radiotolerans* MLP1, contributing to the adaptive capacity of this bacterium in environments with high concentrations of heavy metals. These findings provide relevant information for understanding bacterial metal tolerance mechanisms and

represent a potential basis for future biotechnological applications focused on bioremediation processes.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Contaminación por metales pesados y adaptación microbiana al cobre	1
1.2 Mecanismos microbianos de resistencia y homeostasis a metales pesados	3
1.3 Sistemas bacterianos de transporte y expulsión de metales pesados	4
1.4 Importancia biológica del cobre en microorganismos	7
1.5 Regulación genética y mecanismos bacterianos de homeostasis del cobre	8
1.6 Sistemas bacterianos de homeostasis y detoxificación del cobre	10
1.7 Generalidades del género <i>Methylobacterium</i>	13
1.8 Estudio de resistencia a bacterias del género <i>Methylobacterium</i>	14
2. ANTECEDENTES.....	16
2.1 Mecanismo de interacción y desintoxicación en <i>Bacillus subtilis</i>	16
2.2 Tolerancia a cobre y simbiosis en <i>Rhizobium tropici</i>	17
2.3 Resistoma de flujo de cobre y mecanismos de hipertolerancia en la bacteria ambiental <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1.....	17
2.4 La función de <i>copA</i> en el sistema de eflujo de cobre en <i>Acinetobacter baumannii</i>	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPOTESIS.....	20
5. OBJETIVOS	21
6. METODOLOGÍA.....	22
6.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo	22
6.2 Identificación <i>in silico</i> de las Cu-ATPasas identificadas en el genoma de <i>M. radiotolerans</i> MLP1	27
6.3 Mutagénesis aleatoria mediante Tn5	28
6.4 Mutagénesis sitio-dirigida de <i>copA1</i> y <i>copA2</i> y posterior clonación en el vector pK18mobsac	31
6.5 Complementación heteróloga de la mutante <i>R. etli</i> CE3/ <i>actp::Ω</i> Sp, sensible a 20 µM de CuCl ₂	36

7. RESULTADOS Y DISCUSION	39
7.1 Identificación de las Cu-ATPasas mediante anotación genómica	39
7.2 Mutagénesis al azar con Tn5 en <i>M. radiotolerans</i> MLP1 y evaluación de la eficiencia de transposición.....	45
7.3 Mutagénesis sitio dirigida de los genes <i>copA1</i> y <i>copA2</i> en <i>M. radiotolerans</i> MLP1 mediante el vector pK18mobsac	46
7.4 Complementación heteróloga de la mutante <i>R. etli</i> CE3/ <i>actp::Ω</i> Sp, sensible a 20 µM de CuCl ₂	50
8. CONCLUSIONES	55
9. REFERENCIAS	56
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	vii
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	viii
ANEXOS	xi
1. Medios de Cultivo	xi
2. Estriado para obtener colonias aisladas.	xii
3. Solución Tween 100 mL.....	xiii
4. Solución de Mg-Tween 500 ml	xiii
5. Solución Xgal (40 mg/ml).....	xiv
6. Solución IPTG (40 mg/ml).....	xiv

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación por metales pesados y adaptación microbiana al cobre

Los metales de transición desempeñan un papel fundamental en los sistemas biológicos, ya que diversos iones metálicos como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y Mn^{2+} actúan como micronutrientes esenciales requeridos en concentraciones traza para el correcto funcionamiento celular. Estos elementos participan en procesos de catálisis enzimática, transferencia electrónica y mantenimiento estructural de proteínas; sin embargo, cuando se encuentran en concentraciones elevadas pueden volverse altamente tóxicos, por lo que las células deben desarrollar mecanismos capaces de expulsarlos, transformarlos o secuestrarlos para disminuir su toxicidad (Cheruiyot, 2013).

En las últimas décadas, diversas actividades antropogénicas, particularmente las relacionadas con la industria, la minería y la agricultura intensiva, han incrementado considerablemente la concentración de metales pesados en ecosistemas donde anteriormente se encontraban en niveles mínimos o incluso ausentes. Como consecuencia, elementos como Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{6+} , Zn^{2+} , Cr^{6+} , Cd^{2+} , Ag^{+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} se han convertido en importantes contaminantes ambientales, afectando principalmente suelos y cuerpos de agua (Mireles *et al.*, 2004; Fritsch *et al.*, 2010). Esta acumulación de metales representa un problema ambiental de gran relevancia debido a su persistencia, capacidad de bioacumulación y efectos tóxicos sobre los organismos vivos.

Entre estos metales, el cobre destaca por su importancia biológica y su elevada reactividad química. La capacidad del cobre para alternar entre los estados de oxidación Cu(I) y Cu(II) , se facilita por la baja barrera energética entre ambas configuraciones electrónicas, constituye la base de su participación en reacciones de transferencia electrónica y catálisis redox esenciales para numerosos procesos biológicos. Debido a esta propiedad, el cobre actúa como cofactor de diversas

enzimas involucradas en la respiración celular, detoxificación de radicales libres, metabolismo del hierro y múltiples procesos de oxidación-reducción (Harris, 2001; Osman & Cavet, 2008).

No obstante, aunque el cobre es un micronutriente indispensable para la mayoría de los organismos, concentraciones elevadas del metal pueden generar efectos tóxicos debido a su capacidad para catalizar la formación de especies reactivas de oxígeno mediante reacciones tipo Fenton, ocasionando daño oxidativo en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Stohs & Bagchi, 1995). Como consecuencia, numerosos microorganismos, plantas y organismos superiores han desarrollado complejos mecanismos de homeostasis y resistencia para regular la captación, almacenamiento y expulsión del cobre intracelular, manteniendo concentraciones compatibles con la viabilidad celular (Nies, 2003; Rensing & Grass, 2003).

La presencia de concentraciones elevadas de metales en el suelo altera significativamente la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas. Diversos estudios han documentado una disminución de la biomasa microbiana, así como modificaciones en la diversidad y composición de las comunidades bacterianas, favoreciendo la selección de microorganismos resistentes a metales. Este proceso adaptativo conduce progresivamente a una reducción en la diversidad genética de la microbiota del suelo y puede afectar procesos ecológicos esenciales relacionados con el reciclaje de nutrientes y la productividad del ecosistema (Sandaa *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2006; Giller *et al.*, 2009).

En respuesta a estas condiciones de estrés, numerosos microorganismos han desarrollado mecanismos especializados de resistencia y homeostasis metálica que les permiten sobrevivir en ambientes contaminados. Dichos mecanismos incluyen sistemas de expulsión activa de metales, proteínas secuestradoras, enzimas detoxificadoras y respuestas antioxidantes que disminuyen el daño celular inducido por el exceso de metales. Por ello, el estudio de bacterias capaces de

tolerar altas concentraciones metálicas resulta de gran interés, tanto para comprender los procesos de adaptación microbiana como para el desarrollo de estrategias biotecnológicas orientadas a la biorremediación de suelos contaminados.

1.2 Mecanismos microbianos de resistencia y homeostasis a metales pesados

Como respuesta a la presión selectiva generada por la acumulación de metales pesados en el ambiente, los microorganismos han desarrollado una amplia diversidad de mecanismos de resistencia y homeostasis que les permiten sobrevivir y adaptarse a condiciones tóxicas. Estos mecanismos pueden clasificarse, de manera general, en sistemas de resistencia específica e inespecífica.

Los mecanismos de resistencia específica involucran genes cuya expresión es inducida directamente por la presencia de metales pesados y que codifican proteínas efectoras o reguladoras especializadas en detoxificación, transporte o secuestro metálico. Por otro lado, los mecanismos inespecíficos corresponden a respuestas celulares indirectas frente al estrés generado por el exceso de metales, entre las que destacan la síntesis de glutatión, tiorredoxinas, glutaredoxinas, sideróforos y proteínas asociadas al estrés oxidativo, como catalasas y superóxido dismutasas, además de ciertos polisacáridos extracelulares que contribuyen a disminuir la toxicidad metálica.

De manera más específica, Marrero-Coto *et al.* (2010) clasificaron los mecanismos de resistencia bacteriana a metales en tres grupos principales. El primero incluye componentes celulares capaces de capturar y secuestrar iones metálicos, neutralizando así su toxicidad. Estos mecanismos pueden involucrar polímeros estructurales, compuestos extracelulares o proteínas con alta afinidad por los metales. Entre los ejemplos más representativos se encuentran la proteína de unión a plata SilE, los sistemas de unión a cobre *copABCD* y CopH, así como la

chaperona CopZ de *Enterococcus hirae* y la metalotioneína SmtA, las cuales participan en el secuestro intracelular de metales.

El segundo grupo corresponde a enzimas que modifican el estado redox de metales y metaloides, transformándolos en formas químicamente menos tóxicas. Estas reacciones incluyen procesos de oxidación, reducción y metilación. Un ejemplo ampliamente estudiado es la cromato reductasa de *Pseudomonas ambigua*, enzima capaz de reducir Cr(VI) a Cr(III), disminuyendo su solubilidad y toxicidad.

Finalmente, el tercer grupo está conformado por transportadores localizados en la membrana celular que expulsan activamente las especies tóxicas fuera del citoplasma. La mayoría de estos sistemas pertenecen a familias especializadas como las ATPasas tipo P, los sistemas RND (Resistance-Nodulation-Division) y los facilitadores de difusión de cationes (CDF, Cation Diffusion Facilitator) (Legatzki et al., 2003) (Fig. 1). Estos sistemas desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis metálica y representan uno de los principales mecanismos de tolerancia bacteriana frente a concentraciones elevadas de metales pesados.

1.3 Sistemas bacterianos de transporte y expulsión de metales pesados

Entre los mecanismos de resistencia más importantes desarrollados por las bacterias destacan los sistemas de transporte y expulsión de metales pesados, los cuales permiten mantener la homeostasis intracelular y disminuir la acumulación de especies tóxicas en el citoplasma. Estos sistemas incluyen principalmente ATPasas tipo P, transportadores de la familia RND (Resistance-Nodulation-Division) y facilitadores de difusión de cationes (CDF, Cation Diffusion Facilitator), además de otras familias especializadas en el transporte de metales específicos (Fig. 1).

Las ATPasas tipo P constituyen uno de los principales sistemas involucrados en la detoxificación y homeostasis de metales pesados. Estas proteínas transportadoras utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para movilizar cationes inorgánicos a través de la membrana celular, ya sea importándolos desde el periplasma hacia el citoplasma o exportándolos en dirección contraria. Entre sus principales sustratos se encuentran H(I), Na(I), K(I), Mg(II), Ca(II), Cu(I), Ag(I), Zn(II) y Cd(II) (Saier, 2006).

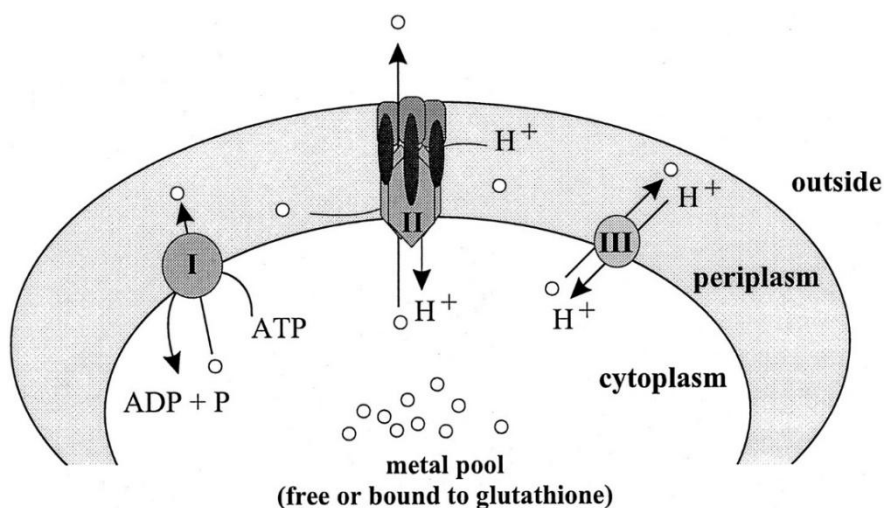


Figura 1. Principales sistemas de expulsión de iones metálicos. I) ATPasas tipo P, II) Sistemas RND y III) Facilitadores de difusión (CDF) (Legatzki *et al.*, 2003).

En *Escherichia coli*, las ATPasas tipo P relacionadas con el transporte de cobre presentan una estructura compleja compuesta por ocho segmentos transmembranales localizados en la región amino terminal. Estas proteínas contienen dominios especializados de unión a metales ubicados principalmente en los segmentos transmembranales cuatro y cinco, conectados a dominios conservados de fosforilación localizados en el citoplasma. Asimismo, poseen motivos conservados ricos en cisteína, prolina, tirosina y asparagina, los cuales participan directamente en la coordinación y transporte del cobre. Los dominios responsables de la unión e hidrólisis de ATP contienen secuencias conservadas de

histidina-prolina esenciales para la actividad catalítica de estas proteínas transportadoras (Marrero & Fando, 2008).

Otro sistema ampliamente distribuido en bacterias corresponde a la familia RND (Resistance-Nodulation-Division), integrada por proteínas involucradas en resistencia a metales pesados, procesos de nodulación y división celular. Los sistemas RND forman complejos tripartitos constituidos por una proteína transportadora localizada en la membrana interna, una proteína de fusión periplásmica (MFP) y un factor de membrana externa (OMF). Esta organización estructural genera un canal continuo que atraviesa toda la envoltura celular bacteriana, permitiendo la expulsión directa de compuestos tóxicos desde el citoplasma hacia el exterior celular (Fig. 1)

Uno de los modelos mejor caracterizados corresponde al sistema CzcABC presente en el plásmido pMOL30 de *Cupriavidus metallidurans* CH34, el cual participa en la resistencia a cobalto, zinc y cadmio. Este sistema constituye un modelo funcional importante para comprender los mecanismos de exportación activa de cationes metálicos mediados por transportadores RND (Marrero & Fando, 2008).

Por otra parte, los miembros de la familia CDF (Cation Diffusion Facilitator) representan los principales transportadores de zinc tanto en organismos procariontes como eucariontes, aunque también se han descrito proteínas especializadas en el transporte de níquel, cobalto, hierro y cadmio (Fig. 1). A diferencia de las ATPasas tipo P, el transporte mediado por proteínas CDF depende de gradientes quimiosmóticos de protones o potasio. En general, los genomas bacterianos contienen un número reducido de transportadores CDF; sin embargo, estos desempeñan funciones importantes en la tolerancia metálica. Un ejemplo representativo es la proteína CzcD de *C. metallidurans*, implicada en resistencia a Zn, Co y Cd (Alonso, 2007; Cervantes *et al.*, 2006).

Además de estas familias principales, se han descrito otros sistemas de expulsión de metales pesados menos estudiados, entre ellos la familia de transportadores NiCoT, especializada en el transporte de níquel y cobalto. Uno de los miembros mejor caracterizados es la proteína RcnA de *E. coli*, involucrada en la expulsión de níquel y en la resistencia celular frente a este metal (Rodríguez *et al.*, 2005).

1.4 Importancia biológica del cobre en microorganismos

El cobre es un micronutriente esencial para la mayoría de los microorganismos debido a su participación en procesos metabólicos fundamentales relacionados con la respiración celular, el metabolismo energético y la respuesta al estrés oxidativo. La importancia biológica de este metal radica en su capacidad para alternar reversiblemente entre los estados de oxidación Cu(I) y Cu(II), propiedad que le permite actuar como un cofactor eficiente en reacciones de transferencia electrónica y catálisis óxido-reducción (Djoko, 2015). Gracias a esta característica, el cobre forma parte de numerosas cuproproteínas y sistemas enzimáticos indispensables para la viabilidad celular.

Las proteínas dependientes de cobre, conocidas como cuproproteínas o cupredoxinas, participan en funciones biológicas esenciales como la transferencia de electrones, la reducción de oxígeno molecular y diversos procesos catalíticos asociados al metabolismo respiratorio (Crichton & Pierre, 2001; Rubino & Franz, 2012). Entre las más importantes destacan las multicobre-oxidasas, las citocromo-c oxidasas, las nitrito-reductasas y las superóxido-dismutasas dependientes de cobre, involucradas en procesos de respiración celular, metabolismo del nitrógeno y detoxificación de especies reactivas de oxígeno.

En bacterias Gram negativas, muchas de estas enzimas se localizan en el espacio periplásmico o asociadas a la membrana citoplasmática, lo que constituye una estrategia adaptativa para limitar la acumulación de cobre libre en el citoplasma y disminuir sus efectos tóxicos (Rademacher & Masepohl, 2012). El periplasma

funciona como una zona de amortiguamiento donde el cobre puede ser secuestrado, almacenado o incorporado selectivamente a proteínas dependientes del metal, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis intracelular (Osman & Cavet, 2008).

La funcionalidad de las cuproproteínas depende de la interacción del cobre con residuos aminoacídicos específicos, principalmente histidina, cisteína y metionina, los cuales modulan sus propiedades catalíticas y de transferencia electrónica (Fraústo da Silva & Williams, 2001). Entre las proteínas de cobre más estudiadas destacan las proteínas tipo I (T1Cu), también conocidas como proteínas de cobre azul, especializadas en transferencia electrónica durante la respiración y fotosíntesis bacteriana. Asimismo, las proteínas tipo II (T2Cu) y tipo III (T3Cu) participan en procesos oxidativos y reacciones de detoxificación celular.

No obstante, aunque el cobre es indispensable para numerosos procesos biológicos, concentraciones elevadas del metal pueden resultar tóxicas debido a la formación de especies reactivas de oxígeno que ocasionan daño oxidativo en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Stohs & Bagchi, 1995). Por ello, los microorganismos han desarrollado mecanismos especializados de homeostasis y resistencia que regulan estrictamente la captación, distribución y expulsión del cobre intracelular, manteniendo concentraciones compatibles con la viabilidad celular (Nies, 2003; Rensing & Grass, 2003).

1.5 Regulación genética y mecanismos bacterianos de homeostasis del cobre

En microorganismos, el cobre es un micronutriente esencial para diversos procesos metabólicos; sin embargo, su acumulación intracelular en concentraciones elevadas puede generar efectos tóxicos debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y al daño oxidativo sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Hodgkinson & Petris, 2012). La elevada reactividad redox del cobre,

particularmente del ion cuproso [Cu(I)], favorece reacciones tipo Fenton con peróxido de hidrógeno producido durante la respiración aerobia, incrementando el estrés oxidativo celular (Koppenol, 2001; Macomber & Imlay, 2009). Además, el cobre puede alterar la función de proteínas dependientes de hierro-azufre y desplazar metales esenciales de centros catalíticos, comprometiendo procesos metabólicos fundamentales (Macomber & Imlay, 2009).

Para mantener concentraciones compatibles con la viabilidad celular, las bacterias han desarrollado mecanismos especializados de homeostasis y detoxificación del cobre, basados principalmente en sistemas de transporte, proteínas quelantes y regulación genética de genes asociados a resistencia metálica. En bacterias gram negativas, estos mecanismos se encuentran organizados en la membrana citoplasmática y el espacio periplásmico, donde participan proteínas encargadas de la captación, distribución y expulsión del metal (Virieux-Petit *et al.*, 2022).

La regulación transcripcional de la homeostasis del cobre depende principalmente de reguladores metálicos sensibles a la concentración intracelular del ion cúprico o cuproso. Uno de los sistemas mejor caracterizados es CueR, un regulador perteneciente a la familia MerR, capaz de detectar incrementos intracelulares de cobre e inducir la expresión de genes relacionados con resistencia y detoxificación metálica, particularmente el gen *copA* (Rademacher & Masepohl, 2012).

El gen *copA* codifica una ATPasa tipo P1B localizada en la membrana citoplasmática, cuya función principal consiste en exportar iones Cu(I) desde el citoplasma hacia el periplasma utilizando energía derivada de la hidrólisis de ATP (Rosenzweig & Argüello, 2012). Estas ATPasas pertenecen a la familia P1B, ampliamente distribuida en microorganismos y especializada en el transporte de metales pesados (Argüello *et al.*, 2007). Estructuralmente, presentan entre seis y ocho segmentos transmembranales y contienen motivos conservados, como CXXC,

CPC y YN, implicados en la unión y translocación del cobre a través de la membrana celular (Fig.2)

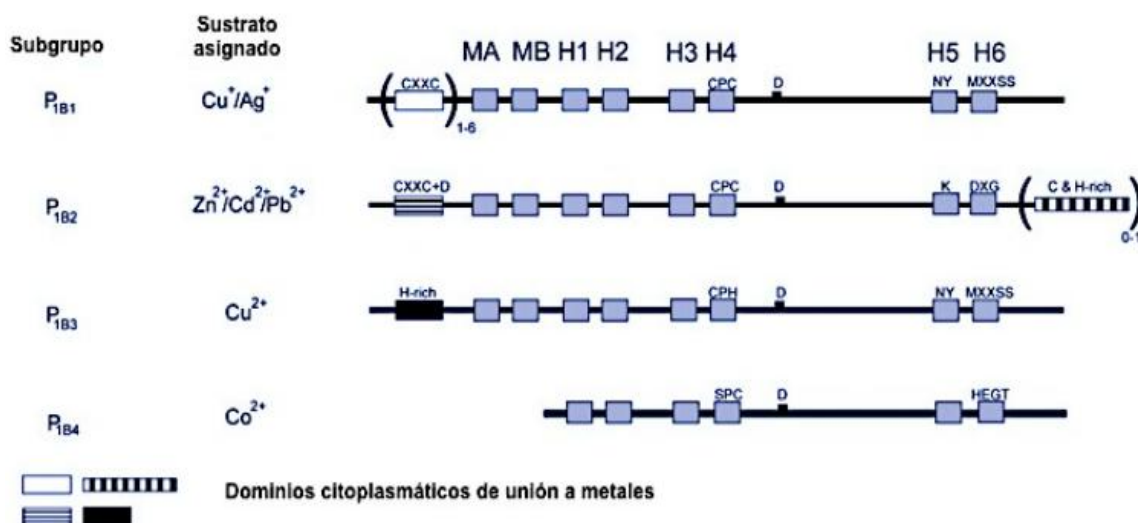


Fig. 2. Características estructurales de los subgrupos de ATPasas P1B. Los cuadros representan fragmentos transmembranales (MA, MB, H1-H6), y los rectángulos dominios citoplasmáticos de unión a metales, los cuales contienen aminoácidos invariables, involucrados en el pegado y transporte del metal. También se muestra el residuo de ácido aspártico (D) que se fosforila durante la catálisis. (Rosenzweig & Argüello, 2012).

1.6 Sistemas bacterianos de homeostasis y detoxificación del cobre

Los microorganismos han desarrollado diversos sistemas especializados para mantener la homeostasis del cobre y contrarrestar los efectos tóxicos derivados de su acumulación intracelular. Entre los mecanismos más importantes destacan las ATPasas tipo P1B, los sistemas de expulsión pertenecientes a la familia RND (Resistance-Nodulation-Division), las oxidasas multicobre y las proteínas periplásmicas de secuestro metálico. En conjunto, estos sistemas permiten regular la captación, distribución, oxidación y expulsión del cobre, favoreciendo la adaptación bacteriana a ambientes con concentraciones elevadas de este metal.

Las ATPasas P1B constituyen uno de los principales mecanismos de resistencia y homeostasis del cobre en bacterias. Dentro de esta familia, las ATPasas P1B-1 se especializan en el transporte de Cu(I), mientras que otros subgrupos, como P1B-3, participan en el transporte de Cu(II) y otros cationes metálicos (Delmar *et al.*, 2014). Estas proteínas transportadoras utilizan la energía derivada de la hidrólisis de ATP para exportar cobre desde el citoplasma hacia el periplasma o el exterior celular, evitando así la acumulación tóxica del metal (Fig. 3). La amplia distribución de estas ATPasas en microorganismos refleja la importancia evolutiva de los mecanismos de homeostasis metálica para la supervivencia bacteriana bajo condiciones de estrés por cobre.

Además de las ATPasas, diversas bacterias poseen el sistema CusCFBA, perteneciente a la familia de transportadores RND, el cual participa en la expulsión de cobre desde el citoplasma hacia el medio extracelular mediante un mecanismo de antiporte acoplado a protones (Rensing & McDevitt, 2013; Delmar *et al.*, 2014). Este sistema está integrado por cuatro proteínas: CusA, un transportador localizado en la membrana citoplasmática que contiene el sitio de unión al cobre; CusB, una proteína periplásmica que conecta estructuralmente a CusA con CusC; y CusC, una proteína localizada en la membrana externa que forma el canal de expulsión hacia el exterior celular (Fig.3). Adicionalmente, el sistema incluye a CusF, una proteína periplásmica encargada de captar y transferir Cu(I) hacia CusA, facilitando su eliminación (Fig.3). La expresión del operón *cusCFBA* es inducida por cobre mediante el sistema regulador de dos componentes CusRS (Magnani & Solioz, 2007), evidenciando una regulación genética altamente especializada en respuesta al estrés metálico.

Otro mecanismo importante de detoxificación bacteriana corresponde a las oxidasas multicobre, enzimas periplásmicas que contienen múltiples átomos de cobre y participan en la oxidación de Cu(I) hacia Cu(II), una forma menos reactiva y menos tóxica para la célula (Rademacher & Masepohl, 2012; Rensing & Grass, 2003). Estas enzimas también participan en procesos de oxidación de compuestos

fenólicos y mantenimiento del estado oxidado de complejos sideróforo-hierro, contribuyendo indirectamente a disminuir el estrés oxidativo asociado al cobre (Osman & Cavet, 2008).

Entre las oxidasas multicobre mejor caracterizadas destaca CueO de *E. coli*, cuya expresión es regulada por el activador transcripcional CueR, responsable también de inducir la expresión del gen *copA* en respuesta al incremento intracelular de cobre. La proteína CueO es exportada al periplasma mediante el sistema TAT (Twin Arginine Translocation), donde participa activamente en la oxidación de Cu(I). Estudios realizados en mutantes deficientes en CueO han demostrado una disminución significativa en la tolerancia bacteriana al cobre bajo condiciones aerobias, evidenciando la estrecha relación entre toxicidad del cobre y estrés oxidativo (Osman & Cavet, 2008).

Además de los sistemas de transporte y oxidación, algunas bacterias poseen proteínas periplásmicas con capacidad de secuestrar cobre libre y disminuir su toxicidad intracelular. Un ejemplo representativo es CopC, una proteína similar a las metalotioneínas que presenta afinidad tanto por Cu(I) como por Cu(II). Esta proteína contiene regiones especializadas en unión metálica localizadas en los extremos amino y carboxilo terminales, permitiendo estabilizar diferentes estados de oxidación del cobre y contribuir al mantenimiento de la homeostasis celular (Song *et al.*, 2014).

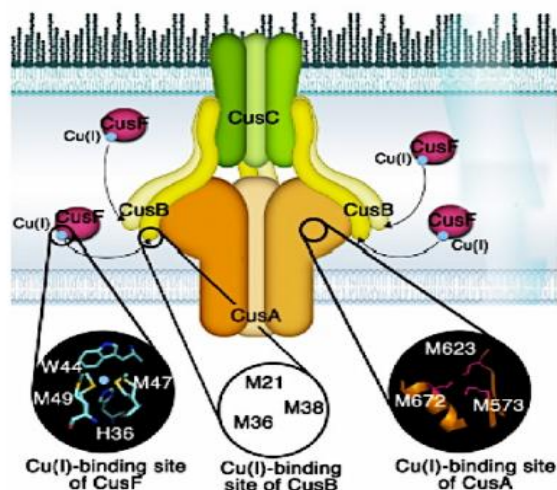


Fig.3 Modelo del complejo CusCFBA. Su función es detoxificar a la célula de los iones Cu^+ que se encuentran en exceso en el citoplasma y periplasma, obteniendo su energía mediante un gradiente de protones (Nies *et al.*, 2011)

1.7 Generalidades del género *Methylobacterium*

Methylobacterium es un género bacteriano perteneciente a la clase Alphaproteobacteria, orden Rhizobiales y familia Methylobacteriaceae, que cuenta actualmente con 52 especies publicadas válidamente, compuesto por bacterias gram negativas, estrictamente aerobias, con forma de bastón, las bacterias del género son conocidas como metilótrofas facultativas pigmentadas de color rosa (PPFM) por ser capaces de crecer en metanol y metilamina, así como en varios sustratos multicarbono, y por producir un carotenoide característico color rosa (Green y Ardley, 2018; Kutschera, 2008).

Los miembros del género están distribuidos en una amplia variedad de ambientes, tanto naturales, que incluyen aire, suelo, polvo, como artificiales, en sistemas de aire acondicionado y baños. Sin embargo, un ambiente notable de este género es en su asociación con plantas, donde se ha reportado que *Methylobacterium* puede colonizar la superficie de las hojas (epífita), los tejidos internos (endófito), y nódulos de muchas especies de plantas (Green y Ardley, 2018).

La asociación que *Methylobacterium* establece con las plantas se basa en una simbiosis, en la que *Methylobacterium* utiliza el metanol que emiten las plantas como su fuente de carbono y energía. En respuesta, *Methylobacterium* le proporciona beneficios a la planta, como la producción de sustancias que ayudan en su crecimiento, al liberar hormonas vegetales, como auxinas y citoquininas, aumentando la disponibilidad de nutrientes, generando una resistencia sistémica contra patógenos e incluso modulando la producción de etileno de la planta (Kutschera, 2007; Raja *et al.*, 2008).

Las bacterias del género *Methylobacterium* han sido reportadas en numerosas especies vegetales, como en trigo (Omer *et al.*, 2004), soja (Anda *et al.*, 2011), caña de azúcar (Andrade *et al.*, 2018), e incluso recientemente, se reporta como un género destacado en agaves y cactus, lo que destaca su presencia generalizada e importancia en plantas terrestres (Bustillos-Cristales *et al.*, 2017; Flores-Núñez *et al.*, 2020)

1.8 Estudio de resistencia a bacterias del género *Methylobacterium*

Cuando el cobre se encuentra en altas concentraciones en el suelo suele ser citotóxico para los microorganismos, ya que puede reducir la biodiversidad y limitar significativamente la reproducción, crecimiento y la actividad de las bacterias, por lo cual, los sistemas de resistencia para regular la homeostasis del Cu juegan un papel crucial en la tolerancia al metal en la mayoría de los organismos, estos mecanismos de homeostasis del cobre implican la absorción, expulsión, oxidación de Cu^+ a Cu^{2+} y secuestro del ión; también se presenta con frecuencia una respuesta adaptativa global que implica la síntesis de enzimas como la catalasa y superóxido dismutasa, las cuales disminuyen el exceso ROS inducidas por la intoxicación con Cu, sin embargo, los mecanismos utilizados y particularmente la coordinación de las respuestas reguladoras varían significativamente entre un organismo y otro.

Estudios genómicos previos han resaltado que uno de los principales mecanismos para lidiar con el exceso de cobre en *Methylobacterium* y *Rhizobium*, es la presencia de múltiples genes que codifican para ATPasas de tipo P_{1B} (Cubillas, Miranda-Sánchez *et al.*, 2017), aunado a ello, estudios biológicos previos, han reportado el papel de diversos genes que están implicados en procesos de respuesta al cobre.

2. ANTECEDENTES

El estudio de mecanismos homeostáticos de cobre en bacterias es un tema relativamente nuevo, por lo que en su mayoría solo ha sido estudiado en organismos modelo siendo los géneros *Bacillus* y *Rhizobium* aquellos que de los que mayor información se posee.

2.1 Mecanismo de interacción y desintoxicación en *Bacillus subtilis*

Un estudio inicial realizado por Banci, *et al.* (2001) se analizó la dinámica de la proteína CopZ de *Bacillus subtilis* en su estado libre de metal mediante el uso de RMN (Resonancia Magnética Nuclear). Este análisis contribuyó a la identificación del sitio de unión a cobre, el cual se encuentra localizado en el primer bucle de la proteína y contiene un motivo altamente conservado por dos cisteínas separadas por dos aminoácidos, los cuales funcionan como ligando principales para coordinar los iones de cobre dentro de la célula. Asimismo, los estudios de relajación de nitrógeno-15 revelaron que la región que comprende este bucle de unión y la primera hélice alfa posee una notable flexibilidad estructural en estado libre, facilitando el reconocimiento molecular y posterior transferencia del metal hacia la ATPasa *copA* encargada de la expulsión de cobre.

Más adelante en 2003, analizó la interacción entre *copZ* citoplasmática y el dominio N-terminal de la ATPasa *copA* de *Bacillus subtilis* mediante RMN a través de experimentos HSQC (Coherencia Cuántica Única Heteronuclear), para de esta manera comprender el papel de las dos proteínas dentro del mecanismo de cobre en bacterias. Para observar su interacción, se propuso un modelo estructural, asimismo, fueron reportados los estudios de movilización de N sobre las proteínas libres y su complejo.

Finalmente, a partir de los datos recabados fue posible determinar que el cobre se transfiere en gran medida de *copZ* a *copA*, lo cual sugiere su posible participación en un proceso de desintoxicación, asimismo, se concluyó que esta

clase de proteínas está involucrada en la homeostasis de cobre, sin embargo, sus roles pueden variar de acuerdo a la especie.

2.2 Tolerancia a cobre y simbiosis en *Rhizobium tropici*

El trabajo realizado por Elizalde-Díaz *et al.* (2019) donde se reportó que la cepa *Rhizobium tropici* CIAT899 era capaz de hacer frente a concentraciones estresantes de Cu^{2+} evaluando como afecta esto en su relación simbiótica con las plantas de frijol. Es por ello que a través de una mutagénesis aleatoria empleando el transposón Tn5 se interrumpió el gen *RTCIAT899_CH17575*, el cual codifica para el flujo de metales pesados en la ATPasa tipo P1B1 designada como *copA*. Como resultado de la mutación realizada se vio afectado el crecimiento de la planta, así como su simbiosis, reflejándose en una reducción drástica en el peso seco de la planta y en los nódulos radiculares, así como en la actividad nitrogenasa. Este trabajo validó experimentalmente la función de mecanismos mediante pruebas de complementación genética en las que se reintrodujo el gen *copA* funcional en la cepa mutante, recuperando por completo su tolerancia al metal y restaurando los fenotipos simbióticos normales del frijol. Finalmente se concluyó que el gen *copA* es esencial para que *R. tropici* CIAT899 sobreviva en ambientes ricos en cobre en vida libre.

2.3 Resistoma de flujo de cobre y mecanismos de hipertolerancia en la bacteria ambiental *Methylobacterium extorquens* AM1

El estudio realizado por Dávalos (2023) evalúa la tolerancia a cobre en bacterias del orden Rhizobiales con el fin de entender como la contaminación agrícola por este metal fomenta la resistencia ambiental. Para llevar a cabo el estudio, se midió la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de cloruro de cobre (CuCl_2) en diversas cepas, sin embargo, se inclinaron por *Methylobacterium extorquens* AM1 debido a su alta resistencia. De acuerdo con los resultados obtenidos, se encontró que las bacterias metilotrofas poseen una mayor tolerancia

en comparación con las asociadas a plantas, destacando *M. extoquens* AM1 con una capacidad de 1.9mM. El análisis bioinformático reveló que la presencia de múltiples bombas de expulsión de cobre (Cu-ATPasas) es una característica común en ese orden bacteriano, asimismo, reveló que esta cepa se encuentra codificada por sistemas CusABC y chaperonas CopZ para expulsar el metal, así como enzimas relacionadas con la transferencia horizontal de genes y elementos genéticos móviles. De esta manera, se demuestra que los aislados bacterianos expuestos a entornos ricos en metales pueden desarrollar un complejo sistema de resistencia que podría comprometer la eficacia de los tratamientos antimicrobianos basados en cobre implementados en el ámbito clínico.

2.4 La función de *copA* en el sistema de eflujo de cobre en *Acinetobacter baumannii*

Se conoce que la investigación de Alquethamy, *et al.* (2019) parte de una infección el sistema inmunitario y emplea el cobre como un agente bactericida dentro de fagosomas de los macrófagos para intoxicar a los patógenos invasores. Mediante análisis bioinformáticos y genéticos, los autores identificaron que *A. baumannii* posee un sistema de expulsión denominado *copA*. Al generar mutantes deficientes de este gen, los investigadores demostraron que *copA* es el transportador primario indispensable para la supervivencia celular ante el estrés por cobre, ya que en su ausencia provoca una acumulación masiva del metal en el citoplasma. Posteriormente, con el modelo de neumonía murina se comprobó que la cepa presenta una capacidad de colonización significativamente menor en el tracto respiratorio y los pulmones en comparación con la cepa silvestre. Con este estudio se confirmó que el sistema *copA* es un factor de virulencia esencial que permite a la bacteria evadir las defensas inmunológicas del hospedero, posicionando a estos transportadores de metales como blancos terapéuticos alternativos.

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación por metales pesados, particularmente por cobre, representa un problema ambiental importante debido al uso excesivo de compuestos a base de este metal en actividades agrícolas, mineras e industriales. El empleo indiscriminado de pesticidas, fungicidas y fertilizantes que contienen cobre, así como el riego de suelos agrícolas con aguas contaminadas por desechos de la industria mineras y municipales, ha favorecido la acumulación de este metal en distintos ecosistemas, afectando la microbiota y alterando el equilibrio ambiental.

En este contexto, *M. radiotolerans* MLP1 destaca por su capacidad de crecer y sobrevivir en ambientes con altas concentraciones de cobre; sin embargo, los mecanismos moleculares que le permiten adaptarse y tolerar este metal aún no han sido completamente identificados ni caracterizados. Estudios bioinformáticos derivados del análisis de su genoma sugieren la presencia de genes potencialmente involucrados en la resistencia al cobre, entre ellos *copA1* y *copA2*, los cuales podrían desempeñar un papel importante en los procesos de homeostasis y detoxificación celular.

Con base en estas predicciones, el presente trabajo se enfoca en la identificación y caracterización funcional de los genes relacionados con la resistencia al cobre en *M. radiotolerans* MLP1, con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de tolerancia a metales pesados en bacterias ambientales. Asimismo, mediante la mutación y transferencia de estos genes a cepas filogenéticamente cercanas, se busca evaluar su participación en el incremento de la tolerancia al cobre.

Los resultados obtenidos podrían contribuir al desarrollo de estrategias biotecnológicas orientadas a la biorremediación de suelos contaminados con cobre, utilizando microorganismos con capacidad de sobrevivir y adaptarse a ambientes con altas concentraciones de este metal.

4. HIPOTESIS

La elevada tolerancia al cobre observada en *M. radiotolerans* MLP1 está determinada por un resistoma especializado constituido principalmente por las ATPasas tipo P1B-1 codificadas por los genes *copA1* y *copA2*, así como por proteínas asociadas a la homeostasis y detoxificación de cobre, incluyendo multicobre oxidasas y proteínas secuestradoras de cobre. La alteración funcional de *copA1* y *copA2* disminuirá significativamente la resistencia al cobre, mientras que su transferencia heteróloga a cepas filogenéticamente cercanas incrementará su tolerancia al metal.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar y caracterizar funcionalmente los genes *copA1* y *copA2* del resistoma de cobre inferidos a partir de la secuencia genómica de *Methylobacterium radiotolerans* MLP1, mediante análisis bioinformáticos, mutagénesis y transferencia genética a cepas filogenéticamente cercanas, para comprender su participación en los mecanismos de homeostasis y resistencia al cobre.

5.2 Objetivos particulares

- Identificar los genes relacionados con la resistencia al cobre en *M. radiotolerans* MLP1, mediante análisis bioinformáticos de la secuencia genómica, para inferir los posibles mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia a este metal.
- Evaluar la tolerancia al cobre de *M. radiotolerans* MLP1 y de cepas filogenéticamente cercanas, mediante ensayos de crecimiento en diferentes concentraciones de cobre, para comparar sus niveles de resistencia al metal.
- Generar y caracterizar mutaciones en los genes *copA1* y *copA2*, mediante técnicas de mutagénesis y análisis fenotípicos, para determinar la participación de estos genes en la resistencia al cobre.
- Transferir los genes mutados *copA1* y *copA2* a cepas filogenéticamente cercanas, mediante complementación heteróloga, para evaluar su efecto en el incremento de la tolerancia al cobre.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados durante el presente trabajo se muestran en las tablas 1 y 2. Las cepas de *M. radiotolerans* MLP1 y aquellas del género *Rhizobium* se cultivaron en medio PY (Peptone-Yeast) y se cultivaron a una temperatura de 30 °C. Por otra parte, las cepas de *E. coli* y sus derivadas fueron cultivadas en medio LB (Lysogeny Broth) a 37°C. Cuando las condiciones lo requirieron, se adicionó antibiótico a los medios de cultivo con las concentraciones plasmadas en la tabla 3.

6.1.1 Preparación de células competentes de *E. coli*

Las células competentes de *E. coli* DH5α se prepararon con el objetivo de facilitar la introducción de ADN plasmídico mediante transformación bacteriana. Para su obtención, se partió de un cultivo bacteriano crecido durante la noche (ON, del inglés overnight) en medio LB líquido. Este cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento, la cual se alcanzó al inocular 2 mL del cultivo ON en 200 mL de medio LB e incubarlo a 37 °C durante una hora. Enseguida, la muestra se distribuyó en cuatro tubos de dilución y se centrifugó durante 20 minutos a 6000 rpm. Más adelante, se descartó el sobrenadante y se añadieron 15 µL de buffer Tris-Borato-Formamida (TBF) para resuspender el pellet. A continuación, las muestras se colocaron en hielo durante al menos 5 minutos y se centrifugaron nuevamente. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 5 mL de medio LB, se mantuvo en hielo y se reservó para su posterior uso en las transformaciones.

6.1.2 Transformación bacteriana para la introducción de ADN exógeno

La figura 4 muestra de manera esquemática el proceso de transformación bacteriana utilizado para la introducción de ADN exógeno en células bacterianas. Este mecanismo de transferencia horizontal permite incorporar plásmidos recombinantes que contienen genes de interés y marcadores de selección. El procedimiento inicia con la preparación de células competentes, las cuales se cultivan hasta la fase logarítmica temprana y luego se sometieron a tratamientos físicos y químicos, como enfriamiento y exposición a cloruro de calcio, con el fin de aumentar la permeabilidad de la membrana celular y favorecer la entrada del ADN. Posteriormente, el ADN exógeno se mezcla con las células competentes y se induce su incorporación mediante choque térmico o electroporación. Una vez internalizado, el ADN puede mantenerse como un plásmido extracromosomal o integrarse al genoma bacteriano. Finalmente, las bacterias transformadas se seleccionan en medios de cultivo suplementados con el antibiótico correspondiente al marcador de resistencia presente en el ADN introducido, permitiendo el crecimiento exclusivo de las células que incorporaron exitosamente el material genético.

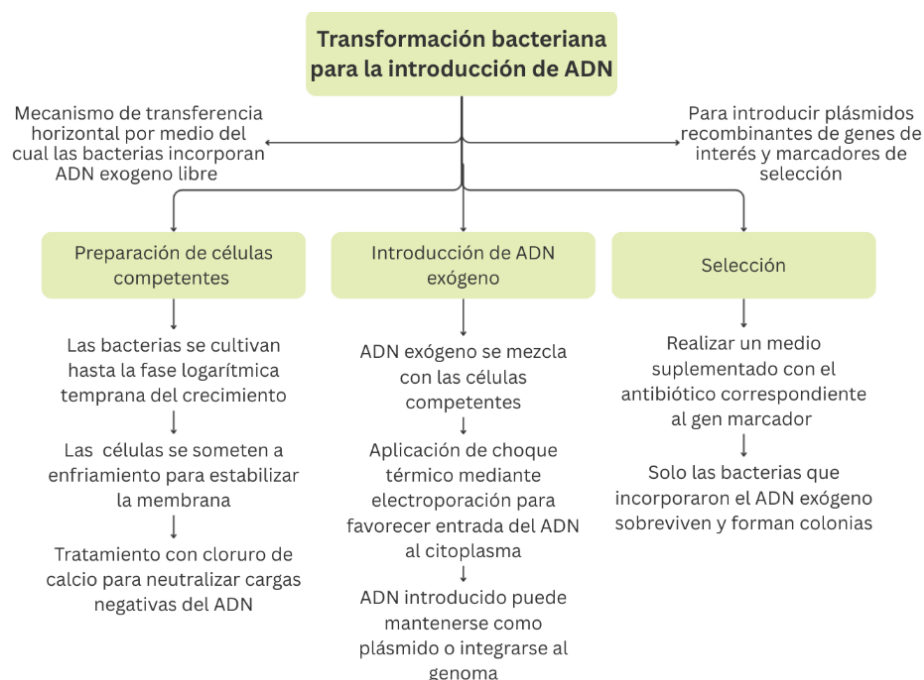


Figura 4. Esquema general del proceso de transformación bacteriana utilizado para la introducción de ADN exógeno en células competentes y la selección de bacterias transformadas mediante resistencia a antibióticos.

Tabla 1. Cepas usadas en este estudio.

Género	Especie	Genotipo relevante	Resistencia a antibiótico (µg/mL)
<i>Rhizobium</i>	<i>tropici</i>	CIAT 899 silvestre	Nal 20
<i>Rhizobium</i>	<i>tropici</i>	CIAT 899 <i>copA::Tn5</i>	Nal 20 Km 30
<i>Rhizobium</i>	<i>tropici</i>	CIAT 899 pK18:: <i>copA</i>	Km 30
<i>Rhizobium</i>	<i>tropici</i>	CIAT 899 pK18:: <i>copA</i> / pBBR-5:: <i>copA</i>	Km 30 Gm 30
<i>Rhizobium</i>	<i>tropici</i>	CIAT 899/pBBR-5	Nal 20 Gm 30
<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i>	CFN42 silvestre	Nal 20

<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i>	CFN42 <i>actP::ΩSp</i>	Sp 75 Nal 20
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	DH5α	Nal 20
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	DH5α pK18mobsac:: <i>copA1</i>	Nal 20 Km 30
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	DH5α pK18mobsac:: <i>copA1</i>	Nal 20 Km 30
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	S17-1	Gm 30
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	S17 DH5α::pKmobsac- <i>copA1</i>	Nal 20 Km 30 Gm30
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	S17 DH5α::pKmobsac- <i>copA2</i>	Nal 20 Km 30 Gm30
<i>Methylobacterium</i>	<i>radiotolerans</i>	MLP1 silvestre	Nal 20
<i>Methylobacterium</i>	<i>radiotolerans</i>	pK18mob	Nal 20 Neo 60
<i>Methylobacterium</i>	<i>radiotolerans</i>	S17 DH5α::pKmobsac- <i>copA2</i>	Nal 20 Km 30 Gm30
<i>Methylobacterium</i>	<i>radiotolerans</i>	S17 DH5α::pKmobsac- <i>copA2</i>	Nal 20 Km 30 Gm30

Tabla 2. Plásmidos y transposones utilizados en estos estudios.

Plásmido	Genotipo relevante	Resistencia a antibiótico (μg/mL)
pK18mobsac	Plásmido integrativo contiene genes <i>mob</i> , <i>sacB</i> , amplio rango de hospedero	Km 30

pBBR1MCS-5	Plásmido no integrativo, replica en amplio rango de hospederos	Gm30 Tc10
pRK2013	Contiene genes <i>tra</i> , <i>mob</i>	Km 30
pSRK	Contiene <i>oriT</i> , <i>mob</i> , marcador de resistencia	Gm30
pSUP2021-Tn5	Herramienta para mutagénesis por inserción de Tn5	Km 30 Nm30

Tabla 3. Antibióticos usados durante el presente estudio.

Antibiótico	Stock (mg/ml)	Disolvente	μL para 100 ml	Concentración final (μg/mL)
Neomicina (Neo)	60	H ₂ O	100	60
Ácido nalidíxico (Nal)	20	H ₂ O	100	20
Kanamicina (Km)	30	H ₂ O	100	30
Espectinomicina (Sp)	100	H ₂ O	100	100
Gentamicina (Gm)	20	H ₂ O	100	20
Kanamicina (Km)	30	H ₂ O	100	30
Tetraciclina (Tc)	10	Etanol 70%	100	10

6.2 Identificación *in silico* de las Cu-ATPasas identificadas en el genoma de *M. radiotolerans* MLP1

El acceso al genoma de la cepa *M. radiotolerans* MLP1 se llevó a cabo mediante el uso de bases de datos públicas de secuencias genómicas, principalmente del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). En primer lugar, se identificó el número de acceso de ensamblaje, el cual corresponde a JAPTHG010000000 asociado al proyecto de secuenciación de esta cepa. Posteriormente, dicho identificador fue ingresado en el portal NCBI Assembly (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly>), lo cual permitió acceder a la página específica del ensamblaje genómico de la cepa MLP1; así pues, mediante la plataforma se obtuvo la información general del genoma, incluyendo su estado de ensamblaje, tamaño y organismo de origen.

No obstante, la identificación de genes homólogos relacionados con la resistencia a metales en el genoma de *M. radiotolerans* MLP1 se realizó mediante la aplicación de protocolos de análisis comparativo complementario. En primera instancia, se efectuó una búsqueda de ATPasas tipo P en la lista del proteoma generada en NCBI durante la anotación del genoma. El acceso a la información proteómica se efectuó desde el apartado de anotación del genoma disponible en NCBI Assembly, donde se encuentra enlazada la lista de proteínas predichas durante el proceso de anotación automática. Este método se llevó a cabo mediante una lista en la que se usaron diversos términos con los cuales se nombra a la función; a continuación, se eliminaron las proteínas fuera del rango de entre 600 a 900 aminoácidos.

El segundo protocolo consistió en realizar una búsqueda de secuencias de aminoácidos homólogas por medio de la herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales BLASTP (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Se utilizó como proteína de búsqueda, la única Cu-ATPasa codificada en el genoma de *R. etli* CFN42 (WP_011427866.1), debido a la evidencia funcional previamente

demostrada por el fenotipo de sensibilidad a una solución de CuCl_2 20 μM de una mutante por interrupción del gene *copA* (*actP:: Ω Sp*). De las secuencias obtenidas se seleccionaron aquellas con un porcentaje de identidad con la proteína de búsqueda entre 70 y 90 %. Asimismo, se utilizó CD-search (NCBI) para verificar la presencia de dominios y aminoácidos invariables en Cu-ATPasas.

6.3 Mutagénesis aleatoria mediante Tn5

6.3.1 Análisis de la tolerancia a antibióticos de la cepa MLP1

Previo a la manipulación genética de la cepa MLP1, fue necesario conocer las resistencias a antibióticos que naturalmente existen en la cepa silvestre para poder planear la combinación de antibióticos adecuada para seleccionar mutantes y hacer complementaciones genéticas. Este protocolo comenzó con la propagación de la cepa *M. radiotolerans* MLP1 conservada viable y estable en glicerol estéril; se depositó una alícuota de glicerol de 10 μl en una caja de Petri con medio de cultivo PY (Anexo 1.1) adicionado de Nal 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Nal 20) y se realizó un estriado para obtener colonias aisladas (Anexo 2). La caja de PY propagada se incubó tres días a 30 °C.

Con posterioridad, la cepa crecida se propagó en medio PY líquido por 14 horas en agitación; de este cultivo se realizaron diluciones seriadas de 10^{-3} a 10^{-6} y se aplicaron gotas de 25 μl a cajas de medio PY con Nal 20 y cantidades crecientes de neomicina de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 65 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La incubación se realizó a 30°C.

6.3.2 Mutagénesis de *M. radiotolerans* MLP1 con el transposón Tn5

La mutagénesis insercional con el transposón Tn5 se realizó mediante conjugación bacteriana biparental utilizando como cepa donadora a *E coli* S17-1 portadora del transposón Tn5-Km, resistente a neomicina (Neo) y sensible a ácido

nalidíxico (Nal), mientras que *M. radiotolerans* MLP1 se empleó como cepa receptora, resistente a Nal y sensible a kanamicina/neomicina (Fig. 5). La cepa donadora se propagó en 3 mL de medio LB suplementado con neomicina (60 µg/mL), mientras que la cepa receptora se cultivó en 3 mL de medio PY; ambos cultivos se incubaron durante 14–16 h a 30 °C. Mas tarde, las células donadoras se recuperaron por centrifugación y se lavaron dos veces con medio PY para eliminar el antibiótico residual previo al proceso de conjugación.

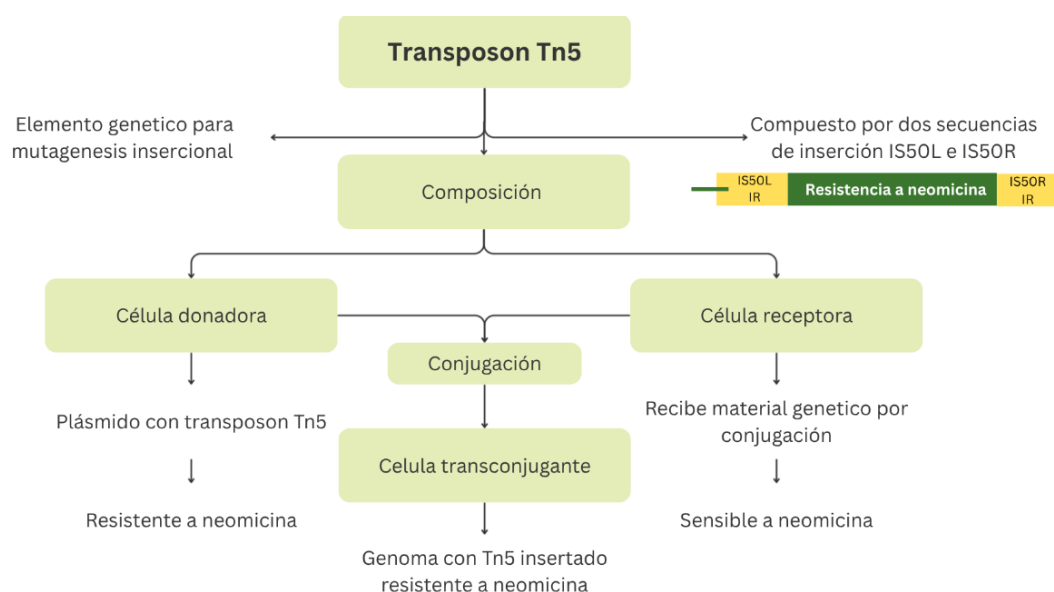


Figura 5. Esquema de la mutagénesis insercional con el transposón Tn5 mediante conjugación bacteriana entre *E. coli* S17-1 y *M. radiotolerans* MLP1.

El transposón Tn5, compuesto por las secuencias de inserción IS50L e IS50R que flanquean un gen de resistencia a neomicina, fue transferido desde la cepa donadora hacia la célula receptora mediante conjugación bacteriana, permitiendo su inserción en el genoma de *M. radiotolerans* MLP1 y la obtención de células transconjugantes resistentes a neomicina (Fig. 5). Para el ensayo de conjugación se mezclaron 2 mL del cultivo de la cepa receptora con 1 mL del cultivo de la cepa donadora y, posteriormente, se sembraron 100 µL de la mezcla sobre placas con medio PY incubadas a 30 °C. Adicionalmente, se realizó un ensayo de conjugación

utilizando a *R. etli* CFN42 como cepa receptora, empleándose como control de frecuencia de transposición (Fig. 6).

La figura 6 muestra un esquema general del proceso de conjugación bacteriana, un mecanismo de transferencia horizontal de genes, mediante el cual una célula donadora transfiere ADN exógeno hacia una célula receptora. La célula donadora contiene un plásmido conjugativo que porta los genes necesarios para la transferencia genética y, generalmente, genes de resistencia a antibióticos, mientras que la célula receptora carece de dicho plásmido y es sensible al antibiótico utilizado durante la selección.

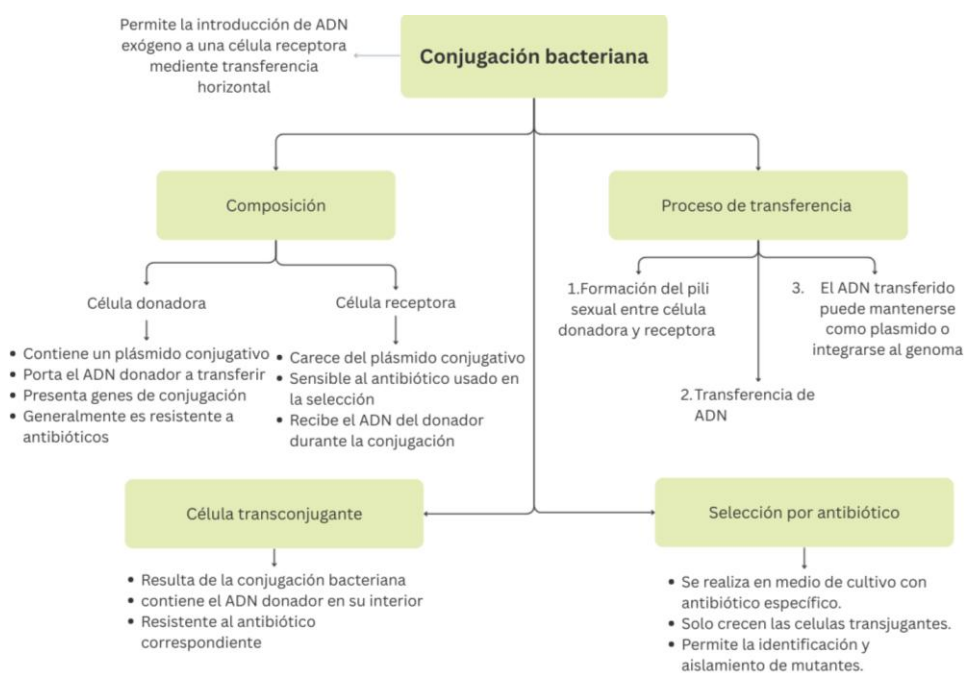


Figura 6. Esquema general del proceso de conjugación bacteriana y transferencia horizontal de ADN entre una célula donadora y una célula receptora, que conduce a la formación de células transconjugantes resistentes al antibiótico utilizado para la selección.

El proceso inicia con la formación del *pili* sexual entre ambas células, seguido por la transferencia del ADN desde la bacteria donadora hacia la receptora. Posteriormente, el ADN transferido puede mantenerse como un plásmido

independiente o integrarse en el genoma bacteriano (Fig. 6). Como resultado de este proceso se generan células transconjugantes que contienen el ADN transferido y adquieren resistencia al antibiótico correspondiente. Finalmente, la selección en medios de cultivo suplementados con antibióticos permite identificar y aislar las células transconjugantes obtenidas mediante conjugación bacteriana.

6.3.3 Aislamiento de mutantes sensibles a cobre por inserción de Tn5

Pasadas 24 horas, la biomasa resultante de las transconjugantes de *M. radiotolerans* MLP1 que albergan el Tn5 se colocó en un tubo de dilución con 1 mL de Mg-Tween (Anexo 3). De cada una de las cruas se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-8} las cuales se plaquearon en cajas de PY suplementadas con Neo 20 y Nal 40.

6.3.4 Aislamiento de colonias transconjugantes Tn5 de *M. radiotolerans* MLP1

Después de 72 h de incubación, se tomaron las colonias con palillos estériles crecidas en el medio selectivo y se propagaron realizaron diluciones hasta 10^{-4} en dos placas de medio PY con diferente concentración de antibiótico, una Nal 20/Nm 20 y otra con Nal 20/Nm 60 ambas adicionadas con CaCl_2 4.5 mM. Se incubaron por 12 h a 30° C. Transcurrido el tiempo, se buscaron colonias que crecieran correctamente y de ellas se extrajo el genoma para realizar PCR amplificando el fragmento de TN5.

6.4 Mutagénesis sitio-dirigida de *copA1* y *copA2* y posterior clonación en el vector pK18mobsac

6.4.1 Diseño de oligonucleótidos mutagénicos para la amplificación de *copA1* y *copA2* mediante PCR

Con base en la información recopilada mediante el análisis bioinformático previamente realizado, se identificaron dos genes codificantes de Cu-ATPasas, denominados *copA1* y *copA2*, a partir de los cuales se diseñaron oligonucleótidos mutagénicos específicos para la amplificación de estas regiones de interés (Tabla 4). Estos oligonucleótidos se diseñaron utilizando los programas Snapgene y Oligo 7 Primer Analysis Software, se seleccionaron dos enzimas, una de corte común y una de corte raro dentro del genoma de *M. radiotolerans* MLP1 que no pudieran dimerizarse y presentaran una temperatura de fusión similar; en este caso se hizo uso de los sitios de restricción EcoRI y XbaI (Tabla 4).

Tabla 4. Oligos utilizados para realizar mutagénesis sitio dirigida, usando los sitios de corte para EcoRI y XbaI.

Oligo	Secuencia del oligo	T _m (°C)
Forward <i>copA1</i>	5´ - GGAATTC CTCGACCTCGCGCCGGG-3´	62
Reverse <i>copA1</i>	5´ - GCTCTAG ACGACAACCGCCACGCCG-3	64
Forward <i>copA2</i>	5´ - GGAATTC GCGTGGTCGACCGCGTC-3´	65
Reverse <i>copA2</i>	5´ - GCTCTAG ACCGCGACCCGTCCGGAGA-3´	66

Se realizó una reacción PCR para obtener las mutantes, utilizando el Kit para PCR directa de Thermo Scientific. Este proceso hizo uso de la enzima Phusion DNA Polymerase de alta fidelidad para amplificar los oligonucleótidos que contenían la mutación deseada y se realizó en un volumen final de 50 µL, compuesto por 25 µL de la enzima Phusion DNA, 2.5 µL del oligo upper, 2.5 µL del oligo lower, 1 µL de DNA de *M. radiotolerans* MLP1 Y 19 µL de agua destilada estéril. A continuación, se llevaron a cabo múltiples ciclos de PCR, los cuales inician con un paso de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos, cada uno con la siguiente secuencia: 94°C durante 1 minuto, 62-66°C (de acuerdo con la

temperatura del oligo), durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, lo anterior seguido de un paso de alargamiento final a 72°C durante 10 minutos.

Mas adelante, los productos de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (peso/volumen) utilizando un marcador de peso molecular (DNA Ladder) para estimar el tamaño de los amplicones obtenidos (419 y 521 pb). Una vez corroborado que el fragmento amplificado correspondía al tamaño esperado, la banda de interés fue extraída y purificada del gel para su posterior clonación.

6.4.2 Clonación de los productos de PCR en el vector pK18mobsac

Los productos de PCR correspondientes a *copA1* y *copA2*, así como el plásmido pK18mobsac, fueron sometidos a digestión enzimática con EcoRI y XbaI. Para cada reacción se utilizaron 40 µL de ADN, 12 µL de buffer Tango 2X, 2 µL de cada enzima de restricción y 4 µL de agua destilada estéril, obteniendo un volumen final de 60 µL. Las mezclas se prepararon en tubos Eppendorf y después se incubaron a 37 °C durante 1 hora para favorecer la digestión enzimática. Seguidamente, las enzimas de restricción presentes en las reacciones de digestión fueron inactivadas mediante incubación a 65 °C durante 10 min.

Para la reacción de ligación se preparó una mezcla que contenía 7 µL de agua destilada estéril, 7 µL del vector pK18mobsac, 10 µL del inserto mutante correspondiente (*copA1* o *copA2*), 3 µL de buffer de ligación, 1 µL de ditioneitol (DTT) y 4 µL de T4 DNA ligasa. La mezcla se homogeneizó suavemente y más tarde se incubó a 22 °C para favorecer la ligación del inserto al vector. Las construcciones genéticas obtenidas, se denominaron pK18mobsac::*copA1* y pK18mobsac::*copA2*

6.4.3 Transformación de plásmidos recombinantes, pK18mobsac::*copA1* y pK18mobsac::*copA2*, en *E. coli* DH5α

La transformación de plásmidos recombinantes consiste en introducir el vector (pK18mobsac::*copA1* / pK18mobsac::*copA1*) en células competentes de *E. coli* DH5α . Este proceso se llevó a cabo mediante shock térmico; para ello se añadieron 50 µL de células competentes a la ligación anterior, se mantuvo durante 1 hora en hielo y posteriormente se elevó a 42°C durante 2 minutos, después se colocó en hielo por 2 minutos más y finalmente a 37 °C por 1 hora. A continuación, se le agregaron 100 µL de medio LB líquido y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación ligera para promover su crecimiento. Las construcciones genéticas obtenidas se identificaron como *E. coli* DH5α pK18mobsac::*copA1* y *E. coli* pK18mobsac::*copA2*.

6.4.4 Selección de transformantes

Una vez transformadas las cepas *E. coli* DH5α pK18mobsac-*copA1* y *E. coli* DH5α pK18mobsac-*copA2*, se inoculan en cajas Petri de medio LB suplementado con 200 µl de Km 30, 200 µl de IPTG y 200 µl Xgal (Anexo 5 y 6). En las cajas se inocularon 100 µl de cada una de las construcciones transformadas además de un control únicamente con pK18mobsacB.

En este medio se observan dos tipos de bacterias, aquellas de color blanco las cuales corresponden a que el gen *lacZ* fue interrumpido por un inserto de interés, y las de color azul, en donde *lacZ* es funcional, es decir, que el vector está vacío, por lo tanto, no hay mutación.

6.4.5 Conjugación de cepas de *E. coli* DH5α pKmobSac-copA1 y *E. coli* DH5α pKmobSac-copA2 a la cepa receptora *E. coli* S17.

La cruce biparental se realizó utilizando una proporción 2:1 entre la cepa receptora (*E. coli* S17) y las cepas donadoras (*E. coli* DH5α pKmobSac-copA1 y *E. coli* DH5α pKmobSac-copA2). Para ello, se colocaron 200 µL de un cultivo ON de *E. coli* S17 en un tubo de ensayo y posteriormente se mezclaron con cada una de las cepas donadoras correspondientes. La suspensión celular obtenida fue transferida a una caja con medio PY sólido suplementado con calcio, esto con el propósito de favorecer el proceso de conjugación bacteriana. Finalmente, las cajas se incubaron a 30 °C bajo condiciones adecuadas para permitir la transferencia plasmídica y el desarrollo de las células transconjugantes las cuales se nombraron *E. coli* S17 DH5α::pKmobSac-copA1. y *E. coli* S17 DH5α::pKmobSac-copA2.

6.4.6 Transferencia por conjugación de los plásmidos *E. coli* S17 DH5α::pK18mobSac::copA1 y *E. coli* S17 DH5α::pSK18MobSac::copA2 en *M. radiotolerans* MLP1

La introducción de los plásmidos recombinantes pK18mobSac::copA1 y pK18mobSac::copA2 en *M. radiotolerans* MLP1 se realizó mediante conjugación triparental, ya que de igual manera se incluyó el plásmido helper pRK2013. Durante estos ensayos, las cepa donadora (*E. coli* S17 DH5α::pKmobSac-copA1 / *E. coli* S17 DH5α::pKmobSac-copA2) y receptora (*M. radiotolerans* MLP1) se incubaron a 30 °C para facilitar la transferencia del ADN plasmídico. A continuación, se realizó la cruce, donde se colocaron 200 µL de la cepa *M. radiotolerans* MLP1, 100 µL del plásmido de interés y 50 µL del plásmido helper, se incubaron a 30°C por 24 horas.

Una vez concluido el periodo de conjugación, se procedió a la siembra de las células en medio PY suplementado con los antibióticos correspondientes (Nal 20, Km30, Gm 30), con el fin de seleccionar aquellas bacterias transconjugantes

que incorporaron exitosamente los plásmidos recombinantes. La integración de las construcciones plasmídicas, así como la presencia de los genes *copA1* y *copA2*, se verificó mediante purificación de plásmidos y evaluación del fenotipo de tolerancia al cobre. Estos análisis permitieron determinar la participación funcional de ambos genes en los mecanismos de resistencia al cobre presentes en la cepa estudiada. Las cepas resultantes se denominaron *M. radiotolerans* S17 DH5α::pKmobsac-*copA1* y *M. radiotolerans* S17 DH5α::pKmobsac-*copA2*.

6.5 Complementación heteróloga de la mutante *R. etli* CE3/*actP*::Ω Sp, sensible a 20 μM de CuCl₂

6.5.1 Obtención de la cepa mutante sensible a cobre

En estudios previos se obtuvo una mutante derivada de *R. etli* CE3 mediante la interrupción del gen *actP* (*copA*) por integración de un casete ΩSp, el cual confiere resistencia al antibiótico espectinomicina. La inserción de dicho casete provocó la terminación prematura de la transcripción del RNA mensajero correspondiente a la Cu-ATPasa, debido a la presencia de terminadores transcripcionales localizado corriente abajo del gen de resistencia. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de CuCl₂ para la cepa silvestre fue de 20 μM, mientras que la mutante presentó una CMI de 5 μM.

6.5.2 Diseño de oligonucleótidos

Debido a que no se conocía con precisión el sitio de inicio de la transcripción de *R. etli* CE3, fue necesario diseñar dos estrategias de oligonucleótidos para el extremo 5' de cada extremo (Tabla 5). Los oligonucleótidos se realizaron mediante los programas Snapgene y Oligo 7 Primer Analisis Software, primer conjunto de iniciadores se diseñó lo más próximo posible al codón de inicio de traducción ATG

(39 pb antes del codón), con el propósito de favorecer la expresión génica a partir del promotor presente en el vector de clonación.

Por otra parte, el segundo conjunto de oligonucleótidos se diseñó incluyendo aproximadamente 100 pb corriente arriba del codón de inicio ATG, bajo la hipótesis de que dicha región pudiera contener secuencias promotoras nativas capaces de dirigir la transcripción del gen.

Tabla 5. Oligos diseñados para dos diferentes estrategias con la cepa *R. etli* CE3 Ω Sp

Oligo	Secuencia del oligo	T _m (°C)
<i>copA1</i> up pos 37	CGAATTCCGCCTTCGCCGAGAAGAC	57.3
<i>copA1</i> low pos 2827	GCTCTAGAAGCGGTAGTACGCCCAGA	59.8
<i>copA2</i> up pos 33	CGAATTCGATGAAGCGCAGCGTGTG	57.3
<i>copA2</i> low pos 2727	GCTCTAGACCCCTTGACCTTCCCATG	59.8

6.5.3 Clonación de genes

Para la clonación de los genes de interés se utilizó el vector pBBR1S, el cual cuenta con un marcador de resistencia a antibiótico (esteptomicina) para la selección de transformantes y un sitio de clonación múltiple (MCS) con sitios únicos de restricción para diversas enzimas, entre ellas EcoRI y XbaI.

Los genes *copA1* y *copA2* fueron amplificados mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos diseñados con secuencias adicionales

correspondientes a los sitios de restricción EcoRI y XbaI en los extremos 5'. Posteriormente, tanto los productos de PCR como el vector pBBR1 fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI, para después ser ligados utilizando ADN ligasa.

6.5.4 Transformación bacteriana y selección de clones

Las construcciones plasmídicas obtenidas fueron introducidas en células competentes de *E. coli* DH5 α mediante transformación bacteriana. Las células transformadas fueron sembradas en medio selectivo suplementado con el antibiótico correspondiente y después incubadas bajo condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano. Las colonias obtenidas fueron purificadas y analizadas mediante PCR para confirmar la presencia de los genes clonados.

6.5.5 Movilización plasmídica mediante conjugación

Debido a que el vector pBBR1MCS carece de los genes necesarios para la transferencia conjugativa, la movilización de las construcciones plasmídicas hacia la cepa receptora se realizó mediante conjugación bacteriana utilizando el plásmido helper pRK2013, el cual proporciona en trans los genes *tra* requeridos para la transferencia plasmídica.

Las construcciones recombinantes fueron previamente introducidas en *E. coli* S17, utilizada como cepa donadora. Posteriormente, se realizaron cruces biparentales entre la cepa donadora y *R. etli* CE3 Ω Sp bajo condiciones favorables para la conjugación. Finalmente, las bacterias transconjugantes se denominaron CE3 Ω S17 *copA1*-L y CE3 Ω S17 *copA1*-C fueron seleccionadas en medios suplementados con los antibióticos correspondientes y utilizadas para los análisis funcionales de resistencia al cobre.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Identificación de las Cu-ATPasas mediante anotación genómica

La Tabla 6 muestra los criterios utilizados para identificar ATPasas tipo P1B en el genoma de la cepa *M. radiotolerans* MLP1, así como la relación de las proteínas encontradas con proteínas homólogas obtenidas mediante análisis BlastP. El proceso de identificación se efectuó a partir de la anotación genómica utilizando términos comúnmente asociados a transportadores metálicos y ATPasas tipo P.

De acuerdo con los resultados, se identificaron siete proteínas candidatas asociadas al transporte de metales pesados. Las siete proteínas pertenecen a la familia de ATPasas tipo P involucradas en el transporte activo de iones metálicos a través de membranas celulares. Asimismo, la mayoría de las proteínas también se anotaron con los términos “metal-transporting”, “heavy metal” y “divalent metal cation”, lo que sugiere una posible participación en la homeostasis y resistencia a metales pesados.

Las proteínas con accesos MDE3744228.1, MDE3744588.1, MDE3747835.1 y MDE3749888.1 presentaron coincidencia positiva en prácticamente todos los criterios de búsqueda, indicando una alta probabilidad de corresponder a ATPasas P1B especializadas en el transporte de cationes metálicos divalentes. Por otro lado, la proteína MDE3747865.1 fue la única anotada específicamente como “cation-transporting”, aunque no presentó asociación con el término “heavy metal”, lo que podría indicar una función más general en el transporte catiónico.

Además, todas las proteínas mostraron homología con la Cu-ATPasa de *R. etli* mediante BlastP, reforzando la hipótesis de que estas proteínas participan en mecanismos de transporte y tolerancia al cobre u otros metales pesados. En contraste, la proteína MDE3744397.1 presentó únicamente el término “P-type

ATPase” y la homología con la Cu-ATPasa de *R. etli*, por lo que podría representar una ATPasa más divergente o menos caracterizada dentro de esta familia.

Tabla 6. ATPasas tipo P1B identificadas en el genoma de *M. radiotolerans* MLP1 mediante anotación genómica y análisis de homología BlastP con la Cu-ATPasa de *R. etli*.

			Anotación de genoma					Proteínas homólogas BlastP
#	Acceso GeneBank	NCBI RefSeq	Metal-Transporting	Cation-transporting	Heavy metal	P-type ATPase	Divalent metal cation	<i>R. etli</i> Cu-ATPasa
1	MDE3744228.1	WP_116655330.1	+	-	+	+	+	+
2	MDE3744380.1	WP_116655235.1	+	-	-	+	+	+
3	MDE3744588.1	WP_116656071.1	+	-	+	+	+	+
4	MDE3747835.1	WP_116655846.1	+	-	+	+	+	+
5	MDE3747865.1	WP_116655820.1	-	+	-	+	+	+
6	MDE3749888.1	WP_071000281.1	+	-	+	+	+	+
7	MDE3744397.1	WP_041372247.1	-	-	-	+	-	+

7.1.1 Identificación de ATPasas tipo P transportadoras de cobre en el genoma de *M. radiotolerans* MLP1 mediante análisis de proteínas homólogas e Identical Protein Groups

Mediante la búsqueda de transportadores de cobre de *M. radiotolerans* MLP1 similares a la Cu-ATPasa de *R. etli* se desplegó un listado de 100 proteínas pertenecientes a diversas cepas de *M. radiotolerans* las cuales poseen proteínas homologas a WP_011427866.1 de *R. etli* CFN42. Para determinar cuáles de esas proteínas se encuentran en el genoma de cepa MLP1, se accedió a la liga mediante del número de acceso de cada una, misma que nos condujo al apartado GenePept report seguidamente al apartado de Identical Protein Group, en la cual se desplegó una lista de cepas que tienen proteínas idénticas. A partir de esta lista, se buscaron proteínas de la cepa MLP1 (Fig. 7).

heavy metal translocating P-type ATPase

[GenPept](#) [FASTA](#) [Graphics](#) [BLAST](#)

Name: heavy metal translocating P-type ATPase RefSeq Selected Product: WP_116655330.1, 818 amino acids Taxonomic Group: a-proteobacteria Assembly Accessions: 7 Protein Accessions: 4 CDS Regions: 7 Total Rows: 7			Protein Classes ☒ WP_116655330.1 - 4 rows ☒ INSDC - 3 rows Update Report			
Source	CDS Region in Nucleotide	Protein	Name	Organism	Strain	Assembly
RefSeq	NZ_JAPTHG010000001.1 76574-79030 (+)	WP_116655330.1	heavy metal translocating P-type ATPase	Methylobacterium radiotolerans	MLP1	GCF_028886065.1
RefSeq	NZ_JBCEWR010000002.1 4520345-4522801 (+)	WP_116655330.1	heavy metal translocating P-type ATPase	Methylobacterium sp. DCY52	DCY52	GCF_038498265.1
RefSeq	NZ_QEKZ010000001.1 216853-219309 (-)	WP_116655330.1	heavy metal translocating P-type ATPase	Methylobacterium radiotolerans	DSM 760	GCF_003096615.1
RefSeq	NZ_VUOK010000021.1 107035-109491 (-)	WP_116655330.1	heavy metal translocating P-type ATPase	Methylobacterium sp. 2A	2A	GCF_009806555.1
INSDC	JAPTHG010000001.1 76574-79030 (+)	MDE3744228.1	heavy metal translocating P-type ATPase	Methylobacterium radiotolerans	MLP1	GCA_028886065.1
INSDC	VUOK010000021.1 107035-109491 (-)	MWV22632.1	cadmium-translocating P-type ATPase	Methylobacterium sp. 2A	2A	GCA_009806555.1
INSDC	QEKZ010000001.1 216853-219309 (-)	PVZ07231.1	Cu+-exporting ATPase	Methylobacterium radiotolerans	DSM 760	GCA_003096615.1

Figura 7. Proteínas idénticas a WP_116655330.1 que se encuentran en el genoma de diferentes cepas de *M. radiotolerans*.

7.1.2 Análisis de dominios conservados en ATPasas tipo P asociadas al transporte de cobre en *M. radiotolerans* MLP1

La Tabla 7 presenta el análisis de dominios conservados de las proteínas identificadas como posibles transportadores de cobre en el genoma de *M. radiotolerans* MLP1. Para cada proteína se muestra el tamaño en aminoácidos, la localización genómica, los números de acceso GeneBank y RefSeq, así como las familias de dominios conservados detectadas mediante análisis bioinformático.

Los resultados muestran que todas las proteínas poseen dominios relacionados con ATPasas tipo P y transporte de metales, principalmente pertenecientes a la superfamilia HAD-like. Sin embargo, únicamente las proteínas WP_116655330.1 y WP_116656071.1 presentaron el dominio conservado P-type_ATPase_Cu-like (cd02094), previamente asociado con Cu-ATPasas funcionalmente caracterizadas en *R. etli* CFN42 y *R. tropici* CIAT 899.

Además, varias proteínas presentaron el dominio HMA (Heavy Metal Associated), relacionado con unión y transporte de metales pesados, mientras que la proteína WP_116655820.1 mostró el dominio ZntA, asociado con ATPasas transportadoras de zinc y otros cationes divalentes. En conjunto, estos resultados sugieren que WP_116655330.1 y WP_116656071.1 representan los candidatos con mayor evidencia para participar específicamente en el transporte de cobre en la cepa MLP1.

Tabla 7. Tabla 7. Dominios conservados identificados en proteínas ATPasas tipo P del genoma de *M. radiotolerans* MLP1. Se muestran el tamaño, localización genómica, accesos GeneBank y RefSeq, así como las familias de dominios conservados asociadas al transporte de metales y cobre. El dominio P-type_ATPase_Cu-like se detectó únicamente en las proteínas WP_116655330.1 y WP_116656071.1, sugiriendo su posible función como transportadores de cobre.

#	Tamaño (aa)	Inicio	Termino	GeneBank Accession	RefSeq	CDS	Familia de dominios Conservados
1	818	76574	79030	MDE3744228.1	WP_116655330.1	JAPTHG010000001.1 76574-79030 (+)	P-type_ATPase_Cu- like cd02094 HAD-like cl21460 HMBD pfam19335 COG3350 cl42732
2	641	59075	61000	MDE3744380.1	WP_116655235.1	NZ_JAPTHG010000002.1 59075-61000 (+)	HAD_like super family cl21460
3	824	88836	91310	MDE3744588.1	WP_116656071.1 CueR	JAPTHG010000003 88836-91310	P-type_ATPase_Cu- like cd02094 HAD_like cl21460 HMA cd00371
4	732	49262	51460	MDE3747835.1	WP_116655846.1	JAPTHG010000031.1 49262-51460 (+)	HAD_like super family cl21460

							HMA cd00371
5	812	84710	87148	MDE3747865.1	WP_116655820.1	NZ_JAPTHG010000031.1 84710-87148 (+)	ZntA COG2217
6	731	15798	17993	MDE3749888.1	WP_071000281.1	JAPTHG010000072 15798-17993	HAD_like super family cl21460 HMA cd00371
7	900	74891	77593	MDE3744397.1	WP_041372247	JAPTHG010000002 74891-77593	HAD_like super family cl21460

HAD-like: Haloacid Dehalogenase-like Hydrolases

HMA: heavy metal associated domain

7.2 Mutagénesis al azar con Tn5 en *M. radiotolerans* MLP1 y evaluación de la eficiencia de transposición

Con el objetivo de identificar genes involucrados en la resistencia y transporte de cobre en *M. radiotolerans* MLP1, se realizó una mutagénesis al azar mediante el transposón Tn5. Para ello, se llevó a cabo una cruce biparental entre la cepa receptora MLP1 y la cepa donadora portadora del transposón, seguida de la selección de posibles mutantes en medio suplementado con antibióticos. A continuación, se evaluó la eficiencia de transposición mediante análisis de crecimiento y confirmación molecular por PCR.

De la cruce biparental realizada entre el transposón Tn5 y la cepa MLP1 se observó crecimiento únicamente en las primeras diluciones (10^0 , 10^{-1} y 10^{-2}), donde se apreciaba un crecimiento blanco saturado. Sin embargo, a partir de la dilución 10^{-3} no se detectó crecimiento, por lo que se decidió repetir el experimento inoculando nuevamente las muestras en medio PY suplementado con Nal 20/Neo 60 y Nal 20/Neo 50, plaqueando únicamente las diluciones 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} e incubando a 30 °C.

Para verificar que el transposón Tn5 era funcional y capaz de transponerse eficientemente, se realizó una conjugación control utilizando a *R. etli* CFN42. En este caso se observó una cruce exitosa, indicando que el transposón funcionaba correctamente y que la baja eficiencia de mutagenización estaba asociada específicamente a la cepa MLP1.

Con el fin de confirmar la transposición, se extrajo DNA genómico de las colonias que crecieron en las placas PY Nal20/Nm60. El DNA obtenido se utilizó como molde en una reacción de PCR dirigida a amplificar un fragmento interno del Tn5 responsable de la resistencia a neomicina. Las colonias positivas para la amplificación confirmaron la presencia del transposón; sin embargo, la frecuencia de transposición observada fue muy baja. Considerando que para identificar el gen

de interés se requiere analizar entre 2,000 y 3,000 colonias mutantes, se concluyó que el protocolo de mutagénesis con Tn5 no era viable para la cepa MLP1.

7.3 Mutagénesis sitio dirigida de los genes *copA1* y *copA2* en *M. radiotolerans* MLP1 mediante el vector pK18mobsac

Para llevar a cabo la mutagénesis sitio dirigida en *M. radiotolerans* MLP1, se empleó el vector suicida pK18mobsac junto con las enzimas de restricción EcoRI y XbaI, con el objetivo de generar construcciones recombinantes que permitieran identificar la inserción del plásmido en el genoma bacteriano. Más adelante, se diseñaron oligonucleótidos específicos para las Cu-ATPasas *copA1* y *copA2*, y se realizaron PCR gradiente para determinar las temperaturas óptimas de alineamiento.

Los resultados mostraron una amplificación eficiente para *copA1*, observándose bandas definidas y del tamaño esperado. En contraste, *copA2* presentó una amplificación débil y poco definida, dificultando la confirmación del amplicón. A pesar de ello, los fragmentos obtenidos fueron ligados al vector pK18mobsac y utilizados para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α .

La verificación de colonias transformadas se realizó mediante selección en medio LB suplementado con IPTG y X-gal. Este sistema permitió diferenciar colonias recombinantes blancas, que contenían inserto de ADN, de colonias azules correspondientes a plásmidos sin inserto funcionalmente intactos en el gen *lacZ* (Fig. 8). Como resultado, la construcción pK18mobsac::*copA1* produjo un número considerable de colonias transformantes, mientras que pK18mobsac::*copA2* generó únicamente tres colonias. En total, se seleccionaron y purificaron 24 colonias para análisis posteriores.

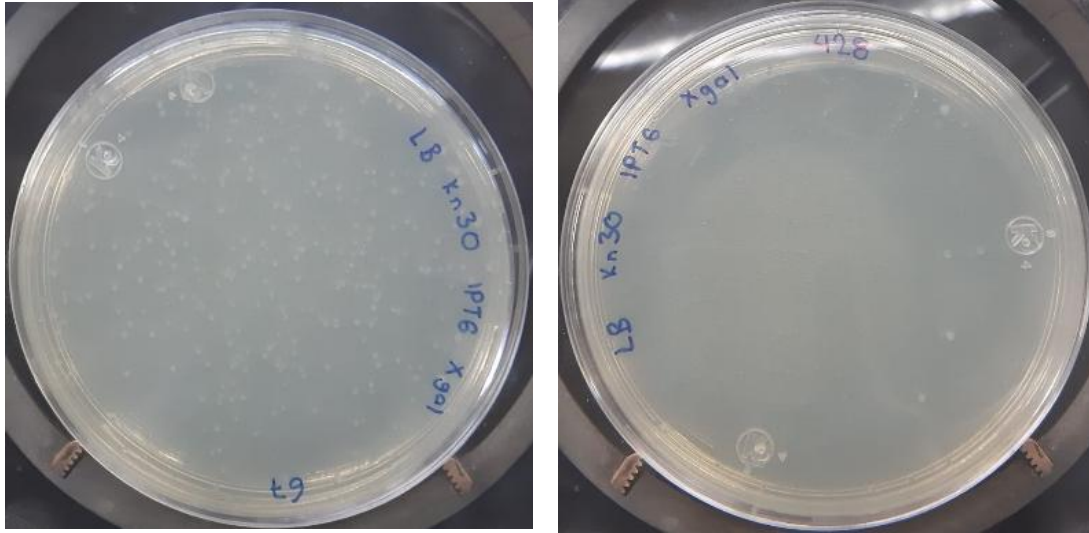


Figura 8. Colonias obtenidas de las cepas transformadas de *E. coli* DH5 α pKmobSac-copA1 y *E. coli* DH5 α pKmobSac-copA2 mediante selección con Xgal e IPTG.

Consecutivamente, se realizó una PCR de confirmación utilizando las colonias transformadas como molde, con el fin de corroborar la presencia de los fragmentos de interés y seleccionar clones positivos como se puede observar en la figura 9 donde A y B muestran las bandas pertenecientes a la cepa *E. coli* DH5 α pKmobSac-copA1 observándose en la mayoría de ellas el peso esperado de la banda (0.48 Kb) de acuerdo con el biomarcador y la cepa control de *E. coli* DH5 α . En la figura C se observan las cepas transformadas de *E. coli* DH5 α pKmobSac-copA2, no obstante, contamos con ausencia de bandas debido a que la cepa no se transformó de manera favorable. Las construcciones recombinantes obtenidas en DH5 α fueron transferidas a *E. coli* S17-1 para utilizar esta cepa como donadora en ensayos de conjugación.

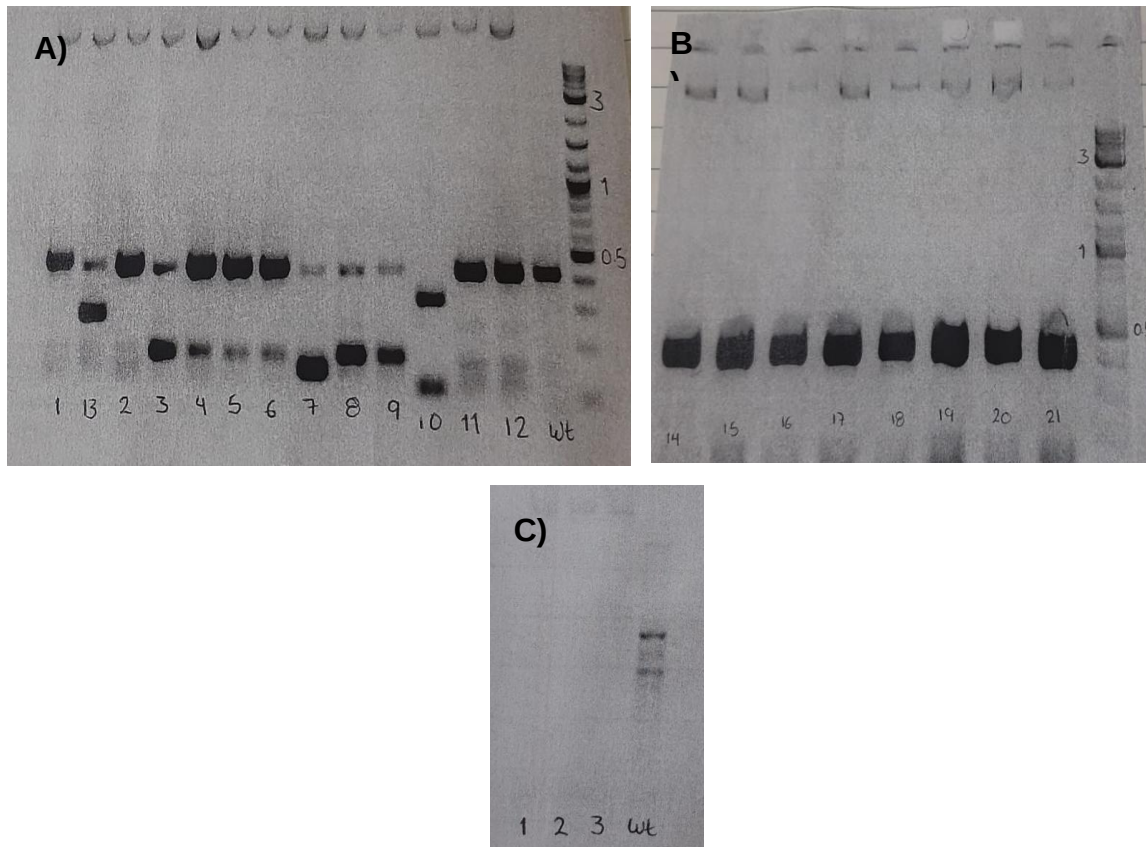


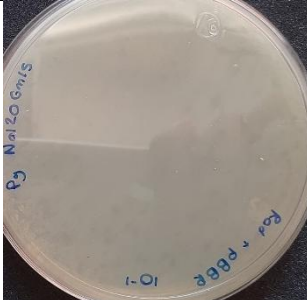
Fig. 9. Geles de electroforesis resultado de los PCR realizados a 24 colonias de cepas transformadas y *E. coli* DH5 α pKmobSac-*copA2*. A y B son bandas correspondientes a la transformadas *E. coli* DH5 α pKmobSac-*copA1*. C pertenece a bandas correspondientes a las colonias transformadas de *E. coli* DH5 α pKmobSac-*copA2*.

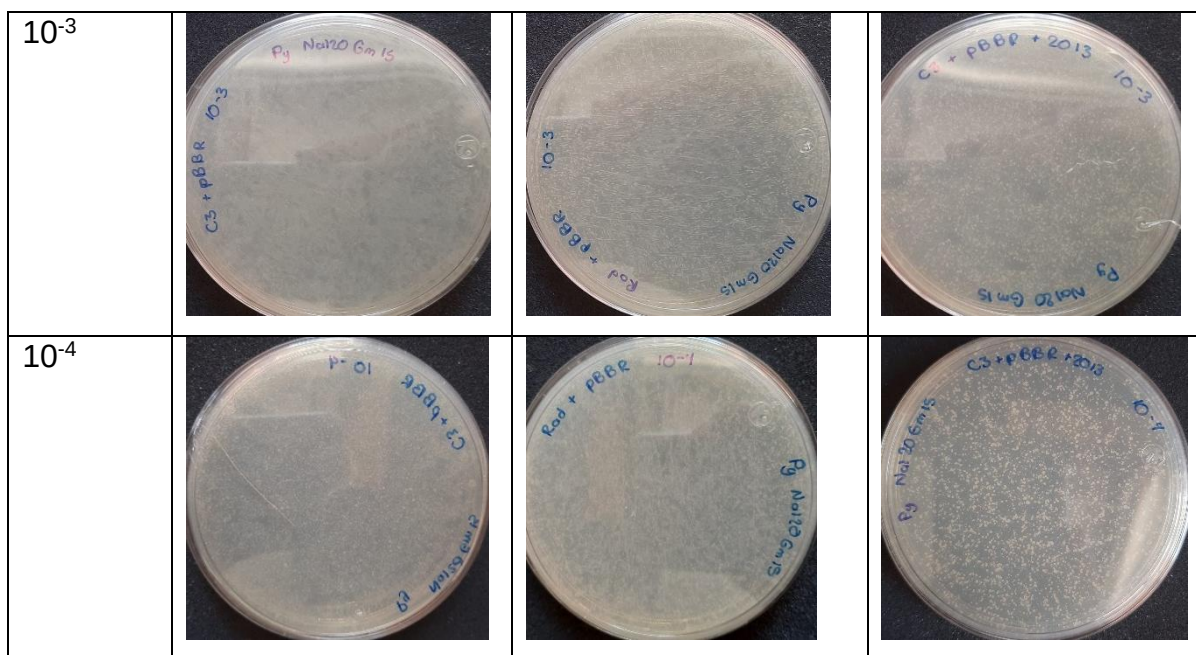
Las cruces bacterianas se realizaron entre MLP1 y las células transformadas con la construcción S17-1/pK18mobSac::*copA1*, debido a que *copA2* no mostró una expresión adecuada durante las etapas previas. Para validar el proceso de conjugación se incluyeron distintos controles experimentales, entre ellos MLP1 + pBBR, *R. etli* CE3 + pBBR y la combinación *R. etli* CE3 + pBBR + pRK2013, esto se realizó con el propósito de evaluar la viabilidad de las cepas y la eficiencia del sistema de movilización plasmídica (Tabla 8).

El análisis de las diluciones seriadas posteriores a la conjugación mostró únicamente un número reducido de colonias aisladas, sugiriendo una baja eficiencia

en la transferencia o establecimiento de las construcciones plasmídicas en la cepa receptora. Estos resultados coinciden con la dificultad previamente observada para la manipulación genética de MLP1. Finalmente, esta estrategia de transformación fue descartada, ya que, aunque la construcción *copA1* logró transformarse exitosamente, el número de colonias obtenidas fue considerablemente bajo en comparación con cepas modelo, mientras que en *copA2* la eficiencia fue aún menor, limitando su viabilidad para el desarrollo del estudio.

Tabla 8. Comparativa de diluciones entre los controles experimentales realizados para comprobar la viabilidad de transferencia de pBBR en MLP1, CE3 y CE3 pRK 2013.

Dilución	MPL1 + pBBR	CE3 + pBBR	CE3 + pBBR + pRK2013
10 ⁰			
10 ⁻¹			
10 ⁻²			



7.4 Complementación heteróloga de la mutante *R. etli* CE3*lactp::Ω* Sp, sensible a 20 μ M de CuCl₂

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de las Cu-ATPasas y de sus regiones reguladoras, se utilizaron dos construcciones derivadas de *R. etli* CE3 Ω Sp que diferían en la longitud del fragmento insertado entre los sitios de corte, una de 39 pb y otra de 100 pb. Esta estrategia permitió analizar la capacidad de las cepas para complementarse utilizando elementos reguladores heterólogos o propios, así como determinar el efecto de dichas construcciones sobre la resistencia y asimilación de cobre. Adicionalmente, se realizaron ensayos de complementación en la cepa *R. etli* CE3 Ω Sp utilizando los genes *copA1* y *copA2*, además, se colocaron como cepas control a CE3 WT, CE3 Ω Sp Y CE3 Ω pBBR.

Los resultados mostraron cepas transformadas tal como se esperaba, esto en función a los controles colocados, debido a que en el caso de CE3 Ω Sp y CE3 Ω pBBR , únicamente cuentan con una resistencia máxima a cobre de 10 μ M (Fig. 10 C y D), teniendo las cepas transformadas un crecimiento bacteriano mayor, no

obstante el crecimiento obtenido en la mayoría de ellas es menos al de la cepa silvestre, CE3 WT, la cual cuenta con una resistencia a cobre de 25 μM (Fig. 10 A).

En el caso de la construcción de CE3 ΩSp con el fragmento más corto restableció parcialmente el fenotipo regulatorio característico de la cepa silvestre (Fig. 10 F). Esta cepa presentó un comportamiento similar al de *R. etli* CE3 WT, manteniendo crecimiento bacteriano hasta concentraciones cercanas a 20 μM de Cu^{2+} . Esto sugiere que la construcción no interfirió significativamente con los mecanismos endógenos de homeostasis de cobre, permitiendo conservar una respuesta fisiológica comparable a la cepa no modificada.

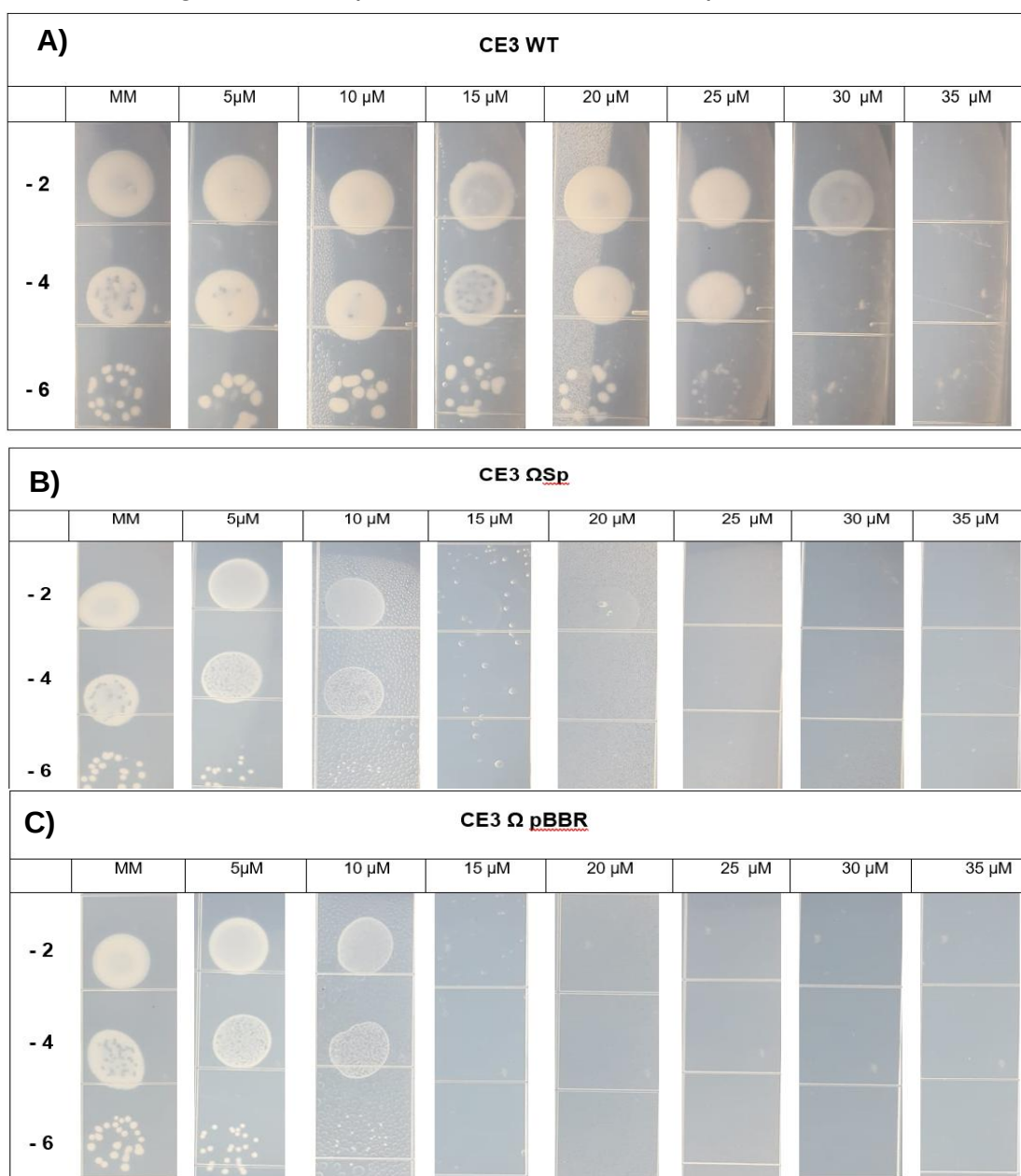
En contraste, la construcción con el fragmento de mayor longitud no mostró una mejora en la resistencia al cobre (Fig. 10 G). Por el contrario, se observó una disminución en el crecimiento bacteriano a concentraciones superiores a 10 μM de Cu^{2+} , indicando una posible alteración en la expresión o funcionalidad de los elementos introducidos. Asimismo, este comportamiento podría estar relacionado con una carga metabólica derivada de la inserción genética, afectando la adaptación celular al estrés por cobre.

En los ensayos de complementación con *copA2*, la cepa CE3 ΩSp no presentó un incremento en la resistencia respecto a la cepa WT, ya que el crecimiento bacteriano fue inhibido a partir de 20 μM de Cu^{2+} (Fig 10 E). Esto sugiere que la inserción de *copA2* no fue suficiente para conferir una tolerancia funcional al metal, posiblemente debido a problemas de expresión del gen heterólogo, diferencias regulatorias o incompatibilidades con los sistemas de transporte de metales de la cepa receptora.

Por su parte, la cepa complementada únicamente con *copA1* mostró un comportamiento prácticamente idéntico al de la cepa WT, ya que ambas dejaron de crecer a concentraciones superiores a 20 μM de Cu^{2+} (Fig. 10 D). Estos resultados

indican que, bajo las condiciones evaluadas, la presencia de copA1 tampoco proporcionó una ventaja adicional en términos de resistencia al cobre.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que las cepas complementadas lograron recuperar parcialmente la resistencia basal al cobre característica de la cepa silvestre; sin embargo, no se observó un incremento significativo en la tolerancia al metal asociado a la expresión de las Cu-ATPasas copA1 y copA2. Esta información permitió evaluar la funcionalidad de los fragmentos reguladores y de las construcciones genéticas empleadas en las distintas cepas transformadas.



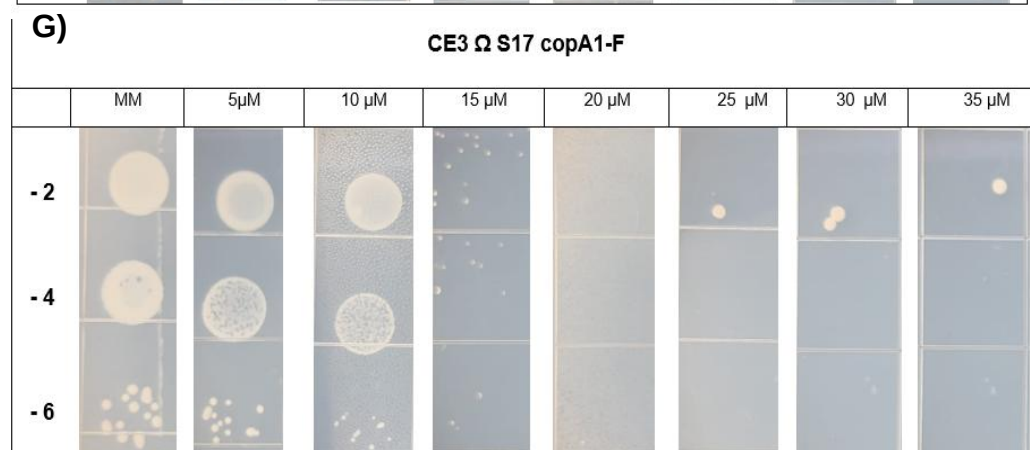
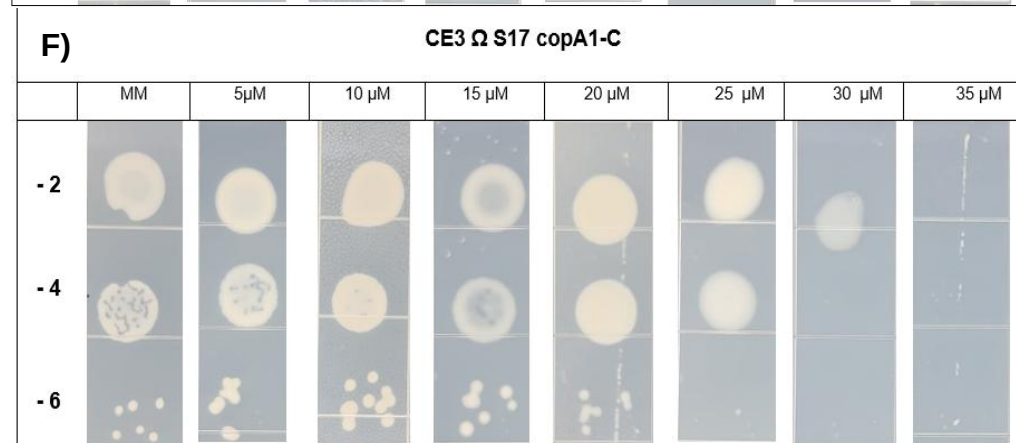
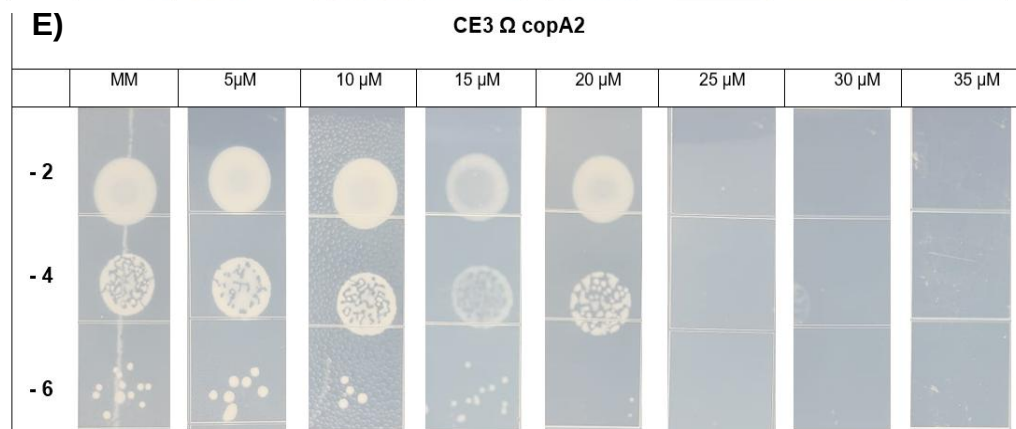
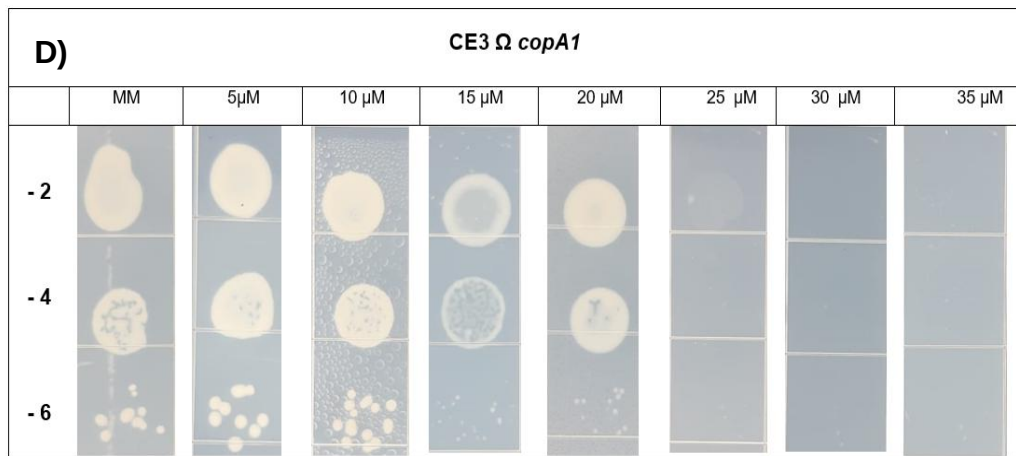


Figura 10. Efecto de cobre en el crecimiento y viabilidad de la cepa silvestre de *R. etli* CE3 WT y sus mutantes derivadas. Se muestran los ensayos de dilución en serie (-2, -4, -6) cultivados en medio mínimo (MM) suplementado con diferentes concentraciones del compuesto: (A) MM sin inductor; (B) 5 μ M; (C) 10 μ M, (D) 15 μ M; (E) 20 μ M ; (F) 25 μ M; (G) 30 μ M; y (H) 35. En cada placa se observan las cepas: CE3 Ω Sp, CE3 Ω pBBR, CE3 Ω copA1, CE3 Ω copA2, CE3 WT, CE3 Ω copA1-C, CE3 Ω copA1- F.

8. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se estableció que los genes *copA1* y *copA2* identificados en *M. radiotolerans* MLP1 se encuentran estrechamente relacionados con los mecanismos de tolerancia a cobre. Asimismo, se observó que la transferencia y expresión heteróloga de dichos genes en cepas filogenéticamente relacionadas, como *R. etli* CFN42, confiere un incremento significativo en la resistencia a este metal, lo que confirma su participación funcional en procesos de homeostasis y detoxificación de cobre.

No obstante, durante el desarrollo experimental se evidenció que *M. radiotolerans* MLP1 presenta una considerable dificultad para su manipulación genética. En particular, no fue posible generar mutantes mediante mutagénesis por transposición utilizando Tn5 ni a través de mutagénesis dirigida por inserción de vectores. En consecuencia, la complementación heteróloga en una cepa mutante de *R. etli* constituyó la única aproximación experimental viable para evaluar funcionalmente los genes asociados a resistencia. Estos resultados sugieren la presencia de barreras genéticas o mecanismos de restricción que limitan la incorporación y estabilidad de material genético exógeno, dificultando la aplicación de métodos convencionales de mutagénesis.

De igual manera, las investigaciones y experimentos realizados permitieron determinar que la ATPasa *copA1* representa el principal mecanismo de resistencia al cobre en la cepa analizada, desempeñando un papel fundamental en la homeostasis y detoxificación del metal. En contraste, el gen *copA2* mostro una contribución limitada, proporcionando únicamente un incremento moderado en la tolerancia de cobre. Estos hallazgos sugieren una posible especialización funcional entre ambos sistemas de transporte metálico, donde *copA1* actuaría como el principal determinante en resistencia frente a condiciones de estrés por cobre.

9. REFERENCIAS

- Alonso, I., Navarro-Aviñó, J. P., López-Moya, J. R., & Martínez, M. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2), 10–25.
- Alquethamy, S. F., Khorvash, M., Pederick, V. G., Whittall, J. J., Paton, C. H., Paulsen, I. T., Hassan, K. A., McDevitt, C. A., & Eijkelkamp, B. A. (2019). The role of the CopA copper efflux system in *Acinetobacter baumannii* virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), Artículo 575.
- Anda, M., Kamari, A., & Rosli, N. M. (2011). Utilization of agricultural waste amendments to alleviate heavy metal toxicity in soybean (*Glycine max* L.) crops. *Journal of Hazardous Materials*, 189(1-2), 341–348.
- Andrade, P. A. M., de Chaves, M. G., de Souza, S. C., & Andreote, F. D. (2018). Rhizosphere microbiome of sugarcane: Structure, function, and metal tolerance of bacterial communities under agricultural management. *Applied Soil Ecology*, 127, 112–121.
- Argüello, J. M., Eren, E., & González-Guerrero, M. (2007). The structure and function of heavy metal transport P1B1 ATPases. *Biometals*, 20(3-4).
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Huffman, D. L., & O'Halloran, T. V. (2001). Solution structure of the yeast copper chaperone Atx1 in its metallated form. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8415–8422.
- Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Del Conte, R., & Gonnelli, L. (2003). Understanding copper trafficking in bacteria: Interaction between the copper transport protein CopZ and the N-terminal domain of the copper ATPase

CopA from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 42(7), 1939–1949. Available from: <https://doi.org/10.1021/bi026855p>

Bustillos-Cristales, M. R., Corona-Gutiérrez, I. Y., Martínez-Ocampo, F., Courty, P. E., & Bahena-Ramírez, A. (2017). Genetic and functional diversity of metal-tolerant bacteria associated with the rhizosphere of terrestrial plants in mine tailings. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(16), 14210–14223.

Cervantes, C., Espino-Saldaña, A. E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I. L., Rivera-Cano, M. E., Avila-Rodríguez, M., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 203–210.

Cheruiyot, D. J., Boyd, R. S., & Moar, W. J. (2013). Exploring lower limits of plant elemental defense by cobalt, copper, nickel and zinc. *Journal of Chemical Ecology*, 39(5), 666–674.

Crichton, R., & Pierre, J. L. (2001). Old iron, young copper: From Mars to Venus. *Biomaterials*, 14(2), 99–112.

Cubillas, C., Miranda-Sánchez, F., González-Sánchez, A., Elizalde, J. P., Vinuesa, P., Brom, S., & García-de los Santos, A. (2017). A comprehensive phylogenetic analysis of copper transporting P1B1 ATPases from bacteria of the Rhizobiales order uncovers multiplicity, diversity and novel taxonomic subtypes. *MicrobiologyOpen*, 6(4).

Dávalos, A., Lozano-Aguirre Beltrán, L. F., & García-de los Santos, A. (2023). Draft genome sequence of the highly copper-tolerant *Methylobacterium radiotolerans* MLP1 isolated from the rhizosphere of grasses adjacent to mine tailings. *Microbiology Resource Announcements*, 12(9).

- Delmar, J. A., Su, C. C., & Yu, E. W. (2014). Bacterial multidrug efflux transporters. *Annual Review of Biophysics*, 43, 93–117.
- Djoko, K. Y., Ong, C. L., Walker, M. J., & McEwan, A. G. (2015). The role of copper and zinc toxicity in innate immune defense against bacterial pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, 290(31), 18954–18961.
- Elizalde-Díaz, J. P., Hernández-Lucas, I., Medina-Aparicio, L., Dávalos, A., Leija, A., Alvarado-Affantranger, X., García-García, J. D., Hernández, G., & Garcia-de los Santos, A. (2019). *Rhizobium tropici* CIAT 899 *copA* gene plays a fundamental role in copper tolerance in both free life and symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Microbiology*, 165(6), 651–661.
- Flores-Núñez, V. M., Fonseca-García, C., Jones, J. A., & Alatorre-Cobos, F. (2020). Genomic insights into the copper homeostasis and metal resistance of bacterial communities associated with terrestrial plants. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Fraústo da Silva, J. J. R., & Williams, R. J. P. (2001). *The biological chemistry of the elements: The inorganic chemistry of life* (2nd ed.). Oxford University Press.
- Frey, P. A., & Reed, G. H. (2012). The ubiquity of iron. En *Structure and Mechanism in Protein Science*. Academic Press.
- Fritsch, C., Giraudoux, P., Coeurdassier, M., Douay, F., Raoul, F., Pruvot, C., Waterlot, C., de Vaufléury, A., & Scheifler, R. (2010). Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: Influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. *Chemosphere*, 81(2), 141–155.

- Giller, K. E., Witter, E., & McGrath, S. P. (2009). Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(10), 2031–2037.
- Green, P. N., & Ardley, J. K. (2018). Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: A proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(9), 2727–2748.
- Harris, E. D. (2001). Copper homeostasis: The role of cellular transporters. *Nutrition Reviews*, 59(9), 281–285.
- Hodgkinson, V., & Petris, M. J. (2012). Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *Journal of Biological Chemistry*, 287(17), 13549–13555.
- Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle—70 years later. *Redox Report*, 6(4), 229–234.
- Kutschera, U. (2008). *Evolutionsbiologie* (Vol. 8318). UTB.
- Legatzki, A., Grass, G., Anton, A., Rensing, C., & Nies, D. H. (2003). Interplay of the Czc system and two P-type ATPases in conferring metal resistance to *Ralstonia metallidurans*. *Journal of Bacteriology*, 185(15), 4354–4361.
- Macomber, L., & Imlay, J. A. (2009). The iron-sulfur clusters of dehydratases are primary intracellular targets of copper toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(20), 8344–8349.
- Magnani, D., & Solioz, M. (2007). How bacteria handle copper. In D. H. Nies & S. Silver (Eds.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals* (pp. 259–285).

- 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*, 41(1), 67–78.
- Marrero, J., & Fando, R. (2008). Interacciones entre metales pesados y microorganismos: Mecanismos de resistencia y aplicaciones biotecnológicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(3), 135–144.
- Mireles, A., Solís, C., Andrade, E., Lagunas-Solar, M., Piña, C., & Flocchini, R. G. (2004). Heavy metal accumulation in plants and soil irrigated with wastewater from Mexico City. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 219, 187–190.
- Nies, D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 313–339.
- Nies, D. H. (2011). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes: Case studies with *Cupriavidus metallidurans*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5),
- Omer, A. M., El-Sawah, M. M. A., & Al-Thani, R. F. (2004). Genotypic and phenotypic characterization of bacterial communities associated with wheat roots. *Microbiological Research*, 159(3), 265–274.
- Osman, D., & Cavet, J. S. (2008). Copper homeostasis in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 65, 217–247.
- Pereira, S. I. A., Lima, A. I. G., & Figueira, E. M. D. A. P. (2006). Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy-metal contamination: Effects on protein expression. *Applied Soil Ecology*, 33(3), 286–293.

- Press, F., & Siever, R. (2001). *Understanding Earth* (3rd ed.).
- Rademacher, C., & Masepohl, B. (2012). Copper-responsive gene regulation in bacteria. *Microbiology*, 158(10), 2451–2464.
- Raja, C. E., Annamalai, K., & Murugesan, G. S. (2008). Isolation and characterization of a metal-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2517–2523.
- Rensing, C., & Grass, G. (2003). *Escherichia coli* mechanisms of copper homeostasis in a changing environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 197–213.
- Rodríguez, A., Effantin, G., & Mandrand-Berthelot, M. A. (2005). Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2912–2916.
- Rosenzweig, A. C., & Argüello, J. M. (2012). Toward a molecular understanding of metal transport by P_{1B} -Type ATPases. *Current Topics in Membranes*, 69, 113–136.
- Rubino, J. T., & Franz, K. J. (2012). Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles a toxic cargo for essential function. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 107(1), 129–143.
- Saier, M. H., Jr. (2006). A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2), 354–411. Available from:

- Sandaa, R. A., Torsvik, V., Enger, Ø., Daae, F. L., Castberg, T., & Hahn, D. (1999). Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(3), 237–251.
- Song, J., Wang, Y., & Jiang, L. (2014). Structure of the periplasmic copper-binding protein CueP from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(1), 123–131.
- Stohs, S. J., & Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 321–336.
- Virieux-Petit, M., Hammer-Dedet, F., Aujoulat, F., Jumas-Bilak, E., & Romano-Bertrand, S. (2022). From copper tolerance to resistance in *Pseudomonas aeruginosa* towards patho-adaptation and hospital success. *Genes*, 13(2).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales sistemas de expulsión de iones metálicos.....	5
Figura 2. Características estructurales de los subgrupos de ATPasas P1B.....	10
Figura 3. Modelo del complejo <i>cusCFBA</i>	13
Figura 4. Esquema general del proceso de transformación bacteriana utilizado para la introducción de ADN exógeno en células competentes y la selección de bacterias transformadas mediante resistencia a antibióticos.....	24
Figura 5. Esquema de la mutagénesis insercional con el transposón Tn5 mediante conjugación bacteriana entre <i>E. coli</i> S17-1 y <i>M. radiotolerans</i> MLP1.....	29
Figura 6. Esquema general del proceso de conjugación bacteriana y transferencia horizontal de ADN entre una célula donadora y una célula receptora	30
Figura 7. Proteínas idénticas a WP_116655330.1 que se encuentran en el genoma de diferentes cepas de <i>M. radiotolerans</i>	41
Figura 8. Colonias obtenidas de las cepas transformadas de <i>E. coli</i> DH5α pKmobSac-copA1 y <i>E. coli</i> DH5α pKmobSac-copA2 mediante selección con Xgal e IPTG.....	47
Figura 9. Geles de electroforesis resultado de los PCR realizados a 24 colonias de cepas transformadas <i>E. coli</i> DH5α pKmobSac-copA1 y <i>E. coli</i> DH5α pKmobSac-copA2.....	48
Figura 10. Efecto de cobre en el crecimiento y viabilidad de la cepa silvestre de <i>R. etli</i> CE3 WT y sus mutantes derivadas.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas usadas en este estudio.....	24
Tabla 2. Plásmidos y transposones utilizados en estos estudio.....	25
Tabla 3. Antibióticos usados durante el presente estudio.....	26
Tabla 4. Oligos mutagénicos para mutación sitio dirigida usando los sitios de corte EcoRI y XbaI.....	32
Tabla 5. Oligos diseñados para dos diferentes estrategias con la cepa <i>R. etli</i> CFN42.....	37
Tabla 6. Criterios de búsqueda de ATPasas de tipo P transportadoras de metales (>600 aa) anotadas en el genoma de <i>M. radiotolerans</i> MLP1.....	40
Tabla 7. Búsqueda de Cu-ATPasas en la lista de proteínas anotadas del genoma de <i>M. radiotolerans</i> MLP1.....	43
Tabla 8. Comparativa de diluciones entre los controles experimentales realizados para comprobar la viabilidad de transferencia de pBBR en MLP1, CE3 Y CE3 pRK 2013.....	48

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

MLP1	Mina La Prieta 1
CuCl ₂	Cu-ATPasas
CPC	Motivo Cisteína-Prolina-Cisteína
YN	Motivo Tirosina-Asparagina
CXXC	Motivo Cisteína - dos aminoácidos variables - Cisteína
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
LB	Lysogeny Broth
Cu	Cobre
Au	Oro
Fe	Hierro
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
Ni	Níquel
Zn	Zinc
Cr	Cromo
Cd	Cadmio
Ag	Plata
Pb	Plomo
Hg	Mercurio
Ti	Talio
Ga	Galio
Ge	Germanio
H	Hidrogeno
K	Potasio
S	Azufre
Cu ₅ FeS ₄	Bornita
CuFeS ₂	Calcopirita

Cu_2S	Calcocita
Cu_2O	Cuprita
$\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$	Malaquita
$\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$	Azurita
RND	Resistencia-Nodulación-División
CDF	Facilitadores de difusión de cationes
MFP	Proteínas de fusión de membranas
OMF	Factores de membrana externa
RPE	Resonancia paramagnética electrónica
UV-vis	Espectroscopía de absorción electrónica
T1Cu	Proteínas de cobre tipo I
T2Cu	Proteínas de cobre tipo II
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutasa Cu/Zn
T3Cu	Proteínas de cobre tipo III
N_2OR	Oxido nitroso reductasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
ATP	Adenosin trifosfato
MER	Razon de error de modulación
Cus	Clones de significado incierto
Cop	Proteinas de cubierta
CaCl_2	Cloruro de calcio
Neo	Neomicina
Nal	Acido nalidixico
Km	Kanamicina
Sp	Espectinomicina
Gm	Genamicina
Km	Kamanicina
Tc	Tetraciclina
NCBI	National Center for Biotechnology Information

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ON	Over night
PCR	Reaccion encadena de la polimerasa
LB	Luria Bertani
PY	Peptona-Extracto de levadura
DDT	Ditiotreitol
IPTG	Isopropil – B-D-1-tiogalactopiranosido
HAD-like	Haloacid Dehalogenase-like Hydrolases
HMA	Heavy Metal Associated Domain
PY	Peptone-Yeast, Peptona y Extracto de Levadura
ON	Over night, toda la noche
TBF	Tris-Borato-Formamida

ANEXOS

1. Medios de Cultivo

1.1 Medio de cultivo PY (Peptona - Extracto de levadura)

Composición

	500 ml	100 ml	2000 ml
Peptona de caseína (gr)	2.5	5	10
Extracto de levadura (gr)	1.5	3	6
Para PY sólido agregar a cada matraz			
Agar (gr)	1.5	3.75	7.5

Procedimiento de preparación

1. Medir 900 mL de agua destilada en un matraz.
2. Añadir peptona y extracto de levadura.
3. Agitar con ayuda de un agitador magnético y una placa de calentamiento en frío hasta obtener la disolución completa de los componentes.
4. En caso de preparar medio sólido, agregar el agar-agar.
5. Ajustar el volumen final a 1 litro con agua destilada.
6. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
7. Dejar enfriar hasta tener una temperatura media.
8. Cuando se encuentre a temperatura media suplementar con cloruro de calcio 0.7M (7.7gr/100 ml).
9. Si se requiere, añadir antibióticos y mezclar bien.
10. Distribuir en caja de Petri o frascos estériles según su uso.

1.2 Medio de cultivo LB (Luria - Bertani)

Composición

	500 ml	1000 ml	2000 ml
Peptona de caseína (gr)	5	10	20
Extracto de levadura (gr)	2.5	5	10
Cloruro de sodio (gr)	5	10	20
Para LB sólido agregar a cada matraz			
Agar (gr)	1.5	3.75	7.5

Procedimiento de preparación

1. Medir 900 mL de agua destilada en un matraz.
2. Añadir peptona de caseína, extracto de levadura y cloruro de sodio.
3. Agitar con ayuda de un agitador magnético y una placa de calentamiento en frío hasta obtener la disolución completa de los componentes.
4. En caso de preparar medio sólido, agregar el agar-agar.
5. Ajustar el volumen final a 1 litro con agua destilada.
6. Esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos
7. Dejar enfriar hasta tener una temperatura media.
8. Si se requiere, añadir antibióticos.
9. Distribuir en caja de Petri o frascos estériles según su uso.

2. Estriado para obtener colonias aisladas.

1. Esterilizar el asa bacteriológica por flameado y dejarla enfriar unos segundos en la plana de medio de cultivo.

2. Tomar una pequeña cantidad de cultivo bacteriano (regularmente 3-5 μL) o tocar suavemente una colonia aislada previa.
3. Realizar el primer estriado en un sector de agar, trazando líneas paralelas sin levantar el asa.
4. Esterilizar nuevamente el asa y enfriarla.
5. Girar la placa 90° y realizar el segundo estriado, cruzando ligeramente el final del primer sector evitando dañar el agar.
6. Repetir el proceso de esterilización del asa.
7. Girar nuevamente la placa y realizar el tercer estriado, cruzando solo una pequeña porción del segundo sector.
8. Esterilizar el asa.
9. Realizar un último giro y realizar un cuarto estriado de la misma forma que los anteriores.
10. Cerrar la placa e incubar a la temperatura y tiempo adecuados a la cepa.

3. Solución Tween 100 mL

Composición:

Tween 80

Agua destilada estéril

Preparación:

1. Medir 90 ml de agua destilada estéril.
2. Añadir 10 μl de Tween con ayuda de una micropipeta.
3. Mezclar suavemente hasta homogenizar.
4. Aforar a 100 ml con agua destilada estéril y homogenizar.
5. Homogenizar suavemente.

En caso de no tener agua destilada estéril realizar una esterilización con jeringa y filtro esterilizante.

4. Solución de Mg-Tween 500 ml

Composición:

- 1.23 gr de Sulfato de magnesio (MgSO_4)

50 µl de Tween 0.01%

500 ml de agua destilada

Procedimiento:

1. Pesar la cantidad estipulada de MgSO_4 en la balanza analítica
2. Disolver el MgSO_4 en aproximadamente 400 ml de agua destilada previamente calentada, agitando hasta su completa disolución.
3. Añadir la cantidad de Tween usando una micropipeta.
4. Mezclar suavemente hasta obtener una solución homogénea.
5. Aforar con agua destilada hasta obtener un volumen final de 500 ml.
6. Homogenizar nuevamente.
7. Esterilizar y reservar.

5. Solución Xgal (40 mg/ml)

- a) Pesar 0.04 gramos de Xgal.
 - b) Colocar en un tubo eppendorf.
 - c) Resuspender con 1 ml de dimetilsulfóxido (DNCO).
- No se filtra.

6. Solución IPTG (40 mg/ml)

- a) Pesar 0.06 gramos de IPTG.
- b) Colocar en un tubo eppendorf.
- c) Resuspender en 1.5 ml de agua ultra pura.
- d) Filtrar con jeringa y filtro.