Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



**Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional**

Esta licencia es la más restrictiva de las seis licencias principales Creative Commons, permitiendo a otras solo descargar sus obras y compartirlas con otras siempre y cuando den crédito, pero no pueden cambiarlas de forma alguna ni usarlas de forma comercial.

http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0

**UNIVERSIDAD NACIONAL" SAN LUIS GONZAGA"**
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**
**EVALUACION DE ORIGINALIDAD**

# INFORME DE REVISIÓN

Se ha realizado el análisis con el software antiplagio de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga", por parte del director de la Unidad de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas, quien deja:

## C O N S T A N C I A

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título es:

**Filogenia de los genes merP y merT en bacterias resistentes a cloruro de mercurio aisladas de ambientes acuáticos, Ica – Perú**

Presentado por:

**ADELIZ ROSARIO NEGRILLO PEVE**

Del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **CIENCIAS BIOLOGICAS** obteniéndose como resultado una coincidencia de **1%** otorgándosele el calificativo de:

**APROBADO**

Se adjunta al presenta el reporte de evaluación del software antiplagio.

Observaciones:

SE APRUEBA EL PRESENTE TRABAJO POR TENER UNA SIMILITUD MENOR O IGUAL AL LIMITE ESTABLECIDO EN EL REGLAMENTO CORRESPONDIENTE (MENOR A 20%).

Ica, 02 de Julio de 2025

FREDDY Y. CALDERÓN RAMOS
DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
FAC. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
U.N. "SAN LUIS GONZAGA" ICA

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Ciencias Biológicas

# Filogenia de los genes *merP* y *merT* en bacterias resistentes a cloruro de mercurio aisladas de ambientes acuáticos, Ica – Perú

Línea de Investigación

Salud pública y conservación del medio ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

AUTOR

NEGRILLO PEVE ADELIZ ROSARIO

**Ica – Perú**

**2025**

## DEDICATORIA

Doy gracias a Dios por haberme dado el regalo de la vida y por guiar mi camino. Quiero agradecer especialmente a mi mamá Rosa por estar siempre a mi lado en cada paso que doy, y a mi abuelo, quien desde el cielo es esa luz que me ilumina y me acompaña. También agradezco a mis padres por todo su apoyo y respaldo durante mi recorrido profesional. Y a todas las personas que estuvieron conmigo en este proceso, brindándome su apoyo y ánimo para sacar adelante este trabajo de investigación.

## AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis, Dr. Juan Carlos Tantaleán Vásquez y Dra. Rosa Altamirano Díaz por su orientación, indicaciones, consejos y apoyo para la ejecución del presente trabajo de investigación.

Al laboratorio de análisis BioSLab, por permitirme realizar parte de los procedimientos necesarios para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Universidad Nacional San Luis Gonzaga (UNICA) y en especial a la Facultad de Ciencias Biológicas por formarme como profesional durante 5 años, además de brindarme las instalaciones para realizar mi trabajo de investigación.

Al Vicerrectorado de Investigación de la UNICA por el financiamiento de la tesis según RESOLUCIÓN VICERRECTORAL Nº083-VRI-UNICA-2022.

A mis profesores de la UNICA que contribuyeron en mi formación y a todas las personas que de alguna manera influyeron y colaboraron en la realización de esta tesis.

# INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA……i

AGRADECIMIENTOS……ii

INDICE DE CONTENIDO……...iii

INDICE DE TABLAS……...……iv

INDICE DE FIGURAS …… v

RESUMEN……vi

ABSTRACT……vii

I. INTRODUCCION……1
II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA…….5
2.1. Material Biológico…….5
2.2. Conservación y reactivación de cepas bacterianas ……..5
2.3. Extracción de ADN……...5
2.4. Diseño de partidores específicos para los genes *mer*P y *mer*T……..….6
2.5. Detección de los genes *mer*P y *mer*T mediante reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR)…….……..7
2.6. Electroforesis de amplicones de PCR en gel de agarosa ……..…….8
2.7. Secuenciación de amplificados de PCR……..…9
2.8. Búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos “GenBank”…….…….…..9
2.9. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas……...9
2.10. Elección de modelo evolutivo…….……...10
2.11. Construcción de árboles filogenéticos…….…...10
2.12. Construcción de matriz de identidad……..10
III. RESULTADOS……11
IV. DISCUSIÓN……..23
V. CONCLUSIONES…….26
VI. RECOMENDACIONES……27
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS……...……... 28
VIII. ANEXOS …….…… 34

## INDICE DE TABLAS


**Tabla 1.** Partidores utilizados para la detección de los genes *merP* y *merT.* 6

**Tabla 2.** Componentes de la reacción de PCR para amplificar genes *merP1, merP2, merT1 y merT2.* 7

**Tabla 3**. Amplificados de los genes *merP1* y *merT1* en bacterias resistentes a mercurio aisladas de aguas residuales. 11

**Tabla 4.** Amplificados de los genes *merP2 y merT2* en bacterias aisladas de aguas residuales. 11

**Tabla 5.** Similitud entre las secuencias del gen *merP2* con la base de datos de GenBank obtenida mediante BLASTn. 12

**Tabla 6.** Similitud entre las secuencias del gen *merT1* con la base de datos de GenBank obtenida mediante BLASTn 13

**Tabla 7.** Similitud entre las secuencias del gen *merT2* con la base de datos del GenBank obtenida mediante BLASTn. 14

**Tabla 8.** Valores estadísticos en relación a los porcentajes de similitud entre las secuencias nucleotídicas del gen *merP2* de bacterias resistentes a mercurio obtenidos en la matriz de identidad. 15

**Tabla 9.** Valores estadísticos en relación a los porcentajes de similitud entre secuencias nucleotídicas del gen *merT1* de bacterias resistentes a mercurio obtenidos en la matriz de identidad. 15

**Tabla 10.** Valores estadísticos en relación a los porcentajes de similitud entre secuencias nucleotídicas del gen *merT2* de bacterias resistentes a mercurio obtenidos en la matriz de identidad. 16

**Tabla 11.** Matriz de identidad creada con ClustalW. Porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas del gen *merP2* 40

**Tabla 12.** Matriz de identidad creada con ClustalW. Porcentajes de similitud de pares de secuencias nucleotídicas del gen *merT2* 41

**Tabla 13**. Matriz de identidad creada con Clustal W. Porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas del gen *merT1* 42

## INDICE DE FIGURAS


**Figura 1.** Determinación del gen *merT1* en electroforesis gel de agarosa al 2%, mostrando amplificaciones en los carriles 1: I3-2; 2: M1A-2; 3: N1A-1; 5: Y-01. 10

**Figura 2.** Árbol filogenético de secuencias de nucleótidos de genes *merP2* de bacterias aisladas de fuentes acuáticas utilizando el método Neighbor-Joining. 17

**Figura 3.** Árbol filogenético de secuencias de nucleótidos de genes *merT1* de bacterias aisladas de fuentes acuáticas utilizando el método Neighbor-Joining. 18

**Figura 4.** Árbol filogenético de secuencias de nucleótidos *merT2* de aislados bacterianos de fuentes acuáticas. 19

**Figura 5.** Flujograma de reactivación de cepa bacteriana. 33

**Figura 6.** Flujograma de pasos para un análisis filogenético. 34

**Figura 7.** Detección de ADN genómico en gel de agarosa 35

**Figura 8.** Preparación de las reacciones de PCR. Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Microbiología Industrial. 35

**Figura 9.** Secuencia nucleotídica de genes merT1-F 36

**Figura 10.** Secuencias nucleotídicas de genes merT1-R 36

**Figura 11.** Algoritmo BLASTn en la página web de National Center for Biotechnology Information (NCBI). 37

**Figura 12.** Programa Mega-X. 37

**Figura 13.** Interfaz de Mega X para elegir un modelo evolutivo. 38

**Figura 14.** Programa BioEdit. 38

**Figura 15.** Programa Clustal W. 39

**RESUMEN**

Las bacterias resistentes a mercurio contienen en su genoma genes, componentes del operón *mer*, que le confieren resistencia a este metal tóxico. Los genes *merP* y *merT,* llamados transportadores, codifican para proteínas que trasladan el mercurio al interior de la célula donde se reduce a una forma menos tóxica. El objetivo fue evaluar la filogenia de los genes *merP* y *merT* de 16 cepas bacterianas resistentes a mercurio, pertenecientes al laboratorio de Biología Molecular y Microbiología Industrial-UNICA. Se extrajo ADN genómico para determinar la presencia de los genes *merP* y *merT* utilizando la técnica de PCR. Se emplearon partidores específicos con base a enterobacterias y *Pseudomonas*. Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados mediante el método de Sanger y las secuencias nucleotídicas se procesaron con herramientas bioinformáticas como Bioedit para la limpieza y alineamiento de secuencias consenso, el programa ClustalW estableció una matriz de identidad, el algoritmo BLASTn proporcionó similitud de secuencias con la base de datos de Genbank. La elaboración de árboles filogenéticos se realizó usando el programa MegaX que reveló la relación evolutiva de las cepas bacterianas. Se detectó la presencia de los genes *merP* y *merT* para el género *Pseudomonas* mientras que para la familia Enterobacteriaceae solo se detectó el gen *merT.* Se concluye que los genes *merP* y *merT* están presentes en bacterias resistentes a mercurio aisladas en la región Ica y tienen una relación evolutiva cercana.

**PALABRAS CLAVE**: Resistencia, mercurio, operón *mer*, filogenia, genes *merP* y *merT*.

## ABSTRACT

Mercury-resistant bacteria contain genes in their genome, components of the mer operon, which confer resistance to this toxic metal. The *merP* and *merT* genes, called transporters, code for proteins that transport mercury into the cell where it is reduced to a less toxic form. The objective was to evaluate the phylogeny of the *merP* and *merT* genes of 16 mercury-resistant bacterial strains belonging to the Molecular Biology and Industrial Microbiology Laboratory-UNICA. Genomic DNA was extracted to determine the presence of the *merP* and *merT* genes using the PCR technique. Specific primers based on enterobacteria and Pseudomonas were used. The PCR products obtained were sequenced using the Sanger method and the nucleotide sequences were processed with bioinformatics tools such as Bioedit for the cleaning and alignment of consensus sequences, the ClustalW program established an identity matrix, the BLASTn algorithm provided sequence similarity with the Genbank database. Phylogenetic trees were constructed using the MegaX program, which revealed the evolutionary relationship of the bacterial strains. The presence of the *merP* and *merT* genes was detected for the *Pseudomonas* genus, while only the *merT* gene was detected for the Enterobacteriaceae family. It is concluded that the *merP* and *merT* genes are present in mercury-resistant bacteria isolated in the Ica region and have a close evolutionary relationship.



**KEYWORDS:** Resistance, mercury, *mer* operon, phylogeny, *merP* and *merT* genes.

# I. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados es un problema creciente, principalmente debido a las actividades antropogénicas. La minería, la metalurgia, la agricultura, los vehículos de motor, entre otros, son las principales fuentes de contaminación (1). Estos metales pueden llegar a contaminar ríos, lagos, cultivos, suelo, aire de áreas urbanas, ambientes costeros y marinos. La biomagnificación de este metal a través de la cadena alimenticia representa un riesgo para la salud debido a su presencia en tejidos de peces y moluscos (2, 3). Las bacterias resistentes a metales pesados, usan diferentes mecanismos; como: el transporte transmembrana, el secuestro a nivel intracelular y extracelular, la formación de complejos y las reacciones redox, las cuales son la base de diferentes estrategias de biorremediación (4).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera al mercurio (Hg) uno de los diez compuestos químicos que ocasionan más problemas en la salud pública (5, 6)**.** Debido a su naturaleza metálica, se bioacumula en los organismos ocasionando problemas graves de salud en personas, así como también al ambiente (6–8). Esto ocasiona que a medida que se escale en la cadena trófica, la cantidad de mercurio acumulada en los organismos de especies superiores sea más alta (9, 10).

El mercurio causa múltiples efectos tóxicos, dependiendo del estado químico en el que se encuentre (11)**.** En su forma elemental o metálica ($Hg^0$), se halla de forma natural en las erupciones volcánicas, en amalgamas dentales, termómetros, entre otros; el mercurio inorgánico ($Hg^{2+}$), presente en residuos mineros, pinturas, ampollas, cosméticos, donde la ruta de exposición es digestiva y cutánea; el mercurio orgánico "metilmercurio", ingresa en el cuerpo humano por la ingesta de alimentos contaminados como peces, mariscos, aves y mamíferos que los ingieren; la ruta de exposición es digestiva e inclusive transplacentaria, ya que durante el embarazo puede entrar en contacto con el bebé y causar problemas de desarrollo (12). Estas formas de mercurio se diferencian por el grado de toxicidad y el daño que ocasionan en los sistemas nervioso, inmunitario, digestivo y órganos como la piel, los pulmones, riñones y ojos (7, 13, 14)**.**

Las bacterias expuestas a ambientes contaminados con metales pesados desarrollaron mecanismos a través de los años que constituyen defensas que les permiten sobrevivir en ambientes altamente tóxicos (15). Una gran variedad de especies bacterianas son resistentes al mercurio, entre ellos algunos miembros de los géneros bacterianos como *Pseudomonas, Proteus, Xanthomonas, Alteromonas, Aeromonas, Staphylococcus, Bacillus, Klebsiella* y otras enterobacterias (16)**.** La resistencia al mercurio es conferida por genes que codifican proteínas y se encuentran inmersos en los cromosomas, plásmidos y algunos elementos transponibles, que generan duplicaciones y distribuciones de las enzimas, transportadores o reguladores entre varios replicones de una célula (17).

La resistencia al mercurio se le atribuye a la presencia del operón *mer* y otros genes de respuesta general (15, 18)**.** La presencia de este operón en las bacterias, como mecanismo principal para la desintoxicación de mercurio, demuestra su importancia en la naturaleza (19). El operón *mer* es un sistema génico compuesto por un conjunto de genes que funcionan en sincronía para conferir resistencia al mercurio, incluye los genes funcionales *merA* y *merB*, que codifican para las enzimas ion mercúrico reductasa y organomercurial liasa, respectivamente; los genes transportadores de mercurio *merP* y *merT* y los genes reguladores *merD* y *merR* (20). Las proteínas MerP y MerT están involucradas en el transporte del mercurio hacia el interior de la célula y sus genes han sido encontrados en plásmidos y transposones, principalmente en bacterias Gram negativas (21–23)**.** Las especies bacterianas que contienen los genes *merP* y *merT* están mejor adaptadas para sobrevivir en ambientes con altos niveles de mercurio y son capaces de transformar este metal en formas menos tóxicas utilizando los productos de los genes *merA* y *merB* (24, 25)**.**

Cuando se incorpora mercurio inorgánico a una célula bacteriana resistente, las proteínas transportadoras actúan de manera coordinada para controlar su absorción a través de la membrana bacteriana para luego convertirlas en formas menos tóxicas (24)**.** En el espacio periplásmico, el mercurio se une a un par de residuos de cisteína de la proteína MerP. Luego, se transfiere a otro par de residuos de cisteína en la proteína MerT, una proteína de membrana citoplasmática. Finalmente, el mercurio se transfiere a un par de cisteínas en el sitio activo de MerA (reductasa de mercurio) que lo convierte de mercurio inorgánico a mercurio volátil. Cuando el mercurio es orgánico, participa la enzima MerB, que degrada los organomercuriales por proteólisis liberando al mercurio (26)**.** Se han identificado otros genes componentes del operón *mer* que codifican para proteínas transportadoras y otras, estas son *merC, merE* y *merF* (27, 28)**.**

Numerosas cepas bacterianas Gram negativas resistentes a mercurio y aisladas de diferentes fuentes ambientales, presentan genes del operón *mer* en el cromosoma, plásmidos y transposones (22). *Pseudomonas putida,* aislada de un ambiente marino, resistió a concentraciones de 200µM y 300µM de $HgCl_2$, presenta los genes transportadores *merT, merP* y *merC* en su cromosoma y tuvo la capacidad de volatilizar el mercurio presente en los medios de cultivo (29)**.** Las especies *Pseudomonas stutzeri* y *Pseudomonas aeruginosa* portadoras de los genes *merP* y *merT* fueron capaces de tolerar hasta 1000 µM de $HgCl_2$ (24)**.** *Pseudomonas stutzeri* 273, aislada de una fuente marina, demostró mediante ensayos genéticos y transcriptómicos que los genes *merA, merP, merT, merD* y *merR* son los responsables de la resistencia a mercurio (30)**.** *Pseudomonas pseudoalcaligenes* S1, presento una alta resistencia a mercurio y gran capacidad de bioacumulación. Los genes que expresaron después de la exposición a $Hg^{2+}$ fueron *merT, merP* y *merA*. La mayor resistencia y bioacumulación de $Hg^{2+}$ se observó cuando los genes *merT* y *merP* se expresaron juntos (31)**.** Asimismo, otras especies de bacterias se han aislado de aguas

contaminadas con mercurio y se ha determinado la presencia de los genes *merP* y *merT* mediante la técnica de PCR (24, 29). También se ha documentado el uso de bacterias resistentes a metales pesados unidas a *Phragmites australis* para ser usado como barrera biológica en humedales artificiales, durante el tratamiento de aguas residuales, donde demostró el mayor porcentaje de eliminación de mercurio después de 304 días (26, 32).

La filogenia es un análisis sistemático de las relaciones evolutivas entre especies, basado en secuencias genómicas, representando como un árbol que muestra las líneas evolutivas (33)**.** Estos análisis permiten evaluar e interpretar las características claves de la historia filogenética entre especies a partir de los datos observados (34)**.** Las técnicas filogenéticas brindan un análisis exhaustivo de la biología evolutiva de las especies debido a su versatilidad. En bacterias, se usan técnicas de identificación y clasificación, para reconstruir relaciones evolutivas e identificar casos de transferencia horizontal de genes entre las especies (35, 36)**.**

Los árboles filogenéticos son gráficos que expresan relaciones genéticas, en los que el tiempo fluye desde la raíz del árbol, que representa una era anterior, hasta los puntos actuales. Las ramas representan relaciones evolutivas, estrechamente relacionadas con individuos o grupos. Los nodos representan ancestros comunes, mientras que las puntas representan individuos u organismos (22)**.** Los árboles filogenéticos se elaboran mediante la técnica estadística "Bootstrap" que alinea las secuencias de nucleótidos de ADN múltiples veces, obteniendo árboles filogenéticos por cada arranque, y se describen como un árbol consenso (37, 38).

En la actualidad, la contaminación por mercurio es un problema ambiental significativo, especialmente en ecosistemas acuáticos, como consecuencia de su uso en minería para extracción de oro. En el Perú, la minería es una actividad que se realiza en las 24 regiones, concentrándose el 97% de la producción en Madre de Dios, Puno, Arequipa, Ayacucho e Ica; por lo que, se han identificado altos niveles de mercurio en diversos cuerpos de agua, generando un impacto adverso en la biodiversidad y la salud humana (3, 7, 39, 40, 41).

Los genes que confieren resistencia a los metales pesados tóxicos pueden ser utilizados como marcadores para identificar microorganismos resistentes y al conocer los mecanismos involucrados se pueden desarrollar estrategias de biorremediación para eliminar contaminantes específicos (16, 19, 40, 41). El análisis de los genes transportadores de mercurio, específicamente *merP* y *merT*, en bacterias resistentes a mercurio procedentes de ambientes acuáticos es muy importante para comprender su relación en diferentes especies, su movilidad genética y si participan en la biorremediación natural y adaptación frente a la contaminación con mercurio. Las bacterias que expresan estos genes desarrollaron mecanismos evolutivos para sobrevivir en

ambientes contaminados, permitiéndoles no solo resistir la toxicidad del mercurio, sino también disminuir su concentración mediante procesos bioquímicos (4, 7, 18, 19, 42).

La detección de los genes *merP* y *merT* y su estudio filogenético en bacterias acuáticas indica la participación de un mecanismo para la desintoxicación natural del mercurio y su potencial aplicación biotecnológica (44, 45). Asimismo, se avanza en la comprensión del rol que cumplen estos microorganismos en ambientes contaminados con mercurio y si existe movilidad génica entre ellos, mecanismo natural que permite la selección de agentes biorremediantes que permiten la recuperación de hábitats acuáticos.

# II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

## 2.1. Material Biológico.

Se utilizaron cepas bacterianas aisladas de aguas residuales de la región Ica. Pertenecientes a la colección del Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Microbiología Industrial, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Las cepas utilizadas pertenecen a la familia Enterobacteriaceae y al género *Pseudomonas*, según la identificación preliminar por pruebas bioquímicas y fisiológicas. Estas se codificaron según su procedencia: C, Cachiche; I, Ingenio; Y, Yaurilla; S, Saramarca; M, Marcona; E y N, otros lugares. Los códigos fueron los siguientes: C1-G1, C1-J1, EL2-2, I3-2, I3-3, I4-1, I4-2, M1A-2, M1C-3, N1A-1, N1A-2, S2-1, Y1-F, Y-01, Y1-E, Y1-H2.

## 2.2. Conservación y reactivación de cepas bacterianas.

Las cepas se conservaron a -20°C en caldo Luria Bertani (LB) suplementado con glicerol al 30%. Se inoculó una alícuota de 100 µL en 2 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI) y se incubó a 35 °C por 24 a 48 h.

Para verificar la pureza de la cepa, del cultivo anterior se realizó siembra en agar LB suplementado con $HgCl_2$ (10 µg/ml). Se evaluó el tipo de colonias en busca de la uniformidad de su morfología. Adicionalmente, se tomó una colonia típica y se sembró por estría y agotamiento en placas con agar MacConkey. Las incubaciones en ambos casos fueron a 35 °C por 24 h.

## 2.3. Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit comercial de purificación Gene JET (Thermo Scientific, USA). El procedimiento fue el siguiente: en tubos Eppendorf de 1.5 ml se adicionó 1.5 ml de cultivo de cepa bacteriana con un crecimiento menor de 24 h. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular con 180 µl de solución de digestión. Luego, se añadió 20 µl de proteinasa K y se homogeneizó por vórtex hasta obtener una suspensión uniforme. La suspensión bacteriana se incubó a 56 °C por 30 min en baño María y cada diez minutos se realizó una mezcla breve con vórtex, hasta que las células estén completamente lisadas. Pasado el tiempo indicado se adicionó 20 µl de RNasa, se mezcló brevemente por vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Luego, se añadió 200 µl de solución de lisis y se aplicó vórtex por 15 s, hasta tener una mezcla homogénea. En seguida, se adicionó 400 µl de etanol al 50% y se homogeneizó

por vórtex. El lisado se transfirió a una columna de purificación de ADN genómico insertada en un tubo de colección de 2 ml. Se centrifugó la columna durante 1 min a 10,000 rpm, se descartó el tubo colector que contiene el sobrenadante pasado y se reemplazó por un tubo colector nuevo. Se agregó 500 µl de tampón de lavado1. Luego, se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min. El líquido pasado se descartó y se colocó nuevamente la columna en un tubo colector. Se agregó 500 µl de tampón de lavado 2 y se centrifugó a máxima velocidad (14000 rpm) por 3 min, se descartó la solución residual y se volvió a centrifugar por 1 min a máxima velocidad para evitar residuos de lavado. Se descarto el tubo colector que tenía la solución residual de lavado y se transfirió la columna a un microtubo Eppendorf de 1.5 ml. Para finalizar, se agregó 100 µl de tampón de elusión en el centro de la membrana de la columna de purificación. Se dejó incubar por 2 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min. Para obtener una mayor cantidad de ADN se volvió a adicionar 100 µl más de tampón de elusión y se repitió el paso anterior. Finalmente, se descartó la columna y el ADN se conservó a -20 °C.

El producto de extracción de ADN fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1x. Las muestras se prepararon mezclando 1 µl de tampón de carga con 5 µl de solución de ADN. La electroforesis procedió a 50 V por 1h luego de colocar las muestras en el gel. Una vez concluido el tiempo de electroforesis, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.1 µg/ml) por 1 min y se lavó con agua destilada por 30 min. Finalmente, la visualización de las bandas de ADN genómico se realizó exponiendo el gel en un transiluminador Biotop a 320 nm.

### 2.4. Diseño de partidores específicos para los genes *merP* y *merT*

Para diseñar los partidores se obtuvieron secuencias completas de los genes *merP* y *merT* de la base de datos del National Center for Biotechnology Information - NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Se usaron secuencias de enterobacterias y *Pseudomonas* dado que las cepas utilizadas fueron clasificadas dentro de estos dos grupos. Se usaron como secuencias de referencia las pertenecientes a las especies *P. putida*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas juntendi* y *Pseudomonas monteilii*. Las secuencias se alinearon con el programa Mega X (https://www.megasoftware.net/), la secuencia consenso se obtuvo con el programa Bioedit (https://bioedit.software.informer.com/Descargar-gratis/). Esta secuencia fue guardada en formato FASTA para su uso posterior. El diseño se realizó con la secuencia consenso y utilizando el programa Web Primer (http://www.candidagenome.org/cgi-bin/compute/web-primer). Se establecieron los siguientes parámetros: Tamaño de

partidores, con un mínimo de 18 nucleótidos (*mer*) y un máximo 21 (*mer)*; temperatura de melting, entre 55 °C y 57 °C. Los demás parámetros fueron establecidos por defecto. Los mejores pares de partidores fueron generados automáticamente por el programa en base a los parámetros establecidos. Adicionalmente se utilizaron partidores obtenidos de la literatura (Tabla 1).

**Tabla 1.** Partidores utilizados para la detección de los genes *merP* y *merT*.

| Nombre del partidor | Secuencia 5'-3' | Tm | Referencia |
|---|---|---|---|
| merP1-F | ATGAAGAAACTGTTTGCCTCC | 58 | (24) |
| merP1-R | TCACTGCTTGACGCTGGACG | 66 | (24) |
| merT1-F | ATGTCTGAACCACAAAACGGG | 62 | (24) |
| merT1-R | TTAATAGAAAAATGGAACGAC | 52 | (24) |
| merP2-F | TGAAAAAACTGCTTGCATCCT | 60 | Por el autor |
| merP2-R | TATTGCTTGACGCTGGACG | 61 | Por el autor |
| merT2-F | ATGTCTGAACCATCAAACGGG | 62 | Por el autor |
| merT2-R | AAGGGGAGGATGTAGGGGAAA | 63 | Por el autor |

## 2.5. Detección de los genes *merP* y *merT* mediante reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).

La amplificación de los genes *merP* y *merT* se realizó mediante PCR, utilizando ADN genómico de cada una de las cepas y los partidores indicados en la Tabla 1. Para diferenciar los productos, éstos se indicarán como los genes *merP1, merP2, merT1* y *merT2.*

Para los genes *merP1* y *merP2* se estableció el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial, a 94 °C por 5 min, luego 30 ciclos de PCR (desnaturalización a 94 °C por 1 min; hibridación de partidores a 58 °C y 54 °C por 1 min para *merP1* y *merP2,* respectivamente; extensión a 72 °C por 1 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR esperados fueron de 276 pb y 271 pb para *merP1* y *merP2,* respectivamente.

Para amplificar el gen *merT1* se usaron los partidores indicados en la Tabla 1 y se empleó el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial, a 94 °C por 3 min, luego 30 ciclos de PCR (desnaturalización a 94 °C por 30 s; hibridación de partidores a 55,3 °C por 20 s; extensión a 72 °C por 30 s) y una extensión final a 72 °C por 5 min. El producto de PCR esperado fue de 351 pb.

Para el gen *mer*T2 se estableció el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, luego 30 ciclos de PCR (desnaturalización a 94 °C por 1 min; hibridación de partidores a 57 °C por 1 min; extensión a 72 °C por 1 min) y una extensión final a 72 °C por 10 min. El producto de PCR esperado fue de 350 pb.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador DLAB TC1000-G en un volumen de reacción de 25 µL diseñado como se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Componentes de la reacción de PCR para amplificar genes *merP1, merP2, merT1 y merT2*

| Reactivos | Volumen (µl) |
|---|---|
| $H_2O$ libre de nucleasas | 9.5 |
| PCR master mix (2x) | 12.5 |
| Partidor-F (40 pmol/µl) | 0.5 |
| Partidor-R (40 pmol/µl) | 0.5 |
| ADN genómico | 2 |
| Volumen final | 25 |

## 2.6. Electroforesis de amplicones de PCR en gel de agarosa

Se usó 5 µl de producto de cada reacción de PCR con 1 µl de tampón de carga. Para verificar el tamaño de las bandas se usó un gel de agarosa al 2% preparado en tampón TAE, y el marcador de peso molecular Gene ruler 1kb DNA Lader. La electroforesis procedió a 50 V por 1h, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.1 µg/ml) por 1 min, posteriormente se lavó con agua destilada por 30 min. Finalmente, la visualización de las bandas del producto de PCR se realizó exponiendo el gel en un transiluminador Biotop a 320 nm.

## 2.7. Secuenciación de amplificados de PCR

Los productos de amplificación de los genes *merP2, merT1 y merT2* obtenidos mediante PCR se almacenaron a -20 °C hasta su remisión a secuenciación a la empresa Macrogen Chile (https://dna.macrogen.com/main.do), según las indicaciones y la información solicitada en los formatos de remisión (https://dna.macrogen.com/support/retrieveDownloadCenter.do?menuCd=SUP500). De cada producto de amplificación se remitió 10 µl (50 ng/ µl) y de cada partidor 20 µl (10 pmol/ µl). Ambos fueron preparados en tubos Eppendorf de 1.5 ml según las indicaciones de la empresa.

## 2.8. Búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos "GenBank"

Para identificar a los genes *merP* y *merT*, las secuencias nucleotídicas de los amplificados por PCR se compararon con secuencias depositadas en GenBank de NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), mediante el algoritmo "Basic Local Alignment Search Tool", BLASTn; para detectar secuencias de homólogas en su base de datos (46,47)**.** Se seleccionaron las opciones de búsqueda "nucleotide collection (nr/nt) y "Highly similar sequences (megablast)". Los valores "Max. Score" (puntuación de la mejor secuencia alineada) y "Total score" (suma de puntuaciones de todas las secuencias alineadas), se usaron como parámetros para determinar la similitud y clasificar las secuencias homólogas. Cuanto más altos son estos valores, la secuencia de consulta con la secuencia objetivo en la base de datos, están más estrechamente relacionadas. Asimismo, se examinaron los valores E que estaban más cerca de 0, un parámetro que proporciona una estimación de la significancia estadística de la similitud. Es decir, cuanto más cerca de cero esté el valor E, es más probable que el resultado sea idéntico a la secuencia de consulta (42,44,48).

## 2.9. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas.

Para obtener el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes *merP2*, *merT1* y *merT2* se usó el programa Mega X (https://www.megasoftware.net/). Se inició con la creación de un nuevo alineamiento con la opción "ALIGN", se seleccionó "edit/build alignment" con la opción "create a new alignment" y designando el "data type for alignment" como DNA. Se copiaron las secuencias dando "clic" derecho en "sequence 1" y luego se seleccionó pegar. Antes de empezar con el alineamiento se eliminó la última secuencia "sequence 1", luego se seleccionaron todas las secuencias utilizando ctrl+E, se hizo "click" en "Alignment", se seleccionó "Align by Clustal W" y se aceptó la configuración por defecto para el alineamiento de secuencias nucleotídicas. El alineamiento generó una data que se guardó asignando un nombre en formato MAS,

compatible con Mega X (https://www.megasoftware.net/). El alineamiento se usó para identificar el modelo adecuado para la construcción del árbol filogenético para ambos genes.

### 2.10. Elección de modelo evolutivo

Dentro del programa Mega X (https://www.megasoftware.net/), se seleccionó en "MODELS" la opción "Find Best DNA/Protein Models (ML)", se desplegó una ventana para elegir el documento de secuencias previamente alineado y guardado en formato MAS y se aceptó la configuración por defecto. El programa brindó una serie de modelos evolutivos de forma descendente donde el primer resultado usualmente es el mejor modelo a usar (49, 50).

### 2.11. Construcción de árboles filogenéticos

Para la construcción de los árboles filogenéticos se usó el método estadístico "Neighbor-joining" (51). El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque "Bootstrap" (1000 réplicas) se muestran junto a las ramas (52). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 3 parámetros de Tamura (53) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio.

Para las secuencias del gen *merP2*, el análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos, con un total de 298 posiciones en el conjunto de datos final. Para las secuencias del primer grupo del gen *merT1*, el análisis involucró 26 secuencias de nucleótidos. Con un total de 353 posiciones en el conjunto de datos final. Para las secuencias del gen *merT2*, el análisis involucró 5 secuencias de nucleótidos con un total de 358 posiciones en el conjunto de datos final. En todos los genes, todas las posiciones ambiguas se eliminaron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2 parámetros de Kimura (54). Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11 (55).

### 2.12. Construcción de matriz de identidad

Para la construcción de matriz de identidad, se usó el programa en línea CLUSTAL OMEGA (https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo), se realizó la comparación de pares para obtener los porcentajes de similitud de cada secuencia. Las secuencias de ADN se ingresaron al programa en formato FASTA, en la opción "Sequence Type" se seleccionó DNA, se dio inicio al análisis haciendo clik en "Submit", al finalizar el análisis el resultado se encontró en el apartado "Result Files" con la denominación "Percent Identity Matrix". Los resultados se analizaron de acuerdo a las medidas de tendencia central (media, mediana y moda).

# III. RESULTADOS

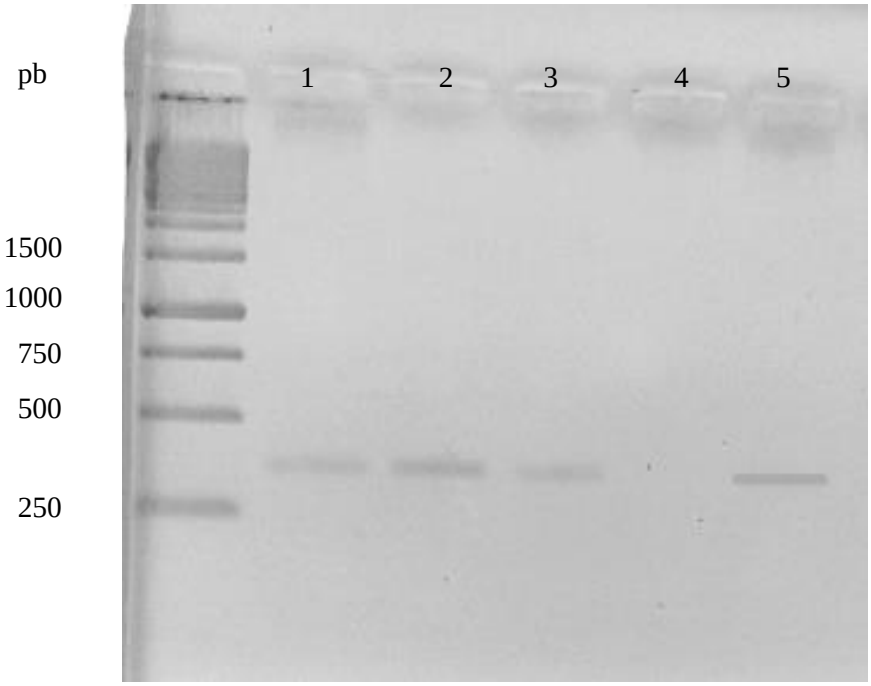



**Figura 1.** Determinación del gen *merT1* en electroforesis gel de agarosa al 2%, mostrando amplificaciones en los carriles 1: I3-2; 2: M1A-2; 3: N1A-1; 5: Y-01.

**Tabla 3**. Amplificados de los genes *merP1* y *merT1* en bacterias resistentes a mercurio aisladas de aguas residuales.

| Cepa | *merP1* | *merT1* |
|---|---|---|
| I3-2 | - | + |
| M1A-2 | - | + |
| N1A-1 | - | + |
| Y-01 | - | + |

**+: presencia; -: ausencia**

**Tabla 4.** Amplificados de los genes *merP2 y merT2* en bacterias aisladas de aguas residuales.

| Cepa | *merP2* | *merT2* |
|---|---|---|
| I3-3 | + | + |
| I4-1 | + | + |
| I4-2 | + | + |
| S2-1 | + | + |
| Y1-E | + | + |
| Y1-H2 | + | + |
| C1-G1 | + | + |
| C1-J1 | + | + |
| M1C-3 | + | + |
| EL2-2 | + | + |
| N1A-2 | + | + |
| Y1-F | + | + |

**+: presencia; -: ausencia**

**Tabla 5.** Similitud entre las secuencias del gen *merP2* con la base de datos de GenBank obtenida mediante BLASTn.

| Cepa | Cepa de referencia | Acceso | Max. score | Total score | Valor E | Cobertura (%) | Identidad (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *C1-G1 A | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 516 | 822 | 1.00E-141 | 100 | 100 |
| *C1-G1 B | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| C1-J1 A | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 510 | 927 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| C1-J1 B | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 516 | 822 | 1.00E-141 | 100 | 100 |
| C1-J1 C | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| EL2-2 | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| I3-3 A | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 516 | 822 | 1.00E-141 | 100 | 100 |
| I3-3 B | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| I4-1 A | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 510 | 927 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| I4-1 B | *Pseudomonas aeruginosa* | CP040126.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| I4-2 A | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 510 | 927 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| I4-2 B | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| M1C-3 A | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 516 | 822 | 1.00E-141 | 100 | 100 |
| M1C-3 B | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| N1A-2 A | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| N1A-2 B | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 516 | 822 | 1.00E-141 | 100 | 100 |
| N1A-2 C | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| S2-1 A | *Pseudomonas aeruginosa* | MT043137.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| S2-1 B | *Pseudomonas aeruginosa* | MN583270.1 | 516 | 516 | 1.00E-141 | 100 | 100 |
| S2-1 C | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 510 | 927 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| Y1-E A | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 516 | 822 | 1.00E-141 | 100 | 100 |
| Y1-E B | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 510 | 510 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| Y1-F | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 510 | 927 | 6.00E-140 | 100 | 100 |
| Y1-H2 | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP128190.1 | 510 | 1026 | 6.00E-140 | 100 | 100 |

**Tabla 6.** Similitud entre las secuencias del gen *merT1* con la base de datos de GenBank obtenida mediante BLASTn.

| Cepa | Cepa de referencia | Acceso | Max. score | Total score | Valor E | Cobertura (%) | Identidad (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I3-2 | *Escherichia coli SCU-397* | CP054830.1 | 649 | 649 | 0.0 | 99 | 100 |
| Y-01 | *Klebsiella sp. Gen ND3* | JN188353.1 | 619 | 619 | 1e-172 | 100 | 98.28 |
| N1A-1 | *Citrobacter freundii* | JN188346.1 | 603 | 603 | 1e-167 | 100 | 98.53 |
| M1A-2 | *Klebsiella pneumoniae F16KP0050* | CP052176.1 | 599 | 599 | 2e-166 | 100 | 99.69 |

**Tabla 7.** Similitud entre las secuencias del gen *merT2* con la base de datos del GenBank obtenida mediante BLASTn.

| Cepa | Cepa de referencia | Acceso | Max. score | Total score | Valor E | Cobertura (%) | Identidad (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *C1-G1 A | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 649 | 962 | 0 | 100 | 100 |
| *C1-G1 B | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 649 | 0 | 100 | 100 |
| C1-J1 A | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 649 | 1130 | 0 | 100 | 100 |
| C1-J1 B | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 649 | 962 | 0 | 100 | 100 |
| C1-J1 C | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 649 | 0 | 100 | 100 |
| EL2-2 | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 649 | 0 | 100 | 100 |
| I3-3 A | *Achromobacter xylosoxidans* | CP054571.1 | 649 | 649 | 0 | 100 | 100 |
| I3-3 B | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 649 | 962 | 0 | 100 | 100 |
| I3-3 C | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 649 | 0 | 100 | 100 |
| I4-1 A | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 649 | 1130 | 0 | 100 | 100 |
| I4-1 B | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 1298 | 0 | 100 | 100 |
| I4-2 A | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 649 | 1130 | 0 | 100 | 100 |
| I4-2 B | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 1298 | 0 | 100 | 100 |
| M1C-3 A | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 649 | 962 | 0 | 100 | 100 |
| M1C-3 B | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 649 | 0 | 100 | 100 |
| N1A-2 A | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 1298 | 0 | 100 | 100 |
| N1A-2 B | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 649 | 962 | 0 | 100 | 100 |
| N1A-2 C | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 649 | 0 | 100 | 100 |
| S2-1 A | *Pseudomonas aeruginosa* | MN583270.1 | 649 | 1281 | 0 | 100 | 100 |
| S2-1 B | *Pseudomonas aeruginosa* | MN583270.1 | 649 | 1196 | 0 | 100 | 100 |
| S2-1 C | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 649 | 1130 | 0 | 100 | 100 |
| Y1-E A | *Pseudomonas guguanensis* | CP040349.1 | 649 | 649 | 0 | 100 | 100 |
| Y1-E B | *Pseudomonas sp. NY5710* | CP045554.1 | 649 | 962 | 0 | 100 | 100 |
| Y1-F | *Pseudomonas aeruginosa* | CP128190.1 | 649 | 1130 | 0 | 100 | 100 |
| Y1-H2 | *Pseudomonas aeruginosa* | CP050322.1 | 649 | 649 | 0 | 100 | 100 |

**Tabla 8.** Valores estadísticos en relación a los porcentajes de similitud entre las secuencias nucleotídicas del gen *merP2* de bacterias resistentes a mercurio obtenidos en la matriz de identidad.

| Similitud de secuencias nucleotídicas del gen *merP2* | |
|---|---|
| Medidas de tendencia central | Valor estadístico (%) |
| Media | 80.76 |
| Mediana | 79.71 |
| Moda | 100 |
| N° más bajo | 57.88 |
| N° más alto | 100 |

**Tabla 9.** Valores estadísticos en relación a los porcentajes de similitud entre secuencias nucleotídicas del gen *merT1* de bacterias resistentes a mercurio obtenidos en la matriz de identidad.

| Similitud de secuencias nucleotídicas del gen *merT1* | |
|---|---|
| Medidas de tendencia central | Valor estadístico (%) |
| Media | 91.035 |
| Mediana | 89.145 |
| Moda | 100 |
| N° más bajo | 83.49 |
| N° más alto | 100 |

**Tabla 10.** Valores estadísticos en relación a los porcentajes de similitud entre secuencias nucleotídicas del gen *merT2* de bacterias resistentes a mercurio obtenidos en la matriz de identidad.

| Similitud de secuencias nucleotídicas del gen *merT2* | |
|---|---|
| Medidas de tendencia central | Valor estadístico |
| Media | 80.20 |
| Mediana | 78.35 |
| Moda | 100 |
| N° más bajo | 54.13 |
| N° más alto | 100 |

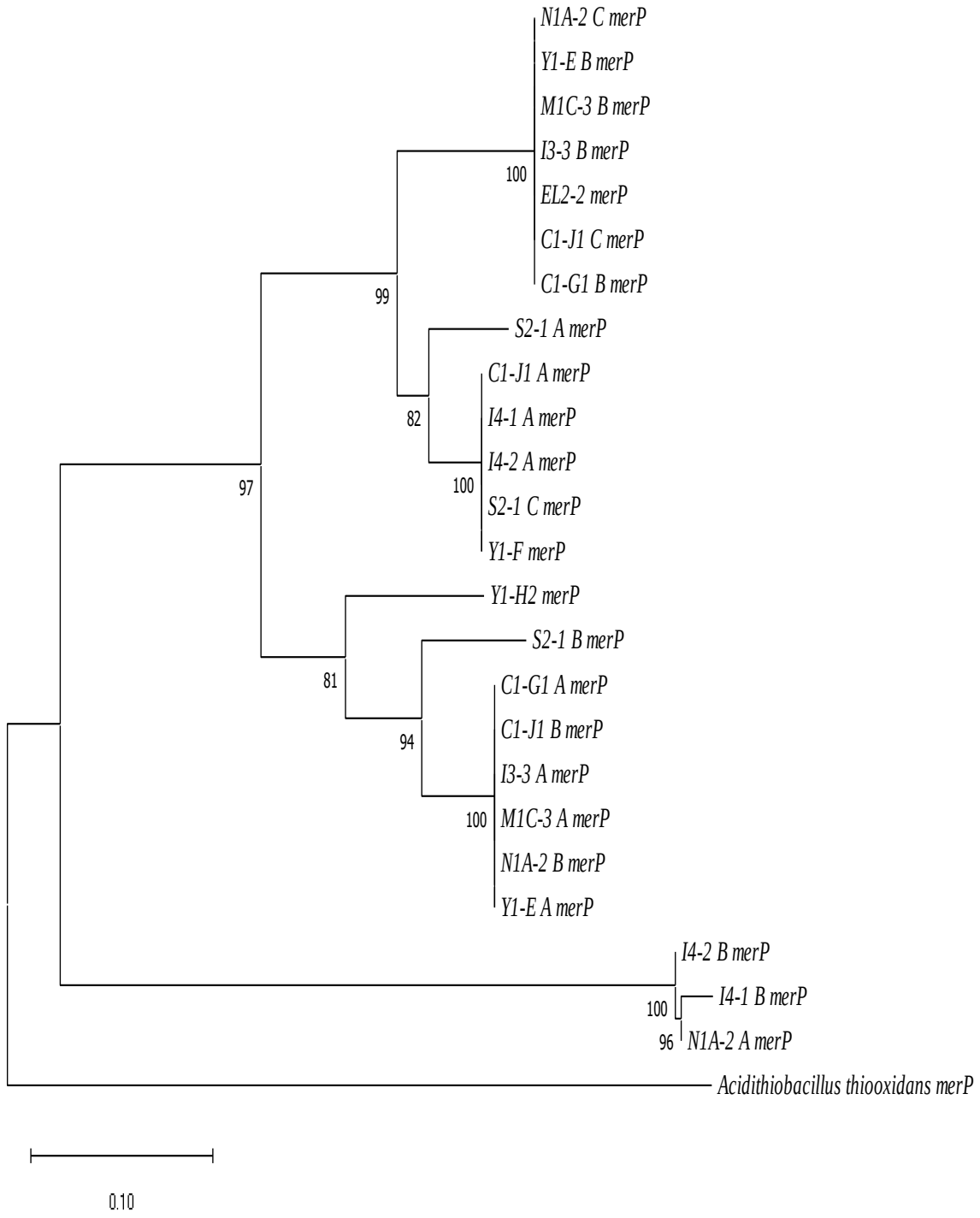



**Figura 2.** Árbol filogenético de secuencias de nucleótidos de genes *merP2* de bacterias aisladas de fuentes acuáticas utilizando el método Neighbor-Joining.

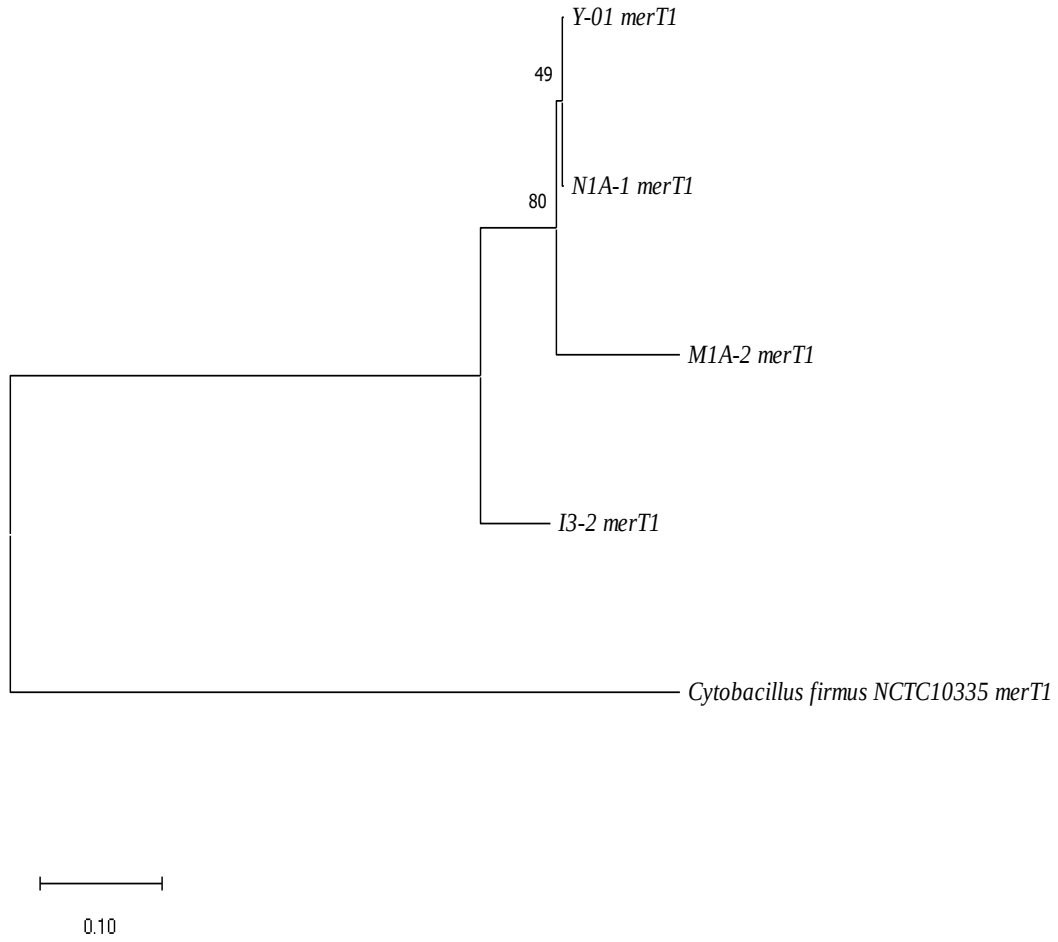



**Figura 3.** Árbol filogenético de secuencias de nucleótidos de genes *merT1* de bacterias aisladas de fuentes acuáticas utilizando el método Neighbor-Joining.

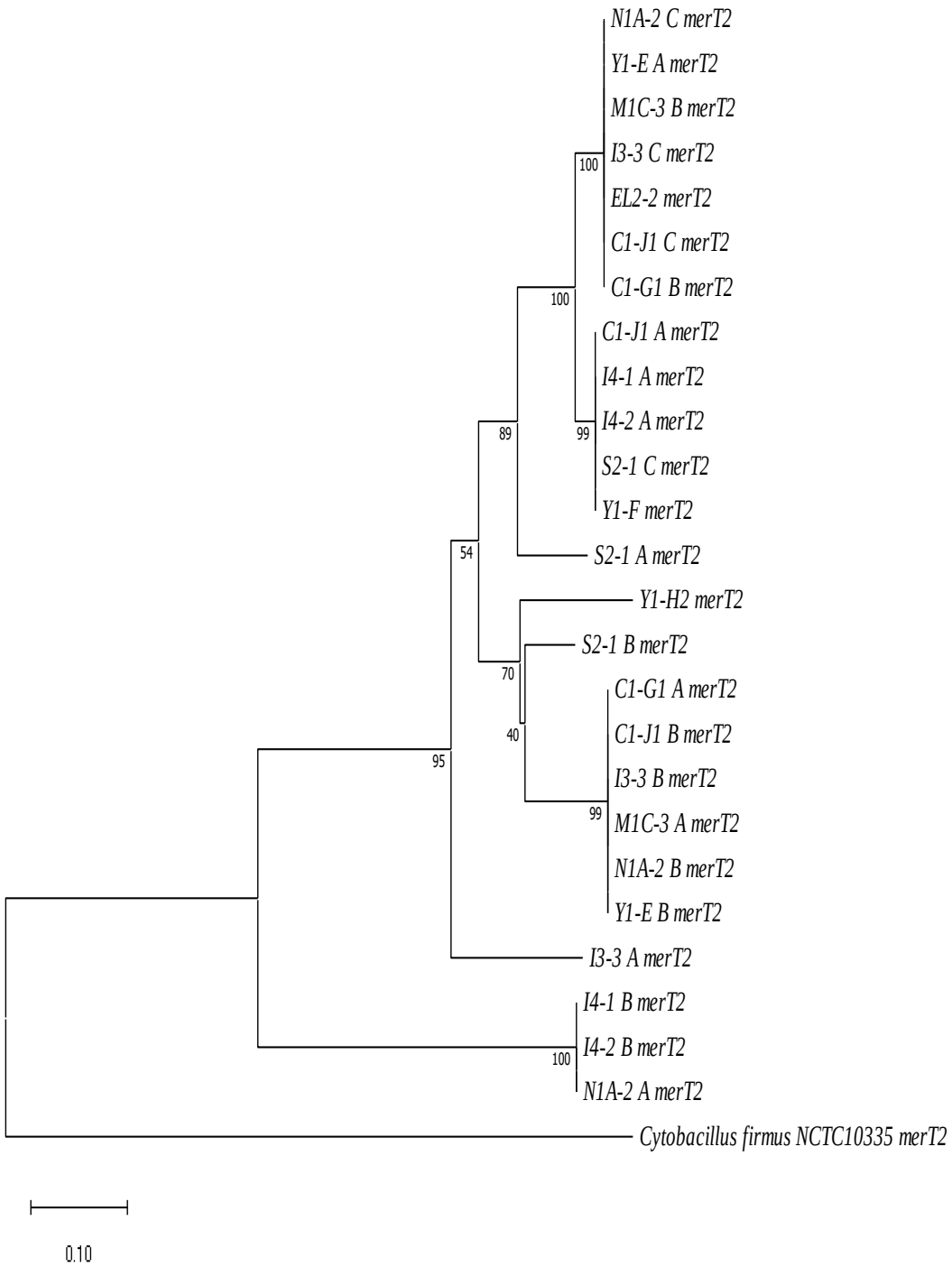



**Figura 4.** Árbol filogenético de secuencias de nucleótidos *merT2* de aislados bacterianos de fuentes acuáticas.

# IV. DISCUSION

En el presente estudio se evaluaron 16 cepas bacterianas provenientes de aguas residuales resistentes a mercurio inorgánico, para determinar la presencia de genes *merP* y *merT*, componentes del operón *mer* e involucrados en el mecanismo de resistencia a mercurio (56, 57) y determinar su filogenia.

Los genes *merP2*, *merT1* y *merT2* se detectaron mediante PCR (Tabla 3 y Tabla 4). La presencia de genes *merP* y *merT* en los aislados bacterianos indica que utilizan el mecanismo del operón *mer* en la resistencia a mercurio, donde estos componentes génicos actúan de manera coordinada para transferir el metal tóxico al interior de la célula a través de la membrana plasmática antes de reducirlo a metal volátil ($Hg^0$) (24, 58, 63).

No se obtuvieron amplicones del gen *merP1*, probablemente porque los partidores fueron obtenidos de literatura y su diseño se basó en información de bacterias de otras latitudes, las cuales podrían tener modificaciones en las secuencias del gen en mención.

De las 16 cepas evaluadas se obtuvieron 24 secuencias nucleotídicas del gen *merP2 y* 29 de los genes *merT1* y *merT2*, posiblemente por duplicación génica o movilización a través de virus, transposones y plásmidos. Evidenciando secuencias nucleotídicas de un mismo gen, estos resultados coinciden con los estudios realizados en *P. pseudoalcaligenes* S1, que contiene en su genoma hasta 3 copias completas de los genes *merP* y *merT*, los cuales afectan de manera positiva en sus niveles de resistencia (29, 31, 62)**.**

La comparación de secuencias nucleotídicas obtenidas con la información depositada en la base de datos NCBI, se encontró que los genes son similares a las especies *Pseudomonas guguanensis, P. aeruginosa, Achromobacter xylosoxidans* (Tabla 5) y a las especies *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii* (Tabla 6). Esta información concuerda en gran medida con los resultados obtenidos del análisis del transporte de mercurio a través de la membrana en cuerpos de agua contaminados en la India (24). El origen de los genes se determinará con la identificación de las cepas mediante métodos moleculares. En este sentido se podrá decir si los genes son propios de la bacteria o han sido transferidos de otras especies, un evento muy común en bacterias que habitan ambientes acuáticos (59, 60).

Se observó que diversas especies de *Pseudomonas* son portadoras de los genes *merP* y *merT*, como es el caso de *P. putida*, *P. stutzeri* y *P. aeruginosa*, aisladas de ambientes acuáticos y resistentes a cloruro de mercurio en concentraciones que varían entre 200 μM hasta 1000 μM (24).

Los valores estadísticos de similitud entre las secuencias nucleotídicas de los genes *merP2*, *merT1* y *merT2* (Tablas 8, 9 y 10), mostró que el valor de la media es superior al 80%, mediana superior al 78% y la moda del 100 %, lo que da solidez y confiabilidad.

El análisis filogenético permite comprender la evolución, la biodiversidad y la ecología de los microorganismos. Se representan las relaciones determinadas a partir del análisis comparativo de secuencias de ADN en forma de árbol, con el objetivo de presentar un resumen de su historia evolutiva (64).

Para determinar las relaciones entre los genes estudiados, se analizaron 24 secuencias nucleotídicas del gen *merP2* (Figura 2), obtenidas de 12 cepas bacterianas (31). Se añadieron al código de cada cepa las letras A, B o C, en función de la cantidad de secuencias nucleotídicas obtenidas. Para identificar la relación filogenética entre ellas se añadió el "outgroup" *Acidithiobacillus thiooxidans*, el cual brinda robustez al árbol filogenético y aparece como un clado separado (55). Los genes *merP2* se agruparon en 8 clados diferentes (Figura 2), en el que se observó su relación filogenética, los nodos mostraron porcentajes entre 81% a 100% de Bootstrap (52). Se observó que las cepas NIA-2, C1-J1, C1-G1, S2-1, Y1-E, M1C-3, I3-3, I4-1 y I4-2, poseían entre 2 o 3 secuencias nucleotídicas y a pesar de pertenecer a una misma cepa no se agruparon en un mismo clado, esto podría indicar que las secuencias nucleotídicas repetidas provienen de otra especie, o han sufrido modificaciones por la presencia de fagos y por tanto no tienen una relación filogenética cercana. Se obtuvo una secuencia nucleotídica de los códigos EL2-2, Y1-F y Y1-H2, estas secuencias no tienen una relación filogenética cercana, por lo que estos genes presumiblemente serían propios de la especie portadora (51).

Se analizaron 4 secuencias nucleotídicas, del gen *merT1* obtenidas de 4 cepas bacterianas, utilizando como "outgroup" a la cepa *Cytobacillus firmus*. Los genes *merT1* se agruparon en 4 clados diferentes en el que se observó su relación filogenética (Figura 3). Los códigos Y-01 y N1A-1, tienen mayor relación filogenética entre ellas. Sin embargo, según la similitud de secuencias pertenecen a diferentes especies (Tabla 6). Las secuencias con los códigos Y-01, N1A-1, y M1A-2 tienen una relación filogenética con un Bootstrap de 80. A pesar de que pertenecen al mismo grupo de enterobacterias las especies en el árbol filogenético muestran cierta cercanía filogenética pero no se llega a un Bootstrap de 100 (52). Esta variabilidad nucleotídica en el gen *merT1* es propia de cada especie, pero su cercanía se sustenta en que pertenecen a un mismo grupo bacteriano.

*S*e analizaron 25 secuencias nucleotídicas, del gen *merT2* obtenidas de 12 cepas bacterianas. Se observaron hasta tres secuencias nucleotídicas por cepa bacteriana, mientras que en algunas sólo se obtuvo una o dos secuencias. Como en el caso anterior del gen *merP2*, se añadieron las letras A, B o C, a los códigos de las cepas dependiendo de la cantidad de secuencias nucleotídicas obtenidas del gen *merT2*. En este caso, también se añadió el "outgroup" *C. firmus.*

Los genes *merT2* se agruparon en 9 clados diferentes (Figura 4), en el que se observó su relación filogenética, los nodos mostraron porcentajes entre 40% a 100% de Bootstrap (52). Así como en el caso de los genes *merP2*, se obtuvieron 3 secuencias nucleotídicas del gen *merT2* de las cepas bacterianas N1A-2, C1-J1, S2-1, I3-3, donde cada secuencia se ubicó en un clado

diferente, demostrando que a pesar de pertenecer a una misma cepa estas secuencias no tienen una relación filogenética cercana. Es posible que la movilidad génica haya involucrado la secuencia de más de un gen e incluso operones completos (61). Se obtuvieron 2 secuencias nucleotídicas de las cepas bacterianas Y1-E, M1C-3, C1-G1, I4-1, I4-2, cada secuencia se ubicó en un clado diferente, como en el caso anterior. Solo se obtuvo una secuencia nucleotídica de los códigos EL2-2, Y1-F y Y1-H2, estas no tienen una relación filogenética cercana.

Los resultados indican que, a pesar de provenir de fuentes acuáticas de una misma región, existe variabilidad genética en los genes del operón *mer*, por lo que los niveles de resistencia podrían variar entre especies, considerando la presencia de cepas con bajos niveles de resistencia hasta aquellas con elevados valores y gran potencial biotecnológico (59, 62).

Se estableció que las cepas examinadas en esta investigación contienen los genes *merP* y *merT*, responsables de la resistencia a mercurio y su rol en el operón *mer*. Investigaciones en rizobios fijadores de nitrógeno revelaron que la inclusión de estos genes tiene significativas consecuencias en la desintoxicación efectiva del mercurio no solo para la biorremediación del suelo, sino también para las plantas residentes que se desarrollan en terrenos contaminados con mercurio (41, 64).

# V. CONCLUSIONES

Al finalizar el presente trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Los genes *merP* y *merT* están presentes en bacterias resistentes a cloruro de mercurio aisladas de ambientes acuáticos de la Región Ica.
2. Se detecta solo el gen *merT* en Enterobacterias y los genes *merP* y *merT* en aquellas pertenecientes al género *Pseudomonas*.
3. Cuando los genes *merP* o *merT* se encuentran repetidos en el genoma bacteriano, no siempre se agrupan en un mismo clado en los árboles filogenéticos.
4. Los genes *merP* y *merT* de las bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y al género *Pseudomonas* pueden tener cercanía filogenética a pesar de proceder de diferente lugar de muestreo.

# VI. RECOMENDACIONES

1. Determinar la presencia de los genes *merP* y *merT* en bacterias de otros tipos de fuentes acuáticas en Ica.
2. Determinar la relación filogenética de otros genes transportadores del operón *mer* como *merC, merE* y *merF* con relación a los genes *merP* y *merT*.
3. Determinar si los genes *merC, merE* y *merF* se encuentran presentes junto a *merP* y *merT* en las cepas bacterianas aisladas de la región Ica.
4. Determinar si los genes *merC, merE* y *merF* se encuentran presentes en bacterias resistentes al mercurio aisladas de fuentes acuáticas de la región Ica.

## VII. REFERENCIAS


1. García-Hernández J, Cadena-Cárdenas L, Betancourt-Lozano M, García-De-La-Parra LM, García-Rico L, Márquez-Farías F. Total mercury content found in edible tissues of top predator fish from the Gulf of California, Mexico. Toxicol Environ Chem [Internet]. 2007 Jul [cited 2024 Mar 4];89(3):507–22. Available from: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02772240601165594
2. Davila O, Gomez-Bernal J, Ruiz-Huerta E. Plants and Soil Contamination with Heavy Metals in Agricultural Areas of Guadalupe, Zacatecas, Mexico. Chapters [Internet]. 2012 Feb 29 [cited 2024 Mar 4]; Available from: https://ideas.repec.org/h/ito/pchaps/51065.html
3. Villanueva F, Botello A. Metales pesados en la zona costera del Golfo de México y Caribe Mexicano: una revisión. Rev Int Contam Ambient [Internet]. 1992 [cited 2024 Mar 4];8(1):47–61. Available from: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37080104
4. Nanda M, Kumar V, Sharma D. Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water. Aquat Toxicol. 2019 jul 1; 212:1–10.
5. Organización Mundial de la Salud. El mercurio y la salud [Internet]. OMS; 2017 [cited 2022 Mar 21]. Available from: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health.
6. Muñoz N, Arango-Ruiz Á. El mercurio como contaminante y factor de riesgo para la salud humana. Rev Lasallista Investig. 2021;17(2):280–96.
7. Osores F, Grández J, Fernández J. Mercurio y salud en Madre de Dios, Perú. Acta Médica Peru [Internet]. 2010 [cited 2024 Mar 4];27(4):310–4. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172010000400016&lng=es&nrm=iso&tlng=es
8. Marín R. Fisicoquímica Y Microbiología De Los Medios Acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas Segunda edición. 2019. 418 p.
9. Navarro E, Alonso A. Asociación Española de Ecología Terrestre Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. 2007 [cited 2022 Mar 21];16(2):1–17. Available from: http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=488&Id_Categoria=1&tipo=portada
10. Beltrán M, Gómez A. Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. Rev Fac Ciencias Básicas [Internet]. 2016 Jul 25 [cited 2022 Apr 11];12(2):172–97. Available from: https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/2027

11. Barriga M, Pariasca A. Bioaccumulation of lead, cadmium and mercury in Argopecten purpuratus (LAMARCK, 1819) and Aulacomya ater (Molina, 1782), commercial species from Peru, and risk assessment. Ecol Apl [Internet]. 2018 Jul 25 [cited 2022 Mar 21];17(1):53–60. Available from: https://revistas.lamolina.edu.pe/index.php/eau/article/view/1173
12. Bose-O'Reilly S, McCarty K, Steckling N, Lettmeier B. Mercury Exposure and Children's Health. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care [Internet]. 2010 [cited 2022 Mar 21];40(8):186. Available from: /pmc/articles/PMC3096006/
13. Organización Panamericana de la Salud. Mercurio [Internet]. OPS/OMS [cited 2024 Mar 4]. Available from: https://www.paho.org/es/temas/mercurio
14. Valderas J, Mejías M, Riquelme J, Aedo K, Aros S, Barrera F. Family poisoned by elemental mercury: a case report. Rev Chil pediatría [Internet]. 2013 Feb [cited 2024 Mar 4];84(1):72–9. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062013000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=en
15. Boyd E, Barkay T. The mercury resistance operon: From an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. Front Microbiol. 2012;3(OCT):349.
16. Irawati W, Soraya Y, Baskoro A. A Study on Mercury-Resistant Bacteria Isolated from a Gold Mine in Pongkor Village, Bogor, Indonesia. HAYATI J Biosci. 2012 Dec 1;19(4):197–200.
17. Barkay T, Miller S, Summers A. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 2003 Jun 1 [cited 2022 Apr 11];27(2–3):355–84. Available from: https://academic.oup.com/femsre/article/27/2-3/355/615559
18. Wahba H, Stevenson M, Mansour A, Sygusch J, Wilcox D, Omichinski J. Structural and Biochemical Characterization of Organotin and Organolead Compounds Binding to the Organomercurial Lyase MerB Provide New Insights into Its Mechanism of Carbon-Metal Bond Cleavage. J Am Chem Soc [Internet]. 2017 Jan 18 [cited 2022 Mar 21];139(2):910–21. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27989130/
19. Mathema V, Thakuri B, Sillanpää M. Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. Arch Microbiol [Internet]. 2011 Dec [cited 2022 Mar 21];193(12):837–44. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21912976/
20. Ohshiro Y, Uraguchi S, Nakamura R, Takanezawa Y, Kiyono M. Cadmium transport activity of four mercury transporters (MerC, MerE, MerF and MerT) and effects of the periplasmic mercury-binding protein MerP on Mer-dependent cadmium uptake. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2024 Mar 4];367(21). Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33119092/
21. Nakhleh L, Morrison D. Phylogenetic Networks. Encycl Evol Biol. 2016 Jan 1;264–9.

22. Scott A, Baum D. Phylogenetic Tree. Encycl Evol Biol. 2016 Jan 1;270–6.
23. Argudín M, Hoefer A, Butaye P. Heavy metal resistance in bacteria from animals. Res Vet Sci. 2019 Feb 1; 122:132–47.
24. Jan A, Azam M, Choi I, Ali A, Haq R. Analysis for the presence of determinants involved in the transport of mercury across bacterial membrane from polluted water bodies of India. Brazilian J Microbiol [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2022 Mar 20];47(1):55. Available from: /pmc/articles/PMC4827696/
25. Dash H, Das S. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. Int Biodeterior Biodegradation. 2012 Nov 1; 75:207–13.
26. Naguib M, El-Gendy A, Khairalla A. Microbial Diversity of Mer Operon Genes and Their Potential Rules in Mercury Bioremediation and Resistance. Open Biotechnol J. 2018 May 11;12(1):56–77.
27. Sultan I, Ali A, Gogry F, Rather I, Sabir J, Haq R. Bacterial isolates harboring antibiotics and heavy-metal resistance genes co-existing with mobile genetic elements in natural aquatic water bodies. Saudi J Biol Sci. 2020 Oct 1;27(10):2660–8.
28. Sone Y, Nakamura R, Pan-Hou H, Itoh T, Kiyono M. Role of MerC, MerE, MerF, MerT, and/or MerP in resistance to mercurials and the transport of mercurials in Escherichia coli. Biol Pharm Bull [Internet]. 2013 Nov [cited 2022 Apr 15];36(11):1835–41. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23985830/
29. Zhang W, Chen L, Liu D. Characterization of a marine-isolated mercury-resistant Pseudomonas putida strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2012 Feb [cited 2022 Mar 21];93(3):1305–14. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21751007/
30. Zheng R, Wu S, Ma N, Sun C. Genetic and physiological adaptations of marine bacterium Pseudomonas stutzeri 273 to mercury stress. Front Microbiol. 2018 Apr 5;9(APR):682.
31. Zhang J, Zeng Y, Liu B, Deng X. MerP/MerT-mediated mechanism: A different approach to mercury resistance and bioaccumulation by marine bacteria. J Hazard Mater. 2020 Apr 15; 388:122062.
32. Amabilis L, Siebe C, Moeller G, Durán C. Remoción de mercurio por Phragmites australis empleada como barrera biológica en humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes a metales pesados. Rev Int Contam Ambient [Internet]. 2016 [cited 2024 Mar 4];32(1):47–53. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992016000100047&lng=es&nrm=iso&tlng=es
33. Choudhuri S. Chapter 3 – Genomic Technologies [Internet]. Bioinformatics for Beginners. 2014 [cited 2024 Mar 4]. 55–72 p. Available from: http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780124104716/bioinformatics-for-beginners

34. Jarvis PD, Holland BR, Sumner JG. Phylogenetic Invariants and Markov Invariants. In: Reference Module in Life Sciences. Elsevier; 2017.
35. Stavrinides J, Ochman H. Phylogenetic Methods. Encycl Microbiol. 2009 Jan 1;247–60.
36. Klomp D. The Use of Phylogenetic Comparative Methods in the Study of Evolution and Visual Signalling. Encycl Anim Behav. 2019 Jan 1;581–8.
37. Degnan J. Consensus Methods, Phylogenetic. Encycl Evol Biol. 2016 Jan 1;341–6.
38. Abascal F, Irisarri I, Zardoya R. Filogenia y Evolución Molecular. In: Bioinformática con Ñ [Internet]. 2014 [cited 2024 Mar 4]. p. 231–257. Available from:https://www.researchgate.net/publication/301558498_Filogenia_y_Evolucion_Molecular
39. Iza J, Recalde C Iza. Determinantes Genéticos Y Sus Mecanismos De Acción Implicados En La Resistencia Bacteriana a Metales Pesados: Una Revisión. Perfiles. 2022;1(27):26–38.
40. Xu S, Sun B, Wang R, He J, Xia B, Xue Y, et al. Overexpression of a bacterial mercury transporter MerT in Arabidopsis enhances mercury tolerance. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2017 Aug 19 [cited 2022 Mar 21];490(2):528–34. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28624459/
41. Cano S. Contaminación con mercurio por la actividad minera. Biomédica [Internet]. 2012 [cited 2024 Apr 2];32(3):309–12. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572012000300001&lng=en&nrm=iso&tlng=es
42. Sociedad Geológica del Perú. Publicación Especial N ° 15-Resúmenes ampliados del XX Congreso Peruano de Geología (2021) 631. [cited 2024 Apr 2]; Available from: www.sgp.org.pe
43. Sotero A, De Jesus M, Lacerda M, Moreira J, Filgueiras A, Barrocas P. A conservative region of the mercuric reductase gene (merA) as a molecular marker of bacterial mercury resistance. Brazilian J Microbiol [Internet]. 2008 Apr [cited 2024 Apr 2];39(2):307–10. Available from: https://www.scielo.br/j/bjm/a/Sbx7PtXz5cpYC5JL8TYT7dy/?lang=en
44. Guerrero J, Ortiz Z. Biorremediación de la contaminación por mercurio en mineria informal [Internet]. 2013 [cited 2024 Apr 2]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/258499354_biorremediacion_de_la_contaminacion_por_mercurio_en_mineria_informal
45. Pearson W. BLAST and FASTA similarity searching for multiple sequence alignment. Methods Mol Biol [Internet]. 2014 [cited 2024 Mar 4]; 1079:75–101. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24170396/

46. Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D. Basic local alignment search tool. J Mol Biol [Internet]. 1990 [cited 2024 Mar 4];215(3):403–10. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2231712/
47. Hall B. Effects of sequence diversity and recombination on the accuracy of phylogenetic trees estimated by kSNP. Cladistics. 2016 Feb 1;32(1):90–9.
48. Masatoshi N, Sudhir K. Molecular Evolution and Table of Contents [Internet]. 2000 [cited 2024 Apr 4]. 329 p. Available from: https://global.oup.com/academic/product/molecular-evolution-and-phylogenetics-9780195135855
49. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Mol Biol Evol [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Apr 4];38(7):3022–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33892491/
50. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol [Internet]. 1987 [cited 2024 Mar 4];4(4):406–25. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3447015/
51. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution [Internet]. 1985 Jul [cited 2024 Mar 4];39(4):783–91. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28561359/
52. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. Mol Biol Evol [Internet]. 1992 [cited 2024 Mar 4];9(4):678–87. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1630306/
53. Nishimaki T, Sato K. An Extension of the Kimura Two-Parameter Model to the Natural Evolutionary Process. J Mol Evol [Internet]. 2019 Jan 15 [cited 2024 Mar 4];87(1):60. Available from: /pmc/articles/PMC6514111/
54. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Mol Biol Evol [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2024 Mar 4];38(7):3022–7. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33892491/
55. Moraga R, Merino C, Mondaca M. Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. Investig Mar [Internet]. 2003 [cited 2024 Apr 11];31(1):91–5. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-71782003000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
56. Hamlett N, Landale E, Davis B, Summers A. Roles of the Tn21 merT, merP, and merC gene products in mercury resistance and mercury binding. J Bacteriol [Internet]. 1992 [cited 2024 Apr 11];174(20):6377. Available from: /pmc/articles/PMC207586/?report=abstract
57. Misra T. Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. Plasmid. 1992 Jan 1;27(1):4–16.

58. Liebert C, Hall R, Summers A. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. Microbiol Mol Biol Rev [Internet]. 1999 Sep [cited 2024 Apr 11];63(3):507–22. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10477306/
59. Oregaard G, Sørensen S. High diversity of bacterial mercuric reductase genes from surface and sub-surface floodplain soil (Oak Ridge, USA). ISME J [Internet]. 2007 Sep [cited 2024 Apr 11];1(5):453–67. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18043664/
60. Hall J, Harrison E, Pärnänen K, Virta M, Brockhurst M. The Impact of Mercury Selection and Conjugative Genetic Elements on Community Structure and Resistance Gene Transfer. Front Microbiol [Internet]. 2020 Aug 5 [cited 2024 Apr 11]; 11:561448. Available from: www.frontiersin.org
61. Mindlin S, Bass I, Bogdanova E, Gorlenko Z, Kaliaeva E, Petrova M, et al. Horizontal transfer of mercury resistance genes in natural bacterial populations. Molekuliarnaia biologiia [Internet]. 2002 [cited 2024 Oct 26];36(2):216–27. Available from: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11969083/
62. Zheng R, Wu S, Ma N, Sun C. Genetic and Physiological Adaptations of Marine Bacterium Pseudomonas stutzeri 273 to Mercury Stress. Frontiers in Microbiology. 2018 Apr 5;9.
63. Hu D, Liu B, Wang L, Reeves P. Living Trees: High-Quality Reproducible and Reusable Construction of Bacterial Phylogenetic Trees. Molecular Biology and Evolution [Internet]. 2019 Oct 19 [cited 2024 Oct 27];37(2):563–75. Available from: https://academic.oup.com/mbe/article/37/2/563/5601619?login=false
64. Bhat A, Sharma R, Kumaran D, Mercedes L, Mishra A, Bowers R, et al. Horizontal gene transfer of the Mer operon is associated with large effects on the transcriptome and increased tolerance to mercury in nitrogen-fixing bacteria. BMC Microbiology. 2024 Jul 6;24(1).

## VIII. ANEXOS

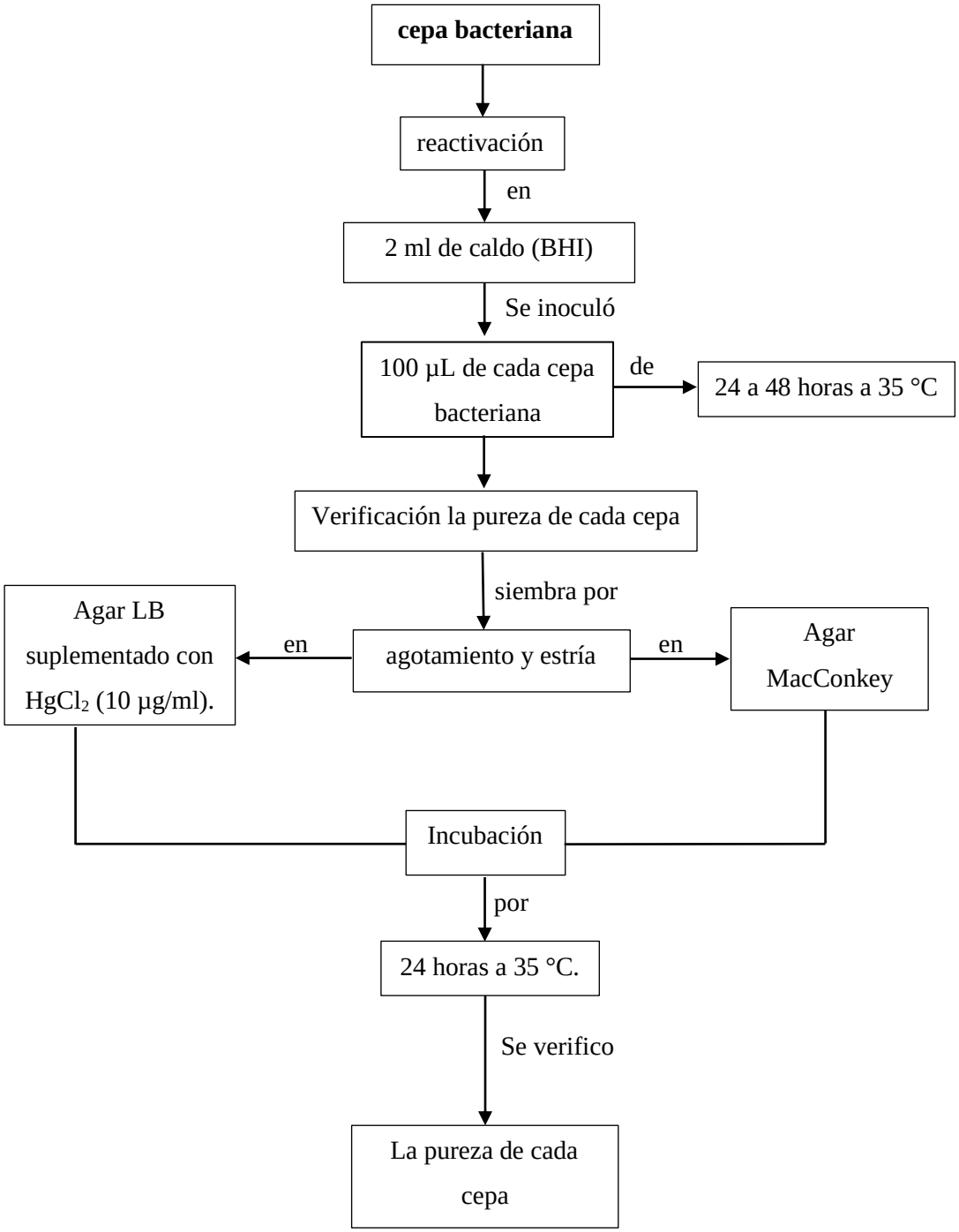



**Figura 5.** Flujograma de reactivación de cepa bacteriana

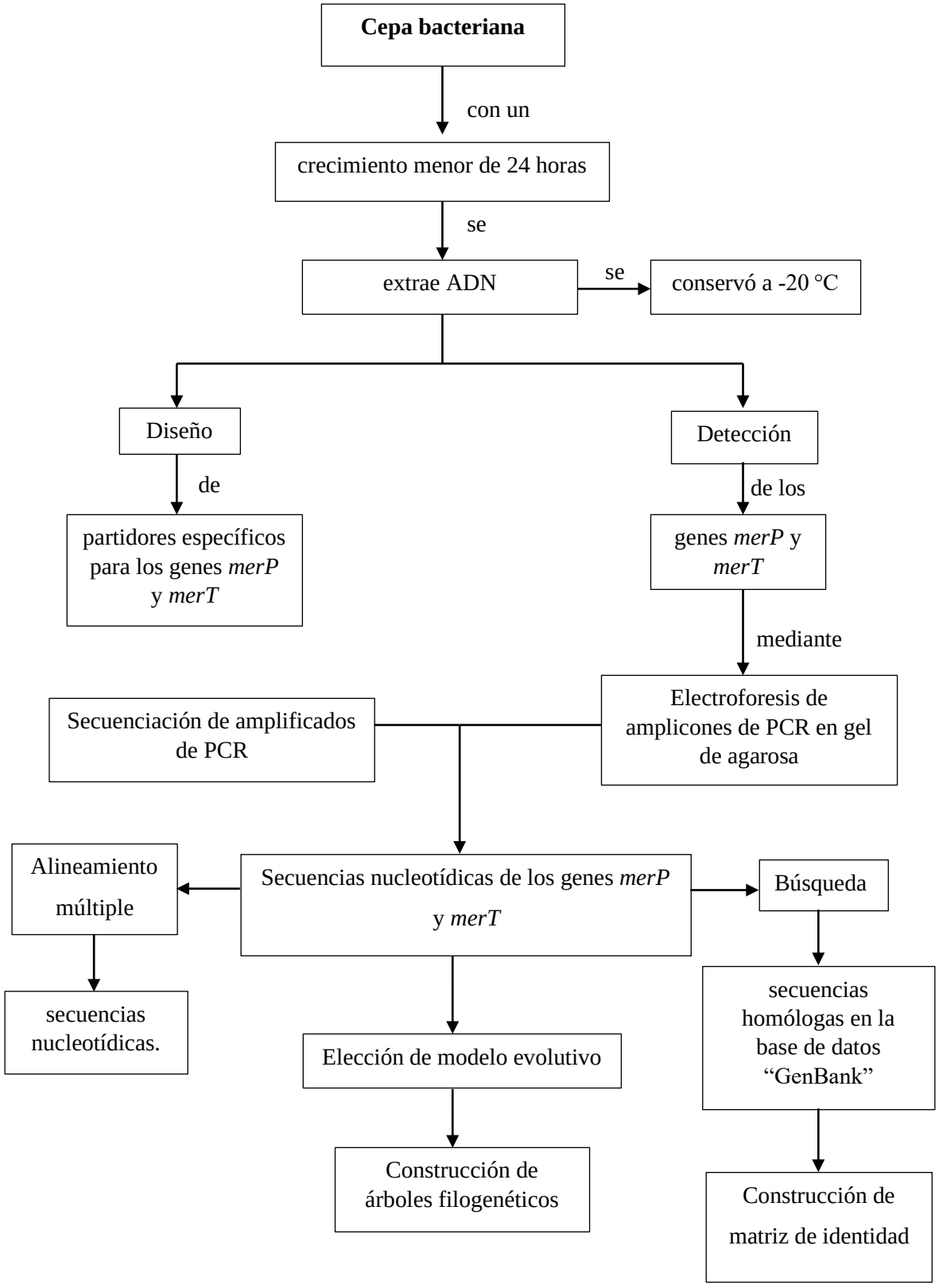



**Figura 6.** Flujograma de pasos para un análisis filogenético.

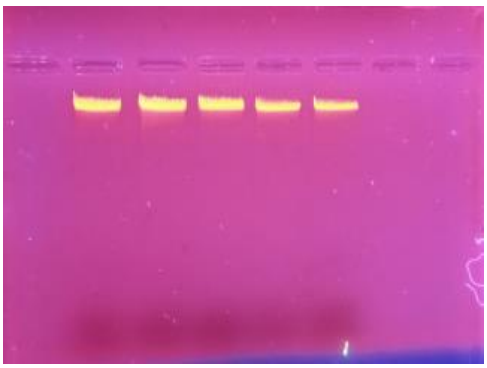


**Figura 7.** Detección de ADN genómico en gel de agarosa



**Figura 8.** Preparación de las reacciones de PCR. Laboratorio de Biotecnología, Biología Molecular y Microbiología Industrial.

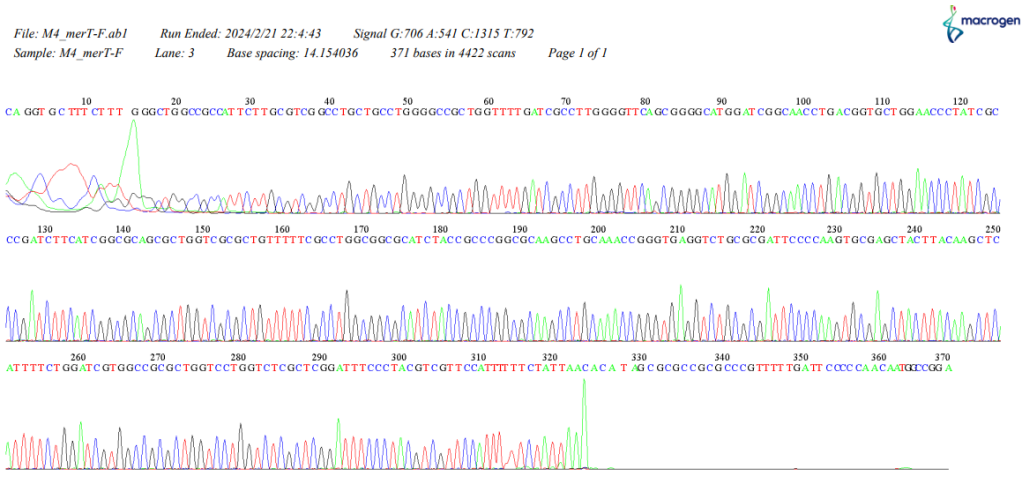



**Figura 9.** Secuencia nucleotídica de genes *merT1-F*

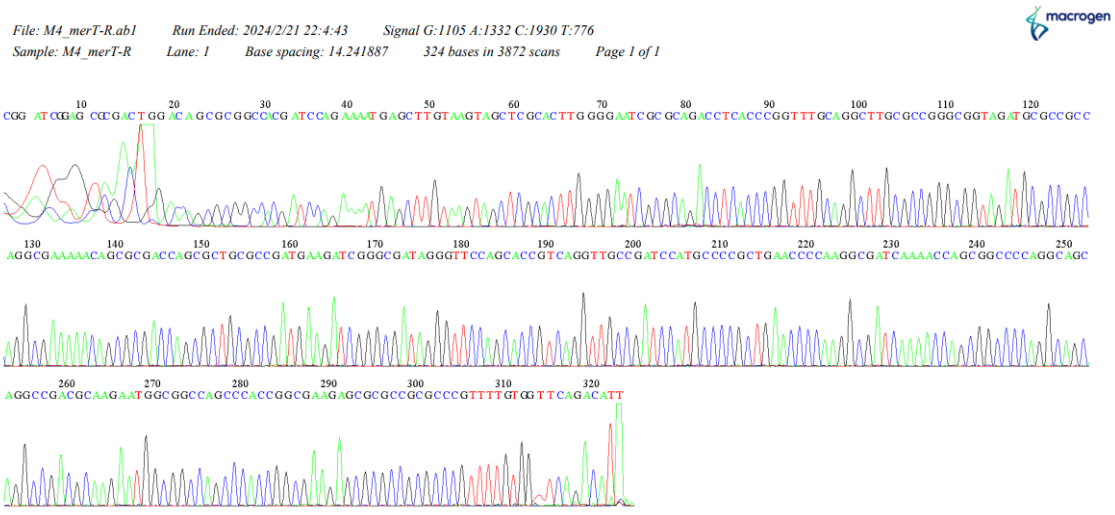



**Figura 10.** Secuencias nucleotídicas de genes *merT1-R*

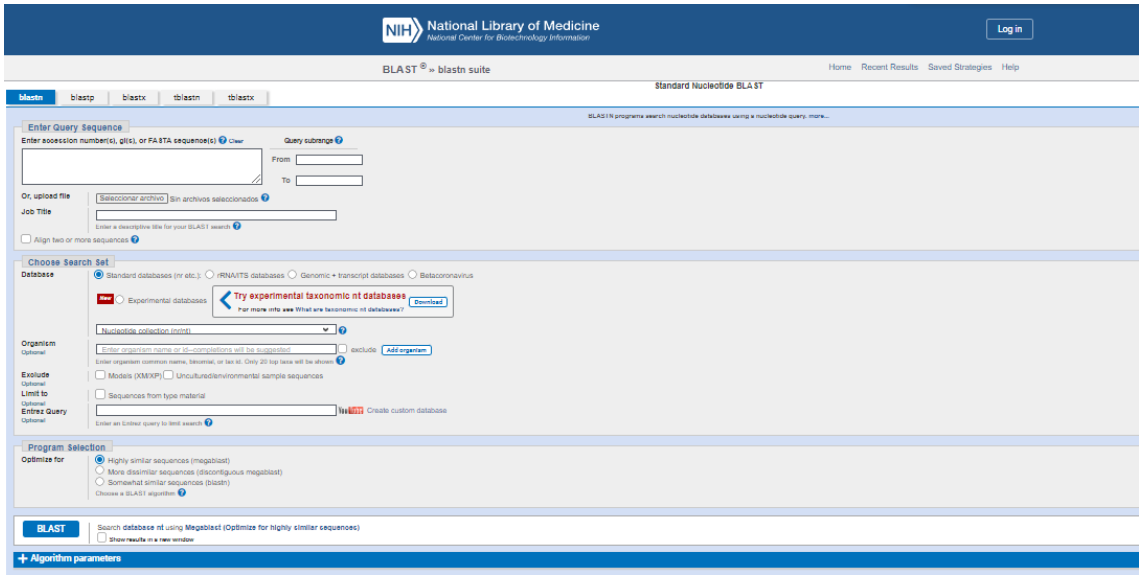



**Figura 11.** Algoritmo BLASTn en la página web de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

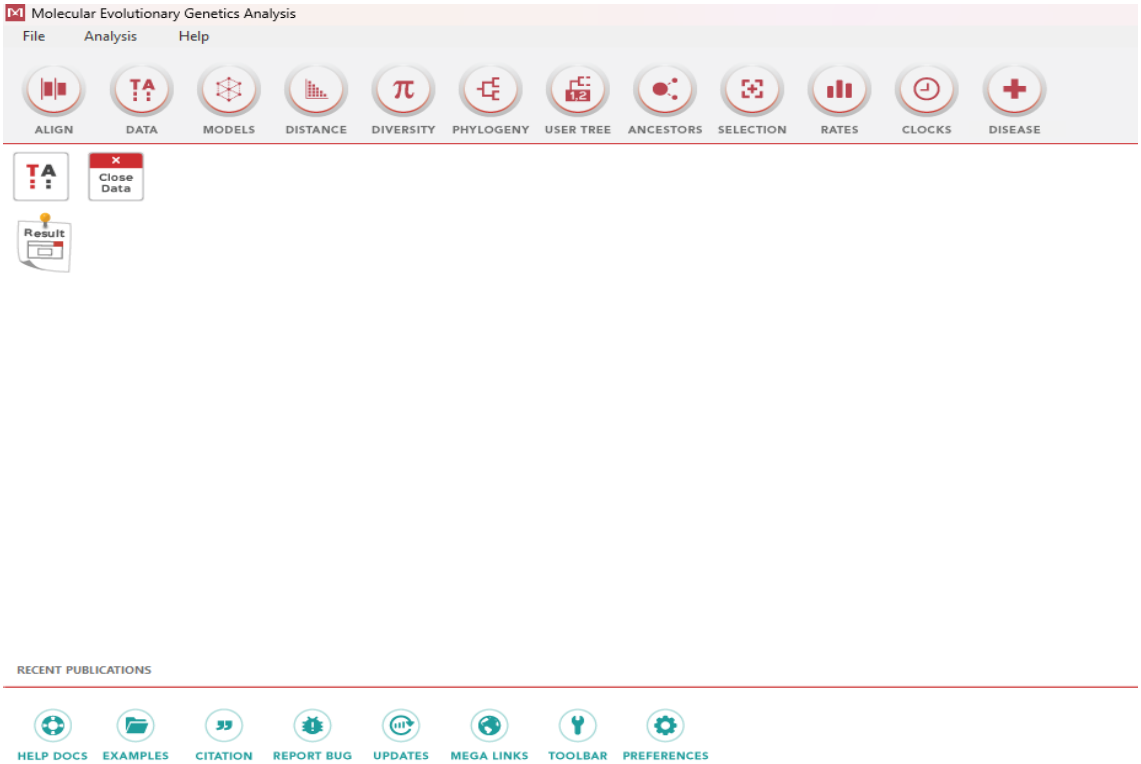



**Figura 12.** Programa MEGA-X.

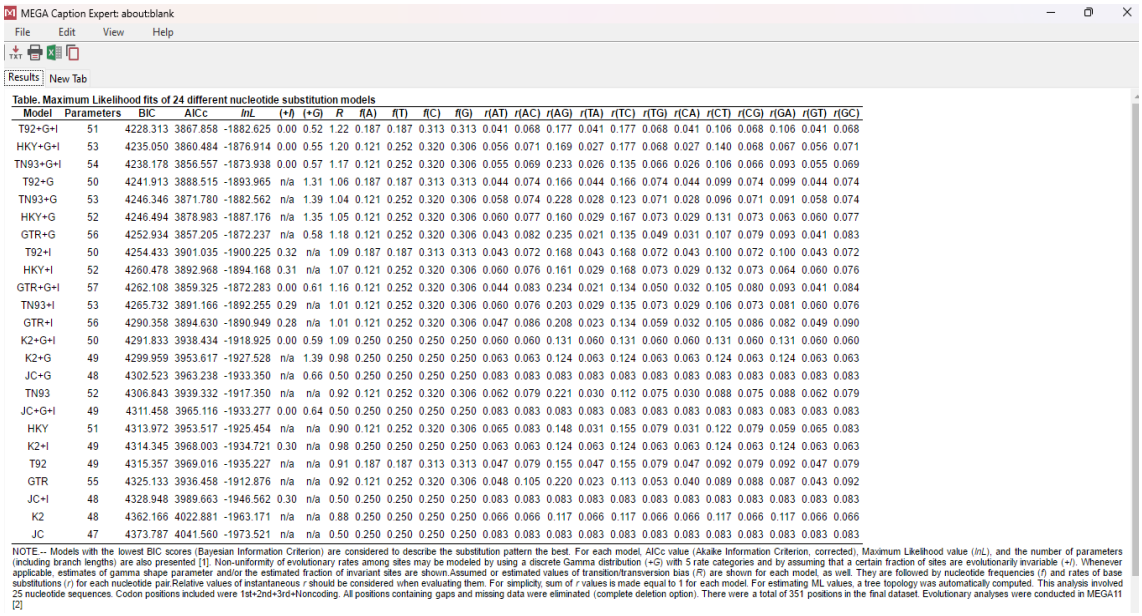



Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

| Model | Parameters | BIC | AICc | lnL | (+I) | (+G) | R | f(A) | f(T) | f(C) | f(G) | r(AT) | r(AC) | r(AG) | r(TA) | r(TC) | r(TG) | r(CA) | r(CT) | r(CG) | r(GA) | r(GT) | r(GC) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T92+G+I | 51 | 4228.313 | 3867.858 | -1882.625 | 0.00 | 0.52 | 1.22 | 0.187 | 0.187 | 0.313 | 0.313 | 0.041 | 0.068 | 0.177 | 0.041 | 0.177 | 0.068 | 0.041 | 0.106 | 0.068 | 0.106 | 0.041 | 0.068 |
| HKY+G+I | 53 | 4235.050 | 3860.484 | -1876.914 | 0.00 | 0.55 | 1.20 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.056 | 0.071 | 0.169 | 0.027 | 0.177 | 0.068 | 0.027 | 0.140 | 0.068 | 0.067 | 0.056 | 0.071 |
| TN93+G+I | 54 | 4238.178 | 3856.557 | -1873.938 | 0.00 | 0.57 | 1.17 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.055 | 0.069 | 0.233 | 0.026 | 0.135 | 0.066 | 0.026 | 0.106 | 0.066 | 0.093 | 0.055 | 0.069 |
| T92+G | 50 | 4241.913 | 3888.515 | -1893.965 | n/a | 1.31 | 1.06 | 0.187 | 0.187 | 0.313 | 0.313 | 0.044 | 0.074 | 0.166 | 0.044 | 0.166 | 0.074 | 0.044 | 0.099 | 0.074 | 0.099 | 0.044 | 0.074 |
| TN93+G | 53 | 4246.346 | 3871.780 | -1882.562 | n/a | 1.39 | 1.04 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.058 | 0.074 | 0.228 | 0.028 | 0.123 | 0.071 | 0.028 | 0.096 | 0.071 | 0.091 | 0.058 | 0.074 |
| HKY+G | 52 | 4246.494 | 3878.983 | -1887.176 | n/a | 1.35 | 1.05 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.060 | 0.077 | 0.160 | 0.029 | 0.167 | 0.073 | 0.029 | 0.131 | 0.073 | 0.063 | 0.060 | 0.077 |
| GTR+G | 56 | 4252.934 | 3857.205 | -1872.237 | n/a | 0.58 | 1.18 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.043 | 0.082 | 0.235 | 0.021 | 0.135 | 0.049 | 0.031 | 0.107 | 0.079 | 0.093 | 0.041 | 0.083 |
| T92+I | 50 | 4254.433 | 3901.035 | -1900.225 | 0.32 | n/a | 1.09 | 0.187 | 0.187 | 0.313 | 0.313 | 0.043 | 0.072 | 0.168 | 0.043 | 0.168 | 0.072 | 0.043 | 0.100 | 0.072 | 0.100 | 0.043 | 0.072 |
| HKY+I | 52 | 4260.478 | 3892.968 | -1894.168 | 0.31 | n/a | 1.07 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.060 | 0.076 | 0.161 | 0.029 | 0.168 | 0.073 | 0.029 | 0.132 | 0.073 | 0.064 | 0.060 | 0.076 |
| GTR+G+I | 57 | 4262.108 | 3859.325 | -1872.283 | 0.00 | 0.61 | 1.16 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.044 | 0.083 | 0.234 | 0.021 | 0.134 | 0.050 | 0.032 | 0.105 | 0.080 | 0.093 | 0.041 | 0.084 |
| TN93+I | 53 | 4265.732 | 3891.166 | -1892.255 | 0.29 | n/a | 1.01 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.060 | 0.076 | 0.203 | 0.029 | 0.135 | 0.073 | 0.029 | 0.106 | 0.073 | 0.081 | 0.060 | 0.076 |
| GTR+I | 56 | 4290.358 | 3894.630 | -1890.949 | 0.28 | n/a | 1.01 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.047 | 0.086 | 0.208 | 0.023 | 0.134 | 0.059 | 0.032 | 0.105 | 0.086 | 0.082 | 0.049 | 0.090 |
| K2+G+I | 50 | 4291.833 | 3938.434 | -1918.925 | 0.00 | 0.59 | 1.09 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.060 | 0.060 | 0.131 | 0.060 | 0.131 | 0.060 | 0.060 | 0.131 | 0.060 | 0.131 | 0.060 | 0.060 |
| K2+G | 49 | 4299.959 | 3953.617 | -1927.528 | n/a | 1.39 | 0.98 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.063 | 0.063 | 0.124 | 0.063 | 0.124 | 0.063 | 0.063 | 0.124 | 0.063 | 0.124 | 0.063 | 0.063 |
| JC+G | 48 | 4302.523 | 3963.238 | -1933.350 | n/a | 0.66 | 0.50 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 |
| TN93 | 52 | 4306.843 | 3939.332 | -1917.350 | n/a | n/a | 0.92 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.062 | 0.079 | 0.221 | 0.030 | 0.112 | 0.075 | 0.030 | 0.088 | 0.075 | 0.088 | 0.062 | 0.079 |
| JC+G+I | 49 | 4311.458 | 3965.116 | -1933.277 | 0.00 | 0.64 | 0.50 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 |
| HKY | 51 | 4313.972 | 3953.517 | -1925.454 | n/a | n/a | 0.90 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.065 | 0.083 | 0.148 | 0.031 | 0.155 | 0.079 | 0.031 | 0.122 | 0.079 | 0.059 | 0.065 | 0.083 |
| K2+I | 49 | 4314.345 | 3968.003 | -1934.721 | 0.30 | n/a | 0.98 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.063 | 0.063 | 0.124 | 0.063 | 0.124 | 0.063 | 0.063 | 0.124 | 0.063 | 0.124 | 0.063 | 0.063 |
| T92 | 49 | 4315.357 | 3969.016 | -1935.227 | n/a | n/a | 0.91 | 0.187 | 0.187 | 0.313 | 0.313 | 0.047 | 0.079 | 0.155 | 0.047 | 0.155 | 0.079 | 0.047 | 0.092 | 0.079 | 0.092 | 0.047 | 0.079 |
| GTR | 55 | 4325.133 | 3936.458 | -1912.876 | n/a | n/a | 0.92 | 0.121 | 0.252 | 0.320 | 0.306 | 0.048 | 0.105 | 0.220 | 0.023 | 0.113 | 0.053 | 0.040 | 0.089 | 0.088 | 0.087 | 0.043 | 0.092 |
| JC+I | 48 | 4328.948 | 3989.663 | -1946.562 | 0.30 | n/a | 0.50 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 |
| K2 | 48 | 4362.166 | 4022.881 | -1963.171 | n/a | n/a | 0.88 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.066 | 0.066 | 0.117 | 0.066 | 0.117 | 0.066 | 0.066 | 0.117 | 0.066 | 0.117 | 0.066 | 0.066 |
| JC | 47 | 4373.787 | 4041.560 | -1973.521 | n/a | n/a | 0.50 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.250 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 | 0.083 |

NOTE.-- Models with the lowest BIC scores (Bayesian Information Criterion) are considered to describe the substitution pattern the best. For each model, AICc value (Akaike Information Criterion, corrected), Maximum Likelihood value (*lnL*), and the number of parameters (including branch lengths) are also presented [1]. Non-uniformity of evolutionary rates among sites may be modeled by using a discrete Gamma distribution (+G) with 5 rate categories and by assuming that a certain fraction of sites are evolutionarily invariable (+I). Whenever applicable, estimates of gamma shape parameter and/or the estimated fraction of invariant sites are shown.Assumed or estimated values of transition/transversion bias (*R*) are shown for each model, as well. They are followed by nucleotide frequencies (*f*) and rates of base substitutions (*r*) for each nucleotide pair.Relative values of instantaneous *r* should be considered when evaluating them. For simplicity, sum of *r* values is made equal to 1 for each model. For estimating ML values, a tree topology was automatically computed. This analysis involved 25 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated (complete deletion option). There were a total of 351 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11 [2]

**Figura 13.** Interfaz de Mega X para elegir un modelo evolutivo.

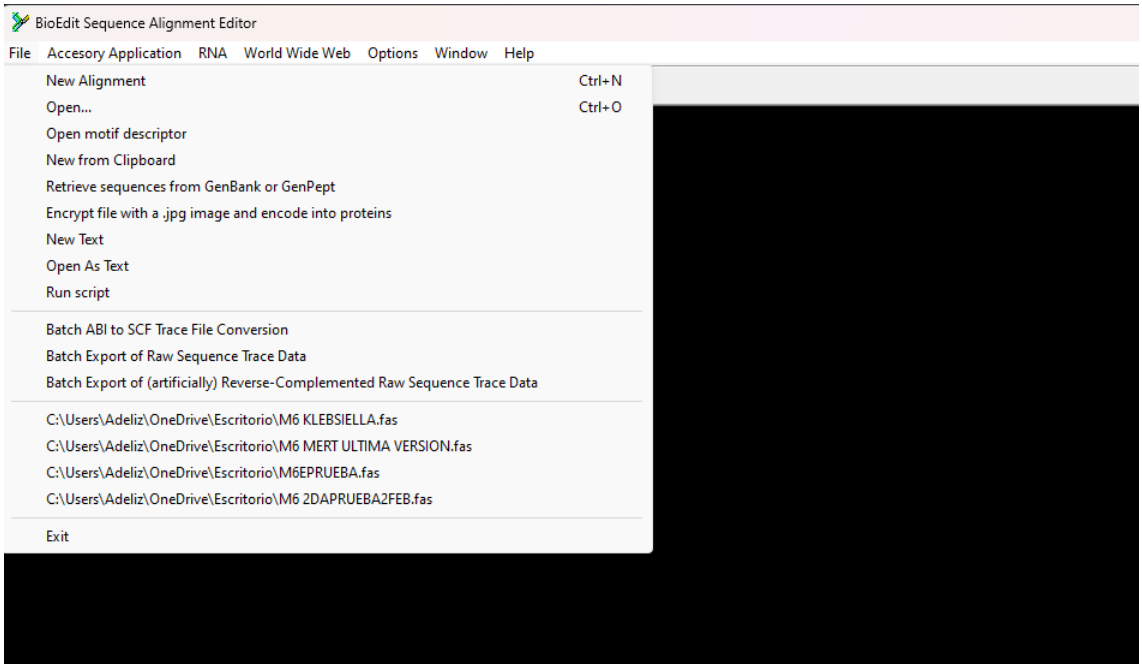



**Figura 14.** Programa BioEdit

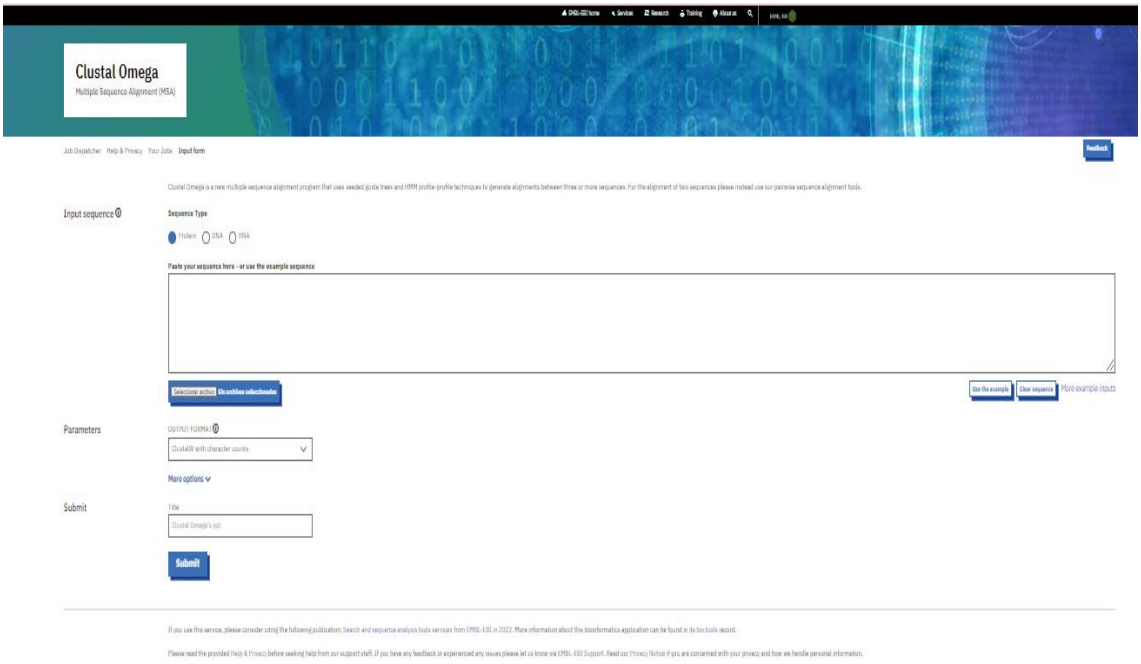



**Figura 15.** Programa Clustal W.

**Tabla 11.** Matriz de identidad creada con ClustalW. Porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas del gen *merP2*.

| Código | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (1) I4-1 B | **100** | 98.91 | 98.91 | 59.71 | 59.71 | 59.71 | 59.71 | 59.71 | 59.7 | 59.71 | 58.24 | 58.24 | 58.24 | 58.24 | 58.24 | 58.24 | 57.88 | 60.87 | 60.87 | 60.87 | 60.87 | 60.87 | 60.87 | 59.78 |
| (2) I4-2 B | 98.91 | **100** | 100 | 60.81 | 60.81 | 60.81 | 60.81 | 60.81 | 60.8 | 60.81 | 59.34 | 59.34 | 59.34 | 59.34 | 59.34 | 59.34 | 58.97 | 61.96 | 61.96 | 61.96 | 61.96 | 61.96 | 61.96 | 60.87 |
| (3) N1A-2 A | 98.91 | 100 | **100** | 60.81 | 60.81 | 60.81 | 60.81 | 60.81 | 60.8 | 60.81 | 59.34 | 59.34 | 59.34 | 59.34 | 59.34 | 59.34 | 58.97 | 61.96 | 61.96 | 61.96 | 61.96 | 61.96 | 61.96 | 60.87 |
| (4) *C1-G1 E | 59.71 | 60.81 | 60.81 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 87.68 | 77.54 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 73.55 |
| (5) C1-J1 C | 59.71 | 60.81 | 60.81 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 87.68 | 77.54 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 73.55 |
| (6) EL2-2 | 59.71 | 60.81 | 60.81 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 87.68 | 77.54 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 73.55 |
| (7) I3-3 B | 59.71 | 60.81 | 60.81 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 87.68 | 77.54 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 73.55 |
| (8) M1C-3 B | 59.71 | 60.81 | 60.81 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 87.68 | 77.54 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 73.55 |
| (9) N1A-2 C | 59.71 | 60.81 | 60.81 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 87.68 | 77.54 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 73.55 |
| (10) Y1-E B | 59.71 | 60.81 | 60.81 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 87.68 | 77.54 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 73.55 |
| (11) C1-J1 A | 58.24 | 59.34 | 59.34 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.8 | 88.77 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 93.12 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.99 |
| (12) I4-1 A | 58.24 | 59.34 | 59.34 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.8 | 88.77 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 93.12 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.99 |
| (13) I4-2 A | 58.24 | 59.34 | 59.34 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.8 | 88.77 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 93.12 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.99 |
| (14) S2-1 C | 58.24 | 59.34 | 59.34 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.8 | 88.77 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 93.12 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.99 |
| (15) Y1-F | 58.24 | 59.34 | 59.34 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.77 | 88.8 | 88.77 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 93.12 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.99 |
| (16) S2-1 A | 58.24 | 59.34 | 59.34 | 87.68 | 87.68 | 87.68 | 87.68 | 87.68 | 87.7 | 87.68 | 93.12 | 93.12 | 93.12 | 93.12 | 93.12 | **100** | 77.17 | 78.62 | 78.62 | 78.62 | 78.62 | 78.62 | 78.62 | 76.45 |
| (17) 24 Y1-H | 57.88 | 58.97 | 58.97 | 77.54 | 77.54 | 77.54 | 77.54 | 77.54 | 77.5 | 77.54 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 77.17 | **100** | 86.23 | 86.23 | 86.23 | 86.23 | 86.23 | 86.23 | 82.61 |
| (18) *C1-G1 | 60.87 | 61.96 | 61.96 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.4 | 75.36 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.62 | 86.23 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 91.04 |
| (19) C1-J1 B | 60.87 | 61.96 | 61.96 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.4 | 75.36 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.62 | 86.23 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 91.04 |
| (20) I3-3 A | 60.87 | 61.96 | 61.96 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.4 | 75.36 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.62 | 86.23 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 91.04 |
| (21) M1C-3 A | 60.87 | 61.96 | 61.96 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.4 | 75.36 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.62 | 86.23 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 91.04 |
| (22) N1A-2 E | 60.87 | 61.96 | 61.96 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.4 | 75.36 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.62 | 86.23 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 91.04 |
| (23) Y1-E A | 60.87 | 61.96 | 61.96 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.36 | 75.4 | 75.36 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 79.71 | 78.62 | 86.23 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 91.04 |
| (24) S2-1 B | 59.78 | 60.87 | 60.87 | 73.55 | 73.55 | 73.55 | 73.55 | 73.55 | 73.6 | 73.55 | 78.99 | 78.99 | 78.99 | 78.99 | 78.99 | 76.45 | 82.61 | 91.04 | 91.04 | 91.04 | 91.04 | 91.04 | 91.04 | **100** |

**Tabla 12.** Matriz de identidad creada con ClustalW. Porcentajes de similitud de pares de secuencias nucleotídicas del gen *merT2*. Código

| Código | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (1) I4-1 | **100** | 100 | 100 | 54.7 | 54.13 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 54.99 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 54.99 |
| (2) I4-2 | 100 | **100** | 100 | 54.7 | 54.13 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 54.99 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 54.99 |
| (3) N1A-2 | 100 | 100 | **100** | 54.7 | 54.13 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 54.99 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 54.99 |
| (4) I3-3 | 54.7 | 54.7 | 54.7 | **100** | 75.78 | 76.35 | 76.35 | 76.35 | 76.35 | 76.35 | 76.35 | 76.35 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 72.08 | 75.5 | 75.5 | 75.5 | 75.5 | 75.5 | 75.5 | 76.07 |
| (5) S2-1 | 54.13 | 54.13 | 54.13 | 75.78 | **100** | 86.04 | 86.04 | 86.04 | 86.04 | 86.04 | 86.04 | 86.04 | 85.75 | 85.75 | 85.75 | 85.75 | 85.75 | 76.92 | 83.48 | 83.48 | 83.48 | 83.48 | 83.48 | 83.48 | 79.49 |
| (6) *C1-G1 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 76.35 | 86.04 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 76.64 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 81.48 |
| (7) C1-J1 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 76.35 | 86.04 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 76.64 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 81.48 |
| (8) EL2-2 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 76.35 | 86.04 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 76.64 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 81.48 |
| (9) I3-3 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 76.35 | 86.04 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 76.64 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 81.48 |
| (10)M1C-3 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 76.35 | 86.04 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 76.64 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 81.48 |
| (11) N1A-2 | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 76.35 | 86.04 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 76.64 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 81.48 |
| (12) Y1-E | 56.41 | 56.41 | 56.41 | 76.35 | 86.04 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 76.64 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 81.48 |
| (13) C1-J1 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 76.64 | 85.75 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 76.64 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 81.2 |
| (14) I4-1 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 76.64 | 85.75 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 76.64 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 81.2 |
| (15) I4-2 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 76.64 | 85.75 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 76.64 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 81.2 |
| (16) S2-1 | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 76.64 | 85.75 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 76.64 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 81.2 |
| (17) Y1-F | 56.98 | 56.98 | 56.98 | 76.64 | 85.75 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 95.16 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 76.64 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 81.2 |
| (18) Y1-H2 | 54.99 | 54.99 | 54.99 | 72.08 | 76.92 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | 76.64 | **100** | 82.62 | 82.62 | 82.62 | 82.62 | 82.62 | 82.62 | 84.05 |
| (19) *C1-G1 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 75.5 | 83.48 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 82.62 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 87.46 |
| (20) C1-J1 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 75.5 | 83.48 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 82.62 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 100 | 87.46 |
| (21) I3-3 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 75.5 | 83.48 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 82.62 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 100 | 87.46 |
| (22) M1C-3 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 75.5 | 83.48 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 82.62 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 100 | 87.46 |
| (23) N1A-2 | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 75.5 | 83.48 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 82.62 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 100 | 87.46 |
| (24) Y1-E | 56.13 | 56.13 | 56.13 | 75.5 | 83.48 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 77.21 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 78.35 | 82.62 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | **100** | 87.46 |
| (25) S2-1 | 54.99 | 54.99 | 54.99 | 76.07 | 79.49 | 81.48 | 81.48 | 81.48 | 81.48 | 81.48 | 81.48 | 81.48 | 81.2 | 81.2 | 81.2 | 81.2 | 81.2 | 84.05 | 87.46 | 87.46 | 87.46 | 87.46 | 87.46 | 87.46 | **100** |

**Tabla 13.** Matriz de identidad creada con ClustalW. Porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas del gen *merT1*.

| Cepa | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| (1) I3-2 | **100** | 85.67 | 84.66 | 83.49 |
| (2) Y-01 | 85.67 | **100** | 96.17 | 88.99 |
| (3) N1A-1 | 84.66 | 96.17 | **100** | 89.30 |
| (4) M1A-2 | 83.49 | 88.99 | 89.30 | **100** |