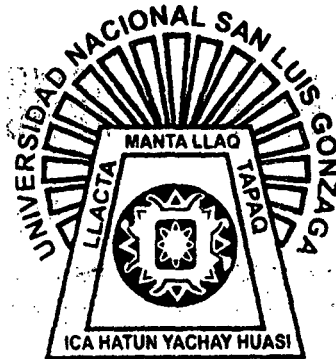


UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADEMICA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**"CARACTERIZACION DE LA CEPA BACTERIANA
CTe-01 RESISTENTE A TELURITO DE POTASIO"**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

Bach. ESPINOZA SALAZAR, LUCY ELENA

ICA - PERU

2015

Dedicatoria

A mis amados padres, María y José, que con su cariño y amor hicieron todo lo que pudieron para que cumpliera mis metas y sueños. Me acompañaron y me dieron su apoyo en mis años de estudiante y en la realización de mi tesis. A ti mamá que te preocupabas cuando llegaba tarde a casa y a ti papi que me acompañabas hasta la puerta del laboratorio y te asegurabas que llegue con bien.

A mis queridos asesores, que con sus experiencias y lecciones influyeron a que sea una persona correcta y preparada para cualquier reto que me imponga la vida. Aprendí de ustedes lo mejor en este proceso, como personas y como profesionales.

Agradecimientos

Gracias Dios por permitirme tener buena salud, llenaste mi espíritu de motivación e inspiración para culminar con mi tesis.

Gracias a mis padres que me dieron la vida, la educación, me dieron su apoyo y confiaron en mí. Fueron absolutamente comprensivos en este camino, me enseñaron e inculcaron todos los valores que ahora practico, me siento afortunada de ser su hija y orgullosa que sean mis padres. Gracias hermanos, Fernando y Laura que la mayoría de veces parece que lidiamos una guerra, pero en momentos y situaciones difíciles nos unimos. Ustedes son mis modelos y pronto les seguiré los pasos.

Gracias a mis docentes, que me enseñaron a amar mi carrera y sobre todo al Dr. Juan Carlos Tantaleán y a la Dra. Rosa Altamirano que se convirtieron en mis segundos padres de mi segundo hogar. Gracias por su paciencia y dedicación en mi tesis. Su sabiduría influyó en mi madurez profesional. Muchas gracias por recibirme y por apostar por mí.

Gracias al laboratorio de análisis biológicos BiosLab y al laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Docente Madre y del Niño "San Bartolomé" de la ciudad de Lima por las facilidades para la realización de algunas pruebas realizadas en el presente trabajo de investigación y alcanzar los objetivos perseguidos.

Gracias amigos y personas que fui conociendo en el proceso, mi mente y mi corazón no olvidarán el apoyo que me brindaron.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1. Material biológico.....	6
3.1.1. Cepas bacterianas	6
3.2. Métodos	6
3.2.1. Reactivación de la cepa bacteriana CTe-01.....	6
3.2.2. Características culturales y microscópicas	7
3.2.3. Caracterización bioquímica	7
3.2.4. Caracterización fisiológica.....	8
3.2.4.1. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de diferentes metales pesados	8
3.2.4.2. Susceptibilidad a antibióticos	9
3.2.4.3. Efecto fosfato de sodio en la resistencia a telurito de potasio	11

RESUMEN

El telurito es extremadamente tóxico para la mayoría de los organismos vivos. Sin embargo, existen pocas bacterias capaces de crecer y reducir el telurito a ciertas concentraciones. En el presente estudio, se realizó la caracterización de la cepa bacteriana denominada como CTe-01 resistente a telurito de potasio.

Se determinaron las siguientes características: microscópicas y culturales; bioquímicas, mediante el sistema automatizado VITEK, la resistencia a diferentes sales de metales pesados mediante determinación de MIC; resistencia a antibióticos, por el método de Kirby-Bauer; el efecto del fosfato de sodio en la resistencia a K_2TeO_3 , por medio de curvas de crecimiento; amplificación y secuenciación del gen 16S ADNr para identificar la cepa bacteriana hasta nivel de especie; se verificó la presencia de ADN plasmidial, por electroforesis en gel de agarosa y se realizó el perfil de proteínas totales mediante SDS-PAGE

Esta bacteria es un bacilo Gram negativo que forma colonias de color negro cuando crece en presencia de telurito de potasio. Así mismo, fermenta la glucosa, maltosa, manitol y sacarosa; cataliza reacciones químicas mediante las enzimas prolina arilamidasa, tirosina arilamidasa y lisina descarboxilasa, utiliza el citrato y succinato como fuente de carbono. Es resistente a sales de metales (en $\mu\text{g/mL}$; K_2TeO_3 , 150; K_2CrO_4 , 60; $K_2Cr_2O_7$, 50; $AgNO_3$, 50; $HgCl_2$, 20; $NiSO_4$, 450; $CoCl_2$, 150; Na_3AsO_3 , 300; $CuSO_4$, 250; $ZnSO_4$, 210; $LiCl$, >1000; $CdCl_2$, 100) y muestra resistencia a antibióticos (en $\mu\text{g/mL}$; tobramicina, 20; vancomicina, 30; ampicilina, 10; ampicilina sulbactam, 20). Así mismo, se determinó que el fosfato de sodio afecta el crecimiento de la cepa CTe-01 en presencia de telurito de potasio tanto en medio líquido como en medio sólido. El análisis de la secuencia permitió identificar la cepa como *Aeromonas veronii*. Porta un plásmido que migra entre las bandas de 6,557 a 9,416 pb con respecto al marcador de peso molecular estándar Lambda DNA/Hind III. En el perfil de proteínas totales, no muestra sobreexpresión alguna cuando crece en presencia de telurito.

Se concluye que la cepa bacteriana CTe-01 corresponde a la especie *Aeromonas veronii*.

Palabras claves: Telurito de potasio, *Aeromonas veronii*.

I. INTRODUCCIÓN

La caracterización de microorganismos, incluyendo la identificación bacteriana se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones, tales como: medicina forense microbiana, amenazas de bioterrorismo y estudios ambientales⁴². A pesar de la falta de una definición coherente de especies, la oportuna caracterización e identificación de las bacterias siguen siendo crítica en muchas áreas, como salud pública, diagnóstico clínico, monitoreo ambiental, control de la seguridad alimentaria y la identificación de agentes de amenaza biológica.

Recientes avances en técnicas moleculares han ofrecido alternativas atractivas a los procedimientos microbiológicos convencionales para la caracterización e identificación de microorganismos. Estos nuevos métodos pueden proporcionar una salida rápida de datos, sobre cepas individuales y poblaciones enteras²⁰, sin restarle importancia a las técnicas convencionales y automatizadas que son una herramienta útil y rápida para el análisis microbiológico.

El aislamiento y la caracterización de microorganismos resistentes a metales y metaloides como el Te es de trascendencia debido que bacterias aisladas del ambiente, si bien pueden ser patógenas para el hombre, animales y plantas, debido a sus determinantes genéticos de patogenicidad y virulencia, son de utilidad en procesos biotecnológicos⁵⁸ como bioadsorción⁴⁵, síntesis de nanopartículas⁴ y biorremediación^{34,33,45,15} de ambientes contaminados.

El desarrollo industrial y la creciente urbanización causan problemas ambientales graves debido al vertimiento de efluentes industriales y domésticos con presencia de metales tóxicos, los cuales constituyen la causa de la contaminación de los ambientes acuáticos²⁹, sedimentos y aguas subterráneas. Esta contaminación causa efectos adversos en el hombre, animales y vegetales. Sin embargo existen microorganismos que crecen en presencia de metales tóxicos.

La resistencia bacteriana a metales pesados, los mecanismos de resistencia y los determinantes genéticos involucrados, tanto en los cromosomas bacterianos, plásmidos, o transposones^{27, 12}, han recibido especial atención debido a que las cepas resistentes pueden utilizarse como una alternativa en la detoxificación de ecosistemas contaminados por metales pesados y metaloides. Dado que estos elementos, tales como: Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Sb^{3+} , Se^{4+} y Te^{4+} son poco o nada biodegradables^{28,27,24}, su interés biológico se debe principalmente a su toxicidad⁴⁴ por lo que representan una amenaza para todos los organismos²⁷, debido a sus efectos tóxicos y mutagénicos^{29,27}.

El telurio es un metaloide que pertenece al grupo (VI-A) de la tabla periódica, se encuentra en concentraciones bajas en el ambiente (alrededor de 0,002 ppm) y en cantidades moderadas en muchos alimentos, incluyendo el ajo. Se encuentra principalmente en forma de telurito (TeO_3^{2-}) y telurato (TeO_4^{2-}), ambos tóxicos para la mayoría de microorganismos^{49,44,52,11,39}, particularmente para bacterias Gram-negativas^{52,6,48}, a concentraciones tan bajas como 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^{51,7,18} y también para las células de mamíferos¹⁸.

Las bacterias resistentes a telurito (TeO_3^{2-}) se caracterizan por reducir el telurito a telurio metálico (Te^0) insoluble y no tóxico⁴⁹, el cual es acumulado intracelularmente como inclusiones negras^{10,52,6,11}. Este fenómeno también ha sido observado en levaduras y eritrocitos⁵².

La toxicidad del telurito se debe a su carácter de oxidante fuerte y a la interferencia en numerosos procesos celulares⁴⁴. A pesar de su toxicidad, existen bacterias resistentes naturales a telurito las cuales han sido aisladas de entornos clínicos y muestras ambientales⁵¹. Algunos organismos Gram positivos como cepas de *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, son naturalmente resistentes a telurito de potasio⁶.

Existen diversos ensayos que permiten caracterizar a las especies bacterianas e incluyen entre otros, las pruebas bioquímicas, morfológicas, fisiológicas y también métodos moleculares, como genómica, basado en la secuenciación del gen 16S ADNr y otros genes de expresión constitutiva, que permite la identificación bacteriana con más precisión, basados en la expresión de proteínas y perfiles de plásmidos.

En el presente estudio se planteó caracterizar la cepa bacteriana CTe-01 que resiste a K_2TeO_3 y se propuso como objetivos: determinar sus características culturales, bioquímicas y fisiológicas; determinar la especie bacteriana mediante la secuenciación del gen 16S ADNr y determinar su perfil de plásmidos y proteínas.

II. ANTECEDENTES

A nivel internacional se documentó los siguientes estudios:

Rathgerber y col. (2002) en Canadá, aislaron 10 cepas de bacterias altamente resistentes a telurito de potasio de muestras de respiraderos hidrotermales. En medios conteniendo telurito de potasio acumulando de telurio metálico. El MIC a la sal de telurio osciló entre 1500 y 2500 µg/mL. El análisis filogenético reveló que 4 de las 10 cepas pertenecían al género de *Pseudoalteromonas*.

Coral y col. (2005) en Turquía, aislaron 48 cepas de *Pseudomonas* spp. de aguas residuales, las cuales fueron caracterizadas en base a sus cualidades morfológicas, culturales y bioquímicas. La mayoría de cepas fueron resistentes a telurito de potasio con un MIC de 55 µg/mL y determinaron que las cepas poseían un plásmido que mediaba la resistencia a telurito.

Kagami y col. (2012) en Japón, aislaron dos cepas bacterianas resistentes a 30 mM de telurito y tenían la capacidad de remover entre 86-89% de telurito del agua. Fueron identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* y *Ochrobactrum anthropi*, por sus rasgos fenotípicos, ensayos bioquímicos y por secuenciación del gen ARNr 16S mediante PCR.

Shamim y col. (2013) en India, aislaron e identificaron una cepa de *Aeromonas caviae* basada en sus características bioquímicas. Mostró resistencia a nitrato de plomo de 1,2 mM y para otros metales donde los valores MIC fueron 1,2 mM, 30 µM, 0,4 mM y 0,9 mM para ZnSO₄, HgCl₂, CdSO₄ y CuSO₄, respectivamente. Además mostró resistencia a antibióticos comunes como amikacina, ciprofloxacino, kanamicina, estreptomina, entre otros. El análisis de SDS-PAGE evidenció a tres proteínas inducidas por el plomo, con un peso molecular de 15,7; 16,9 y 32,4 KDa posiblemente involucradas en la resistencia a este metal.

Arenas y col. (2014) en Chile, aislaron 123 bacterias resistentes a telurito de muestras colectadas en la Antártida y caracterizaron seis nuevas cepas bacterianas resistentes y reductoras de telurito. Identificaron cepas de *Staphylococcus hameolyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Acinetobacter hameolyticus*, *Pseudomonas lini* y dos cepas de *Psychrobacter immobilis* mediante secuenciamiento del gen ARNr 16S. Estas mostraron una resistencia a telurito entre 35 y 575 µg/mL y un alto nivel de reducción del ión tóxico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material Biológico

3.1.1. Cepas bacterianas

- La cepa bacteriana CTe-01 resistente a telurito de potasio (100 µg/mL) fue aislada de la laguna de oxidación de Cachiche y pertenece al cepario del laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad San Luis Gonzaga de Ica.
- La cepa comercial *Escherichia coli* BW25113 fue utilizada como control en los ensayos.

3.2. Métodos

3.2.1. Reactivación de la cepa bacteriana CTe-01

La cepa CTe-01 fue conservada en medio Luria Bertani (LB) con 30% de glicerol a -20°C, (ver anexos Fig. 09). Se reactivó inoculando 20 µL de cepa en 1 mL de caldo L.B. y se incubó a 37°C por 24 horas. Luego del crecimiento, una asada de esta suspensión se sembró por estrías y agotamiento en placas con agar L.B. y se incubaron a 37°C por 24 horas.

3.2.2. Características culturales y microscópicas

Para la observación de las características macroscópicas, se tomó una asada de cultivo líquido de la cepa bacteriana CTe-01 y fue sembrada por estrías y agotamiento en placas de Agar L.B. y Agar L.B. suplementado con 100 µg/mL de K_2TeO_3 ¹⁷. Las características microscópicas de la cepa CTe-01 se verificaron mediante tinción Gram⁴⁴.

3.2.3. Caracterización bioquímica

El perfil bioquímico de la cepa bacteriana CTe-01 se determinó mediante el sistema automatizado VITEK en el laboratorio de Microbiología del Hospital Nacional Docente Madre y del Niño "San Bartolomé" de la ciudad de Lima, (ver anexos Fig. 11 y Tabla N° 13).

Se preparó una suspensión de la cepa en un tubo 1,8 mL de solución salina al 0,45% y se ajustó la suspensión al tubo número 1 de la escala de McFarland. Se extrajo la tarjeta de identificación para bacterias Gram negativas y se rotuló el número de la cepa. Los pocillos de la tarjeta de identificación se llenaron con la suspensión celular (100 µL) y se colocó en el módulo lector-incubador, se siguió el procedimiento de acuerdo al manual VITEK hasta obtener el reporte generado por el equipo²⁰.

Se realizó también una caracterización bioquímica adicional. Se determinó su capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono, en agar citrato Simmons; su capacidad de fermentar la glucosa, lactosa y sacarosa, en agar Hierro Triple azúcar (TSI); presencia de la enzima catalasa, mediante el test de catalasa; presencia de la enzima citocromo-c-oxidasa, mediante el test de oxidasa; la descarboxilación/desaminación de la lisina y la producción de ácido sulfhídrico, en agar Lisina Hierro (LIA); presencia de acetoina, en la prueba de Voges Proskauer (VP); su capacidad de hidrolizar la urea, en agar urea; su movilidad, actividad ornitina descarboxilasa y producción de indol, en medio de movilidad/indol/ornitina (MIO); capacidad de hidrolizar la gelatina, en medio de gelatina; la reducción del telurito de potasio en medio L.B. con telurito de potasio; la hidrólisis de la esculina, en agar bilis esculina; su tolerancia a la glucosa y producción de hemolisina, en agar sangre, (ver anexos Fig. 11 a Fig. 22).

3.2.4. Caracterización fisiológica.

3.2.4.1 Determinación de las concentraciones mínimas inhibitoria (MIC) de diferentes metales pesados.

El MIC fue determinado como la concentración más baja del metal que inhibió completamente el crecimiento bacteriano^{31,35,33}. Se ensayaron los siguientes metales pesados: Cr, Ag, Hg, Ni, Co, As, Cu, Zn, Li, Cd, Te. Estos fueron usados como K_2CrO_4 (0-100 $\mu\text{g/mL}$); $K_2Cr_2O_7$ (0-100 $\mu\text{g/mL}$); $AgNO_3$ (0-100 $\mu\text{g/mL}$); $HgCl_2$ (0-100 $\mu\text{g/mL}$); $NiSO_4$ (0-

600 µg/mL); CoCl₂ (0-400 µg/mL); Na₃AsO₃ (0-600 µg/mL); CuSO₄ (0-600 µg/mL); ZnSO₄ (0-300 µg/mL) LiCl (0-1000 µg/mL); CdCl₂ (0-100 µg/mL) y K₂TeO₃ (0-200 µg/mL).

El ensayo se realizó en tubos de vidrio, con 2 mL de caldo L.B.³, suplementado con suficiente volumen de solución stock para alcanzar las concentraciones de los metales pesados. Finalmente, se agregó 40 µL de la cepa bacteriana crecido en 2 mL de caldo L.B. a 37°C por 24 h⁵⁰. Los tubos se incubaron en agitación (150 rpm) a 37°C por 24 h^{40,21,2}. Los ensayos fueron realizados por triplicado⁵³. La cepa bacteriana CTe-01 fue considerada resistente cuando creció por sobre los valores de MIC del organismo control, *Escherichia coli* BW25113^{1,30}.

3.2.4.2 Susceptibilidad a antibióticos.

La susceptibilidad a antibióticos fue ensayado *in vitro* usando el método de difusión de disco de Kirby-Bauer^{36,29,48,2,34,45} modificado. Los antibióticos ensayados y la potencia de los discos fueron los siguientes³⁰: estreptomicina (S; 10 µg), tobramicina (DOT; 30 µg), gentamicina (GM; 10 µg) neomicina (N; 30 µg), cefalotina (CF; 30 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), ampicilina sulbactam (SAM), ampicilina (AM; 10 µg), kanamicina (KN; 30 µg), amikacina (MK; 30 µg) y vancomicina (VA; 30 µg).

Un cultivo de la cepa en caldo L.B. incubado a 37°C por 24 h fue usado como inóculo para el ensayo²⁹, 100 µl de este cultivo

se dispuso en placas de agar Mueller-Hinton usando un hisopo de algodón estéril embebido en solución salina fisiológica^{31,48,30,34,45}. Los discos de antibióticos fueron colocados en la superficie del agar usando una pinza de metal, suficientemente separados unos de otros con el fin de evitar la superposición de zonas de inhibición. Después de 30 minutos, las placas se invirtieron e incubaron a 37°C por 24 h en condiciones aeróbicas³⁰. *Escherichia coli* BW25113 fue usado como organismo control².

Luego del crecimiento con una regla milimetrada se midieron los halos de inhibición. Se clasificaron en resistente (R), intermedio (I) o susceptibles (S) dependiendo del diámetro de los halos, incluyendo el diámetro de los discos (6 mm)³⁴. Se utilizó una tabla patrón de halos, (ver anexos Tabla. N° 14).

Además se determinó los MIC de diferentes antibióticos mediante el sistema automatizado VITEK, la concentración de los antibióticos utilizados en µg/mL fueron: ampicilina (4, 8, 32), amp-sulbactam (4, 16, 32), cefazolina (4, 16, 64), cefoxitina (8, 16, 32), ceftazidima (1, 2, 8, 32), ceftriaxona (1, 2, 8, 32), cefepima (2, 8, 16, 32), imipenem (2, 4, 16), amikacina (8, 16, 64), gentamicina (4, 16, 32), tobramicina (8, 16, 64), ciprofloxacino (0,5; 2, 4), levofloxacino (0,25; 0,5; 2, 8), nitrofurantoina (16, 32, 64) y trimetoprima/sulfametoxazol (19, 76, 304).

3.2.4.3 Efecto del fosfato de sodio en la resistencia a telurito de potasio.

3.2.4.3.1 En medio sólido.

La cepa bacteriana fue crecida en 1 mL de caldo L.B. suplementado con 100 µg/mL de telurito de potasio, en agitación a 37°C durante toda la noche. Se transfirió 20 µL de este cultivo fresco a 1 mL de caldo L.B. y se prepararon diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-4} en tubos con 9 mL de SSF.

La última dilución se sembró en placas de agar L.B., L.B. + Te (100 µg/mL), L.B. + BF (20 mM) y en placas de L.B. + Te (100 µg/mL) y a diferentes concentraciones de fosfato (1, 5, 10, 15, 20 y 50 mM). Para esto se adicionó 100 µL de la dilución y se sembró en toda la superficie. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h.

3.2.4.3.2 En medio líquido

El crecimiento de la cepa CTe-01 fue estudiada en caldo L.B. (control), caldo L.B. + BF (20 mM), L.B. + Te (100 µg/mL) y en L.B. + Te (100 µg/mL) con diferentes concentraciones de fosfato (0,5; 1, 3, 5, 10 y 20 mM).

Adicionalmente, se ensayó con L.B. + Te (50 µg/mL) con 10 y 20 mM de fosfato de sodio, como control se usó medio L.B. suplementado con 50 µg/mL de K₂TeO₃. Los tubos se inocularon con 300 µL de cultivo crecido toda la noche en agitación (150 RPM) a 37°C en 15 mL de caldo L.B. (ver anexos Fig. 23). El crecimiento fue determinado midiendo cada hora el incremento de biomasa, por medición de la absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro marca UNICO 2100^{45,2}.

3.2.5. Caracterización molecular

3.2.5.1 Secuenciación del gen 16S ADN

3.2.5.1.1 Extracción de ADN genómico

El ADN de la cepa bacteriana CTe-01 fue aislado usando el protocolo de extracción de ADN de Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega®)⁴¹.

La cepa CTe-01 se sembró en placas de agar L.B. y se incubó por 24 h a 37°C. Una asada de células se resuspendió y luego se lisó en 300 µL de una solución de lisis nucleica por pipeteo suave. Se incubó a 80°C por 5 minutos y para remover el ARN se agregó 1,5 µl de solución ARNasa e incubó a 37°C por 1 hora.

Para remover las proteínas y los restos celulares se agregó 100 µl de solución de precipitación de proteínas, se usó vortex a máxima velocidad por 20 segundos, para mezclar la solución de precipitación de proteínas con el lisado celular. Se incubó en hielo por 3 minutos y se centrifugó a 14000 rpm por 2 min.

El sobrenadante conteniendo el ADN, se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga conteniendo 300 µl de isopropanol y se mezcló suavemente hasta que las cadenas de ADN a manera de hilos, formaran una masa visible.

Se centrifugó a 14000 rpm por 1 min. y cuidadosamente se descartó el sobrenadante y se secó el tubo en un papel absorbente.

Se agregó 300 µl de etanol al 70% y se invirtió suavemente para lavar el ADN. Se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. y se aspiró el sobrenadante. El tubo se secó con papel absorbente y se agregó 50 µl de solución de rehidratación, finalmente se almacenó el ADN a 4°C.

3.2.5.1.2 Amplificación del gen 16S ADNr mediante PCR

El gen 16S ADNr fue ampliado por reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) usando ADN cromosomal extraído anteriormente y los partidores siguientes²⁰:

Partidor directo (Primer 16S-F₂):

5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Partidor reverso (Primer 16S-R₂):

5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'.

Se agregaron los componentes de la mezcla de reacción según se indica (Tabla N° 01).

Tabla N° 01: Componentes de la reacción de PCR.

Reactivos	Concentración	Volumen (µL)
Master mix (2 X)	2 X	25
H ₂ O desionizada	-	22,5
Primer 16S-F ₂	40 pmol/µL	1
Primer 16S-R ₂	40 pmol/µL	1
ADN – Cte-01	0,1 µg/ µL	0,5
Volumen total		50 µL

*F: Directo; R: reverso

Se utilizó 30 µL de aceite mineral PROMEGA, para cubrir la mezcla y evitar la evaporación debido a las altas temperaturas del proceso de PCR.

3.2.5.1.3 Parámetros de la reacción de PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador PTC 100, con el siguiente programa (Tabla N° 02):

Tabla N° 02. Programa de PCR para amplificar el gen 16S ADNr de la cepa CTe-01.

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	94	5 min
30 ciclos		
Desnaturalización	94	1 min
Hibridación	47	45 s
Elongación	72	1 min
Elongación final	72	5 min
Conservación	4	10 h

3.2.5.1.4 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE. Se cargaron en los pocillos del gel, 3 μ L del marcador de peso molecular (Lambda DNA/*Hind* III marker) y 5 μ L de los productos de PCR mezclados con 2 μ L de tampón de carga.

La electroforesis se realizó a 50 V durante 50 min en una cámara de electroforesis horizontal, (ver anexos Fig. 24); luego se retiró el gel; se tiñó con bromuro de etidio (0,1 μ g/mL) por 5 min y se lavó con agua destilada por 10 min. Para visualizar las bandas de ADN, el gel se expuso a la luz U.V. en un transiluminador.

3.2.5.2 Secuenciación y análisis *In silico* de las secuencias nucleotídicas.

Los productos de PCR (20 μ L) fueron remitidos a la empresa Macrogen USA para su secuenciación (<http://www.macrogenusa.com>).

Las secuencias de nucleótidos recepcionadas en bloc de notas, se transfirieron a formato Word con letra Courier New tamaño 11.

Se copió la secuencia reversa (Reverse) y con el programa REVSEQ EMBOS (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/revseq>) se invirtió la secuencia reversa, (ver anexos Fig. 25).

Luego se utilizó el programa CLUSTAL OMEGA, para el alineamiento de las secuencias nucleotídicas (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)⁵⁶, (ver anexos Fig. 26).

En la edición, se obtuvo una secuencia consenso el cual se guardó en formato fasta (>seqCTe-01) y se utilizó el programa BLAST^{40,2} (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), (ver anexos Fig. 27), para observar la similitud de las secuencias de nucleótidos con la base de datos. Se ingresó la secuencia y se seleccionó aquellas con más secuencias. Se obtuvo un cuadro de secuencias de alineamientos significativos, comparando entre la secuencia nucleotídica obtenida en el secuenciamiento y las secuencias depositadas en la base de datos del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), (ver anexos Fig.28).

3.2.5.3 Perfil de plásmidos

3.2.5.3.1 Extracción de ADN plasmídico.

El ADN plasmidial de la cepa bacteriana CTe-01 fue obtenido por el método de lisis alcalina².

La cepa se cultivó toda la noche en 5 mL de caldo L.B. a 37°C en agitación. Se transfirió 1,5 mL del cultivo bacteriano a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min.

Se retiró el sobrenadante y se volvió a transferir 1,5 mL del cultivo bacteriano al mismo tubo Eppendorf y se centrifugó a 10000 rpm por 5 min.

Se resuspendió el sedimento en 150 µL de solución I de resuspensión celular, enfriada previamente en hielo y se resuspendió el sedimento utilizando vortex. Se agregó 300 µl de la solución II de lisis y se mezcló por inversión 10 veces. Se incubó por 5 min, se adicionó 225 µL de la solución III de neutralización y se mezcló por inversión 10 veces, (ver Anexos Pág. 72).

Se centrifugó inmediatamente a 14000 rpm por 5 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf. Se agregó la solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25; 24; 1) en volúmenes similares

al sobrenadante y se mezcló por inversión 10 veces. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo.

El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. El tubo se secó sobre papel toalla y el sedimento se lavó con 1 mL de etanol al 70%.

Se centrifugó por última vez a 12000 rpm por 5 min y el sobrenadante fue descartado. El ADN plasmidial se disolvió en 25 μ L buffer de resuspensión de ADN. El ADN plasmidial se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa tal como se describió anteriormente.

3.2.5.4 Perfil de proteínas totales

El perfil de proteínas totales de la cepa CTe-01 se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato sódico (SDS-PAGE)^{45,37}.

Los geles de poliacrilamida se prepararon entre dos placas de vidrio separadas por espaciadores y sellados con una fina capa de agarosa. Para la preparación del gel de poliacrilamida se

utilizaron los componentes estándares (ver Anexos Tabla N° 11 y N° 12)

La cepa bacteriana se cultivó en 5 mL de caldo L.B. y 5 mL de caldo L.B. suplementado con 50 µg/mL de K₂TeO₃, durante 12 horas a 37°C. Finalizado el tiempo se transfirió 1,5 mL del cultivo bacteriano a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 8000 rpm durante 3 min. Se retiró el sobrenadante y se volvió a transferir 1,5 mL del cultivo bacteriano al mismo tubo Eppendorf y se centrifugó a 8000 rpm durante 3 min. Se realizó lo mismo con *E. coli* BW25113, como organismo control.

Las células crecidas con y sin telurito y células de *E. coli* se resuspendieron en 40 µL de tampón de resuspensión Tris HCl y en 50 µL de tampón de carga. Las células resuspendidas fueron distribuidas en tubos Eppendorf de 0,5 mL y fueron tratadas a 95°C por 2 min. Luego fueron centrifugadas a 8000 rpm por 3 minutos y se recuperó el sobrenadante. Éste fue sometido nuevamente a tratamiento térmico, se centrifugó a 8000 rpm por 3 min y se recuperó el sobrenadante.

El gel polimerizado, se sumergió en una cámara de electroforesis vertical, (ver anexos Fig. 29), que contuvo tampón de electroforesis con SDS 1X. Se tomó 15 µL de muestra y se cargó suavemente en los pocillos. En uno de ellos se dispensó 10 µL del marcador de peso molecular estándar de proteínas (broad range).

Las muestras fueron electroforetizadas por 2 horas. Luego el gel se tiñó con azul de Coomassie por 3 min en agitación¹⁸, (ver anexos Fig. 30) y se destiñó en ácido acético al 10% a 37°C por toda la noche¹⁶. Las bandas fueron analizadas para determinar el tamaño molecular relativo en cada muestra.

IV. RESULTADOS

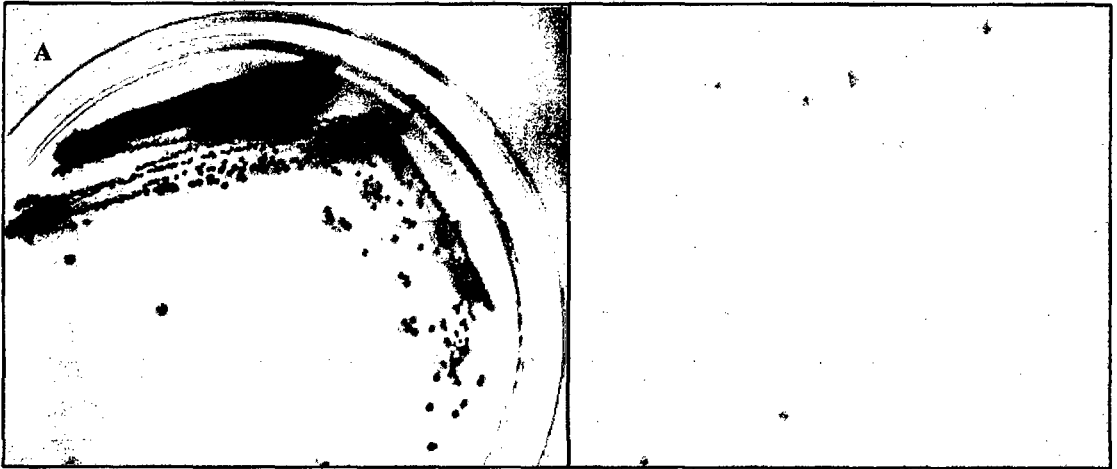


Fig. 01. A: características macroscópicas de la cepa bacteriana CTe-01 en LB + K₂TeO₃ (100 µg/mL); **B:** características microscópicas mediante tinción Gram de la cepa bacteriana CTe-01 (100X).

Tabla N° 03. Características culturales de la cepa bacteriana CTe-01 resistente a telurito de potasio.

Característica	Colonia de cepa Cte-01
Color	Incoloro
Diámetro	1-2 mm
Forma	Circular
Borde	Entero
Elevación	Convexa

Tabla N° 04. Características bioquímicas de la cepa bacteriana CTe-01 determinada mediante el sistema automatizado VITEK.

Característica	CTe-01
Fermentación de azúcares	
Adonitol	-
L-arabitol	-
D-celobiosa	-
D-glucosa	+
D-maltosa	+
D-manitol	+
D-manosa	+
Xilosa	-
Palatinosa	-
D-sorbitol	-
Sacarosa	+/-
D-tagatosa	-
D-trealosa	+
Actividad enzimática	
L-pirrolidonil-arilamidasa	-
Ala-fe-pro-arilamidasa	-
β -galactosidasa	-
Glutamil arilamidasa	-
γ -glutamyl-transferasa	-
β -glucosidasa	-
β -alanina-arilamidasa	-
L-prolina-arilamidasa	+
Tirosina-arilamidasa	+
Glicina-arilamidasa	-
Lipasa	-
Ureasa	-
α -glucosidasa	-
α -galactosidasa	-
β -N-acetil-glucosaminidasa	+
β -N-acetil-galactosaminidasa	-
Fosfatasa	-
Ornitina descarboxilasa	-
Lisina descarboxilasa	+
β -glucuronidasa	-
Fuente de carbono	
Citrato	+
Malonato	-
Gluconato	-
Lactato	-
Succinato	+

+ : positivo; - : negativo; +/- : crecimiento débil.

Tabla N° 05. Pruebas bioquímicas de la cepa bacteriana CTe-01 resistente a telurito de potasio.

Característica	CTe-01
Fermentación de azúcares	
Glucosa	+
Sacarosa	+/-
Lactosa	-
Actividad enzimática	
Catalasa	+
Oxidasa	+
Ornitina descarboxilasa	-
Lisina descarboxilasa	+
Ureasa	-
Gelatinasa	-
Esculinasa	-
Productos de degradación	
Acetoína	+
Indol	+
Acetato	-

+ : Positivo; - : Negativo; +/-: crecimiento débil.

Tabla N° 06. Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de diferentes metales pesados para la cepa bacteriana CTe-01

Sal de metal	Cepa CTe-01 MIC (µg/mL)	<i>Escherichia coli</i> BW25113 MIC (µg/mL)
K ₂ CrO ₄	60	40
K ₂ Cr ₂ O ₇	50	70
AgNO ₃	50	7
HgCl ₂	20	3
NiSO ₄	450	250
CoCl ₂	150	250
Na ₃ AsO ₃	300	550
CuSO ₄	250	550
ZnSO ₄	210	130
LiCl	>1000	700
CdCl ₂	100	75
K ₂ TeO ₃	50	1

Tabla Nº 07. Susceptibilidad a antibióticos de la cepa CTe-01. Método de difusión en disco.

Antibiótico	Sigla	Potencia (µg/mL)	Susceptibilidad	
			CTe-01	<i>Escherichia coli</i> BW25113
Estreptomina	S	10	S	S
Tobramicina	DOT	30	R	R
Gentamicina	GM	10	S	S
Neomicina	N	30	S	S
Cefalotina	CF	30	S	S
Cefotaxima	CTX	30	S	S
Amp-sulbactam	AMS	20	R	I
Ampicilina	AM	10	R	S
Kanamicina	KN	30	S	S
Amikacina	MK	30	S	S
Vancomicina	VA	30	R	R

S: sensible; R: resistente; I: intermedio.

Tabla N° 08. Susceptibilidad a antibióticos de la cepa bacteriana CTe-01 utilizando el sistema automatizado VITEK.

Antibiótico	MIC (µg/mL)	Susceptibilidad
Ampicilina	≥32	R
Amp-sulbactam	≥32	R
Cefazolina	8	R
Cefoxitina	≤4	S
Ceftazidima	≤1	S
Ceftriaxona	≤1	S
Cefepima	≤1	S
Imipenem	≤1	S
AmiKacina	≤2	S
Gentamicina	≤1	S
Tobramicina	≤1	R
Ciprofloxacino	≤0,25	S
Levofloxacino	0,25	S
Nitrofurantoina	≤16	S
Trimetoprima/sulfametoxazol	≤20	S

S: sensible; R: resistente.

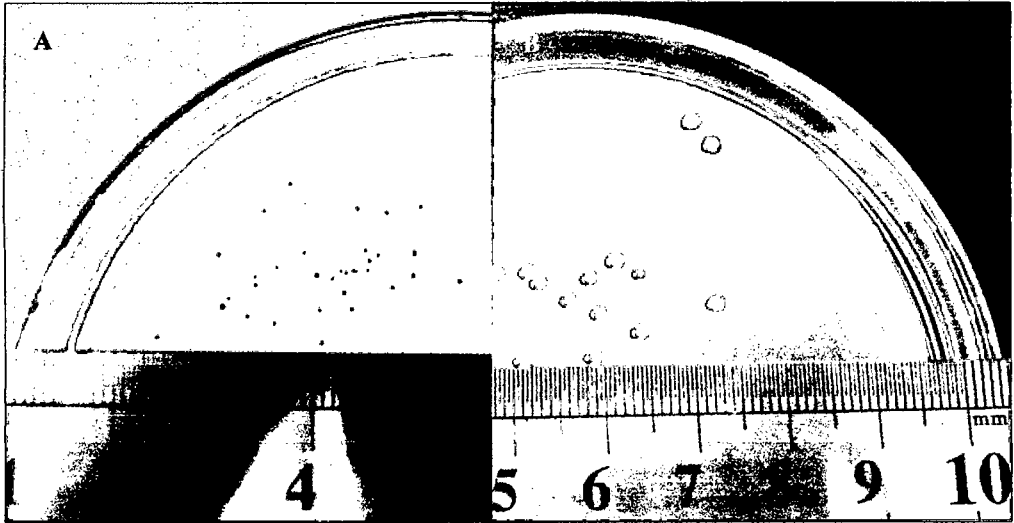


Fig. 02. A: crecimiento de la cepa bacteriana CTe-01 en agar L.B. suplementado con 100 µg/mL de K_2TeO_3 ; B: crecimiento en medio L.B. en ausencia de K_2TeO_3 .

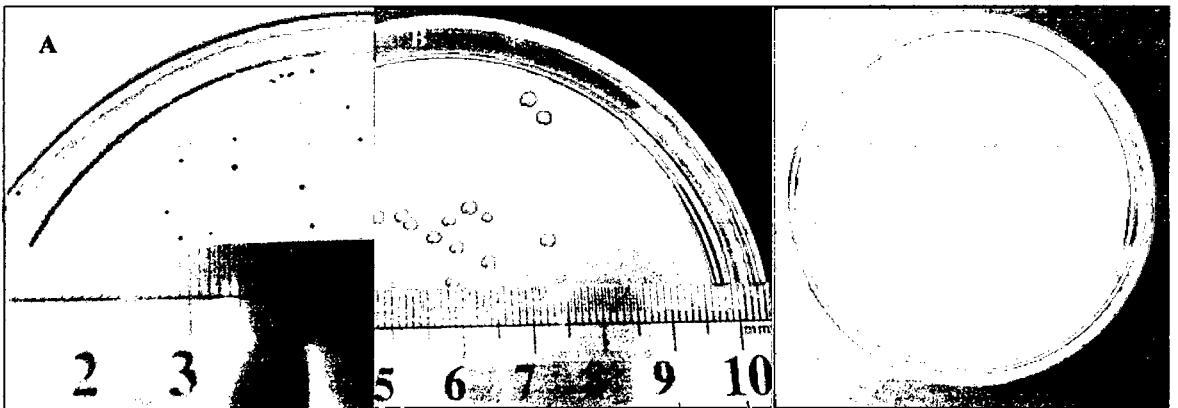


Fig. 03. Crecimiento de la cepa CTe-01 en A: L.B. con K_2TeO_3 /B.F 1 mM; B: L.B. + 20 mM de buffer fosfato; C: ausencia de crecimiento en medio L.B. + 100 µg/mL de K_2TeO_3 + 5 mM de buffer fosfato.

Tabla N° 09. Efecto del fosfato de sodio en el crecimiento de la cepa CTe-01 resistente a telurito de potasio.

Condición	Diámetro colonia (mm)
L.B.	1,5 ± 0,5
L.B. + Te	0,5
L.B. + BF (20 mM)	1 ± 0,5
L.B. + Te + B.F (1 mM)	0,5 ± 0,25
L.B. + Te + B.F (5 mM)	-
L.B. + Te + B.F (10 mM)	-
L.B. + Te + B.F (15 mM)	-
L.B. + Te + B.F (20 mM)	-
L.B. + Te + B.F (50 mM)	-

- : ausencia de crecimiento; L.B.: Luria Bertani; Te: telurito de potasio; B.F: fosfato de sodio; ±: D.S del promedio.

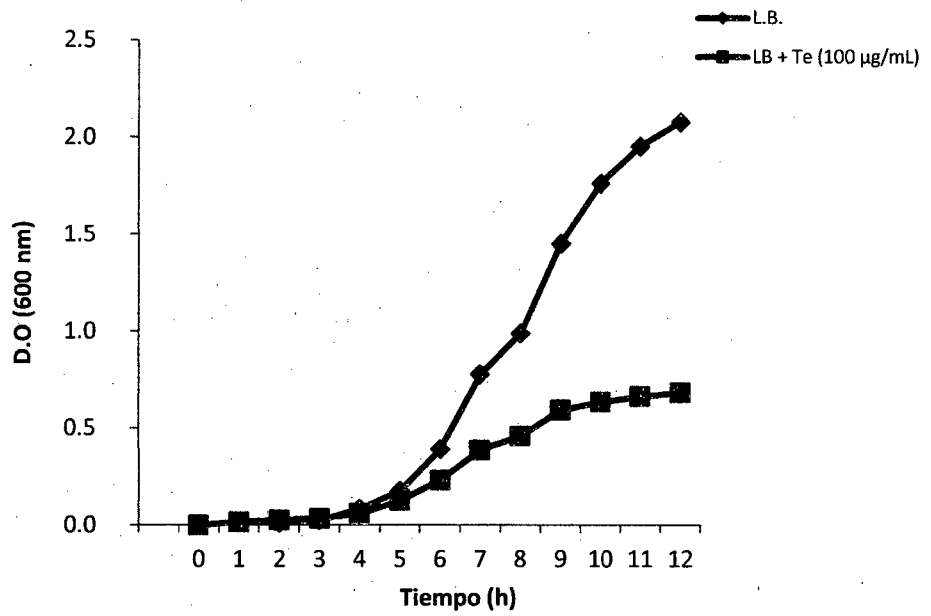


Fig. 04. Crecimiento de la cepa bacteriana CTe-01 en ausencia y presencia de K_2TeO_3 .

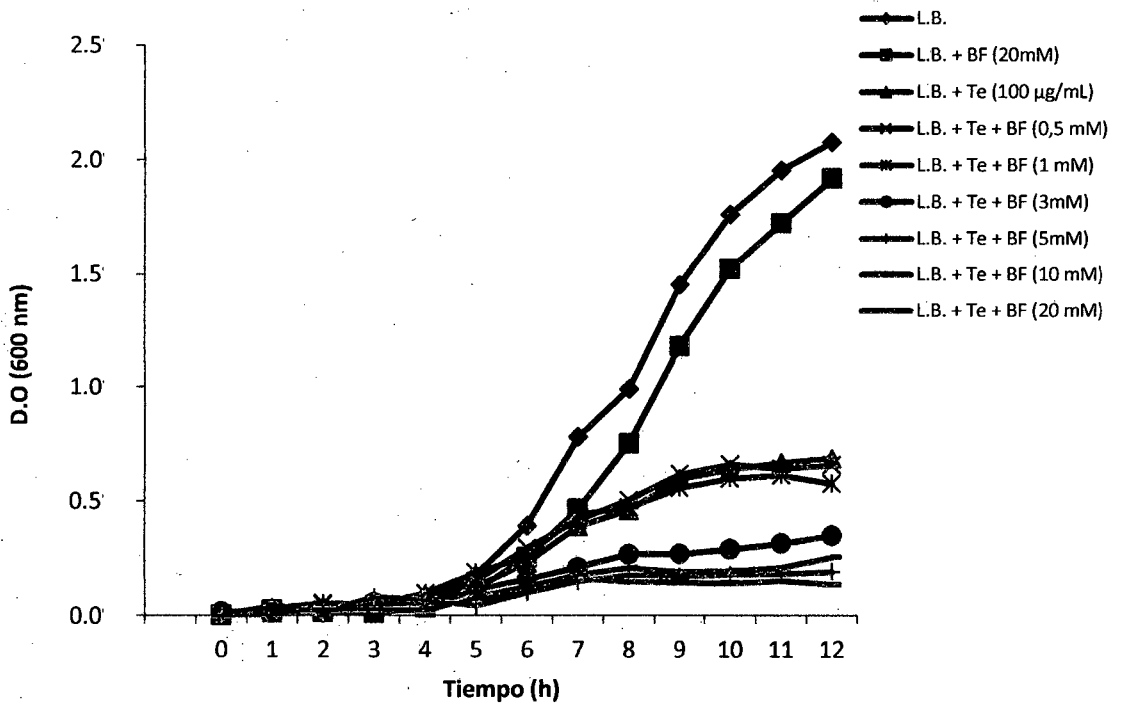


Fig. 05. Crecimiento de la cepa CTe-01 en K_2TeO_3 y a diferentes concentraciones de fosfato de sodio.

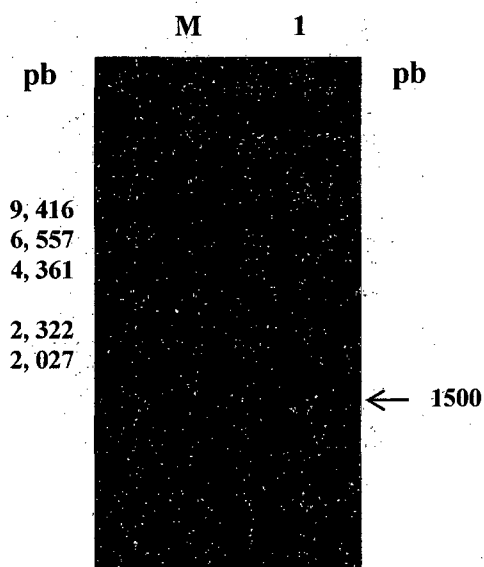


Fig. 06. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles: **M**, marcador Lambda DNA/Hind III; **1**, productos de PCR de la amplificación del gen 16S ADNr de la cepa bacteriana CTe-01.

Tabla N° 10. Similitud de secuencia entre el gen 16S ADNr de la cepa CTe-01 resistente a telurito de potasio con la base de datos del GenBank

Características	Gen Bank
Similitud a la secuencia	<i>Aeromonas veronii</i> B565 strain B565 16S ribosomal RNA
N° de acceso	NR_102789.1
Cobertura %	98
Expentancia	0.0
Identidad %	100

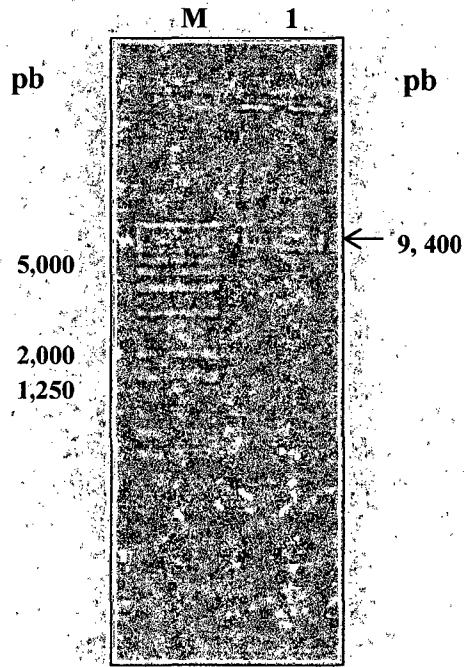


Fig. 07. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carriles: M, Marcador Lambda DNA/Hind III; 1, plásmido de la cepa bacteriana CTe-01.

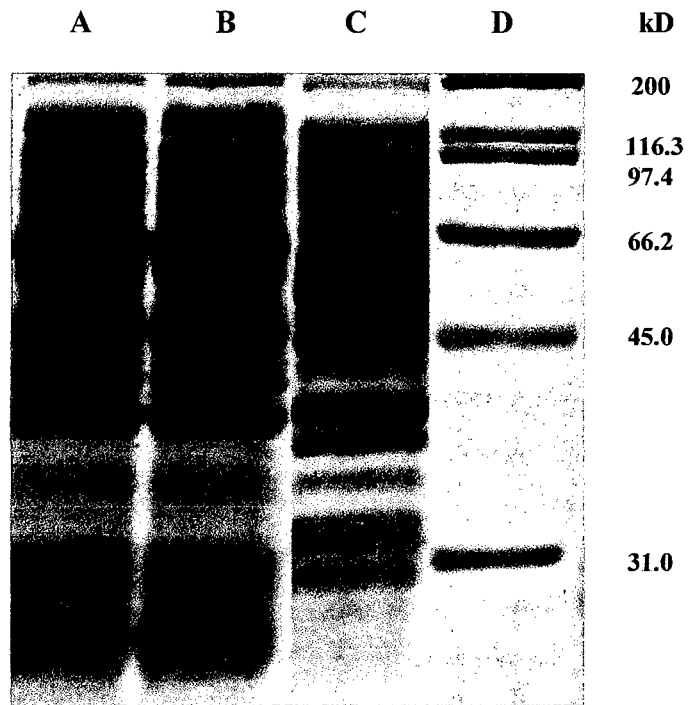


Fig. 08. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Carriles: **A**, cepa bacteriana CTe-01 crecida en presencia de telurito de potasio; **B**, cepa bacteriana CTe-01 crecida en ausencia de telurito de potasio; **C**, perfil de proteínas de *E. coli* BW25113; **D**, Marcador broad range.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizó la cepa bacteriana CTe-01 que fue aislada de aguas residuales de la laguna de oxidación de Cachiche-Ica. Esta bacteria crece en presencia de 100 µg/mL de K_2TeO_3 y tiene la capacidad de reducir el telurito de potasio (Te^{4+}) a telurio elemental (Te^0), a juzgar por la coloración negra de las colonias cuando crece en medio L.B. con telurito de potasio (Fig. 01-A). Esta respuesta sugiere que las células son capaces de activar defensas y mecanismos de detoxificación que les permite continuar su crecimiento en presencia del oxianión⁴.

La identificación de la cepa CTe-01 realizada por el sistema automatizado VITEK emitió un resultado que guarda concordancia con respecto a las especies contenidas en su base de datos. Según el estudio realizado por Castro y col. (2003) logró identificar cepas de *Aeromonas* aisladas de muestras clínicas, peces y aguas contaminadas, mostrando una reacción positiva para la fermentación de la glucosa y sacarosa, descarboxilación de la lisina y la utilización de citrato como fuente de carbono. Además muestra una reacción negativa a la hidrólisis de la esculina. Lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este ensayo (Tabla N° 04).

Esta prueba además sugiere la realización de pruebas bioquímicas complementarias para la identificación final, este estudio reportó que cepa CTe-01 tiene una reacción positiva a la movilidad, catalasa y producción de indol (Tabla N° 05), lo cual coincide con las pruebas bioquímicas realizadas por Sharon y col (2002) donde identificaron cepas del género *Aeromonas* de muestras clínicas y aguas residuales domésticas. La cepa Cte-01 es incapaz de hidrolizar la gelatina lo cual difiere con los estudios

realizados por Nagar y col. (2012), Sharon y col (2002) el cual identifica cepas de *Aeromonas* positivas a esta reacción. Estas observaciones ayudaron a la identificación de la cepa CTe-01, además pruebas moleculares fueron usadas para confirmar la identificación de la cepa como se describe posteriormente.

La cepa bacteriana CTe-01 mostró resistencia a los iones de cromo, plata, mercurio, níquel, zinc, cadmio y telurio. El MIC máximo observado fue para Ni (450 µg/mL) y el mínimo para Hg (20 µg/mL) (Tabla N° 06). Esta resistencia se puede atribuir a la presencia de metales en el sedimento acuático del cual fue aislada. La exposición de las bacterias a estos metales permite la selección de microorganismos resistentes, con la capacidad de tolerar sus efectos nocivos, este proceso de adaptación espontánea, podría deberse al desarrollo o adquisición de sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los iones metálicos²⁷.

A pesar de todos los estudios publicados, es difícil hacer una comparación directa con la literatura publicada debido a la diversidad de medios de crecimiento, condiciones de incubación y concentración de metales utilizados¹. No obstante, la resistencia a diferentes metales pesados ha sido documentada en numerosas investigaciones al igual que este estudio.

Estudios realizados por Akinbowale y col. (2007) y Shamin y col. (2013) informan de cepas de *Aeromonas veronii* y *Aeromonas caviae* respectivamente, aisladas de ambientes acuáticos, como resistentes a cadmio. La resistencia y reducción de telurio de potasio por parte del género *Aeromonas* solo ha sido reportado por Arenas y col. (2014), Castro y col. (2008), Castro y col. (2009) en muestras ambientales de

suelos, sedimentos y aguas, siendo este estudio el primer alcance de resistencia y reducción por parte de *Aeromonas*.

El gen posiblemente involucrado en la resistencia a telurito es *lpdA* localizado en el cromosoma de *Aeromonas caviae* que codifica para una enzima dihidrolipoamida dehidrogenasa quien cataliza la oxidación del NADH a NAD¹⁴.

En la evaluación de susceptibilidad a antibióticos, la cepa bacteriana CTe-01 mostró que es resistente a un número limitado de agentes antimicrobianos, donde la resistencia a aminoglucósidos, cefalosporinas y β -lactámicos es poco frecuente, (Tabla N° 07). Estos datos concuerdan con los estudios realizados por Matyary col. (2010), donde aislados de agua potable que pertenecen al género *Aeromonas* fueron sensibles a aminoglucósidos y cefalosporinas.

Así mismo, en las investigaciones realizada por Akinbowale y col. (2007), cepas de *Aeromonas* aisladas de sedimentos y peces, mostraron sensibilidad a cefotaxime, ciprofloxacino, gentamicina y nitrofurantoína, lo cual coincide a los ensayos realizados en este estudio. Sensibilidad a gentamicina y trimetoprima/sulfametoxazol observada en la cepa bacteriana CTe-01 también se documentó en el trabajo realizado por Son y col. (1997), con cepas de *Aeromonas hydrophila* aisladas de cultivos de *Telapia mossambica*.

Sin embargo, la cepa CTe-01 es resistente a tobramicina, ampicilina, ampicilina sulbactam, cefazolina y vancomicina. Esto concuerda con el estudio de Ye y col. (2012), quienes demostraron que cepas de *Aeromonas veronii* aisladas de tortugas enfermas, fueron resistentes a ampicilina. Otras especies como *A. hydrophila*

estudiadas por Negrete y col. (2003), aisladas del riñón de peces con signos de lesiones e infección, mostraron resistencia a cefazolina y ampicilina, tal como se muestra con los resultados de este estudio (Tabla N° 07). La resistencia a ampicilina parece ser un patrón común entre el género *Aeromonas*; sin embargo, en el trabajo realizado por Son y col. (1997) también en *A. hydrophila*, muestra sensibilidad a ampicilina en aislados de *Telapia mossambica*.

Numerosas especies de *Aeromonas* han sido descritas como importantes patógenos de especies acuáticas, además de su potencial patogenicidad en humanos³⁰ y la resistencia a los antibióticos se debe a la presión ambiental o a la descarga excesiva de antibióticos en ambientes acuáticos⁵⁵.

Los microorganismos desarrollan resistencia a antibióticos, en ambientes donde su concentración es alta o por la adquisición de un gen de resistencia que se encuentra en algún elemento genético y es transferido a un organismo a través de la exposición de antibióticos². Los datos obtenidos en este estudio evidencian que la cepa bacteriana CTe-01 resistente a antibióticos no se limita al ámbito hospitalario, ya que fue aislada de muestras ambientales donde es posible su diseminación a la población en general.

En estudios anteriores se ha demostrado que la resistencia a telurito no está relacionada a productos de genes específicos, sino que es una respuesta multifactorial que involucra directa o indirectamente rutas metabólicas, sus sustratos y productos¹⁹.

La primera indicación con respecto a la captación de telurito es el trabajo de Tomás (1986) quien propuso que el oxianión ingresa a la célula a través del sistema de transporte del fosfato¹⁹ y que es dependiente del pH⁸. Aunque en el estudio realizado por Borghese y Zannoni (2009) se demostró que el sistema de transporte de acetato es utilizado por el telurito para ingresar a células de *Rhodobacter capsulatus*. Hasta la fecha no se tiene una idea clara de la entrada de telurito hacia el interior celular¹⁹.

Cuando la cepa CTe-01 se siembra en medio L.B. suplementada con 20 mM de buffer fosfato de sodio, muestra un crecimiento habitual, (Fig.03-B). De manera similar ocurre cuando la cepa se siembra en medio L.B. suplementada con 100 µg/mL de K₂TeO₃, (Fig.02-A). Sin embargo, la cepa bacteriana CTe-01 muestra un ligero retraso en su crecimiento cuando se siembra en la condición antes mencionada, pero en presencia 1 mM de fosfato, (Fig.03-A).

En mayores concentraciones de fosfato se observó ausencia de crecimiento, (Fig.03-C). No obstante, en el trabajo realizado por Elías y col. (2012) se documentó que cepas de *E.coli* en presencia de altos niveles fuentes de fósforo, es cuatro veces más tolerante a telurito manteniendo su viabilidad celular. En este caso es posible que las bacterias usen el fósforo inorgánico como fuente de fósforo y cuando se encuentra disponible en exceso es tomado por el sistema de transporte de fosfato que es expresado constitutivamente. Bajo estas circunstancias la bacteria puede almacenar el exceso de fósforo²². Es probable que al crecer en concentraciones altas de buffer fosfato y en presencia del oxianión tóxico, este ingrese de manera desmedida ejerciendo su toxicidad con mayor efecto. Volviendo a esta cepa totalmente sensible e impidiendo su crecimiento, (Tabla N°09).

Los ensayos realizados en placas fueron contrastados con los ensayos en medio líquido por medición de la absorbancia a 600 nm. Donde se observó el mismo fenómeno de toxicidad en presencia de concentraciones mayores de 1 mM de buffer fosfato, (Fig. 05). Se comparó el crecimiento de la cepa bacteriana CTe-01 en medio L.B. en presencia y ausencia de telurito de potasio. La cepa bacteriana fue capaz de crecer a una concentración de 100 µg/mL de K₂TeO₃ sin embargo, alcanzó menores valores de O.D comparación con la curva de crecimiento en ausencia del oxianión (Fig. 04).

A pesar de ser la cepa CTe-01 resistente natural al oxianión¹³, su crecimiento es limitado en presencia de altas concentraciones, esto se puede deber a las propiedades potencialmente dañinas, como agente oxidante²⁶. Cuando el telurito alcanza concentraciones suficientemente altas y supera las primeras barreras de defensa, biomoléculas importantes son afectadas¹⁴.

La secuencia del gen 16S ADN_r indicó que la cepa bacteriana designada como CTe-01 tiene 100% de identidad a *A. veronii*. (Tabla N° 10). Comúnmente, *A. veronii* es aislada de muestras clínicas, ambientales y en alimentos. Causa infecciones en heridas, diarrea debido a la ingesta de agua contaminada o septicemia en pacientes inmunocomprometidos²⁵.

Se evidenció la existencia de un plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa³³. Cuya migración electroforética se observa entre las bandas de 6,557 a 9,416 pb con respecto al marcador de peso molecular estándar Lambda DNA/Hind III, (Fig. 07). En los trabajos realizados por Negrete y col. (2003) y Son y col. (1997) se refiere que *A. hydrophila* presenta plásmidos con diferentes tamaños los cuales

oscilan entre 25.7 Kb y 3.3 Kb respectivamente, ambos refieren que las cepas son resistentes a ampicilina.

En el perfil de proteínas de la cepa bacteriana CTe-01 mediante SDS-PAGE se comparó el patrón de bandas de la cepa con y sin exposición a 50 µg/mL de K₂TeO₃, donde no se evidenció diferencias entre ambas. Se observaron bandas proteicas de 65, 45, 44,5; 44 y 37 KDa aproximadamente. Lo que sugiere que no habría alguna inducción o sobre expresión de proteínas por la presencia de telurito de potasio. En el estudio realizado por Nagar y col. (2012) muestran un patrón de bandas de 65 y 45 KDa de la cepa de *A. veronii*, lo cual concuerda con lo observado en este estudio.

Una mejor variación se observó en el patrón de bandas entre la cepa bacteriana CTe-01 y *E. coli* BW25113. La cual muestra un alto nivel de polimorfismo (Fig. 08).

VI. CONCLUSIONES

Al término del trabajo de investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. La cepa bacteriana en estudio es Gram negativa, de forma bacilar, forma colonias circulares de borde entero, incoloras cuando desarrollan en medio LB.
2. La cepa bacteriana CTe-01 fermenta los azúcares siguientes: glucosa, maltosa, manitol y manosa. Posee las siguientes actividades enzimáticas: catalasa, oxidasa, lisina descarboxilasa. Utiliza al citrato y succinato como fuente de carbono y generan acetoina e indol como productos de degradación de la glucosa y triptófano, respectivamente.
3. Posee resistencia a multimetales, entre ellos: Na_3AsO_3 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CuSeO_4 (275 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ZnSO_4 (220 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y LiCl (>600 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y es altamente resistente a ampicilina (≥ 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y vancomicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
4. La cepa bacteriana CTe-01 corresponde a *A. veronii* según la presencia del gen 16S ADNr, alberga un plásmido que migra electroforéticamente entre las bandas de 6,557 a 9,416 pb con respecto al marcador de peso molecular Lambda DNA/Hind III y el análisis de SDS-PAGE no evidencia la expresión de proteínas en presencia de K_2TeO_3 .

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar ensayos de transformación bacteriana en *E. coli* con el plásmido de la cepa de estudio, para determinar si la resistencia de *A.veronii* a telurito de potasio proviene de algún determinante genético presente en él.
- Se propone obtener la secuencia nucleotídica del plásmido completo para el clonamiento de genes y expresión de proteínas que posiblemente confieran resistencia a diversos metales pesados, antibióticos o factores de virulencia.
- Se sugiere aplicar otras técnicas en la detección de proteínas como la electroforesis bidimensional, para detectar de manera adecuada si existe algún patrón de bandas heterogéneo que demuestre alguna inducción o sobre expresión de proteínas inducidas por el telurito de potasio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Akinbowale O.; H. Peng; P. Grant y M. Barton.** Antibiotic and heavy metal resistance in motile *Aeromonads* and *Pseudomonads* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2007.30: 177-182.
2. **Aktan Y.; S. Tan y B. Ilegen.** Characterization of lead-resistant river isolate *Enterococcus faecalis* and assessment of its multiple metal and antibiotic resistance. *Environ. Monit. Assess.* 2013.185: 5285-5293.
3. **Araya M.; J. Tantaleán; J. Pérez; D. Fuentes; I. Calderón; C. Saavedra; R. Burra; T. Chasteen y C. Vásquez.** Cloning, purification and characterization of *Geobacillus stearothermophilus* V uroporphyrinogen-III C-methyltransferase: evaluation of its role in resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 2008.160: 125-133.
4. **Arenas F.; C. Leal; C. Pinto; M. Arenas-Salinas; W. Morales; F. Cornejo; W. Díaz-Vásquez y C. Vásquez.** On the mechanism underlying tellurite reduction by *Aeromonas caviae* ST dihydrolipoamide dehydrogenase. *Biochimie.* 2014.3: 1-9.

5. **Arenas F.; B. Pugin; N. Henríquez; M. Arenas-Salinas; W. Díaz-Vásquez; M. Pozo; C. Muñoz; T. Chasteen; J. Pérez y C. Vásquez.** Isolation, identification and characterization of highly tellurite resistant, tellurite-reducing bacteria from Antarctica. *Polar. Scie.* 2014.8: 40-52.

6. **Avazéri C.; R. Turner; J. Pommier; J. Weiner; G. Giordano y A. Verméglio.** Tellurite reductase activity of nitrate reductasa is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiology* 1997.143: 1181-1189.

7. **Borghese R.; F. Borsetti; P. Foladori; G. Ziglio y D. Zannoni.** Effects of the Metalloid Oxyanion Tellurite (TeO_3^{2-}) on Growth Characteristics of the Phototrophic Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004.70: 6595-6602.

8. **Borghese R.; D Marchetti y D. Zannoni.** The highly toxic oxyanion tellurite (TeO_3^{2-}) enters the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* via an as yet uncharacterized monocarboxylate transport system. *Arch. Microbiol.* 2008.189: 93-100.

9. **Borghese R. y D. Zannoni.** Acetate Permease (ActP) Is Responsible for Tellurite (TeO_3^{2-}) Uptake and Resistance in Cells of the Facultative Phototroph *Rhodobacter capsulatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009.76: 942-944.

- 10. Borsetti F.; R. Borghese; F. Francia; M. Randi; S. Fedi y D. Zannoni.**
Reduction of potassium tellurite to elemental tellurium and its effect on the plasma membrane redox components of the facultative phototroph *Rhodobacter capsulatus*. *Protoplasma* 2002.221: 153-161.
- 11. Borsetti F.; V. Tremaroli; F. Michelacci; R. Borghese; C. Winterstein; F. Daldal y D. Zannoni.** Tellurite effects on *Rhodobacter capsulatus* cell viability and superoxide dismutase activity under oxidative stress conditions. *Res. Microbiol.* 2005.156: 807-813.
- 12. Bruins M.; S. Kapil y F. Oehme.** Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1999.45: 198-207.
- 13. Castro E.; A. Arreola; W. Díaz; CH. Hernández; R. Arteaga y A. Carmona.** La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. *Bioquímica.* 2003.28: 11-18.
- 14. Castro M.; R. Molina; W. Díaz; S. Pichuantes y C. Vásquez.** The dihydrolipoamide dehydrogenase of *Aeromonas caviae* ST exhibits NADH-dependent tellurite reductase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008.375: 91-94.

15. **Castro M.; R. Molina; W. Díaz; G. Pradenas y C. Vásquez.** Expression of *Aeromonas caviae* ST pyruvate dehydrogenase complex components mediate tellurite resistance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009.380: 148-152.
16. **Chien Ch.; J. Ming; T. Meng y Ch. Chih.** Isolation and characterization of environmental cadmium and tellurite resistant *Pseudomonas* strain. *Environ. Toxicol. Chem.* 2011.30: 2202-2207.
17. **Chiong M.; E. Gonzáles; R. Barra y C. Vásquez.** Purification and Biochemical Characterization of Tellurite-Reducing Activities from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* 1998.170: 3269-3273.
18. **Coral G.; B. Arikan y M. Ünalı.** A preliminary study on tellurite resistance in *Pseudomonas* spp. isolated from hospital sewage. *Polish J. of Environ. Stud.* 2005.15: 517-520.
19. **Di Tomaso G.; S. Fedi; M. Carnevali; M. Manegatti; C. Taddei y D. Zannoni.** The membrane-bound respiratory chain of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 cells grown in the presence or absence of potassium tellurite. *Microbiology* 2002.148: 1699-1708.

20. Eden P.; T. Schmidt, R. Blakemore y N. Pace. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* with polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. Int. J. Syst. Bacteriol. 1991. 41:324 – 325.
21. Elías A.; M. Abarca; R. Montes; T. Chasteen; J. Pérez y C. Vásquez. Tellurite enters *Escherichia coli* mainly through the PitA phosphate transporter. Microbiol. Op. 2012.3: 259-267.
22. Emerson D.; L. Agulto; H. Liu y L. Liu. Identifying and characterizing bacteria in an era of genomics and proteomics. 2008. 58: 925-936.
23. Escarpullí G.; M. Aguilera; C. Hernández; R. Arteaga; A. Carmona; A. Pérez; S. Giono; M. Figueras y G. Aparicio. La identificación genética de *Aeromonas*, una realidad y una necesidad para la microbiología diagnóstica. Bioquímica 2003.28: 11-18.
24. Fuentes D.; E. Fuentes; M. Castro; J. Pérez; A. Carmona; A. Pérez; Manuel A. Araya; T. Chasteen; S. Pichuanes y C. Vásquez. Cysteine metabolism-related genes and bacterial resistance to potassium tellurite. J. Bacteriol. 2007.189: 8953-8960.

25. **Hirota R.; A. Kuroda; J. Kato y H. Ohtake.** Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses. *J. Biosci. Bioeng.* 2009.109: 423-432.
26. **Kagami H.; A. Fudemoto; N. Fujimoto; E. Notaguchi; M. Kanzaki; M. Kuroda; S. Soda; M. Yamashita y M. Ike.** Isolation and characterization of bacteria capable of reducing tellurium oxyanions to insoluble elemental tellurium for tellurium recovery from wastewater. *Waste Bio. Valor.* 2012.3:409-418.
27. **Kamika I. y M. Momba.** Assessing the resistance and bioremediation ability of selected bacterial and protozoan species to heavy metals in metal-rich industrial wastewater. *MBC. Microbiol.* 2013.13: 1-14.
28. **Li Y.; Y. Liun; Z. Zhou; H. Huang; Y. Ren; Y. Zhang; G. Li y L. Wang.** Complete genome sequence of *Aeromonas veronii* strain B565. *J. Bacteriol.* 2011.193: 3389-3390.
29. **Lloyd-Jones G.; M. Osborn; D. Ritchie; P. Strike; J. Hobman; N. Brown y D. Rouch.** Accumulation and intracellular fate of tellurite in tellurite-resistant *Escherichia coli*: a model for the mechanism of resistance. *Microbiol. Lett.* 1994.118: 113-120.

- 30. Marrero J.; A. Díaz y O. Coto.** Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. CENIC 2009.41: 67-78.
- 31. Marrugo J. y R. Paternina.** Evaluación de la contaminación por metales pesados en la ciénaga la soledad y bahía de Cispatá, cuenca del bajo Sinú, departamento de Córdoba. GAQAA 2011.1-78.
- 32. Martínez A.; M. Cruz; O. Veranes; M. Carballo; Irina Salgado; S. Olivares; L. Lima y D. Rodríguez.** Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. UH. 2010.1-11.
- 33. Matyar F.; T. Akkan; Y. Uçak y B. Eraslan.** *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). Environ. Monit. Assess. 2010.167: 309-320.
- 34. McIntosh D.; M. Cunningham; B. Ji; F. Fekete; E. Parry; S. Clark; Z. Zalinger; I. Gilg; G. Russell; K. Johnson; M. Beattie y R. Ritchie.** Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. J. Antimicrob. Chemother. 2008.61: 1221-1228.

- 35. MINSA.** [Página principal en internet] Lima: Contaminación por metales pesados.
[Actualizada en setiembre de 2014; acceso setiembre de 2015]
<http://www.minsa.gob.pe>
- 36. Mohamed R. y A. Abo-Amer.** Isolation and characterization of heavy-metal resistant microbes from roadside soil and phylloplane. *J. Basic Microbiol.* 2011.52: 53-65.
- 37. Mohan M.; N. Anju y S. Kumar.** Biological characterization of lead-enhanced exopolysaccharide produced by a lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. *Biodegradation* 2011.23: 775-783.
- 38. Moore M. y S. Kaplan.** Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class *Proteobacteria*: characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 1992.74: 1505-1514.
- 39. Moraga R.; C. Merino y M. Mondaca.** Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Invest. Mar.* 2003.31: 91-95.

40. Nagar V.; R. Shashidhar y J. Bandekar. Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis. *World J. Microb. Biot.* 2012.29: 745-752.
41. Negrete P.; J. Romero y J. Arredondo. Resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio fluvialis* y *Vibrio furnissi*, aislados de *Carassius auratus auratus*. *Vet. Mex.* 2003.35: 21-30.
42. Pérez J. y C. Vásquez. Site-directed mutagenesis as a tool for unveiling mechanisms of bacterial tellurite resistance. *Biochem. Genet. Mol. Biol.* 2013.9: 186-200.
43. Pepi M.; M. Volterrani; M. Renzi; M. Marvasi; S. Gasperini; E. Franchi y S. Focardi. Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization. *J. Appl. Microbiol.* 2007.103: 2299-2308.
44. Premier Biosoft. [Página principal en Internet]. Identifying Bacteria. [Actualizada en julio de 2013; acceso setiembre de 2015]
<http://www.premierbiosoft.com>

45. **PROMEGA.** [Página principal en Internet] Technical manual: Wizard® Genomic DNA Purification Kit. [Actualizada en enero de 2010; acceso setiembre de 2013]
<http://www.promega.com>
46. **Rathgeber C.; N. Yurkova; E. Stackebrandt; J. Thomas y V. Yurkov.** Isolation of tellurite- and selenite-resistant bacteria from hydrothermal vents of the Juan de Fuca ridge in the Pacific Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002.68: 4613-4622.
47. **Rodicio M. y M. Mendoza.** Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2004.11: 81-87.
48. **Rojas D. y C. Vásquez.** Sensitivity to potassium tellurite of *Escherichia coli* cells deficient in CSD, CsdB and IscS cysteine desulfurases. *Res. Microbiol.* 2005.156: 465-471.
49. **Shamim K.; M. Mohan; A. Pandey y S. Kumar.** Isolation and identification of *Aeromonas caviae* strain KS-1 as TBTC- and lead-resistant estuarine bacteria. *Environ. Monit. Assess.* 2013.185: 5243-5249.

50. Sharon L.; W. Abbott; W. Cheung y M. Janda. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reaction and phenotypic identifications schemes. *J.Clin.Microbiol.* 2002.41: 2348-2357.
51. Son R.; G. Rusul; A. Sahilah; A. Zainuri; A. Raha y I. Salmah. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultures fish, *Telapia (Telapia mossambica)*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1997.24: 479-482.
52. Song L. y H. Chun. Cell surface engineering of microorganisms towards adsorption of heavy metals. *Crit. Rev. Microbiol.* 2013.1-10.
53. Summers A. y G. Jacoby. Plasmid-Determined Resistance to Tellurium Compounds. *J. Bacteriol.* 1976.129: 276-281.
54. Tantaleán J.; M. Araya; C. Saavedra; D. Fuentes; J. Pérez; I. Calderón; P. Youderian y C. Vásquez. The *Geobacillus stearothermophilus* V *iscS* gene, encoding cysteine desulfurase, confers resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli* k-12. *J. Bacteriol.* 2003.185: 5831-5737.
55. Tomás J. y W. Kay. Tellurite susceptibility and non-plasmid-mediated resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Ch.* 1986.30: 127-131.

- 56. Tremaroli V.; S. Fedi y D. Zannoni.** Evidence for a tellurite-dependent generation of reactive oxygen species and absence of a tellurite-mediated adaptive response to oxidative stress in cells of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707. Arch. Microbiol. 2007.187: 127-135.
- 57. Turner J.; J. Weiner y D. Taylor.** Tellurite-mediated thiol oxidation in *Escherichia coli*. Microbiology. 1999.145: 2549-2557.
- 58. Turner J.; Y. Aharonowitz; J. Weiner y D. Taylor.** Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. 2000.47: 33-40.
- 59. Vivas. M.; M. Martínez; F. García y R. Salgado.** Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafina. Invest. Univ. Mult. 2008.7: 51-60.
- 60. Ye Y.; Y. Jiang; T. Fan; Q. Jiang; Y. Cheng; J. Lu y L. Lin.** Resistance characterization, virulence factors, and Eric-pcr fingerprinting of *Aeromonas veronii* strains isolated from diseased *Trionyx sinensis*. Foodborne. Pathog. Dis. 2012.9: 1053-1055.
- 61. Zanaroli G.; S. Fedi; M. Carnevali; F. Favab y D. Zannoni.** Use of potassium tellurite for testing the survival and viability of *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

KF707 in soil microcosms contaminated with polychlorinated biphenyls. Res.
Microbiol. 2002.153: 353-360.

IX. ANEXOS

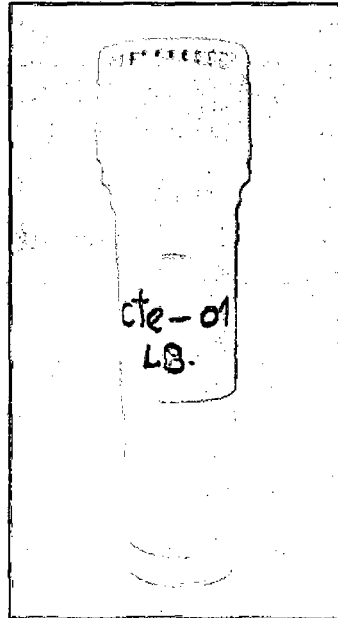


Fig. 09. Cepa CTe-01 conservada en medio L.B. con 30% de glicerol

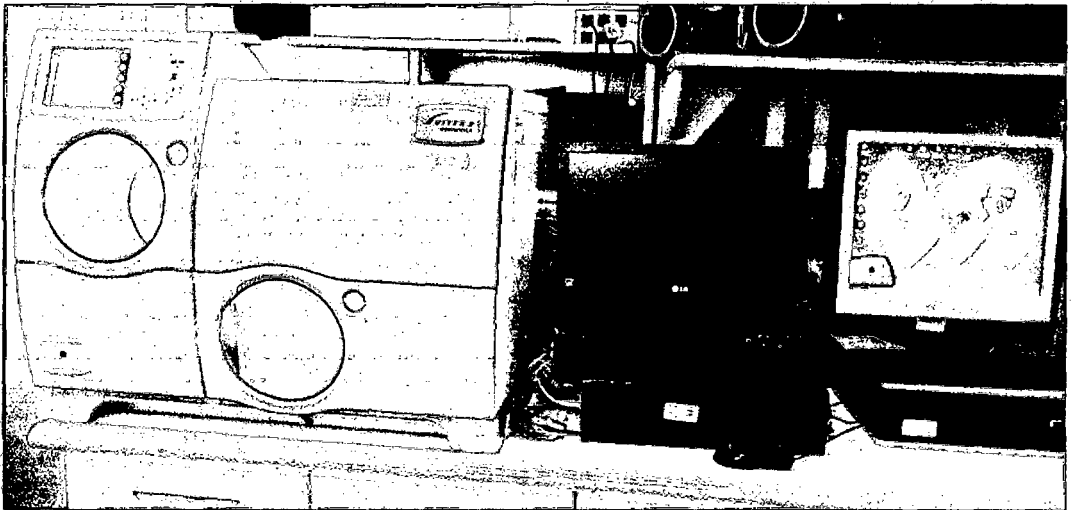


Fig. 10. Equipo automatizado VITEK

Tabla 11: Soluciones para la preparación del gel separador (12%).

Componentes	Volumen (mL)
H ₂ O	2,24
Solución de acrilamida 30 %	2,8
Tris HCl (pH 8,8) 1,5 M	1,82
SDS 10%	0,07
Persulfato de amonio 10 %	0,07
TEMED	0,0028

Tabla 12: Soluciones para la preparación del gel concentrador (5%).

Componentes	Volumen (mL)
H ₂ O	2,1
Solución de acrilamida 30 %	0,5
Tris HCl (pH 8,8) 1,5 M	0,38
SDS 10%	0,03
Persulfato de amonio 10 %	0,03
TEMED	0,003

Tabla N° 13. Relación de ensayos bioquímicos del sistema automatizado VITEK

Análisis	Cantidad/Pocillo (mg)
Fermentación de azúcares	
Adonitol	0,1875
L-arabitol	0,3
D-celobiosa	0,3
D-glucosa	0,3
D-maltosa	0,3
D-manitol	0,1875
D-manosa	0,3
Xilosa	0,0324
Palatinosa	0,3
D-sorbitol	0,1875
Sacarosa	0,3
D-tagatosa	0,3
D-trealosa	0,3
Actividad enzimática	
L-pirrolidonil-arilamidasa	0,018
Ala-fe-pro-arilamidasa	0,0384
β -galactosidasa	0,036
Glutamil arilamidasa	0,0324
γ -glutamil-transferasa	0,0228
β -glucosidasa	0,036
β -alanina-arilamidasa	0,0174
L-prolina-arilamidasa	0,0234
Tirosina-arilamidasa	0,0276
Glicina-arilamidasa	0,012
Lipasa	0,0192
Ureasa	0,15
α -glucosidasa	0,036
α -galactosidasa	0,036
β -N-acetil-glucosaminidasa	0,0408
β -N-acetil-galactosaminidasa	0,0306
Fosfatasa	0,0504
Ornitina descarboxilasa	0,3
Lisina descarboxilasa	0,15
β -glucuronidasa	0,0378
Fuente de carbono	
Citrato	0,054
Malonato	0,15
Gluconato	0,3
Lactato	0,186
Succinato	0,15

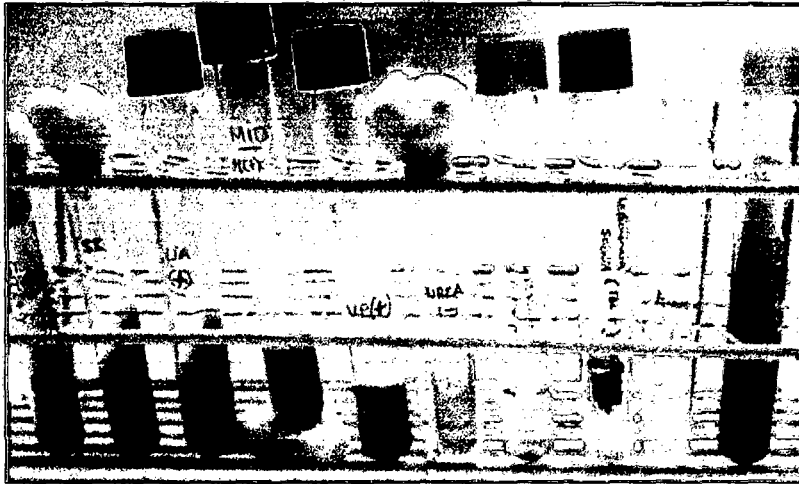


Fig. 11. Pruebas bioquímicas adicionales de la cepa bacteriana CTe-01

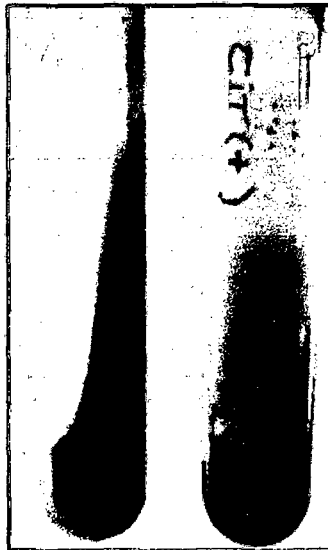


Fig. 12. Medio Citrato Simmons A: tubo sin inocular; B: Cepa CTe-01.

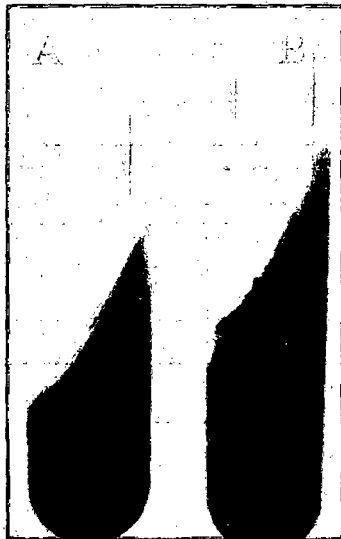


Fig. 13. Medio TSI A: tubo sin inocular; B: Cepa CTe-01.



Fig. 14. A: Test de catalasa; B: Test de oxidasa.

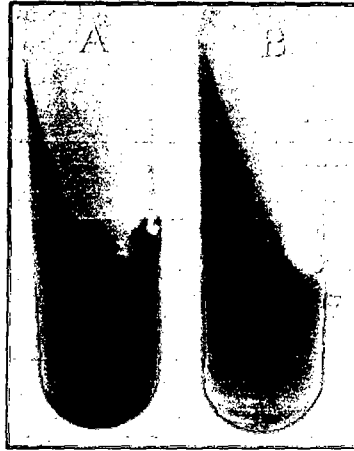


Fig. 15. Medio LIA A: Tubo sin inocular; B: Cepa CTe-01.

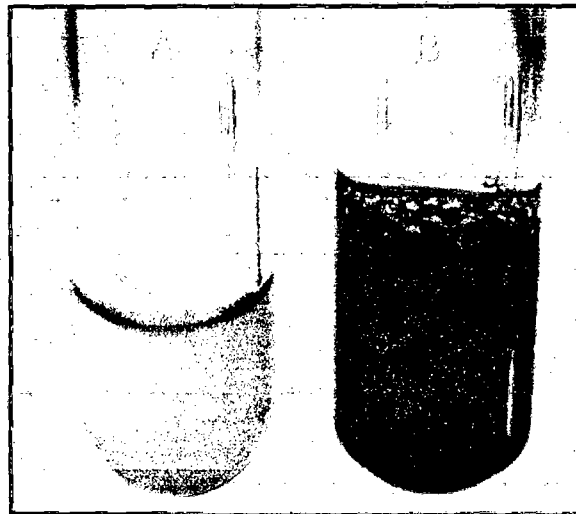


Fig. 16. Prueba Voges-Proskauer A: Caldo glucosado con cepa de 24 horas sin agregar reactivo VP; B: Cepa CTe-01 (Post agregado de reactivo VP).

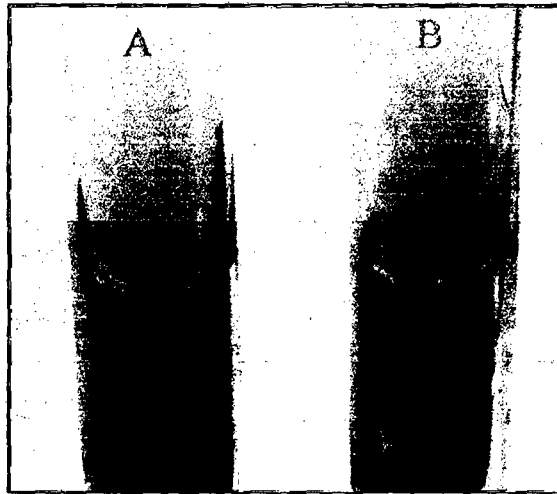


Fig. 17. Medio Urea A: Tubo sin inocular; B: Cepa CTe-01.

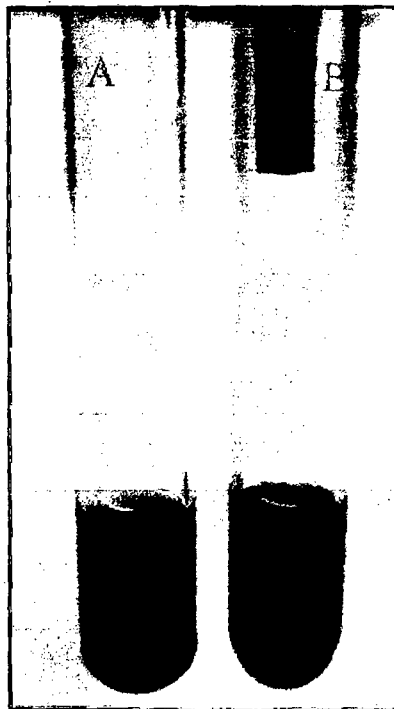


Fig. 18. Medio MIO A: Tubo sin inocular; B: Cepa CTe-01.

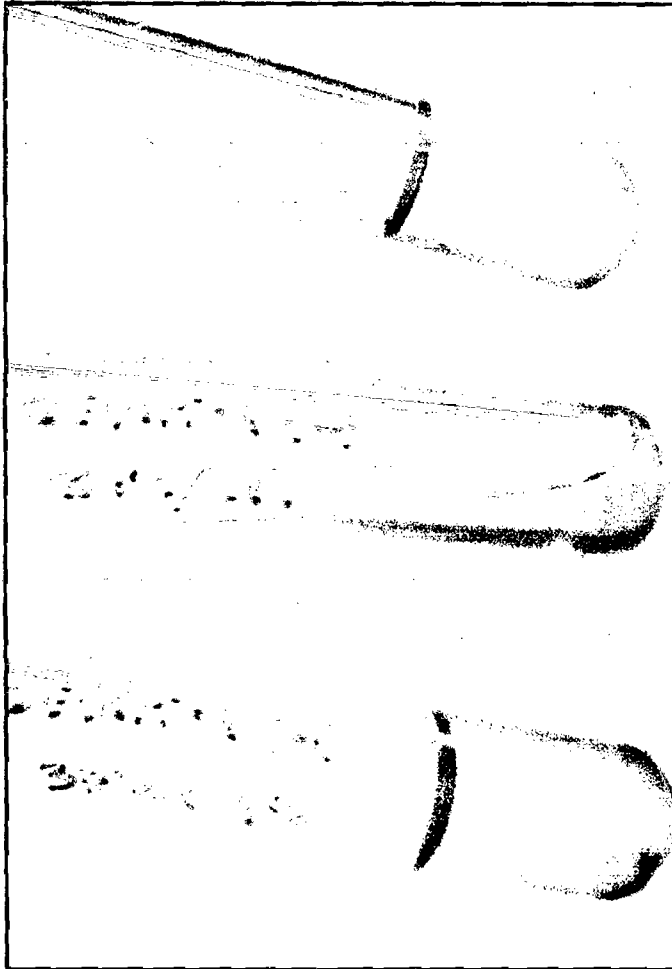


Fig. 19. Medio gelatina **A:** Tubo sin inocular licuado a 37°C y puesto luego a 4°C;
B: Cepa CTe-01 licuada a 37°C; **C:** Cepa CTe-01 puesta a 4°C por 10 min.

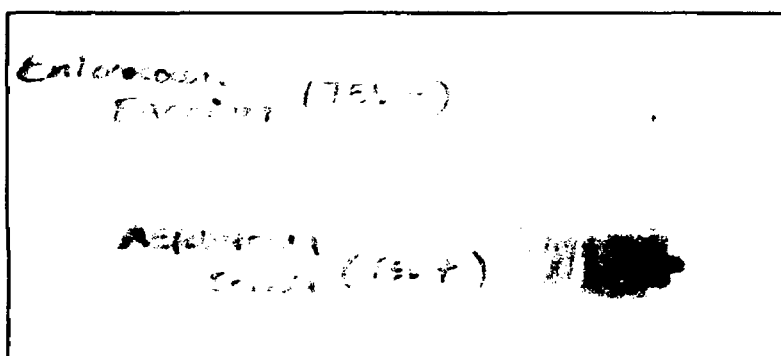


Fig. 20. Medio Telurito de potásio A: Control negativo (*Enterococcus faecium*);
B: Cepa CTe-01.

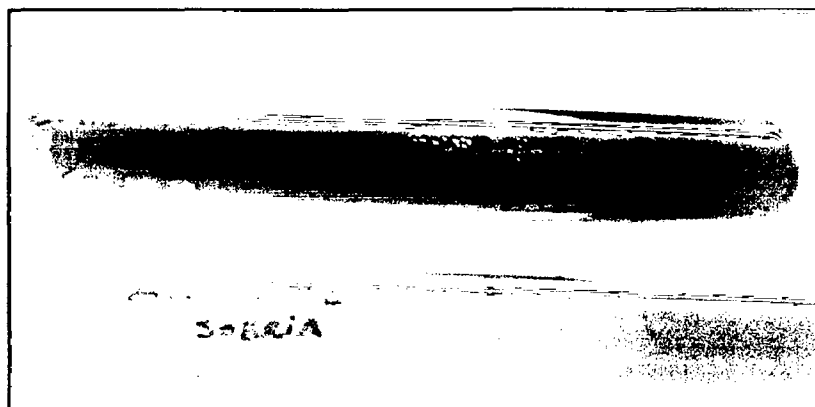


Fig. 21. Medio Bilis esculina A: Control positivo (*Enterococcus faecalis*);
B: Cepa CTe-01.

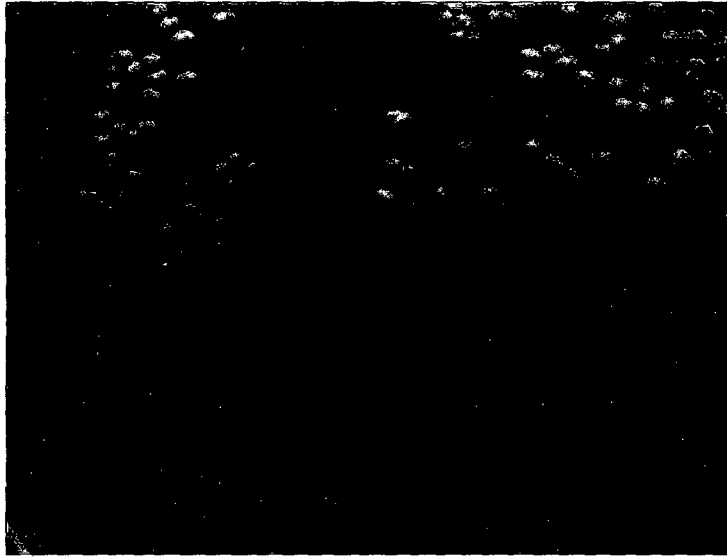


Fig. 22. Medio Agar sangre. Verificación del tipo de hemólisis de la Cepa CTe-01.

Tabla N° 14. Halos de inhibición estándares.

Agente antimicrobiano	Sigla	Potencia (mg)	Resistencia (mm)	Susceptible (mm)
Amikacina	KN	30	≤ 14	≥ 17
Ampicilina	AM	10	≤ 13	≥ 17
Amp-sulbactam	AMS	20	≤ 11	≥ 15
Cefalotina	CF	30	≤ 14	≥ 18
Cefotaxima	CTX	30	≤ 14	≥ 23
Estreptomicina	S	10	≤ 11	≥ 15
Gentamicina	GM	10	≤ 12	≥ 15
Kanamicina	KN	30	≤ 13	≥ 18
Tobramicina	DOT	30	≤ 12	≥ 15
Vancomicina	VA	30	≤ 16	≥ 17

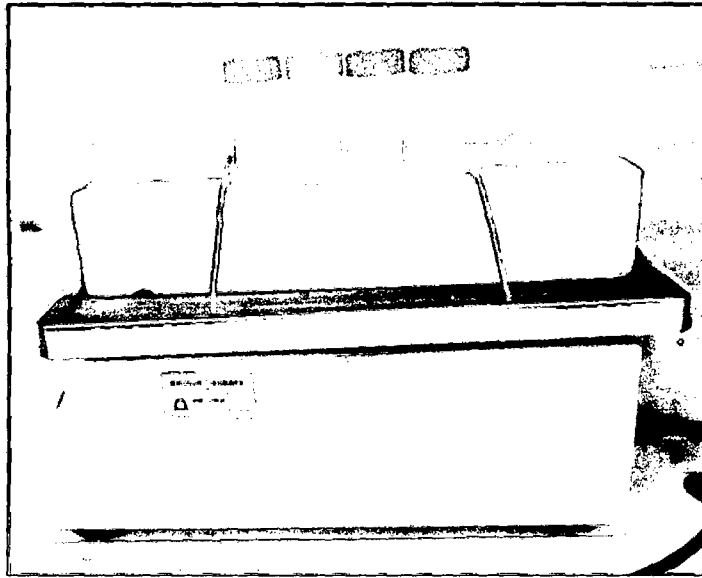


Fig. 23. Incubación y agitación de tubos para evaluar el efecto del buffer fosfato en la resistencia a telurito de potasio en medio líquido.

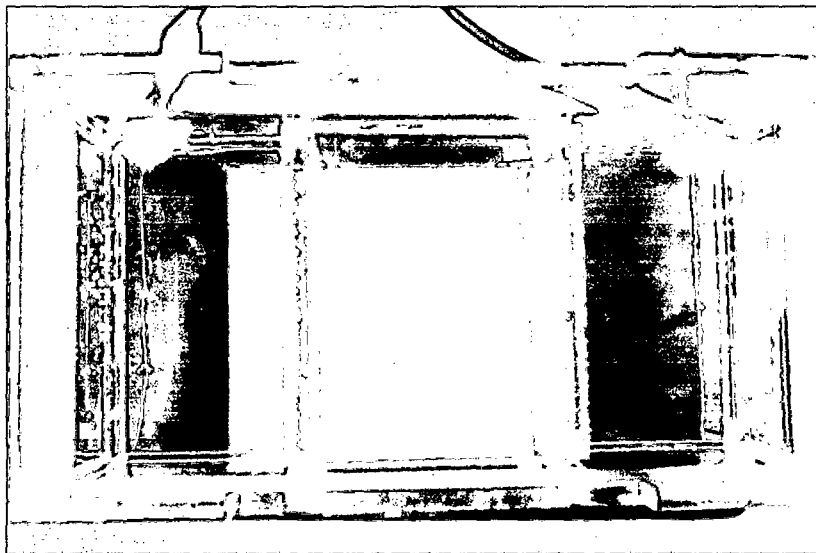


Fig. 24. Electroforesis de los productos de PRC de la cepa CTe-01 en cámara horizontal.

Fig. 27. Comparación de secuencias mediante el programa BLAST.

Fig. 28. NCBI. Base de datos disponibles en línea.

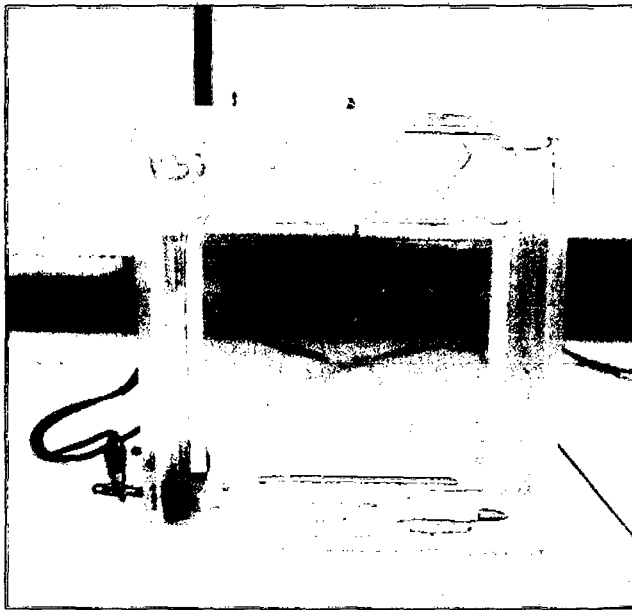


Fig. 29. Corrido electroforético de muestras para el perfil proteico de la cepa CTe-01 en cámara vertical.

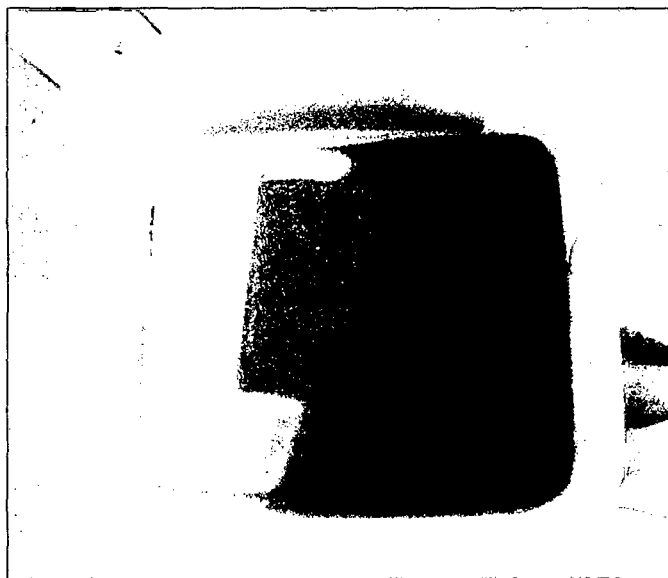


Fig. 30. Tinción del gel de poliacrilamida en colorante azul de Coomassie.

Preparación de reactivos para la extracción de plásmidos por lisis alcalina.

Solución I – Resuspensión celular

- 25 mM Buffer TRIS HCl (pH 8,0)
- 10 mM EDTA (pH 8,0)

Solución II – Lisis celular

- 0,2 N NaOH
- 1% SDS

Solución III – Neutralización celular

- 5 M acetato de potasio
- Ácido acético glacial
- H₂O