



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” DE ICA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL PLASMIDIO pCTe-01  
DE *Aeromonas veronii* CTe-01 Y SU RELACIÓN CON LA  
RESISTENCIA A METALES PESADOS Y ANTIBIOTICOS”**

**TESIS**

Para obtener el título de:

**BIÓLOGO**

**PRESENTADO POR:**

Bach. ORMEÑO VÁSQUEZ, Phillip David

ICA – PERÚ

2016

## Dedicatoria

*A Dios que con su soplo de vida me ha mantenido de pie, y me obsequio una familia maravillosa, padres extraordinarios, profesores formidables y amigos leales, gracias porque a lo largo de esta vida me pusiste en los lugares correctos en los momentos oportunos y con las personas ideales para poder alcanzar mis metas.*

*A mis estimados asesores, que cumplieron un rol crucial en mi desarrollo profesional y personal porque más que asesores son mis segundos padres y amigos en los que siempre puedo confiar, su voluntad inquebrantable y su espíritu investigador perduraran a través de mi persona y serán la flama que encienda la conciencia de nuevas generaciones .*

## Agradecimientos

*G*racias a mis padres que me dieron la vida, por que el resultado de mi persona es fruto de su constancia, trabajo, sacrificio, amor, comprensión, y son unos de los pilares que me impulsan cada a seguir adelante, gracias a ellos soy bastante fuerte para tener conciencia de mis debilidades, bastante valiente para recobrar el ánimo cuando tengo miedo, puedo aceptar la derrota honrosa y ser sencillo y generoso en la victoria, puedo reír sin olvidar como se llora y mirar el porvenir sin perder de vista el pasado. Gracias padres no han vivido en vano.

*G*racias a cada uno de mis docentes que conforman los cimientos de mi formación profesional, ladrillo a ladrillo fueron formándome y me siento orgulloso de haber sido su alumno, todas sus enseñanzas y experiencias están presentes en mi persona, porque su forma de enseñar puede proporcionar alegría a los demás, seguridad en sí mismos e iluminación.

*Gracias compañeros de promoción, compañeros de trabajo de FARVET y amigos que conocí en este largo camino aprendí mucho de ustedes, gracias especiales al Blgo. Juan Pérez que me brindo todos su sabiduría y experiencia que fueron clave en el desarrollo de este trabajo, a la Sra. Bertha que siempre me animaba y alentaba cuando titubeaba, especialmente quiero agradecerte a ti, Naysha porque estas conmigo desde siempre en las buenas y en las malas porque eres la luz que me ilumina cuando no logro ver y el ancla que me lleva a tierra cuando me elevo más de la cuenta.*

## RESUMEN

Se caracterizó el plasmidio pCTe-01 de *Aeromonas veronii* CTe-01 aislada de aguas residuales. Esta bacteria es portadora de factores de virulencia y ha mostrado resistencia a metales pesados y a antibióticos, mecanismos pobremente entendidos en este género y atribuidos a la presencia de determinantes genéticos cromosomales y plasmidiales.

Para caracterizar el plasmidio pCTe-01 se optimizó su extracción evaluando 4 métodos, además de la realización de los ensayos siguientes: perfil electroforético; determinación del peso molecular, mediante corte con las enzimas restricción *Bam*HI, *Pst*I, *Bst*NI y *Mob*I; determinación de la relación entre el plasmidio y la resistencia a metales pesados y antibióticos, mediante experimentos de conjugación bacteriana entre la cepa donadora *A. veronii* CTe-01 y la cepa receptora *E. coli* BW25113. Las características de resistencia a metales pesados se evaluaron mediante determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias y la susceptibilidad a antibióticos de diferentes grupos mediante el sistema MicroScan.

El método adecuado para la extracción del plasmidio pCTe-01 de *A. veronii* CTe-01 fue el QIAprep spin Miniprep. El perfil electroforético de pCTe-01 evidenció que se presenta como dos bandas, el peso molecular fue de aproximadamente 9.5 Kb, a juzgar por los fragmentos obtenidos mediante digestión con la enzima *Bam*HI. Se obtuvo la cepa transconjugante *E. coli* CTe-01 la cual porta el plasmidio pCTe-01. Esta cepa mostró resistencia adquirida al antibiótico cefazolina y a los metales Hg<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> y Zn<sup>+2</sup>.

Se concluye que *A. veronii* CTe-01 posee el plásmido conjugativo pCTe-01 de 9.5 kb y tiene relación con su resistencia a metales pesados y antibióticos.

**Palabras claves:** Plasmidio, resistencia, *Aeromonas veronii*.

## ABSTRACT

The pCTe-01 plasmid *Aeromonas veronii* CTe-01 isolated from wastewater was characterized. This carries bacteria virulence factors and has shown resistance to heavy metals and antibiotics, Mechanisms poorly understood in this genre and attributed to the presence of chromosomal and plasmidial genetic determinants.

Extraction of plasmid evaluating pCTe-01 through 4 methods was optimized. Its molecular characterization itself based on the implementation of the following tests: profile electrophoretic; molecular weight determination by cutting with *Bam*HI restriction enzymes, *Pst*I, *Mob*I and *Bst*NI; determination of the relationship between the plasmid and resistance heavy metals and antibiotics through experiments bacterial conjugation between the donor strain *A. veronii* CTe-01 and the recipient strain *E. coli* BW25113. Resistance characteristics one heavy metals were evaluated by determining the minimum inhibitory concentrations and antibiotics susceptibility of a different groups by MicroScan system.

The proper method for extraction of plasmid pCTe-01 of *A. veronii* CTe -01 was the call of Qiaprep spin Miniprep . The electrophoretic profile of plasmid showed that pCTe -01 is presented as a band of approximately 9.5 Kb, judging from the fragments obtained by digestion with the *Bam*HI enzyme. *E. coli* CTe-01 transconjugant strain which carries the plasmid pCTe-01 was obtained. This strain showed acquired resistance to antibiotic cefazolin and the Hg<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> y Zn<sup>+2</sup> metals.

It is concluded that *A. veronii* CTe -01 has the conjugative plasmid pCTe-01 of 9.5 kb and is related to its resistance to heavy metals and antibiotics.

**Key words:** Plasmid, resistance, *Aeromonas veronii*.

## I. INTRODUCCIÓN

*Aeromonas veronii* es un microorganismo ambiental autóctono; (bacilo gram negativo, no formador de esporas, anaerobio facultativo, oxidasa positivo, en su mayoría mesofílicos y móviles) (Janda y Abbott, 2010). Éstos pueden ser aislados de hábitats acuáticos; tales como: superficies de ríos y lagos, estuarios (Evangelista-Barreto y col., 2010), diferentes tipos de agua, entre ellas: residuales, potable (Pepe y col., 2010). Asimismo, de animales como aves y peces (Esteve y col., 2012; Nagar y col., 2013), e invertebrados hirudíneos donde participan como simbioses (Laufer y col., 2008; Nelson y Graf; 2008; Whitaker y col., 2014) o presente en alimentos (Castro-Escarpulli y col., 2003; Ghenghesh y col., 2008).

Esta bacteria está considerada como patógeno de peces (Kozinska y col., 1997; Pettibone y col., 1996; Ghenghesh y col., 2008) y recientemente como patógeno emergente de humanos (Janda y Abbott, 2010; Pepe y col., 2010). Son agentes etiológicos de varios procesos infecciosos intestinales donde desempeñan un rol importante como patógeno primario en procesos diarreicos agudos y extra-intestinales donde son capaces de producir bacteremia, septicemia, meningitis, neumonía, peritonitis, miocarditis; entre otras, que en algunas ocasiones pueden comprometer la vida en pacientes inmunodeprimidos (Castro-Escarpulli y col., 2003; Guerra y col., 2007; Kivanic y col., 2010; Bravo y col., 2011).

Desde el punto de vista epidemiológico la frecuencia de *A. veronii* proveniente de heces asociada a sintomatología diarreica se presenta mayormente en niños (Wilcox y col., 1992; Kün y col., 1997; Soler, 2003; Vila y col., 2003; Ghenghesh y col., 2008; Guevara y col., 2008) y con menor frecuencia en ancianos (Brown y col., 1997). Se

destaca la ocurrencia en Perú (58%) seguido de Australia (11%), Dibojouti (3%), India (2%) y Estados Unidos (1%) como los países con mayor número de casos donde también esta bacteria suele colonizar el tránsito intestinal de niños neonatos durante sus primeras semanas de vida (Hernandes y col., 2013; Pazzaglia y col., 1990).

Dentro de los factores de virulencia presentes en las especies de *Aeromonas* que participan en procesos infecciosos, se encuentran la producción de enterotoxinas, habilidad invasiva, adhesinas, hemolisinas y toxina similar a la shiga. Los tres últimos han sido atribuidos a la presencia de plasmidios portadores de genes de virulencia (Adams y col., 1998; Borrego y col., 1991; Brown y col., 1997; Stuber y col., 2003) y de resistencia antimicrobiana (Chang y Bolton, 1987; del Castillo y col., 2013; Gordon y col., 2008; Marti y Balcázar, 2012) o a metales pesados (Maytar y col., 2010; McIntosh y col., 2008; Moura y col., 2012; Pérez-Valdespino y col., 2013). En este sentido, las cepas de *Aeromonas* son conocidas por albergar plasmidios estables, los cuales juegan un rol importante en la virulencia, multidrogo resistencia a antimicrobianos (MDR), y resistencia a metales pesados, mecanismos que en las especies de éste género están pobremente entendidos (Majumdar y col., 2007).

El desarrollo en la Biología Molecular ha hecho posible crear técnicas para estudiar y caracterizar a los seres vivos desde su composición molecular más básica, el ADN. Los plasmidios son elementos extracromosomales de ADN circular o lineal presentes en células procariotas (bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas) o eucariotas cuyo tamaño puede oscilar entre 300 pb a 2400 kpb. La diversidad de plasmidios, tanto en tamaño como en número de copias y carácter genético (Triehs, 2004) ha demostrado ser uno de los mejores logros en un ambiente celular debido a que la adición de plasmidios en una célula podría ser una de las

mayores ventajas para que ésta sobreviva en un ambiente particular o adaptarse a uno nuevo (Kado, 1998; Novick 1969). Los métodos de caracterización, tanto para las bacterias como para los plasmidios, se clasifican en dos grandes grupos: fenotípicos (basados en características fisiológicas o bioquímicas) y genotípicos (basados en el estudio del ADN) (Narváez y col., 2005), donde se hace necesaria la búsqueda de métodos de extracción de ADN que permitan obtener concentraciones óptimas de plasmidios para poder realizar una adecuada caracterización, los cuales dependerán de la naturaleza de la bacteria, el tamaño y número de copias del plasmidio (Birnboim y Doly 1979; Kado y Liu, 1981; Coll y col., 2005).

*A. veronii* CTe-01 es una cepa procedente de la laguna de oxidación de Cachiche, donde es realizado el tratamiento de aguas residuales, la cual fue aislada en base a su alto nivel resistencia al  $K_2TeO_3$  y la presencia de un plasmidio de posible bajo número de copias fue detectado (Espinoza, 2015). Por lo cual, el desarrollo de métodos que permitan la obtención de cantidades óptimas de ADN plasmídico para esta bacteria son necesarios para su caracterización.

El hábitat del cual fue aislada *A. veronii* CTe-01 es un buen ejemplo de un punto clave potencial para transferencia horizontal génica entre bacterias (Moura y col., 2007; Moura y col., 2010; Moura y col., 2011; Moura y col., 2012), considerando que las plantas de tratamiento de aguas residuales reciben desechos de fuentes urbanas y rurales como hospitales e industrias, es posible que éstas condiciones contribuyan a la rápida extensión de plasmidios con determinantes de resistencia a metales pesados y antibióticos (Drögue y col., 2000; Bahl y col., 2009) o de virulencia (Borrego y col., 1991; Stuber y col., 2003; Majundar y col., 2007), emergiendo así patógenos humanos multirresistentes, pudiendo causar serios problemas a la salud, por otra parte se ha

propuesto el uso de plasmidios conjugativos de resistencia a metales pesados como alternativa a un nuevo concepto de biorremediación in situ con microorganismos no patógenos adaptados a ambientes contaminados (Endo y col., 2002).

En el presente estudio se planteó determinar las características moleculares del plasmidio pCTe-01 de *Aeromonas veronii* CTe-01 y su relación con la resistencia a metales pesados y antibióticos.

## II. ANTECEDENTES

**Chang y Bolton (1987)** analizaron la resistencia a agentes antimicrobianos 75 aislados clínicos de *Aeromonas spp.* dentro de las cuales *A. sobria* presentó un plasmidio conjugativo de 110 MDa que le confirió resistencia a ampicilina, kanamicina, estreptomicina, espectinomicina, sulfisoxazol, ticarcilina, tobramicina y timetropin. Este plasmidio fue transferible a *Escherichia coli*, *A. hydrophila* y *Salmonella typhimurium* a través de experimentos de conjugación.

**Borrego y col. (1991)**, asociaron la resistencia a tobramicina, neomicina, gentamicina y kanamicina a la presencia de plasmidios en *A. hydrophila*, aislada de peces, mariscos y agua, mediante experimentos de curado de plasmidios con naranja de acridina.

**Pettibone y col. (1996)**, demostraron que no hay relación existente entre plasmidios de pequeño peso molecular (1.5 – 12 Kb) de *Aeromonas*, procedentes de diferentes órganos del pez *Ictalurus nebulosus*, habitante natural del río Buffalo en Estados Unidos y su múltiple resistencia a antibióticos (rifampicina, novobiocina y vancomicina) y metales pesados (cromo, cadmio, níquel, mercurio, zinc, cobalto y plomo).

**Adams y col. (1998)** demostraron mediante el uso de conjugación, que el fenotipo de resistencia a oxitetraciclina, llevado en un plasmidio conjugativo de alto peso molecular de *A. salmonicida*, puede ser transmitido a *E. coli* y a otros aislados clínicos y ambientales de *Aeromonas spp.*

**Cattoir y col. (2008)**, investigaron la presencia de determinantes de resistencia a quinolonas en muestras de agua donde encontraron a *A. punctata* y *A. media* como portadores de un plasmidio conjugativo transferible a *E. coli* mediante electrotransformación.

**McIntosh y col. (2008)**, determinaron que la múltiple resistencia a antibióticos y mercurio de *A. salmonicida* residía en un plasmidio conjugativo y que era transferible vía conjugación usando *E. coli*, *A. hydrophila* y *Edwardesiella tarda* como células recipientes.

**Picão y col. (2008)**, determinaron mediante electrotransformación en *E. coli*. que la resistencia a quinolonas en *A. allosaccharophila*, procedente de un lago suizo, es conferida por un cassette génico móvil perteneciente a un plasmidio de amplio rango de huéspedes.

**Reith y col. (2008)**, caracterizaron mediante secuenciación un megaplasmidio presente en *A. salmonicida*, el cual le confería resistencia a estreptomicina, espectinomomicina, compuestos de amonio cuaternario, sulfonamidas, cloranfenicol y mercurio.

**Marti y Balcázar (2012)**, secuenciaron el plásmido de un aislado ambiental de *Aeromonas* y demostraron su relación con la resistencia a quinolonas, aminoglicósidos, cloranfenicol, macrólidos, compuestos de amonio cuaternarios, rifampicina y sulfonamidas, mediante transformación en *E. coli*.

**Vincent y col. (2014)**, secuenciaron 19 plasmidios procedentes de *A. salmonicida* donde demostraron la presencia de determinantes de resistencia a antibióticos como tetraciclina, florfenicol, cloranfenicol, estreptomicina, espectinomomicina, compuestos de amonio cuaternario antibióticos betalactámicos y mercurio en un plasmidio de 152 kb.

**Espinoza (2015)**, caracterizó la bacteria *A. veronii* CTe-01 procedente de aguas residuales y resistente al telurito de potasio, donde determinó sus características morfológicas, bioquímicas, moleculares y aspectos involucrados a la resistencia de la bacteria con respecto al metal en donde halló el plasmidio pCTe-01.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material Biológico

##### 3.1.1. Cepas bacterianas

- La cepa bacteriana *Aeromonas veronii* CTe-01 fue aislada de la laguna de oxidación de Cachiche-Ica 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 *Escherichia coli* BW25113 pertenece al cepario del laboratorio antes citado y fue utilizada como receptora para los experimentos de conjugación.

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Reactivación de las cepas bacterianas

Las cepas *A. veronii* CTe-01 y *E. coli* BW25113 fueron conservadas en medio Luria Bertani (L.B.) con 30 % de glicerol estéril a -20 °C. Estas se reactivaron inoculando 10 µL de la cepa en 1 mL de caldo L.B., el cual se incubó a 37 °C por 24 h (ver anexos Fig. 07). Luego del crecimiento, una asada de esta suspensión se sembró por estría y agotamiento en agar sangre suplementado con ampicilina (100 µg/mL).

En el caso de *E. coli* BW25113, una asada de esta suspensión se sembró por estría y agotamiento en placas con agar TBX.

Ambas se incubaron a 37 °C por 24 h (ver anexos Fig. 08).

### 3.2.2. Estandarización del protocolo de extracción de ADN plasmidial:

Con la finalidad de obtener ADN plasmidial de buena calidad y en cantidad suficiente se ensayaron los siguientes métodos:

#### a. Método de Birnboim y Doly

*A. veronii* CTe-01 fue cultivada en 10 mL de caldo L.B. a 37 °C durante 18 h con agitación moderada, luego las células fueron centrifugadas 10 min a 6000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular ("pellet") en 200 µL de solución I transfiriéndose a un tubo Eppendorf nuevo. Para lisar las células se añadió 400 µL de solución II mezclando por inversión, luego se incubó 5 min a temperatura de ambiente, el homogenizado se neutralizó añadiéndole 300 µL de solución III, se mezcló por inversión y se incubó 3 min en hielo, el líquido fue centrifugado 5-10 min a 14 000 rpm y 600 µL del sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Para separar el ADN plasmidial de proteínas se adicionó un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1), se agitó en vórtex por 3 s y el tubo se centrifugó 15 min a 14 000 rpm, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, donde se añadió 600 µL de isopropanol, mezcló 5 s con vórtex y se dejó a temperatura de ambiente durante 2 min. El ADN plasmidial fue centrifugado 15 min a 14 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue secado 10 min a temperatura de ambiente invirtiendo el tubo sobre papel secante. Posteriormente, el "pellet" de plasmidios se lavó con etanol de 70 % y se eliminó el sobrenadante de la misma forma que en el punto anterior. Finalmente, el "pellet" fue

resuspendido en 30-50  $\mu$ L de buffer TE y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ver anexos Fig. 09).

#### **b. Método de Kado y Liu**

*A. veronii* CTe-01 fue cultivada en 10 mL de caldo L.B. a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 18 h con agitación moderada, las células fueron centrifugadas 10 min a 6000 rpm, se descartó el sobrenadante y el “pellet” fue resuspendido con 100  $\mu$ L solución I, las células fueron lisadas añadiendo 100  $\mu$ L de solución II y se mezcló por inversión, luego se llevó a incubar a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 35 min, el ADN se extrajo añadiendo 200  $\mu$ L de una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1) y se mezcló agitando 5 s con vórtex o por inversión en forma homogénea. Después las distintas fases se separaron por centrifugación 15 min a 14 000 rpm, la fase acuosa superior (100-150  $\mu$ L) fue transferida a un tubo Eppendorf limpio, el ADN plasmidial fue centrifugado 15 min a 14 000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue secado 10 min a temperatura de ambiente invirtiendo el tubo sobre papel secante. Posteriormente, el “pellet” de plasmidios se lavó con etanol de 75 %, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el “pellet” como se describió anteriormente. Luego, éste se disolvió en 100  $\mu$ L de agua bidestilada estéril (ver anexos Fig. 10).

### **c. Método de termólisis alcalina**

Se inició con un inóculo de una porción de una colonia de *A. veronii* CTe-01, aislada en medio selectivo, en 10 mL de caldo L.B. con ampicilina 100 µg/mL, se incubó a 37 °C durante 15 h hasta obtener una densidad óptica de 0,7-0,8 a 550 nm, el contenido fue recolectado en un tubo falcon y se centrifugó a 6000 rpm por 5 min. El paquete celular se resuspendió homogéneamente en 2,5 mL de buffer TE estéril, se centrifugó nuevamente a 6000 rpm por 5 min y el "pellet" se resuspendió en 200 µL de solución I y se incubó a 37 °C por 5 min. Se transfirió el volumen a 2 tubos de 1,5 mL. (100 µL c/u), se adicionó 200 µL de buffer de lisis se mezcló por inversión y se calentó a 65 °C por 20 min, luego se añadió al lisado un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. Se mezcló en vórtex por 2 min y se centrifugó durante 15 min a 14 000 rpm, la fase acuosa (200 µL aproximadamente) de los dos tubos fue colectada en un tubo Eppendorf y se agregó un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), luego se mezcló y centrifugó por 15 min a 14 000 rpm. La fase acuosa se retiró con cuidado, se colocó en un tubo nuevo y precipitó con 1 volumen de acetato de sodio 3M incubándose en hielo por 15 min. La mezcla fue centrifugada por 15 min a 14 000 rpm, el "pellet" de plasmidios fue lavado con 200 µL de etanol al 75 % y secado 10 min a temperatura de ambiente invirtiendo el tubo sobre papel secante, finalmente el "pellet" se disolvió en 50 µL de Buffer TE.

#### **d. Método comercial QIAprep spin Miniprep**

*A. veronii* CTe-01 fue inoculada 50 µL de cepa en 5 mL de caldo L.B., se incubó a 37 °C durante 12 h. El cultivo se centrifugó a 8000 rpm durante 3 min, el “pellet” se resuspendió totalmente en 250 µL de buffer P1, se agregó 250 µL de buffer P2 y se mezcló suavemente invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces, luego se añadió 350 µL de buffer N3 y se mezcló inmediatamente por inversión, el homogenizado fue centrifugado durante 10 min a 13 000 rpm en una microcentrífuga. Se vertió 800 µL de sobrenadante a la columna QIAprep 2.0, luego se centrifugó durante 30 a 60 s y descartó el fluido excedente, la columna se lavó con 0,75 mL de buffer PE y centrifugó durante 30 a 60 s a 13 000 rpm, se descartó el fluido excedente y centrifugó a velocidad máxima por un min adicional para eliminar el buffer de lavado residual. Finalmente, se colocó una columna QIAprep 2.0 en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Para eluir el ADN se añadió 50 µL de buffer EB al centro de cada columna QIAprep 2.0, se dejó por 1 min y se centrifugó a 13 000 rpm por 1 min. El ADN fue conservado a 4 °C (ver anexos Fig. 11).

#### **3.2.2.1 Verificación de la extracción del plasmidio pCTe-01 en *A. veronii* Cte-01**

##### **a. Electroforesis en geles de agarosa**

Los productos de la extracción de plasmidios obtenidos por los métodos ensayados se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % preparado en buffer TAE al que se incluyó el agente fluorescente SYBR Safe DNA gel Stain 1000X (Thermo Fisher

Scientific) hasta una concentración final de 1X. Se cargaron en los pocillos del gel, 4 µL de los marcadores de peso molecular 1kb, Plus ADN ladder (Thermo Fisher Scientific), Lambda/*Hind*III (Thermo Fisher Scientific) y/o Supercoiled DNA ladder (Biolabs Englands). Por otro lado, 5 µL de los productos de digestión se mezclaron con 2 µL de tampón de carga.

La electroforesis se realizó a 50 V durante 50 min en una cámara de electroforesis horizontal. Para visualizar las bandas de ADN, el gel se expuso a la luz U.V. en un transiluminador (ver anexos Fig. 12).

### **3.2.3. Caracterización molecular del plasmidio pCte-01:**

#### **3.2.3.1. Determinación del perfil plasmídico y del peso molecular del plasmidio pCte-01**

##### **a. Elaboración del perfil plasmídico**

Para estimar el peso del plasmidio los productos de la extracción obtenidos con el método comercial QIAprep spin minicolumn se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % usando los marcadores Supercoiled DNA ladder (Biolabs Englands) y 1kb, Plus ADN ladder (Thermo Fisher Scientific) tal como se describió anteriormente.

##### **b. Digestión con endonucleasas de restricción**

El ADN plasmídico fue digerido con las enzimas restricción *Bam*HI (G↓GATCC), *Pst*I (CTGCA↓G), *Bst*1770I (GTA↓TAC) y *Mbo*I 5' (↓GATC) (Moura y col., 2012). La digestión con las

diferentes enzimas de restricción se efectuó empleando los buffers y temperaturas recomendadas por el fabricante (New England Biolabs). Se adicionaron los siguientes componentes de la reacción bajo condiciones de esterilidad en un tubo de 200  $\mu$ L.

**Tabla 01.** Componentes de la reacción para la digestión del plasmidio pCTe-01 de *A. veronii* CTe-01 con enzimas de restricción.

Reactivos	Concentración	Volumen ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O milliQ	-	7
Buffer de reacción	10X	2
Enzima	5 U/ $\mu$ L	1
ADN Plasmidial	0,1 $\mu$ g/ $\mu$ L	10
<b>Volumen total</b>		<b>20 <math>\mu</math>L</b>

### c. Calculo del peso molecular del plasmidio pCTe-01

Para calcular el peso molecular del plasmidio pCTe-01 los productos de la digestión se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % usando 1 kb, Plus ADN ladder (Thermo Fisher Scientific) tal como se describió anteriormente, la sumatoria de los fragmentos de las enzimas que rindieron bandas definidas y separadas fueron tomados en cuenta para la determinación del peso molecular (Gowland, 1994).

### **3.2.4. Determinación de la relación entre el plasmidio y la resistencia a antibióticos y metales pesados**

Para determinar la relación entre el plasmidio pCTe-01 y los fenotipos de resistencia de *A. veronii* CTe-01 se desarrollaron ensayos de transferencia del plasmidio mediada por contacto celular denominado “conjugación bacteriana”. Se determinaron los agentes de selección en base a los perfiles de resistencia tanto de la cepa en estudio (donadora) como la cepa *E. coli* BW25113 (receptora).

#### **3.2.3.1. Determinación de los agentes de selección para la conjugación bacteriana**

Para determinar los agentes de selección durante la conjugación bacteriana se tomaron en cuenta los perfiles de resistencia a metales pesados y antibióticos expresados en concentración mínima inhibitoria (MIC).

##### **a. 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. Se ensayaron los siguientes metales pesados: Cr, Ag, Hg, Ni, Co, Cu, Zn, Cd, Te. Estos fueron usados como sales de:  $K_2CrO_4$  (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  $\mu\text{g/mL}$ );  $CoCl_2$  (0-400  $\mu\text{g/mL}$ );  $CuSO_4$  (0-600  $\mu\text{g/mL}$ );  $ZnSO_4$  (0-300  $\mu\text{g/mL}$ ) ;  $CdCl_2$  (0-100  $\mu\text{g/mL}$ ) y  $K_2TeO_3$  (0-200  $\mu\text{g/mL}$ ).

El ensayo se realizó en tubos de vidrio, con 2 mL de caldo L.B., suplementado con suficiente volumen de solución stock para alcanzar las concentraciones de los metales pesados. Se inoculó 40 µL de la cepa bacteriana crecido en 2 mL de caldo L.B. a 37 °C por 24 h. Los tubos se incubaron en agitación (150 rpm) a 37 °C por 24 h. Los ensayos fueron realizados por triplicado (Espinoza, 2015), *A. veronii* CTe-01 fue considerada resistente si fue capaz de crecer a 10 µg/mL ( $Hg^{+2}$ ), 100 µg/mL ( $Cd^{+2}$  y  $Cr^{+2}$ ) y 600 µg/mL ( $Cu^{+2}$ ) (Miranda y Castillo, 1998) para los metales restantes ( $Ag$ ,  $Ni^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Te^{+6}$ ), fue considerada resistente si fue capaz de exceder el valor MIC del organismo control *E. coli* BW25113 como lo describió Maytar y col. (2010) y Akimbowale y col. (2007) (ver anexos Fig.19).

**b. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitoria (MIC) de antibióticos**

La susceptibilidad y concentración mínima inhibitoria (MIC) de antibióticos fueron determinados utilizando el Sistema automatizado MicroScan, teniendo en cuenta los puntos de corte recomendados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Se utilizaron los paneles N° 34 y 50 los cuales fueron extraídos asepticamente de sus envases y temperados antes de ser rehidratados (ver anexos Fig. 15).

Para la preparación del inóculo, con un asa bacteriológica estéril se tomó de 4 a 5 colonias grandes bien aisladas y morfológicamente

similares, de un cultivo de 18 – 24 h en placas de Agar Nutritivo, las cuales fueron emulsionadas en 3 mL de agua para inóculo (agua desionizada en autoclave). La turbidez final fue 0,9 utilizando el turbidímetro de MicroScan. Para rehidratar los paneles se inoculó 100  $\mu$ L de la suspensión estandarizada en 25 mL de agua para inóculo con PLURONIC, se invirtió 10 veces para homogeneizar y luego fue vertida a inoculadores de plástico y distribuida uniformemente. Con ayuda de una micropipeta multicanal  $115 \pm 10$   $\mu$ L de inóculo fue depositado en todos los pocillos y se dejó reposar por 5 min (ver anexos Fig. 14). Los paneles fueron incubados en el sistema automatizado WalkWay que suministró los reactivos para las pruebas bioquímicas y brindó las condiciones necesarias de temperatura (35°C) y tiempo (16-20h) (ver anexos Fig. 13). La lectura fue realizada por el sistema automatizado Walkaway y corroborada visualmente (ver anexos Fig. 14).

### **3.2.3.2 Prueba de conjugación bacteriana**

Para el diseño del experimento fueron tomados en cuenta dos agentes de selección (sal de metal / antibiótico) que favorecieron el aislamiento de colonias de la cepa *E. coli* BW25113 portadoras del plasmidio pCTe-01 (transconjugantes).

Para esta prueba se utilizó la cepa *A. veronii* Cte-01 como donadora del plasmidio pCte-01, cuyo perfil dio resistencia a los antibióticos: cefazolina, vancomicina, eritromicina y a las sales de metales pesados:  $K_2TeO_3$ ,  $HgCl_2$  y  $AgNO_3$ . Como cepa receptora se

utilizó la cepa *E. coli* BW25113 libre de plasmidio, con resistencia cromosómica a rifampicina. El protocolo seguido fue una adaptación del método de Moura y col. (2012) cuyas variantes se describen a continuación:

Cultivos líquidos de ambas cepas fueron preparados separadamente en 10 mL de caldo L.B. y cultivados 12 h con agitación a 37 °C, la cepa receptora y donadora fueron mezcladas en un ratio (1:1) y centrifugadas por 5 min a 6000 rpm para precipitar las células, los sobrenadantes fueron descartados y remplazados por 1 mL fresco de caldo L.B., la mezcla fue incubada a 28 °C durante 12 h sin agitación. Luego, las células fueron precipitadas por centrifugación a 6000 rpm durante 5 min y lavadas con solución salina fisiológica, después se prepararon diluciones seriadas con solución salina fisiológica y se sembraron alícuotas de 100 µL por superficie en Agar BPLS suplementado con rifampicina (50 µg/mL) y HgCl<sub>2</sub> (10 µg/mL) e incubadas a 37 °C durante 72 h. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

#### **a. Caracterización fenotípica de transconjugantes**

Para la selección de las posibles colonias transconjugantes se tomaron en cuenta las colonias pequeñas convexas rojas de borde liso y fueron descartadas las colonias mutantes resistentes amarillas. Cada colonia transconjugante fue purificada en agar BPLS suplementado con HgCl<sub>2</sub> (10 µg/mL) e incubada a 37 °C durante 24 a 48 h. La cepa seleccionada fue evaluada para determinar su resistencia a metales pesados y

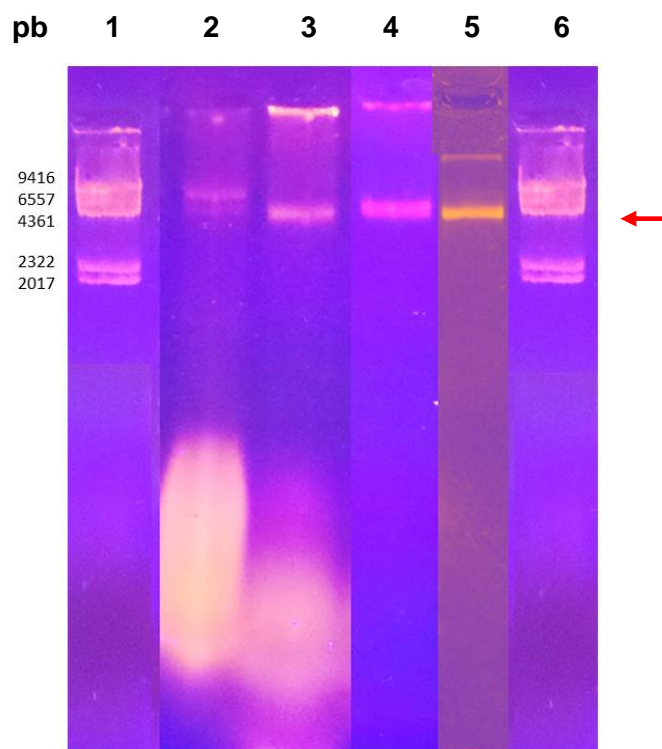
antibióticos mediante pruebas de concentración mínima inhibitoria (MIC) tal como se detalló anteriormente (Ver 3.2.4.1.).

#### **b. Caracterización genotípica de transconjugantes**

Para la caracterización genotípica de los transconjugantes se determinó la presencia del plasmidio en las cepas transconjugantes mediante la elaboración del perfil plasmídico incluyendo corte con enzimas de restricción. Para la extracción de ADN plasmidial se utilizó el kit QIAprep spin miniprep Kit (QIAGEN) desarrollando de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Ver 3.2.2.d.), posteriormente el ADN plasmídico fue digerido con la enzima restricción *Bam*HI (G↓GATCC) (Ver 3.2.3.2.b.) y los productos de la digestión se evaluaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Ver 3.2.3.1.a.). Se empleó como referencia la digestión del plasmidio pCTe-01 extraído de *A. veronii* CTe-01.

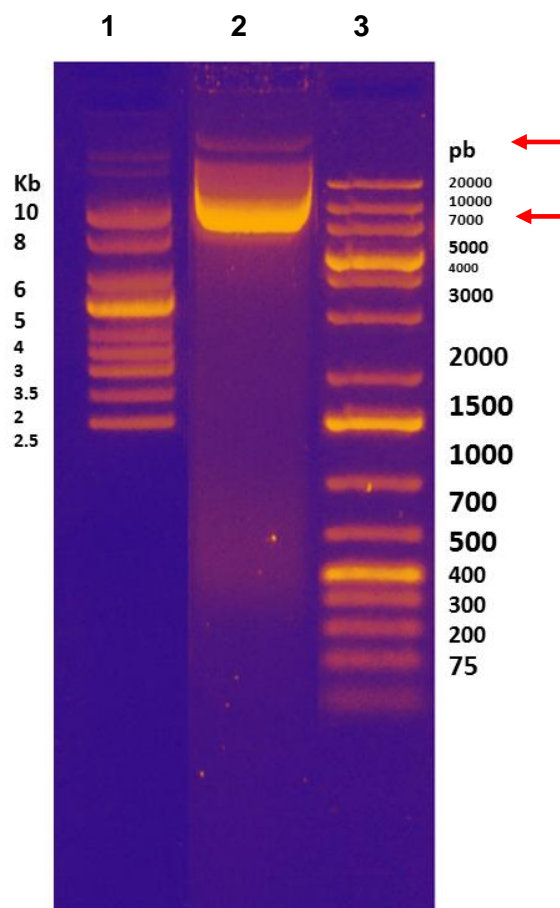
## **IV. RESULTADOS**

La obtención del plasmidio pCTe-01 se realizó mediante la aplicación de cuatro métodos (Fig. 01). El método de Birnboim y Doly, permitió observar al plasmidio pCTe-01 como una banda tenue que migró entre las bandas de 9416 y 6557 pb de bases del marcador de peso Lambda/ *Hind*III (indicado con una flecha), con presencia de ADN cromosomal, en la parte superior y abundante ARN, en la porción inferior del gel. El método de Kado y Liu, permitió observar al plasmidio pCTe-01 como una banda más intensa, con presencia de ADN cromosomal y ARN. El método de termólisis alcalina permitió obtener el plasmidio pCTe-01 con presencia de ADN cromosómico pero con ausencia de ARN. El método comercial QIAprep spin Miniprep permitió obtener una banda de buena calidad libre de ADN cromosomal y ARN.



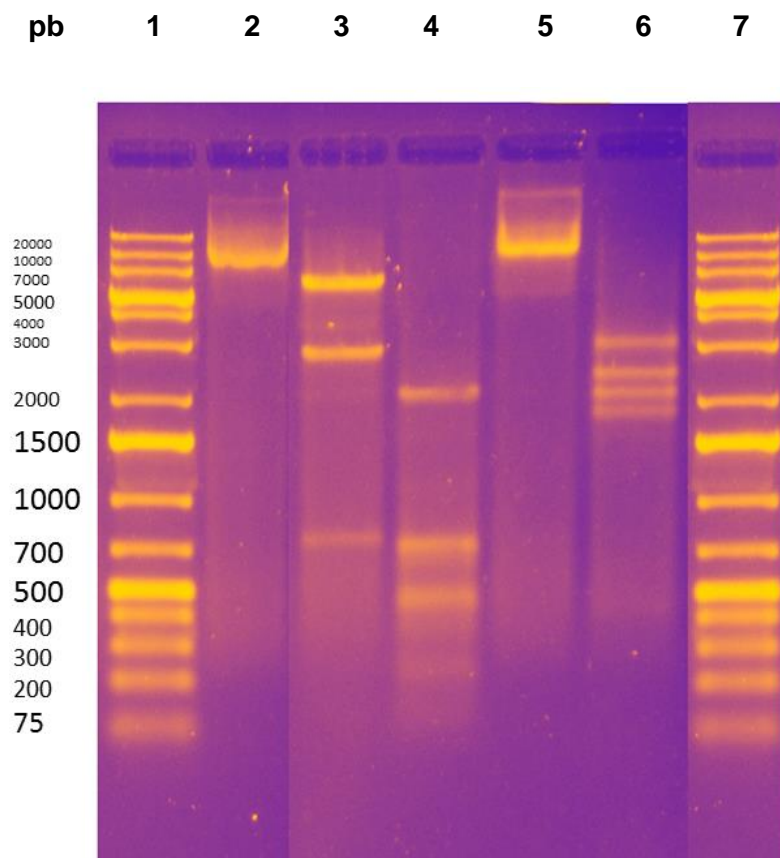
**Fig. 01.** ADN plasmidial pCTe-01 de la cepa CTe-01 extraída mediante diferentes métodos convencionales: Carriles 1 y 6, ADN estándar (lambda/*Hind*III); 2, Método de Birnboim y Doly; 3, Método de Kado y Liu; 4, Método de termólisis alcalina; 5 Método QIAprep spin Miniprep.

El perfil electroforético del plasmidio pCTe-01 de *A. veronii* obtenido por el método comercial QIAprep spin Miniprep se observó como dos bandas, una intensa que corresponde a la forma súper enrollada y una banda de tamaño superior que corresponde a la forma relajada, con presencia de ADN cromosómico y ARN ausente (Fig. 02). La forma súper enrollada del plasmidio migró entre las bandas de 7000 y 10000 pb del marcador de 1kb, Plus ADN ladder (Thermo Fisher Scientific) y entre las bandas de 8 y 10 kb del marcador Supercoiled DNA ladder (Biolabs Englands), mientras que la forma relajada mostró una banda tenue que superó los 20000 pb del marcador de 1kb, Plus ADN ladder (Thermo Fisher Scientific).



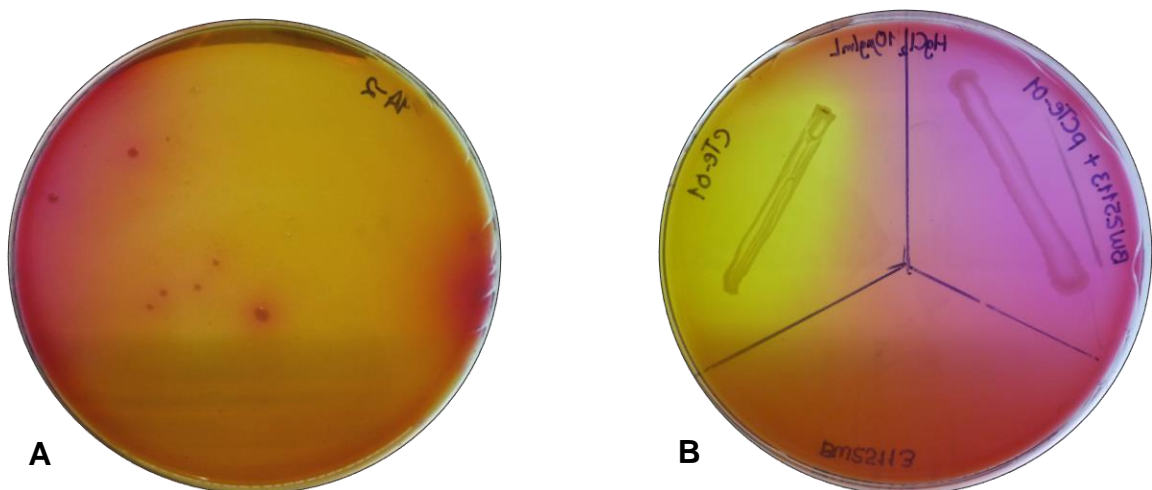
**Fig. 02.** Perfil electroforético del plasmidio pCTe-01 de *A. veronii* CTe-01 en gel de agarosa al 1,5%. Carriles 1, ADN Standard (Supercoiled DNA ladder); 2, ADN plasmidial; 3, ADN Standard (1kb plus ladder).

La estimación del tamaño del plasmidio pCTe-01 se realizó mediante digestiones con enzimas de restricción. El producto de digestión con la enzima *Bam*HI brindó 3 bandas definidas de 6000, 3000 y 700 pb, las cuales suman 9700 pb. La digestión con *Bs*TN generó bandas difusas de aproximadamente 2000, 700, 500, 300, 200 y bandas inferiores poco definidas. La enzima *Mbol* no digirió el plasmidio y la enzima *Pst*I generó cuatro bandas definidas de aproximadamente 3000, 2000, 1800 y 2500 pb, las cuales suman 9300 pb (Fig. 03). El tamaño final del plasmidio pCTe-01 fue de 9500 pb obtenido por el promedio de las sumatorias de los fragmentos obtenidos por las enzimas *Bam*HI y *Pst*I.



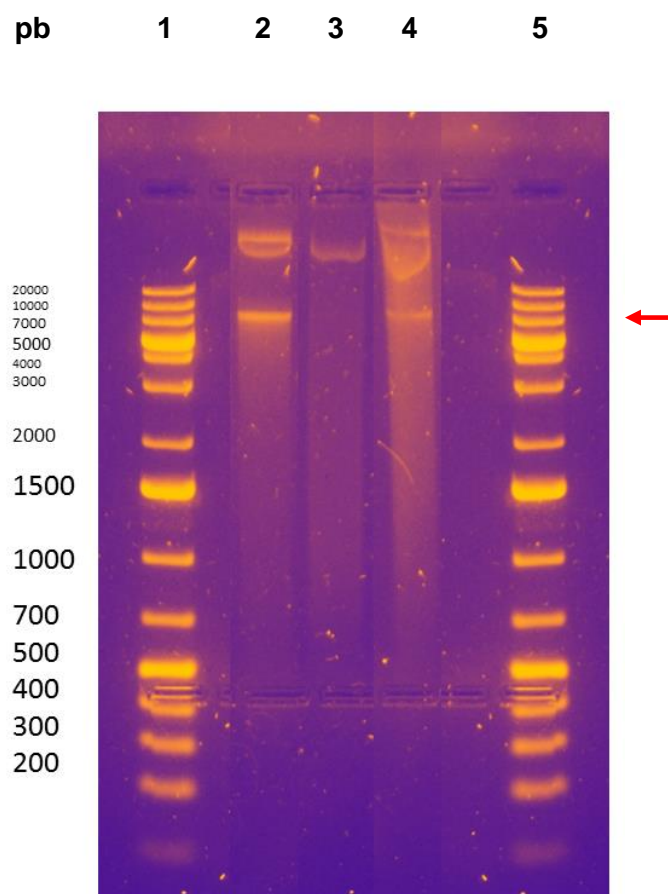
**Fig. 03.** Electroforesis en gel de agarosa de los patrones de restricción de pCTe-01. Carriles: 1 y 7 ADN Standard (1 kb plus); 2. pCTe-01 sin digerir; 3. pCTe-01 digerido con *Bam*HI; 4. pCTe-01 digerido con *Bs*TN; 5. pCTe-01 digerido con *Mbol* y 6. pCTe-01 digerido con *Pst*I.

Las colonias transconjugantes denominadas *E. coli* CTe-01 se aislaron en agar verde brillante lactosa sacarosa rojo de fenol (BPLS) con doble agente de selección. Estas formaron colonias rojas debido a su incapacidad de utilizar lactosa y sacarosa como fuente de carbono, la cepa de *A. veronii* CTe-01 (donadora) no creció por su sensibilidad a Rifampicina y la cepa *E. coli* BW25113 fue inhibida por la presencia de  $\text{HgCl}_2$  en el medio. Sólo la cepas donadora y la transconjugante fueron capaces de crecer en el medio suplementado con (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{HgCl}_2$ ) mostrando fenotipos diferentes (Fig. 04).



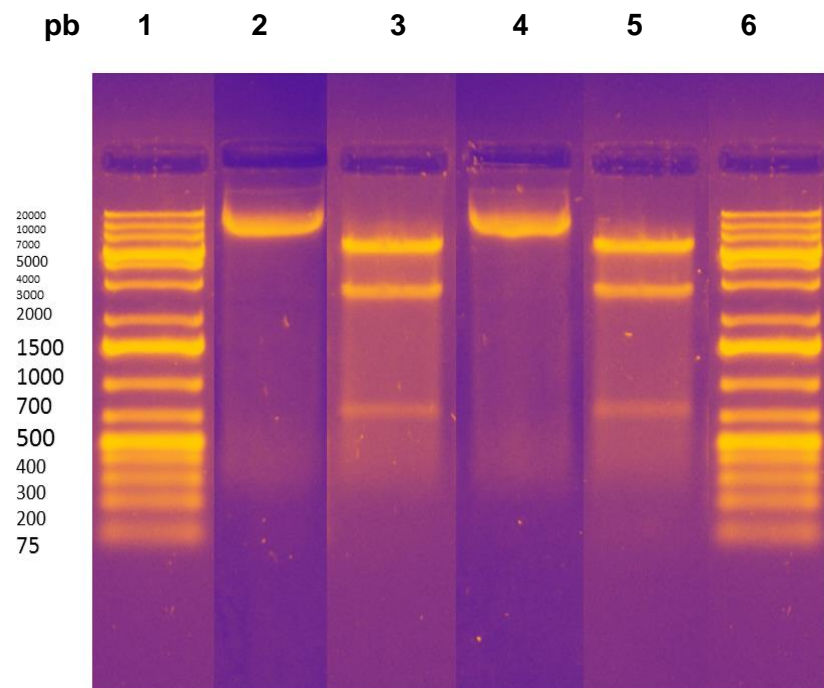
**Fig. 04.** Características fenotípicas de transconjugantes: A. colonias transconjugantes con 72 h de crecimiento en agar BPLS suplementado con rifampicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y  $\text{HgCl}_2$  (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); B. Agar BPLS suplementado con  $\text{HgCl}_2$  (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): *A. veronii* Cte-01 (donador) (esquina superior izquierda), *E. coli* CTe-01 (transconjugante) esquina superior derecha; C, *E. coli* BW25113 abajo.

Para verificar la transconjugación se compararon los perfiles de plasmidios entre *A. veronii* CTe-01 y *E. coli* CTe-01. Los plasmidios obtenidos de ambas cepas migraron al mismo nivel (indicado con una flecha entre las bandas de 7000 y 10000 pb del marcador 1kb, Plus ADN ladder, Thermo Fisher Scientific). La cepa *E. coli* BW25113 (receptora) careció de plasmidio (Fig. 05).



**Fig.05.** Perfil de plasmidios en gel de agarosa al 1 % de las cepas bacterianas utilizadas en el ensayo de conjugación. Carriles: 1 y 5; ADN Standard (1kb plus); 2. *A. veronii* CTe-01 (donadora); 3. *E. coli* BW25113 (receptora) y 4. *E. coli* CTe-01 (Transconjugante).

Los plasmidios presentes en *E. coli* CTe-01 y *A. veronii* CTe-01 fueron sometidos a corte con la enzima *Bam*HI cuyo perfil electroforético mostró el mismo patrón con tres bandas definidas de aproximadamente 6000, 3000 y 700 pb, según el marcador 1Kb, Plus ADN ladder (Thermo Fisher Scientific) para el plasmidio de ambas cepas (Fig. 06).



**Fig. 06.** Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de restricción del plasmidio pCTe-01. Carriles: 1 y 6 ADN Standard (1 kb plus); 2. pCTe extraído de *A. veronii* Cte-01 sin digerir; 3. pCTe-01 extraído de *A. veronii* Cte-01 digerido con *Bam*HI; 4. pCTe-01 extraído de *E. coli* CTe-01 (BW25113 + pCTe-01) sin digerir. 5. pCTe-01 extraído de *E. coli* CTe-01 + pCTe-01 digerido con *Bam*HI.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de diferentes sales de metales pesados fueron determinadas para las cepas utilizadas en el estudio (Tabla 02). *A. veronii* CTe-01 (cepa donadora) mostró resistencia a Hg<sup>+2</sup>, Ag, Ni<sup>+2</sup>, Co<sup>+2</sup>, Cd<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> Te<sup>+6</sup> y Ni<sup>+2</sup> pero fue sensible a Cr<sup>+4</sup>, Cr<sup>+6</sup>, Co<sup>+2</sup> y Cu<sup>+2</sup>. Por otro lado, *E. coli* BW25113 (cepa receptora) fue sensible a la mayoría de los metales con la excepción de Co<sup>+2</sup> y Cu<sup>+2</sup>. La cepa *E. coli* CTe-01 (transconjugante) adquirió resistencia a Hg<sup>+2</sup> y Ni<sup>+2</sup> en comparación al receptor pero menor al donador, para el caso de Cd<sup>+2</sup> y Zn<sup>+2</sup> el nivel de resistencia de la cepa transconjugante superó los valores de *A. veronii* CTe-01.

**Tabla 02.** Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de diferentes metales pesados para *A. veronii* CTe-01 (donador), *E. coli* BW25113 (receptor) y *E. coli* Cte-01 (transconjugante).

SAL DE METAL	MIC (µg/mL)		
	<i>A. veronii</i> Cte-01	<i>E. coli</i> BW25113	<i>E. coli</i> Cte-01
<b>K<sub>2</sub>TeO<sub>3</sub></b>	150	1	1
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	20	3	15
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	50	7	7
<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	50	70	70
<b>K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub></b>	60	40	40
<b>CdCl<sub>2</sub></b>	100	75	250
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	250	130	300
<b>NiSO<sub>4</sub></b>	450	250	325
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	150	250	250
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	250	550	550

La susceptibilidad antimicrobiana de *A. veronii* CTe-01 a betalactámicos mostró patrones de resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación. Fue sensible a monobactámicos, carbapenems y cefalosporinas de segunda, tercera y cuarta generación. *E. coli* BW25113 fue sensible a la mayoría de los betalactámicos con excepción de oxacilina y la cepa transconjugante *E. coli* CTe-01 sólo adquirió resistencia a la cefalosporina de primera generación, cefazolina (Tabla 03).

**Tabla 03.** Susceptibilidad antimicrobiana a betalactámicos en *A. veronii* CTe-01 (donador), *E. coli* BW25113 (receptor) y *E. coli* CTe-01 (transconjugante), utilizando el sistema automatizado MICROSCAN.

ANTIBIÓTICO	(MIC (µg/mL))					
	CTe-01		BW25113		BW2513 + pCte-01	
Amicacina	<=8	S	<= 8	S	<= 8	S
Amox/A Clav	<=4/2	R	<= 4/4	S	<= 4/4	S
Ampicilina	>8	R	<= 8	S	<= 8	S
Amp / Sulbactam	>= 8/4	R	<= 8/4	S	<= 8/4	S
Aztreonam	<=8	S	<= 8	S	<= 8	S
Cefazolina	<b>&gt;= 4</b>	<b>R</b>	<b>&lt;= 2</b>	<b>S</b>	<b>&gt;= 4</b>	<b>R</b>
Cefepima	<= 8	S	<= 8	S	<= 8	S
Ceftazidima	<= 1	S	<= 1	S	<= 1	S
Ceftriaxona	<=8	S	<= 8	S	<= 8	S
Cefuroxima	<= 4	S	<= 4	S	<= 4	S
Imipenem	<= 1	S	<= 1	S	<= 1	S
Levofloxacina	<= 1	S	<= 1	S	<= 1	S
Nitrofurantoina	<=32	S	<= 32	S	<= 32	S
Oxacilina	> 2	R	> 2	R	> 2	R
Penicilina	> 8	R	< 2	S	< 2	S
Piperacilina	16	I	<= 16	S	<= 16	S
Trimet/Sulfa	<= 2/38	S	<= 2/38	S	<= 2/38	S

La susceptibilidad antimicrobiana de *A. veronii* CTe-01 a otros grupos de antibióticos brindó patrones de resistencia a lincosaminas, glicopéptidos y macrólidos pero sensibilidad a tetraciclinas, rifamicinas y diaminopirimidinas en combinación con sulfonamidas. *E. coli* BW25113 solo fue resistente a lincosaminas al igual que la cepa transconjugante *E. coli* Cte-01 que no adquirió fenotipos de resistencia en estos grupos de antibióticos (Tabla 04).

**Tabla 04.** Susceptibilidad antimicrobiana a otros grupos de antibióticos en *A. veronii* CTe-01 (donador), *E. coli* BW25113 (receptor) y *E. coli* Cte-01 (transconjugante), utilizando el sistema automatizado MICROSCAN.

ANTIBIÓTICO	(MIC (µg/mL))					
	CTe-01		BW25113		BW2513 + pCte-01	
Amicacina	<=8	S	<= 8	S	<= 8	S
Ciprofloxacina	<= 1	S	<= 1	S	<= 1	S
Clindamicina	>4	R	> 4	R	> 4	R
Daptomicina	> 4	R	> 4	R	> 4	R
Eritromicina	> 4	R	2	I	2	I
Ertapenem	<=2	S	<= 2	S	<= 2	S
Gentamicina	<= 4	S	<= 4	S	<= 4	S
Levofloxacina	<= 1	S	<= 1	S	<= 1	S
Linezolid	>4	R	> 4	R	> 4	R
Moxifloxacina	<= 0.5	S	<= 0.5	S	<= 0.5	S
Nitrofurantoina	<=32	S	<= 32	S	<= 32	S
Piperacilina	16	I	<= 16	S	<= 16	S
Pip/Tazo	16	I	<= 16	S	<= 16	S
Rifampicina	<= 1	S	> 2	R	> 2	R
Synercid	> 2	R	> 2	R	> 2	R
Ticar/A Clav	<= 16	S	<= 16	S	<= 16	S
Trimet/Sulfa	<= 2/38	S	<= 2/38	S	<= 2/38	S
Tobramicina	<= 4	S	<= 4	S	<= 4	S

## V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizó el plasmidio pCTe-01 albergado en la bacteria *Aeromonas veronii* CTe-01, aislada a partir de aguas residuales y cuyas características microscópicas, culturales, bioquímicas y moleculares fueron determinadas por Espinoza (2015).

Las evidencias electroforéticas indicaron que el plasmidio pCTe-01 sería de alto peso molecular y bajo número de copias a juzgar por la banda débil observada. Esto exigió realizar ensayos orientados a obtener el mayor rendimiento en la extracción de plasmidios. Se ensayaron los métodos siguientes: El método de Birnboim y Doly (1979), el cual no fue adecuado debido a la precipitación de ADN cromosomal y proteínas por el duodecil sulfato de sodio y la alta concentración de acetato de potasio utilizado (Dubey y Juwarkar, 2004), el plasmidio por ser de alto peso molecular fue removido junto con el precipitado de ADN cromosomal (Dubey y Juwarkar, 2004). Además, la remoción del ARN fue ineficiente por lo que el plasmidio obtenido del lisado celular fue escaso y de baja calidad.

La aplicación del método de Kado y Liu (1981) dio como resultado un lisado ligeramente turbio y generó dificultades en la separación de las fases orgánica (fenol: cloroformo: alcohol isoamilico) y acuosa. Sin embargo, mejoró la remoción de ARN, pero no fue completa.

El método de termólisis alcalina permitió el mejor resultado tanto para la extracción como para la detección de los plasmidios. Esto debido a que se combinó la lisis a temperaturas elevadas, las que disminuye el ARN y la precipitación de ácidos

nucleicos con bajas concentraciones de acetato de sodio en combinación con etanol. Este método de obtención del ADN plasmidial fue apropiado y rápido para la detección del plasmidio en *A. veronii* Cte-01 (Ver Fig. 01). Sin embargo, no brindó la calidad suficiente para los ensayos de caracterización posteriores como digestiones con enzimas de restricción. Con la finalidad de obtener una mayor cantidad y calidad de plasmidios se ensayó el Kit Comercial QIAprep spin miniprep Kit (QIAGEN), con este método se observó en la electroforesis del producto obtenido una banda de ADN plasmídico limpia y de alta calidad, adecuada para estudios posteriores.

El plasmidio pCTe-01 migró aproximadamente entre las bandas de 8 kb y 10 kb del marcador Supercoiled DNA Ladder (Biolabs Englands) y entre las bandas de 7 kb y 10 del marcador de peso molecular 1kb, Plus ADN ladder (Thermo Fisher Scientific). Adicionalmente a la banda de mayor definición se observó una banda tenue por encima de ella, que migró sobre los 20 kb. Esto podría atribuirse a la forma relajada o abierta circular (open circular, OC) del plasmidio, fenómeno que suele ocurrir debido al estrés que atraviesa el ADN plasmidial durante su extracción. Esto ocurre durante la lisis bacteriana y durante la remoción de ADN cromosomal. El ADN plasmidial existe como moléculas circulares de ADN de doble hebra cerradas covalentemente, conocidas como formas CCC (Covalently Closed Circular), las alteraciones por el quiebre de la doble hebra brindan configuraciones plasmídicas del tipo abierta circulares (formas OC) o lineal (Formas L) según se afecta una o las dos hebras. Estas tres configuraciones migran a distinta velocidad en los geles de agarosa; la forma CCC más rápidamente que la OC y ésta más rápidamente que la L (Hintermann y col., 1981; Coll y col. 2005) (Ver Fig. 02).

Debido a que no se conocía la secuencia del plasmidio, un método alternativo para estimar con precisión el tamaño del plasmidio es través de la determinación del perfil de restricción, el cual se obtiene mediante la digestión con diferentes enzimas. La selección de las enzimas se basó en trabajos precedentes con otros plasmidios del género donde Brown y col. (1997) utilizaron con éxito *EcoRI*, *HindIII* y *BamHI* para tipificar plasmidios de diferentes especies de *Aeromonas*, Adams y col. (1998) utilizaron las enzimas *EcoRI*, *HindIII* y *Mbol* para tipificar 19 plasmidios conjugativos de especies silvestres de *Aeromonas*, McInstosh y col. (2008) utilizó la enzima *MobI* para cortar parcialmente un plasmidio de *A. salmonicida* finalmente Moura y col. (2012) utilizó las enzimas *BstI770I* y *PstI* para caracterizar plasmidios conjugativos de *Aeromonas* aisladas de aguas residuales. En este sentido, en el presente estudio se seleccionaron las *BamHI*, *BstN*, *Mbol* y *PstI*. De las enzimas ensayadas que brindaron resultados favorables, se puede observar la distancia entre las bandas que es proporcional a la distancia de los sitios de corte para dichas enzimas dentro de la secuencia de ADN, siendo mayor para *BamHI* y menor para *PstI* (Ver. Fig. 03).

La presencia de plasmidios dentro del género *Aeromonas* ha sido documentada por diversos autores, los cuales señalan que éstos varían en tamaño y número de copias dependiendo del lugar de aislamiento. Están presentes en *Aeromonas* patógenas, aisladas de peces de agua dulce, plasmidios que van desde 6,4 Kb hasta 165,9 Kb (Del Castillo y col., 2013; Fehr y col., 2006). Por otro lado, en aquellas procedentes de muestras de ríos, lagos y efluentes no tratados han sido hallados plasmidios entre 20 kb y 80 Kb (Cattoir y col., 2008; Picao y col., 2008), de acuerdo a los antecedentes para el género, se considera que el plasmidio pCTe-01 es un plasmidio de mediano peso molecular.

La presencia de los plasmidios en las bacterias generalmente se relaciona con sus capacidades para resistir a antibióticos (Bennett, 2008; Aminov, 2009; Carattoli, 2009), a metales pesados (Eberhard, 1989; Foster, 1983) o a la producción de toxinas (Foster, 1983; Stuber y col., 2003). En este sentido, para determinar si la presencia del plasmidio pCTe-01 se relaciona con la resistencia a metales observada por *A. veronii* CTe-01, se realizaron los ensayos de conjugación con la finalidad de transferir el plasmidio purificado a la cepa hospedera *E. coli* BW25113. Este ensayo se realizó a 28 °C, experimentos realizados a bajas temperaturas también fueron realizados por Casas y col. (2005) obteniendo resultados favorables. Se obtuvieron colonias transconjugantes luego de 72 h de incubación a 37 °C (Fig.4.A). Estas cepas transconjugantes designadas como *E. coli* CTe-01 fueron capaces de crecer en presencia de HgCl<sub>2</sub> (10 µg/mL) a diferencia de la cepa receptora *E. coli* BW25113 (Fig. 4.B).

Adicionalmente, al fenotipo de resistencia adquirida por la cepa transconjugante, se analizó la presencia del plasmidio en ella. El plasmidio aislado mostró una migración electroforética similar a la observada del aislado de *A. veronii* CTe-01. Se evidenció la presencia de la banda del tamaño esperado pero más tenue que el preparado a partir de la cepa donadora. Ambas migraron entre las bandas de 7 kb y 10 kb del marcador de peso molecular 1 kb, Plus ADN ladder (Thermo Fisher Scientific) y no se observó banda alguna del preparado a partir de la cepa receptora *E. coli* BW25113 (Fig. 5). Para verificar la presencia del plasmidio pCTe-01 en las bacterias transconjugantes, se realizaron digestiones con la enzima *Bam*HI. Se obtuvieron los mismos 3 fragmentos observados en las digestiones del plasmidio pCTe01 aislado de *A. veronii* CTe-01. El mismo patrón de bandas observado con el plasmidio procedente

de la cepa donadora y de la transconjugante indicó la identidad del plasmidio pCTe-01 en ambas cepas (Fig.06).

Plasmidios provenientes de *Aeromonas* capaces de ser transferidos por medio de conjugación han sido ampliamente estudiados en donde se han caracterizado como plasmidios de amplio rango de huéspedes (BHR) (Hedges col., 1985; Adams y col., 1998; Rhodes y col., 2000; McIntosh y col., 2008) o solo detectado los genes *mob* (L'Abée-Lund y Sorum, 2002; Fehr y col., 2006; Majumdar y col., 2011; Han y col., 2012; Girlich, 2011).

Adicionalmente, se determinaron las características de resistencia a metales pesados y antibióticos que podrían haberse transmitido a través del plasmidio a la cepa receptora. En relación a la resistencia a metales pesados la cepa donadora *A. veronii* CTe-01, la información que se disponible sobre el nivel de resistencia a metales pesados para este género es muy escasa y varía dependiendo de la zona de los aislamientos y el nivel de exposición a contaminación por metales pesados de los mismos (Pettibone y col., 1996; Akinbowale y col., 2007; Maytar y col., 2010) por lo cual es difícil establecer una comparación.

Sobre los resultados de resistencia a metales para la cepa transconjugante *E. coli* CTe-01 destaca la adquisición de resistencia al mercurio la cual concuerda con los estudios de McIntosh y col. (2008), Reith y col. (2008), del Castillo y col. (2013) y Vincent y col. (2014), que lo encontraron en *Aeromonas* de especies patógenas de peces y ambientales, la resistencia a este metal en su forma inorgánica esta mediada por una mercurio reductasa presente en el operon *mer* frecuentemente hallado en transposones dentro de plasmidios (Osborn y col., 1997) . Por otro lado la resistencia a

los iones de Ni, Zn y Cd también se vio incrementada, por lo general la resistencia a estos metales está estrechamente ligada a bombas de eflujo de cationes codificada por los operones *czc* (para resistencia a Cd<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup> y Co<sup>+2</sup>) y *cnr* (para resistencia (Co<sup>+2</sup> y Ni<sup>+2</sup>) ubicados en plasmidios de bacterias gram negativas (Nies, 1992; Endo y col., 2002). Resistencia a Ag, Cr, Cu y Te, también ha sido documentada a nivel cromosomal y plasmidial en bacterias Gram negativas (Trevors y col., 1985). Sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables lo cual indicaría que los mecanismos de resistencia están codificados a nivel cromosomal lo que concuerda con Pettibone y col. (1996) donde se halló relación entre el plasmidio y la resistencia a metales.

A partir de los datos obtenidos en la susceptibilidad antimicrobiana, la elevada resistencia a  $\beta$ -lactámicos y cefalosporinas primarias podría ser explicado en *Aeromonas spp.* debido a la producción natural de  $\beta$ -lactamasas en estas especies (Fosse y col., 2003). Sin embargo, pese a los altos niveles de resistencia hallados para  $\beta$ -lactámicos, la cepa en estudio *A. veronii* CTe-01 es susceptible a la mayoría de los otros grupos de antibióticos mostrando perfiles de resistencia similares a los hallados en aislados clínicos y ambientales (Son y col., 1997; Miranda y Castillo, 1998; Hatha y col., 2005; Palu y col., 2005; Jacobs y Chenia, 2007; Orozova y col., 2008). En los estudios realizados por Jones y Wilcox (1995), la mayoría de miembros del género *Aeromonas* son generalmente resistentes a ampicilina, penicilina, carbenicilina, eritromicina, clindamicina y estreptomycin. Por otro lado, documentaron su susceptibilidad a monobactámicos, cefalosporinas de segunda y tercera generación, carbapenems, cloranfenicol y sulfonamidas; lo cual concuerda con los hallazgos en este estudio.

La cepa receptora comercial *E. coli* BW25113 es sensible a la mayoría de los grupos de antibióticos antes mencionados pero resistente a rifampicina, vancomicina, clindamicina y linezolid. A diferencia de ella, la cepa transconjugante *E. coli* CTe-01 mostró resistencia a cefalosporinas de primera generación (cefazolina) (Tabla 03), lo cual indica que fue adquirida a través del plasmidio pCTe-01 y concuerda con los estudios de Hind y col. (2013) donde dos plasmidios pequeños de *A. hydrophila* confieren resistencia a cefalosporinas de primera (cefradime) y tercera (cefotaxima) generación. Por otro lado, el plasmidio no transfirió resistencia a penicilinas, esto se debe a que la mayoría de  $\beta$ -lactamasas producidas por este género están codificadas cromosomalmente (Jones y Wilcox, 1995), no obstante ha sido documentada resistencia a penicilinas asociada a plasmidios de alto (Chang y Bolton; 1987) y bajo (Marti y Balcazar, 2012) peso molecular, es importante destacar que la resistencia a tetraciclinas a menudo se encuentra mediada por plasmidios en *Aeromonas* la cual estuvo ausente en el plasmidio pCTe-01 a diferencia de los estudios de Aoki y col., (1986); Adams y col., (1998); Toranzo y col., (1986); L'Abée-Lund y Sorum, (2002); Jacobs y Chenia (2007); McIntosh y col., (2008); Rhodes y col., (2000); Han y col., (2012), no transfirió resistencia a quinolonas difiriendo de Cattoir y col., (2008); Picao y col., (2008); Majumdar y col., (2011); Marti y Balcázar (2012); Dobiasova y col., (2014); no pudiendo ser considerado como plasmidio portador de multidrogo resistencia como lo hallado en plasmidios de *Aeromonas* estudiados por Sorum y col., (2003); Rhodes y col., (2004); Gordon y col., (2008); Picao y col., (2008); Marti y Balcazar (2012); del Castillo y col., (2013); Dobiasova, (2014).

La significancia de plantas municipales de tratamiento de aguas residuales como fuente de resistencia antimicrobiana y el riesgo de contaminación de aguas superficiales ha sido documentada en numerosos estudios (Isoken y Anthony; 2012).

Las aguas residuales podrían ser una fuente de contaminación de aguas superficiales y subterráneas lo cual resultaría en una diseminación de determinantes de resistencia antimicrobiana hacia agua potable y consecuentemente a los consumidores. Por consiguiente, bacterias como *A. veronii* las cuales son capaces de colonizar diferentes ambientes acuáticos, son de particular interés para manejar formas potenciales de diseminación de resistencia a antibióticos, dada su ubicuidad en éstos ambientes y presencia de patrones de resistencia albergados en plasmidios conjugativos. Por otro lado, el uso de tecnologías que involucren plasmidios conjugativos en huéspedes inocuos para la remoción de metales pesados de lugares contaminados es una vía posible para mejorar el performance de descontaminación de estos compuestos en ambientes críticos, siendo la aplicación de métodos moleculares para la caracterización de plasmidios de resistencia una alternativa viable para el desarrollo de métodos potenciales de prevención y biorremediación.

## VI. CONCLUSIONES

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

1. El plasmidio pCte-01 es un plasmidio conjugativo de aproximadamente 9.5 kb.
2. La cepa transconjugante *E. coli* CTe-01 adquirió resistencia al antibiótico cefazolina y los metales pesados mercurio, cadmio, zinc y níquel.
3. Existe relación entre la presencia del plasmidio pCTe-01 en *Aeromonas veronii* Cte-01 y la resistencia a metales pesados y antibióticos.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Secuenciar el plasmidio completo con la finalidad de detectar genes que confieren resistencia a metales pesados, antibióticos y posibles factores de virulencia.
2. Realizar estudios sobre los mecanismos moleculares por los cuales *A. veronii* CTe-01 resiste a Hg, Ni, Cd y Zn.
3. Diseñar experimentos de conjugación en receptores inoos adaptados a ambientes contaminados que permitan hacer uso de las características de resistencia a metales del plasmidio pCTe-01 en potenciales actividades de biorremediación.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Adams CA, Austin B, Meaden PG y McIntosh D.** Molecular Characterization of Plasmid- Mediated Oxytetracycline Resistance in *Aeromonas salmonicida*. Appl Environ Microbiol 1998; 64 (11): 4194-4201.
2. **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.
3. **Aminov RI.** The rol of antibiotics and antibiotic resistance in nature. Environ Microbiol 2009; 11 (12): 2970-2988.
4. **Aminov RI.** Horizontal gene exchange in environmental microbiota. Frontiers Microbiol 2011; 2 (158): 1-19.
5. **Aoki T, Mitoma Y y Crosa JH.** The characterization of a conjugative R-plasmid isolated from *Aeromonas salmonicida*. Plasmid 1986; 16: 213-218.
6. **Bahl MI, Burmolle M, Meisner A y Hansen LH.** All IncP-1 plasmid subgroups, including the novel  $\epsilon$  subgroup are prevalent in the influent of a Danish wastewater treatment plant. Plasmid 2009; 62: 134-139.
7. **Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R y McArthur JV.** Co-selection of antibiotic and metal resistance. Trends Microbiol 2006; 14 (4): 176-182.

8. **Bauer A W, Kirby WMM, Sherris JC y Turck M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer J Clin Pathol* 1996; 45(4): 493-496.
9. **Bennett PM.** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 347-357.
10. **Bimboim HC y Doly J.** A rapid procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7 (6): 1513-1524.
11. **Borrego JJ, Moriñigo MA, Martínez-Manzanares E, Bosca M, Castro D, Barja JL y Toranzo AE.** Plasmid associated virulence properties of environmental isolates of *Aeromonas hydrophila*. *J Med Microbiol* 1991; 35: 264-269.
12. **Bravo L, Fernández A, Ledo J, Ramírez M, Aguila A, Nuñez FA, Cabrera LE y Cruz Y.** Caracterización fenotípica y factores de virulencia en cepas de *Aeromonas* aisladas de pacientes con enfermedad diarreica aguda en Cuba. *Chil infect* 2011; 28(2): 159-165.
13. **Brown RL, Sanderson K y Kirov SM.** Plasmids and *Aeromonas* virulence. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997; 17: 217-223.
14. **Casas C, Anderson EC, Ojo KK, Keith I, Whelan D, Rinnie D y Roberts MC.** Characterization of pRAS1-like plasmids from atypical North American psychrophilic *Aeromonas salmonicida*. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 242: 59-63.

15. **Castro-Escarpulli G, Figueras MJ, Aguilera-Arreola G, Soler L, Fernández-Rendón E, Aparicio GO, Guarro J y Chacón MR.** Characterization of *Aeromonas spp.* isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Int J Food Microbiol* 2003; 84: 41-49.
16. **Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ y Nordmann P.** Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas spp.* *Emerg Infect Dis* 2008; 14 (2): 231-237.
17. **Chang BJ y Bolton SM.** Plasmids and Resistance to Antimicrobial Agents in *Aeromonas sobria* and *Aeromonas hydrophila* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31 (8): 1281-1282.
18. **Chigo JM.** Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Lett Nat* 2001; 412: 442-444.
19. **Coll P, Coque T, Domínguez A, Vázquez J y Vila J.** Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 18. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Consultado 12 octubre 2005. Disponible en: <http://www.seimc.org/protocolos/microbiologia/cap18.htm>
20. **Counturier M, Bex F, Berggist PL y Maas WK.** Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* 1988; 52(3): 375-395.

- 21. Del Castillo C, Hikima J, Jang H, Nho S, Jung T, Wongtavatchai J, Kondo H, Hirono I, Takeyama H y Aoki T.** Comparative Sequence Analysis of a Multidrug-Resistant Plasmid from *Aeromonas hydrophila*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(1): 120-129.
- 22. Dröge M, Pühler y Selbitschka W.** Phenotypic and molecular characterization of conjugative antibiotic resistance plasmids isolated from bacterial communities of activated sludge. *Mol Gen Genet* 2000; 263: 471-482.
- 23. Dobiasova H, Kutilova I, Piackova V, Vesely T, Cizek A y Dolejska M.** Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Vet Microbiol* 2014; 171: 413-421.
- 24. Dubey K y Juwarkar A.** Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. *Indian J Biotechnol* 2004; 3: 74-81.
- 25. Eberhard WG.** Why do bacterial plasmids carry some genes and not others? *Plasmid* 1989; 21: 167-174.
- 26. Eberhard WG.** Evolution in Bacterial Plasmids and levels of selection. *The Q Rev Biol* 1990; 65(1): 1-22.
- 27. Endo G, Narita M, Huang C y Silver S.** Microbial Heavy Resistance Transposons and Plasmids: Potential Use for Environmental Biotechnology. *J Environ Biotechnol* 2002; 2(2): 71-82.

- 28. Espinoza, LE.** Caracterización de la cepa bacteriana Cte-01 resistente a Telurito de Potasio. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica. Facultad de Ciencias Biológicas. 2015.
- 29. Evangelista-Barreto NM, Teles FC, dos Fernandes RHS, Favalina CM, Macrae A y dos Prazeres D.** Characterization of *Aeromonas* species isolated from an estuarine environment. *Brazilian J Microbiol* 2010; 41: 452-460.
- 30. Fosse T, Giraud-Morin C y Madinier I.** Phenotypes of betalactam resistance in the genus *Aeromonas*. *Pahologie Biologie* 2003; 51: 290-296.
- 31. Foster TJ.** Plasmid-determined Resistance to Antimicrobial Drugs and Toxic Metal Ions in Bacteria. *Microbiol Rev* 1983; 47: 361-409.
- 32. Frost LS, Leplae R, Summers AO y Toussaint A.** Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Natur Rev Microbiol* 2005; 3(9): 722-732.
- 33. Ghenghesh KS, Ahmed SF, El-Khalek RA, Al-Gendy A. y Klena J..** *Aeromonas*-associated infections in developing countries. *J Infect in Developing Countries*, 2008; 02: 81-98.
- 34. Gordon L, Cloeckaert A, Doublet B, Schwarz S, Bouju-Albert A, Ganiere JP, Le Bris H, Le-Fleche-Materos A y Giraud E.** Complete sequence of the floR-carrying multiresistance plasmid Pab5s9 from freshwater *Aeromonas bestiarum*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 65-71.

- 35. Gowland PC.** Determination of the molecular size of a plasmid following restriction endonuclease digestion. *Biochemical Education* 1994; 22: 95–96.  
doi: 10.1016/0307-4412(94)90091-4.
- 36. Guerra IMF, Fadanelli R, Figueiro M, Screiner F, Delamare APL, Wollheim C, Costa SOP y Echeverrigaray S.** *Aeromonas* associated Diarrhoeal disease in South Brazil: Prevalence, virulence factors and Antimicrobial resistance. *Brazilian J Microbial* 2007; 38: 638-643.
- 37. Guevara JM, Huamaní C, Zepa R, Valencia E, Guevara JMM y Anaya M.** *Aeromonas* en la diarrea aguda de niños menores de 5 años. *Anal Fac Med* 2002; 63 (2): 41-45.
- 38. Han JE, Kim JH, Choresca CHJ, Shin SP, Jun JW y Chai JY.** Prevalence of the *tet* gene and complete genome sequencing of *tet* gene-encoded plasmid (pAHH01) isolated from *Aeromonas* species in South Korea. *J App Microbiol* 2012; 112: 631-638.
- 39. Hatha M, Vivekanandhan AA, Julie-Joice G y Christol A.** Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh wáter fish. *Int J Food Microbiol* 2005; 98: 131-134.
- 40. Hedges RW, Smith P y Brazil G.** Resistance Plasmids of *Aeromonads*. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 2091-2095.

- 41. Hernandez F, Henriques L, Pilz R, Bonifacio O, Rhayd G, Oliveira D, Mandetta M y Machado A.** Perspectives in Water Pollution. Chapter 1. Intech. 2013. Brazil. DOI:10.5772/54638.
- 42. Hintermann G, Fischer HM, Cramer R y Hutter R.** Simple procedure for distinguishing CCC, OC, and L forms of plasmid DNA by Agarose gel electroforesis. *Plasmid* 1981; 5: 371-373.
- 43. Isoken HI y Anthony IO.** Antibiotic susceptibility profile of *Aeromonas* species Isolated from wastewater treatment plant. *The Sci World J* 2012; 2012:1-6.
- 44. Jacobs L y Chenia HY.** Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas spp.* isolated from South African aquaculture systems. *Int J Food Microbiol* 2007; 114:295-306.
- 45. Janda JM y abbott SL.** The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin microbiol Rev* 2010; 23 (1) 35-73.
- 46. Johnson TJ, Wannemuehler YW, Jhonson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C y Nolan LK.** Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* Isolates. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(6): 1976-1983.
- 47. Kado CI y Liu ST.** Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; 145(3): 1365-1373.

- 48. Kado CI.** Origin and evolution of plasmids. *Antonie van Leeuwenhoek* 1998; 73: 117-126.
- 49. Kivanic M, Yilmaz M y Demir F.** The occurrence of *Aeromonas* in drinking water, tap water and the Porsuk River. *Brazilian J Microbiol* 2011; 42: 126-131.
- 50. Kozinska A, Figueras MJ, Chacon MR y Soler L.** Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Appl Microbiol* 2002; 93: 1034-1041.
- 51. Kruse H y Sorum H.** Transfer of Multiple Drug Resistance Plasmids between Bacteria of Diverse Origins in Natural Microenvironments. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60 (11): 4015-4021.
- 52. Kühn I, Albert MJ, Ansaruzzaman M, Bhuiyan NA, Alabi SA, Islam MS, Neogi PK, Huys G, Janssen P, Kersters K y Möllby R.** Characterization of *Aeromonas* spp. isolated from humans with diarrhea, from healthy controls, and from surface water in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1997, 35 (2): 369-373.
- 53. L'Abée-Lund TM y Sorum H.** Aglobal non-conjugative plasmid Tet<sup>r</sup> C plasmid, pRAS3, from *Aeromonas salmonicida*. *Plasmid* 2002; 47: 172-181.
- 54. Lan R y Reeves PR.** Gene transfer is a major factor in bacterial evolution. *Mol Biol Evol* 1996; 13(1): 47-55.

- 55. Laufer AS, Siddall ME, y Graf J. (2008).** Characterization of the digestive-tract microbiota of *Hirudo orientalis*, a European medicinal leech. *Appl Environ Microbiol*, 2008; 74(19): 6151-6154.
- 56. Mahlatsi TA.** Characterization of heavy metal tolerant bacterial plasmids isolated from a platinum mine tailings dam. [Tesis para la maestría en Ciencias Ambientales]. Potchefstroom: Faculty of Natural Sciences, North-West University; 2012.
- 57. Majumdar T, Datta S, Ghosh D, Dutta S, Chakraborty, Goswami R y Mazumder S.** Role of virulence plasmid of *Aeromonas Hydrophila* in the pathogenesis of ulcerative disease syndrome in *Clarias Batrachus*. *Indian J Biochem & Biophys* 2007; 44: 401-406.
- 58. Marti E. y Balcázar JL.** Multidrug resistance-encoding plasmid from *Aeromonas* sp. strain P2GI. *Clin Microbiol Infec* 2012; 18: 366-368.
- 59. Maytar F, Akkan T, Ucak Y y Eraslan B.** *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistant and heavy metal resistance species from Iskenderum Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environ Monit Asses* 2010; 167:309-320.
- 60. McIntosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM, Clark SE, Zalinger ZB, Gilg IC, Danner GR, Johnson KA, Beattie M y Ritchie R.** 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.

**61. Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP y Falkow S.** Simple Agarose Gel Electrophoretic Method for the Identification and Characterization of Plasmid Deoxyribonucleic Acid. *J Bacteriol* 1976; 127(3): 1529-1537.

**62. Miranda CD y Castillo G.** Resistance to antibiotic and heavy metals of motile aeromonads from Chilean freshwater. *The Science of the Total Environment* 1998; 224: 167-176.

**63. Moura A, Henriques I, Ribeiro R y Correia A.** Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 1243-1250.

**64. Moura A, Henriques I, Smalla K y Correia A.** Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol* 2010; 161: 58-66.

**65. Moura A, Pereira C, Henriques I y Correia A.** Novel cassettes and integrons in antibiotic-resistant bacteria from urban wastewater. *Res Microbiol* 2012; 163 (2): 92-100.

**66. Moura A, Jové T, Ploy MC, Henriques y Correia A.** Diversity of gene cassette promoters in class 1 integrons from wastewater environments. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78 (5): 5413-5416.

- 67. Moura A, Oliveira C, Henriques I, Smalla K y Correia A.** Broad diversity of conjugative plasmids in integron-carrying bacteria from wastewater environments. FEMS Microbiol Lett 2012; 330:157-164.
- 68. Nagar V, Shashidhar R y Bandekar JR.** Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis. World J Microbiol Biotechnol 2013; 29: 745-752.
- 69. Nelson MC, y Graf J.** Bacterial symbioses of the medicinal leech *Hirudo verbana*. Gut Microbes, 2012; 3(4): 322-331.
- 70. Nies D.** Resistance to Cadmiun, Cobalt, Zinc and Nickel in Microbes. Plasmid 1992; 27:17-28.
- 71. Nies D.** Efflux-Mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol Rev 2003; 27:313-339.
- 72. Norman A, Hansen LH y Sørensen SJ.** Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. Phil Trans R Soc B 2009; 364: 2275-2289.
- 73. Novick RP.** Extrachromosomal Inheritance in Bacteria. Bacteriol Rev 1969; 33 (2): 210-235.
- 74. Novick RP.** Plasmid incompatibility. Bacterial Rev 1987; 51 (4): 381-395.

- 75. Novick RP y Roth C.** Plasmid-linked resistance to inorganic salt in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 1968; 95 (4): 1335-1342.
- 76. Ochman H, Lawrence JG y Groisman EA.** Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nat 2000; 405: 299-304.
- 77. Olsen RH y Wright CD.** Interaction of Pseudomonas and Enterobacteriaceae Plasmids in *Aeromonas salmonicida*. J Bacteriol 1976; 128 (1): 228-234.
- 78. Orozova P, Chikova V, Kolarova V, Nenova R, Konovsova M y Najdenski H.** Antibiotic resistance of potentially pathogenic *Aeromonas* strains. Trakia J Sci 2008; 6(1): 71-77.
- 79. Palu AP, Gomes LM, Miguel MAL, Balassiano IT, Queiroz MIP, Freitas-Almeida AC y de Oliveira SS.** Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. Food Microbiol 2005; 23: 504-509.
- 80. Pazzaglia G, Escalante JR, Sack RB, Rocca C y Benavides V.** Transient intestinal colonization by multiple phenotypes of *Aeromonas* species during the first week of life. J Clin Microbiol 1990; 28 (8): 1842-1846.
- 81. Pepe MT, Risso WM, Martone-Rocha S, Duarte E y Alves MR.** *Aeromonas* presence in drinking water from collective reservoirs and wells in periurban area in Brazil. Brazilian J Microbiol 2010; 41: 694-699.

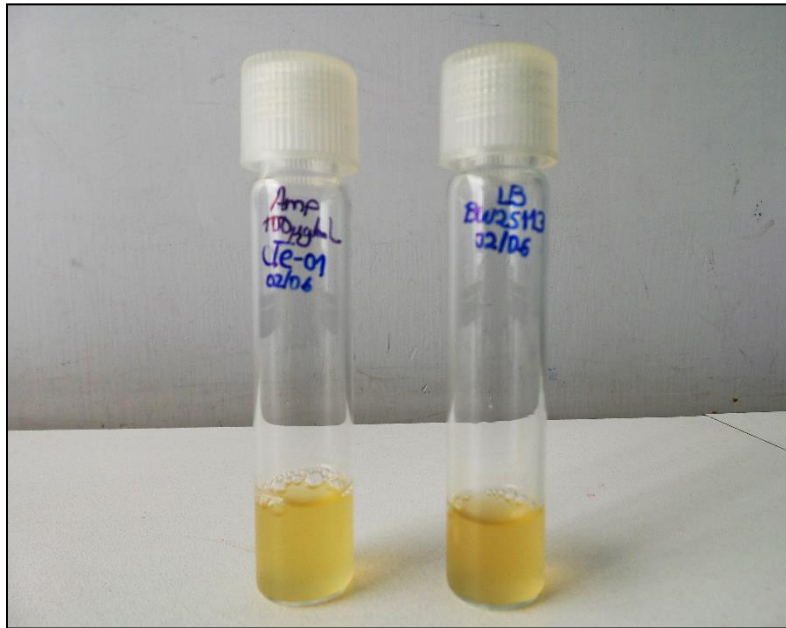
- 82. Perez-Valdespino A, Celestino-Mancera M, Villegas-Rodriguez VL y Curiel-Quesada E.** Characterization of mercury-resistant clinical *Aeromonas* species. *Brazilian J Microbiol* 2013; 44 (4): 1279-1283.
- 83. Pettibone GW, Mear JP y Sampsell BM.** Incidence of antibiotic and metal resistance and plasmid carriage in *Aeromonas* isolated from brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Lett Appl Microbiol* 1996; 23: 234-240.
- 84. Picão RC, Poirel L, Demarta A, Ferreira CS, Corvaglia AR, Petrini O y Nordmann P.** Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 948-950.
- 85. Piotrowska-Seget Z, Cycon M y Kozdroj J.** Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl Soil Ecol* 2005; 28: 237-246.
- 86. QIAGEN.** [Página principal en Internet] QIAprep Miniprep Handbook 2015. 4<sup>ta</sup> ed. 44p. [Actualizada en Junio del 2015; acceso setiembre de 2015] <https://www.qiagen.com>
- 87. Reith ME, Singh RK, Curtis B, Boyd JM, Bouevitch A, Kimball J, Munholland J, Murphy C, Sarty D, Williams J, Nash J, Johnson SC, y Brown L.** The Genome of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* A119: insights into the evolution of a fish pathogen. *BMC Genomics* 2008; 9: 427.

- 88. Rhodes G, Huys G, Swings J, McGann P, Hiney M y Smith P.** Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of tetracycline resistance determinant *tetA*. *App Environ Microbiol* 2000; 66: 3883-3390.
- 89. Rhodes G, Parkhil J, Bird C, Ambrose K, Jones MC y Huys G.** Complete sequence nucleotide sequence of the conjugative tetracycline resistance plasmid pFBAOT6, a member of a group of IncU plasmids with global ubiquity. *App Environ Microbiol* 2004; 70: 7497-7510.
- 90. Sabry SA, Ghozlan HA y Abou-Zeld DM.** Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J Appl Microbiol* 1997; 82: 245-252.
- 91. Son R, Rusul G, Sahilah AM, Zainuri A, Raha y AR Salmah I.** Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophyla* isolates from cultured fish, telapia (*Telapia mossambica*). *Letters in Applied Microbiology* 1997; 24: 479-482.
- 92. Soler FL.** Importancia Biosanitaria de *Aeromonas*: Taxonomía y Epidemiología [tesis doctoral en Ciencias Médicas]. Reus: Facultat de Medicine i ciencies de la Salut, Universitat Rovira i Virgili; 2003.
- 93. Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N y Wertz Stefan.** Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Natur Rev Microbiol* 2005; 3(9): 700-710.

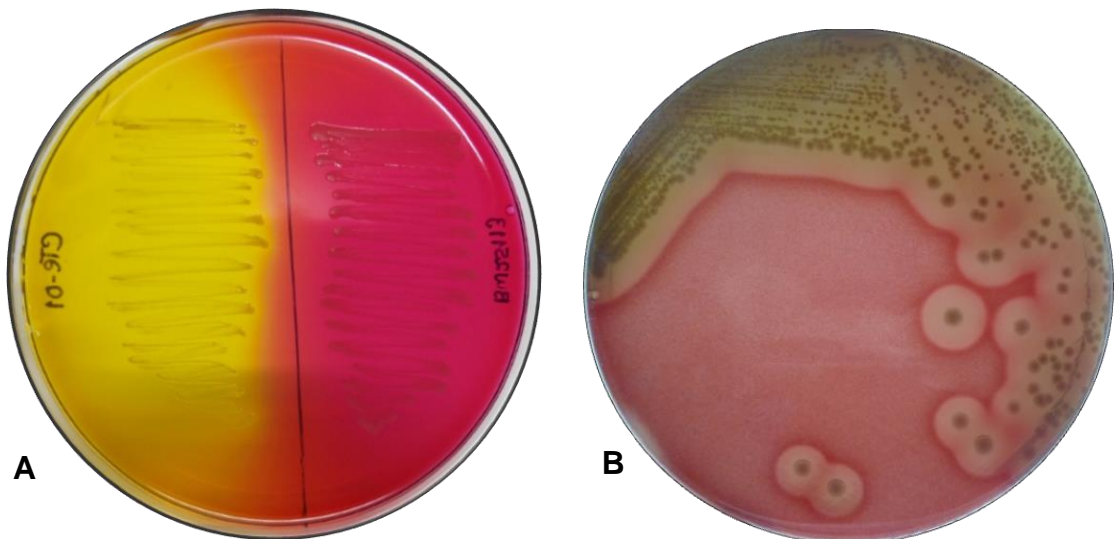
- 94. Stenepanaukas R, Glenn TC, Jagoe CH, Tuckfield CR, Lindell AH y Mcarthur JV.** Elevated Microbial Tolerance to Metals and Antibiotics in Metal-Contaminated Industrial Enviroments. *Environ Sci Technol* 2005; 39: 3671-3678.
- 95. Stenepanaukas R, Glenn TC, Jagoe CH, Tuckfield CR, Lindell AH, King CJ y Mcarthur JV.** Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environ Microbiol* 2006; 8 (9): 1510-1514.
- 96. Stuber K, Burr SE, Braun M, Wahli T y Frey J.** Type III Secretion Genes in *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* are Located on a Large Thermolabile Virulence Plasmid. *J Clin Microbiol* 2003; 41(8): 3854-3856.
- 97. Summers AO.** Generally Overlooked Fundamentals of Bacterial Genetics and Ecology. *Clin Infec Dis* 2002; 34(3): 85-92.
- 98. Timoney JF, Port, Giles J y Spanier J.** Heavy-Metal and Antibiotic Resistance in the Bacterial Flora of Sediments of New York Bight. *Appl Environ Microbiol* 1978; 36 (3): 465-472.
- 99. Trevors JT, Oddie KM y Belliveau BH.** Metal Resistance in Bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 1985, 32: 39-54.
- 100. Toranzo AE, Barja JL, Colwell RR y Hetrick FM.** Characterization of Plasmids in Bacterial Fish Pathogens. *Infect Immun* 1983; 39 (1): 184-192.

- 101. Verma T, Ramteke PW y Garg SK.** Effect of ecological factors on conjugal transfer of chromium-resistant plasmid in *Escherichia coli* isolated from tannery effluent. *Appl Biochem Biotechnol* 2012; 102: 5-20.
- 102. Vila J, Ruiz J, Gallardo F, Vargas M, Soler L, Figueras MJ y Gascon J.** *Aeromonas spp.* and Traveler's Diarrhea: Clinical Features and Antimicrobial Resistance. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(5):552-555.
- 103. Vincent AT, Trudel MV, Paquet VE, Boyle B, Tanaka KH y Dallaire-Dufresne S.** Detection of variants of the pRAS3, pAB5S9, and pSN254 plasmids in *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: multidrug resistance, interspecies exchanges, and plasmid reshaping. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 7367-7374.
- 104. Wilcox MH, Cook AM y Spencer RC.** *Aeromonas spp.* as a potential cause of diarrhoea in children. *J Clin Pathol* 1992; 45: 959-963.
- 105. Wireman J, Liebert CA, Smith T y Summers AO.** Association of Mercury Resistance with Antibiotic Resistance in the Gram-Negative Fecal Bacteria of Primates. *Appl Environ Microbiol* 1997;63(11): 4494-4503).
- 106. Whitaker IS, Maltz M, Siddall ME, y Graf J.** Characterization of the digestive tract microbiota of *Hirudo orientalis* (medicinal leech) and antibiotic resistance profile. *Plastic and reconstructive surgery* 2014; 133(3), 408-418.

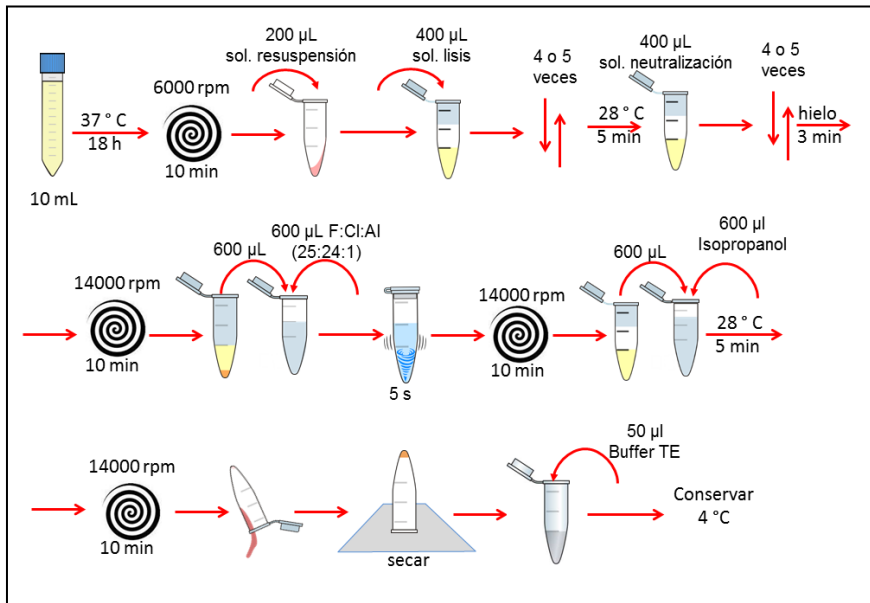
## **IX. ANEXOS**



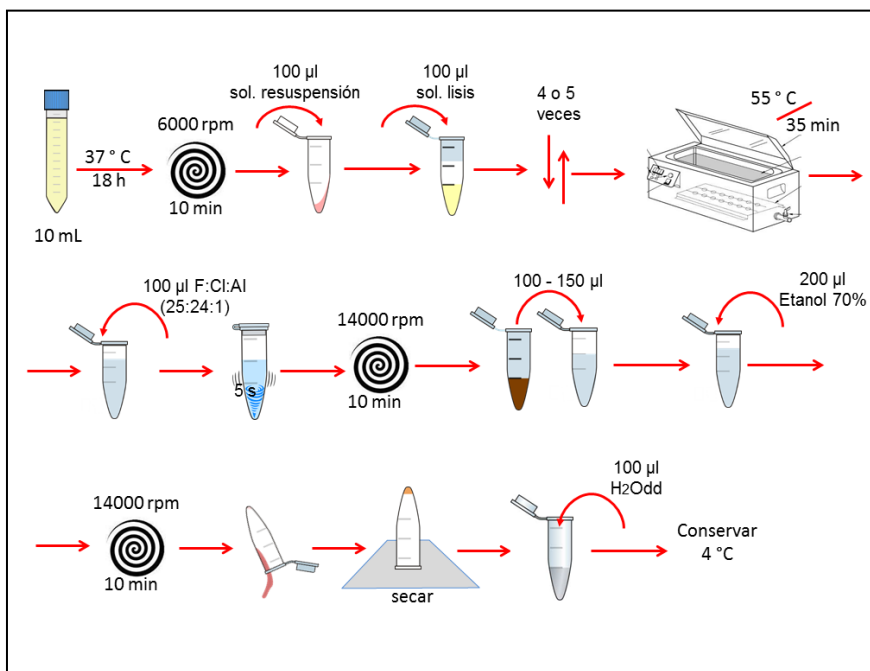
**Fig.07.** Cepas de estudio conservadas en medio de cultivo L.B.: a la izquierda *A. veronii* CTe-01 y a la derecha *E. coli* BW25113.



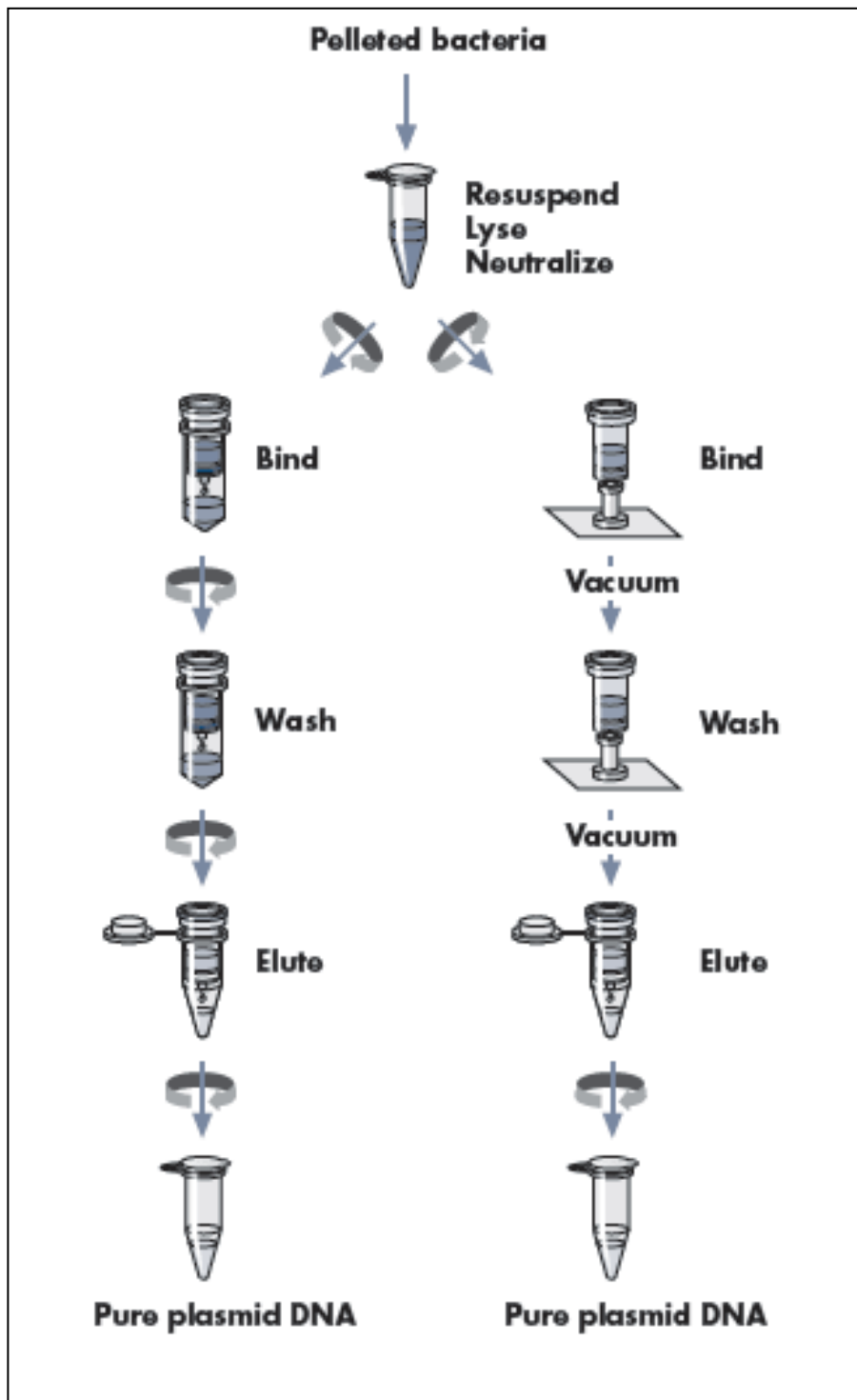
**Fig.08.** Medios de cultivo para la diferenciación de cepas. A. Medio BPLS, a la izquierda *A. veronii* CTe-01 y a la derecha *E. coli* BW25113; B. Medio Agar Sangre, verificación de hemólisis de *A. veronii* CTe-01



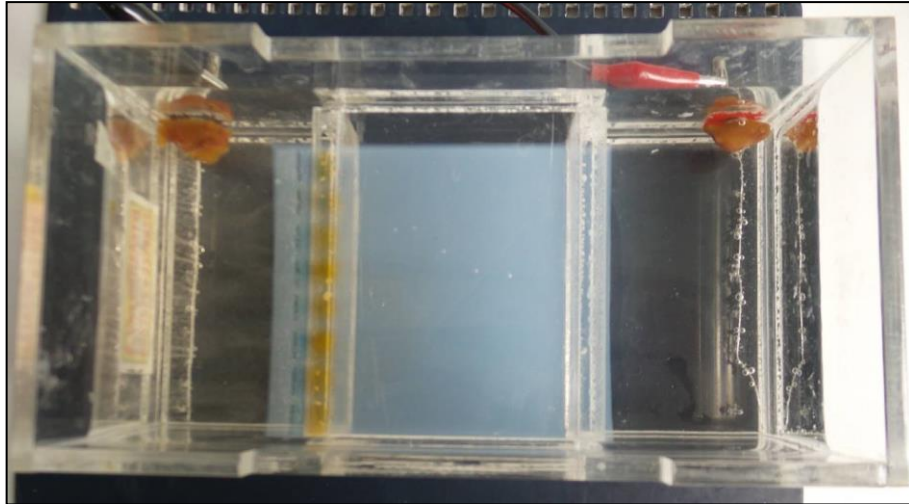
**Fig.09.** Flujograma para la extracción de plasmidios utilizando el método tradicional de Birnboim y Doly.



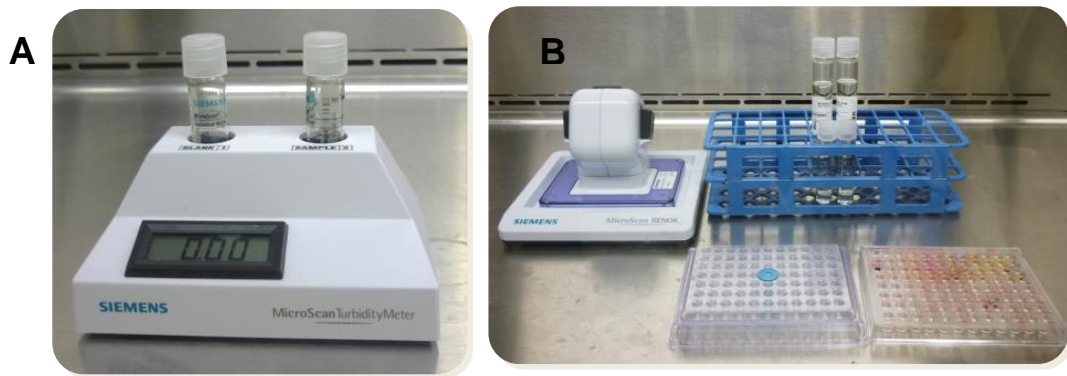
**Fig.10.** Flujograma para la extracción de plasmidios utilizando el método tradicional de Kado y Liu.



**Fig.11.** Flujograma para la extracción de plasmidios utilizando el método comercial QIAprep spin Miniprep Kit.



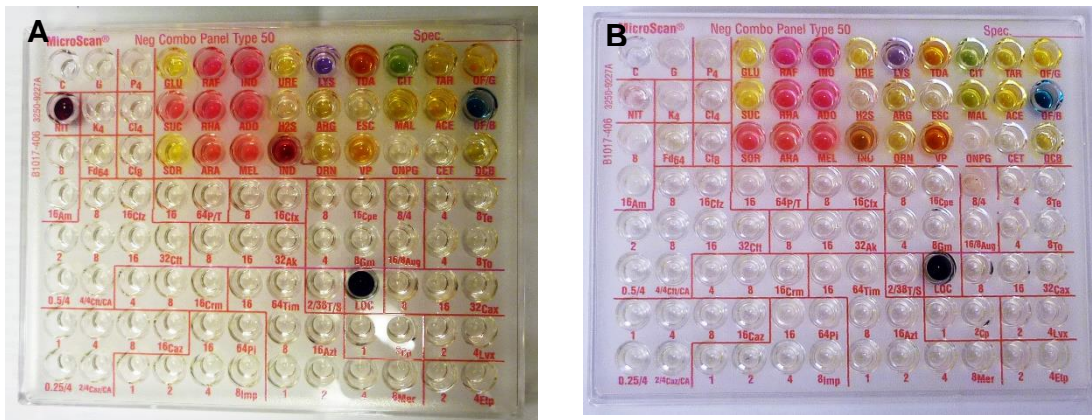
**Fig.12.** Electroforesis de plasmidios de la cepa *A. veronii* CTe-01 en cámara horizontal.



**Fig.13.** A. Turbidímetro MicroScan; B. Pipeta multicanal e inoculadores de plástico.



**Fig.14.** Equipo sistematizado WalkAway Siemens.



**Fig.15.** Paneles N° 50 utilizados para antibiogramas: A. *E. coli* BW25113; B *A. veronii* CTe-01.

## HOSPITAL AUGUSTO HERNANDEZ MENDOZA

### Informe Microbiológico

Nombre: ORMEÑO VASQUEZ PHILLIP	Muestra	Cte-01	Estado	Final
ID del paciente -	Origen	Aguas residuales	F. muestra	07/05/2015
Médico sol. -	Servicio	Cortesía		

#### COLORACION GRAM

Bacilos gram negativos

#### 01 *Aeromonas veronii*

Antimicrobiano	CIM	Interps	Antimicrobiano	CIM	Interps
Amicacina	<=8	S	Amox/A Clav	<=4/2	R
Ampicilina	>8	BLAC	Amp/Sulbactam	<=8/4	R
Aztreonam	<=8	S	Cefazolina	>=4	R
Cefepima	<=8	S	Ciprofloxacina	<=1	S
Cefotaxima	<=2	S	Clindamicina	>4	R
Cefotaxima/A Clavulánico	<=0.5	S	Daptomicina	>4	R
Cefoxitina	<=8	S	Eritromicina	>4	R
Ceftazidima	<=1	S	Gentamicina	<=4	S
Ceftazidima/A Clavulánico	<=0.25	S	Levofloxacina	<=1	S
Ceftriaxona	<=8	S	Linezolid	> 4	R
Cefuroxima	<=4	S	Moxifloxacina	<=0.5	S
Ertapenem	<=2	S	Nitrofurantoina	<=32	S
Imipenem	<=1	S	Oxacilina	>2	R
Levofloxacina	<=2	S	Penicilina	>8	BLAC
Meropenem	<=1	S	Rifampicina	<=1	S
Pip/Tazo	16	I	Synercid	> 2	R
Piperacilina	16	I	Trimet/Sulfa	>2/38	S
Tetraciclina	<=4	S	Vancomicina	>16	R
Ticar/A Clav	<=16	S			
Tobramicina	<=4	S			
Trimet/Sulfa	<=2/38	S			

S = Sensible	N/R = No Informado	Blanco = Dato no disponibles, o antimicrobiano no informable o no probado
I = Intermedio	--- = No Probado	ESBL = Beta-lactamasa de espectro ampliado
R = Resistente	TFG = Cepa Timidin-dependiente	Blac = Beta-lactamasa positiva
MIC = mcg/ml (mg/L)		
S* = Interpretación predictiva sensible		
R* = Interpretación predictiva resistente		
EBL? = Posible ESBL. Se precisan pruebas para confirmar ESBL frente a otras beta-lactamasas.		
IB = Beta-lactamasa Inducible. Aparece en lugar de ;Sensible; en especies portadoras de beta-lactamasas inducibles; pueden ser potencialmente resistentes a todos los antibióticos beta-lactámicos. Se recomienda monitorizar los pacientes durante/después de la terapia. Utilizar otro/combinado con antibióticos beta-lactámicos.		

Para aislamientos de LCR y sangre se recomienda una prueba de betalactamasa para las especies de enterococo.

Impresión 16/05/2015 10:35

Página 1 de 1

**Fig.16.** Susceptibilidad antimicrobiana en *A. veronii* CTe-01 (donador), utilizando el sistema automatizado MICROSCAN.



## HOSPITAL AUGUSTO HERNANDEZ MENDOZA

### Informe Microbiológico

Nombre: ORMEÑO VÁSQUEZ, PHILLIP	Muestra	BW25113	Estado	Final
ID del paciente -	Origen	Cepa Lab	F. muestra	14/06/2015
Médico sol. -	Servicio	Cortesía		

COLORACION GRAM  
Bacilos Gram Negativos /

#### 01 Escherichia coli CTe-01

Antimicrobiano	CIM	Interps	Antimicrobiano	CIM	Interps
Amicacina	<=8	S	Amox/A Clav	<=4/2	S
Aztreonam	<=8	S	Amp/Sulbactam	<=8/4	S
Cefepima	<=8	S	Ampicilina	<=8	S
Cefotaxima	<=2	S	Cefazolina	>=4	R
Cefotaxima/A Clavulánico	<=0.5	S	Ciprofloxacina	<=1	S
Cefoxitina	<=8	S	Clindamicina	>4	R
Ceftazidima	<=1	S	Daptomicina	>4	R
Ceftazidima/A Clavulánico	<=0.25	S	Eritromicina	2	I
Ceftriaxona	<=8	S	Gentamicina	<=4	S
Cefuroxima	<=4	S	Levofloxacina	<=1	S
Ertapenem	<=2	S	Linezolid	> 4	R
Imipenem	<=1	S	Moxifloxacina	<=0.5	S
Levofloxacina	<=2	S	Nitrofurantoina	<=32	S
Meropenem	<=1	S	Oxacilina	>2	R
Pip/Tazo	<=16	S	Penicilina	<2	S
Piperacilina	<=16	S	Rifampicina	>2	R
Tetraciclina	<=4	S	Synercid	> 2	R
Ticar/A Clav	<=16	S	Trimet/Sulfa	>2/38	S
Tobramicina	<=4	S	Vancomicina	>16	R
Trimet/Sulfa	<=2/38	S			

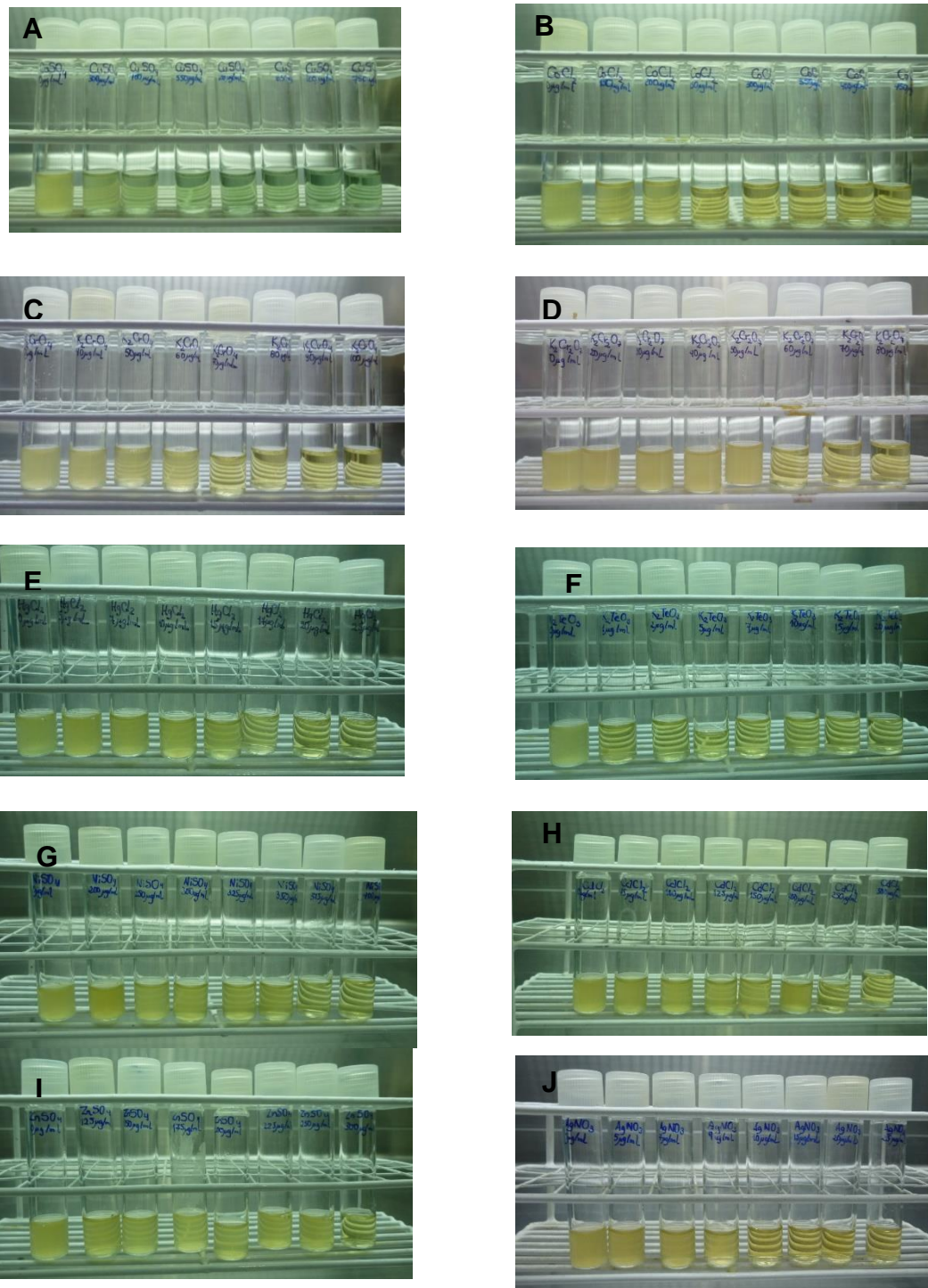
S = Sensible	NR = No Informado	Bianco = Dato no disponibles, o antimicrobiano no informable o no probado
I = Intermedio	--- = No Probado	ESBL = Beta-lactamasa de espectro ampliado
R = Resistente	TFG = Cepa Trimidin-dependiente	Blac = Beta-lactamasa positiva
MIC = mcg/ml (mg/L)		
S* = Interpretación predictiva sensible		
R* = Interpretación predictiva resistente		
EBL7 = Posible ESBL. Se precisan pruebas para confirmar ESBL frente a otras beta-lactamasas.		
IB = Beta-lactamasa Inducible. Aparece en lugar de ;Sensible; en especies portadoras de beta-lactamasas inducibles; pueden ser potencialmente resistentes a todos los antibióticos beta-lactámicos. Se recomienda monitorizar los pacientes durante/después de la terapia. Utilizar otro/combinado con antibióticos beta-lactámicos.		

Para aislamientos de LCR y sangre se recomienda una prueba de betalactamasa para las especies de enterococo.

Impresión 16/05/2015 10:35

Página 1 de 1

**Fig. 18.** Susceptibilidad antimicrobiana en *E. coli* Cte-01 (transconjugante), utilizando el sistema automatizado MICROSCAN.



**Fig.19.** Concentraciones mínimas inhibitorias a metales pesados en la cepa transconjugante *E. coli* CTe-01: A. Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) B. Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ); C. Cromato de potasio ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ); D. Dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ); E. Cloruro de Mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ); F. Telurito de potasio ( $\text{K}_2\text{TeO}_4$ ); G, Sulfato de níquel ( $\text{NiSO}_4$ ); H. Cloruro de cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ); I. Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ); J. Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ).

## **9.1. Composición de soluciones y reactivos:**

Todas las soluciones que se presentan fueron autoclavadas antes de ser utilizadas.

### **9.1.1. Medios de cultivo**

#### **Medio de Luria Bertani (LB)**

Para 1 L: Se disolvió 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y se ajustó a 1L con agua destilada.

#### **Medio verde brillante lactosa sacarosa rojo de fenol (BPLS)**

Para 1L: Se disolvió 57 g del medio en agua destilada.

#### **Medio agar sangre**

Para 1L: Se disolvió 40 g del medio base en agua destilada, luego de ser autoclavado fue suplementado con 6 % de sangre humana.

### **9.1.2. Soluciones para extracción de plasmidios**

#### **Buffer TE 50/50**

Tris HCl 1M, EDTA 0.5 M.

#### **Solución I (Método Kado y Liu):**

50 M Tris HCl (pH=8,0).

#### **Solución I (Método de Birnboim y Doly)**

25 mM Tris (pH= 8,0), 50 mM de glucosa, 1 mM EDTA, 5 mg/mL lisozima.

#### **Solución I (Método termólisis alcalina)**

25 mM Tris (pH= 8,0), 50 mM de glucosa, 10 mM EDTA, 4 mg/mL lisozima.

#### **Solución II (Método Kado y Liu)**

3% SDS, 50 mM Tris (pH= 12,6).

**Solución II (Método de Birnboim y Doly)**

1% SDS, 0,2 NaOH (se preparó al momento de un stock 10N).

**Solución II (Método termólisis alcalina)**

Tris base 50mM, pH 12.5, SDS 3% pH 12.6

**Solución III:**

Para 100 mL: Se agregó 29.5 mL de ácido acético glacial, se llevó a pH 4.8 con pellets de KOH (No se autoclava).

**Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico**

Para 100 mL: Se usó 50 g de cristales de fenol, 40 mL de cloroformo y 2 mL de alcohol isoamilico. Se almacenó en una botella de color caramelo a 4°C.

**Buffer de electroforesis (TAE concentración 50 x):**

Para 1 L: se disolvió 242 g Tris base in 750 mL H<sub>2</sub>O, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de 0.5M EDTA pH 8.0 y se llevó a 1L con H<sub>2</sub>O.