UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA” DE ICA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

“DETECCIÓN DE GENES *merA* Y *merB* EN *Pseudomonas spp.* RESISTENTES A MERCURIO AISLADAS DE AMBIENTES ACUÁTICOS”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

Bach. CHOQUE GUEVARA, RICARDO ENRIQUE.

ICA – PERÚ
2019

DEDICATORIA

Al esfuerzo y dedicación de mis padres, la culminación de esta etapa no le hace justicia aún a todo lo que nos han logrado brindar a mi hermana y a mí. Esperamos algún día, encontrar la manera de expresar la gratitud que ustedes merecen.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres por darme la vida y por haberme cuidado siempre, por los valores que sembraron en mí a base de amor y confianza, aquellos que me fueron imprescindibles en esta etapa. Ustedes son mi admiración y siempre estaré orgulloso de ser su hijo. A mi hermana Lucero, por preocuparte por mí y por estar en cada momento importante.

Gracias a mis asesores el Dr. Juan Carlos Tantaleán y la Dra. Rosa Altamirano. Sus enseñanzas y la motivación que me brindaron, fueron importantes en mi formación y madurez profesional. Así como su paciencia durante toda la etapa de realización de mi Tesis.

Gracias al laboratorio de análisis BIOSLAB y al laboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica de FARVET, por permitirme realizar parte de los procedimientos que fueron necesarios para la culminación de mi Tesis.

Gracias a todos mis profesores, que con sus experiencias me enseñaron lo bello de nuestra carrera. A mis amigos, que estuvieron desde el inicio de mi vida universitaria y los fui conociendo en el camino.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....i

AGRADECIMIENTOS.....ii

RESUMEN.....v

ABSTRACT.....vi

I. INTRODUCCIÓN..... 1

II. ANTECEDENTES..... 5

III. MATERIALES Y MÉTODOS..... 7

3.1. Material biológico..... 7

3.1.1. Cepas bacterianas..... 7

3.2.1. Toma de muestra..... 7

3.2.2. Procesamiento de la muestra..... 8

3.2.2.1 Enriquecimiento de la muestra..... 8

3.2.2.2. Siembra de muestra..... 8

3.2.3. Selección de especies pertenecientes al género *Pseudomonas* 8

3.2.4. Concentración mínima inhibitoria (MIC)..... 9

3.2.5. Diseño de partidores específicos para los genes *merA* y *merB*.. 9

3.2.6. Extracción de ADN genómico..... 10

3.2.7. Identificación molecular de las cepas resistentes a mercurio aisladas. 10

3.2.7.1. Amplificación del 16S mediante PCR..... 10

3.2.7.2. Secuenciación de los productos de PCR y análisis *In silico* de las secuencias. 12

3.2.8. Detección de genes *merA* y *merB* mediante 13

3.2.9. Electroforesis en gel de agarosa. 15

3.2.10. Prueba de volatilización de mercurio. 15

IV. RESULTADOS 17

V. DISCUSIÓN 23

VI. CONCLUSIONES 31

VII. RECOMENDACIONES 32

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 33

IX. ANEXOS 45

RESUMEN

La contaminación por mercurio ha generado graves problemas ambientales. Sin embargo, los microorganismos han desarrollado mecanismos genéticos de resistencia a este metal. En el presente trabajo, se realizó la búsqueda de genes *merA y merB* en *Pseudomonas* resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos.

Se obtuvieron aislamientos bacterianos de muestras de ambientes acuáticos de la Región Ica en agar sangre suplementado con cloruro de mercurio ($HgCl_2$). Posteriormente, para la identificación de las cepas, se realizaron pruebas bioquímicas y la secuenciación del gen ribosomal 16S. Para establecer el grado de resistencia a mercurio, se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos mercuriales, inorgánico ($HgCl_2$) y orgánico, acetato de fenilmercurio (PMA). Además, se realizaron ensayos de volatilización de mercurio.

Se aislaron 07 cepas de *Pseudomonas* resistentes a mercurio, 03 pertenecieron a la especie *P. monteilii* (PMe-03, SMe-08 y SMe-09) y 04 a la especie *P. pseudoalcaligenes* (CMe-08, CMe-15, CMe-16 y CMe-17). Así mismo, los niveles de resistencia a $HgCl_2$ oscilaron entre 750 µM y ≥2000 µM, mientras que la resistencia frente a PMA estuvo entre 32 µM y 300 µM. Se amplificó un fragmento de 461 pb correspondiente al gen *merA* en todas las cepas, mientras que se amplificó un fragmento de 502 pb sólo en las cepas PMe-03, CMe-15, CMe-16, SMe-08 y SMe-09, que corresponde al gen *merB.* Mediante el ensayo de volatilización, todas las cepas mostraron su capacidad de volatilizar $HgCl_2$.

En conclusión, el gen *merA* se detectó en todas las cepas de *Pseudomonas* resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos de Ica, mientras que el gen *merB* se detectó sólo en cinco de ellas.

Palabras clave: Mercurio, *Pseudomonas,* resistencia, volatilización.

ABSTRACT

Mercury contamination has generated serious environmental problems. However, microorganisms have developed genetic mechanisms that confer resistance to this metal. In the present study, the search for *merA* and *merB* genes was carried out in mercury resistant *Pseudomonas* isolated from aquatic environments.

Isolates from aquatic environments of the Ica Region were performed on blood agar supplemented with mercury chloride ($HgCl_2$). Subsequently, biochemical tests and 16S ribosomal gene sequencing were performed to identify the strains. To establish its degree of mercury resistance, minimum inhibitory concentration (MIC) tests were performed using the inorganic mercury ($HgCl_2$); and the organic mercury, phenyl mercury acetate (PMA). In addition, mercury volatilization tests were performed.

07 strains of mercury resistant *Pseudomonas* were isolated, 03 were identified as *P. monteilii* (PMe-03, SMe-08 and SMe-09), and 04 as *P. pseudoalcaligenes* (CMe-08, CMe-15, CMe-16 y CMe-17). Likewise, the levels of resistance to $HgCl_2$ ranged between 750 µM and ≥2000 µM, while the resistance against PMA was between 32 µM and 300 µM. A fragment of 461 bp corresponding to the *merA* gene was amplified in all strains, while a fragment of 502 bp was amplified only in strains PMe-03, CMe-15, CMe-16, SMe-08 and SMe-09, which corresponds to the *merB* gene. Through the volatilization test, all strains showed their ability to volatilize $HgCl_2$.

In conclusion, *merA* gene was detected in all mercury resistant *Pseudomonas* strains isolated from aquatic environment of the Ica Region, while *merB* gene was detected only on five of them.

Key words: Mercury, *Pseudomonas,* resistance, volatilization.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Pseudomonas* fue aislado por primera vez hace más de 100 años (Migula, 1894). Desde entonces se describen como bacterias aerobias Gram negativas, rectas o ligeramente curvadas, móviles por uno o diversos flagelos polares, con especies oxidasas positivas o negativas (Palleroni, 2015). Las especies pertenecientes a este género son metabólicamente versátiles y con requerimientos nutricionales sencillos, lo que les permite habitar diversos ecosistemas terrestres y acuáticos (de Oliveira, 2015). El género consiste en más de 240 especies (Andreani, 2017), muchas de las cuales tienen un rol importante en la biosfera como microbiota rizosférica (Georgieva y col., 2018), degradadores de compuestos orgánicos y aromáticos (Nwinyi y col., 2016), resistentes a antibióticos y a metales pesados (Boeris y col., 2016) (Chen y col., 2018) y como patógenos humanos (Maliniak y col., 2016). Convirtiéndose así, en uno de los géneros bacterianos en los que existe un mayor interés por su potencial aplicación en diversos procesos biotecnológicos.

Se conoce ampliamente que los microorganismos poseen una gran facilidad para la adaptación a ambientes adversos, esto debido a su plasticidad genética y fisiológica que, ayudado por el continuo curso de la evolución, ha permitido desarrollar diversos mecanismos relacionados a la sobrevivencia, proliferación, tolerancia y utilización de diversos recursos (Vivek y col., 2011). La toxicidad ocasionada por los metales pesados ha sido siempre una de las principales barreras para la supervivencia de los microorganismos (Sillampää M., 2009). Sin embargo, las bacterias han logrado desarrollar múltiples mecanismos para lidiar con estos impedimentos, como son: el bloqueo de la entrada de los iones tóxicos a la célula; el eflujo activo del ion metálico, por sistemas específicos codificados

por genes de resistencia; el secuestro físico intracelular por proteínas específicas de unión, el secuestro extracelular por polisacáridos en la pared celular y la conversión enzimática del metal en formas menos tóxicas o volátiles (Naguib, 2018).

La contaminación por metales pesados se ha convertido en un problema de interés actual en el campo ambiental así como en el de la salud pública, esto debido a su naturaleza altamente tóxica. Entre los metales pesados más conocidos se encuentran el mercurio, el plomo, el cadmio y el arsénico; de los cuales el mercurio es el que genera mayor preocupación, debido a que es considerado el sexto de entre los diez elementos más tóxicos (Nascimento, 2003) por su alta capacidad de unión al grupo sulfhídrico de los residuos de cisteína en proteínas y enzimas esenciales, lo que ocasiona la inactivación y el bloqueo de funciones celulares vitales (Vivek y col., 2011). Además, debido a la bioacumulación del mercurio a través de la cadena trófica; éste metal genera problemas emergentes muy serios como enfermedades al hígado, corazón, neurodegenerativas y congénitas (Mahbub K., 2017). Si bien el mercurio forma parte de la corteza terrestre, éste se encuentra naturalmente en bajas concentraciones; aproximadamente a 0.5 mg/kg (Canil y col., 2015), aunque la mayor parte de la emisión de mercurio al ambiente ocurre mediante procesos naturales, casi el 50% del total es emitido a través de actividades antropogénicas como el uso de combustibles fósiles y la minería del oro (Pirrone y col., 2010).

El grado de toxicidad del mercurio está en función de la forma del mismo, siendo los compuestos organomercuriales, en donde está incluido el metilmercurio, los que tienen un mayor grado de toxicidad. Por otra parte, las

formas inorgánicas y elementales son las menos tóxicas y las más volátiles, respectivamente (Segade y col., 2010).

En algunas regiones de nuestro país, debido a la actividad minera informal, se ha generado una alta contaminación por mercurio. Son conocidos los sucesos de la región amazónica de Madre de Dios (MINAM, 2012) y de igual forma, en la Región Ica existen reportes de contaminación por mercurio en las provincia de Palpa y Nazca, principalmente en los distritos de Tulin y Saramarca (Bazan, 2011). Esta actividad minera artesanal contaminante se ha desarrollado desde hace muchos años (Loaiza, 2008).

En los últimos años se ha estudiado ampliamente un mecanismo de resistencia bacteriana a mercurio mediado por el operon *mer*. Este es uno de los sistemas bacterianos de resistencia a metales pesados más conocidos, con una alta tasa de transformación del elemento tóxico en formas no tóxicas (Schaefer y col., 2004). La localización de este “cluster” genético en el genoma bacteriano ha sido documentada en cromosomas (Zeng y col., 2010), plásmidos (Ramírez-Días y col., 2011; Hernández-Ramírez y col., 2018) y transposones (Petrovski y col., 2010), por lo que este sistema está ampliamente distribuido. Además, se encuentra tanto en especies Gram positivas como *Bacillus sp*. (Figueiredo y col., 2014) y Gram negativas como *Pseudomonas sp*., *Escherichia coli sp*. y *Vibrio sp*. (Dash y col., 2017), provenientes de muestras ambientales (Chatziefthimiou y col., 2007; Ramond y col., 2008) o de muestras clínicas (Pundogar y col., 2014).

Por otro lado, estudios de secuenciamento del operon *mer* han demostrado la presencia de diversos genes, lo que ha permitido determinar el mecanismo molecular de la resistencia a mercurio. Dentro de ellos destacan los genes

estructurales *merB*, que codifica la enzima monomérica liaza organomercurial, que rompe el enlace covalente Hg-C liberando mercurio inorgánico Hg (II), y *merA* que codifica una enzima reductasa mercurial, que cataliza la conversión del mercurio inorgánico en volátil Hg(0). Además, los genes *merR*, codificante de la proteína represora sensible al metal y *merT* que codifica una proteína de membrana encargada de transportar el mercurio hacia el interior de la célula (Naguib y col., 2018).

Algunas bacterias poseen un operon *mer* de bajo espectro, ellas contienen sólo el gen *merA*. Otros poseen además el gen *merB* permitiéndoles descomponer especies de mercurio más tóxicas, además de las inorgánicas, estos son conocidos como operones *mer* de amplio espectro. Sin embargo, se ha documentado que el gen *merB* es más común en bacterias Gram negativas que en Gram positivas (Dash y col., 2012).

De este modo, en el presente estudio se planteó detectar los genes *merA* y *merB* en *Pseudomonas spp.* resistentes a mercurio aisladas de ambientes acuáticos. Para esto se propusieron los siguientes objetivos: Aislar cepas bacterianas en base a su tolerancia a mercurio; determinar las especies bacterianas en base a la secuenciación del gen 16S ADNr; detectar los genes *merA* y *merB* en cada cepa aislada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

II. ANTECEDENTES

A nivel internacional se documentaron los siguientes estudios:

Henriques y col. (2016) en Portugal, lograron aislar un total de 137 bacterias Gram negativas a partir de muestras de pantanos salados contaminados y no contaminados. El género predominante en las áreas contaminadas correspondieron al género *Pseudomonas,* con grados de resistencia a mercurio ($HgCl_2$) de hasta 1000 µM, así como a otros metales y a diversos antibióticos. Todos los aislados pertenecientes a este género fueron positivos para la amplificación del gen *merA.*

Jan y col., (2016) en India, aislaron 18 bacterias de aguas contaminadas con mercurio para evaluar su tolerancia a Cloruro de mercurio ($HgCl_2$) y buscar genes del operon *mer* relacionados con el transporte del metal a través de la membrana bacteriana (*merP* y *merT)* mediante PCR. Del total de aislados, se identificaron cinco especies del género *Pseudomonas* correspondientes a las especies *Pseudomonas stutzeri y Pseudomonas aeruginosa,* capaces de tolerar una concentración de hasta 1000 µM de $HgCl_2$ además de poseer los genes *merP* y *merT.*

Giovanella y col. (2015) en Brasil, realizaron aislamientos a partir de sedimentos de cuerpos de agua contaminados con desechos petroquímicos. Obtuvieron 8 aislados de bacterias Gram negativas altamente resistentes al mercurio, seis de ellas pertenecientes al género *Pseudomonas,* con valores MIC para $HgCl_2$ entre 250 µM y 920 µM. Realizaron también la búsqueda del gen de la enzima mercurio reductasa *merA,* resultando positiva para 4 de las cepas de *Pseudomonas* aisladas.

Meredith y col., (2012) en Estados Unidos, aislaron 29 bacterias del tracto gastrointestinal de trucha resistentes a antibióticos y a mercurio, de ellas una perteneció al género *Pseudomonas.* Los valores MIC fueron de 100 µM para $HgCl_2$ y >16 µM para acetato de fenilmercurio (PMA). No se detectó el gen *merA* por PCR en la cepa *Pseudomonas sp.*

Zhang y col. (2011) en China, caracterizaron una cepa *Pseudomonas putida* aislada de ambiente marino resistente a mercurio con un valor MIC de hasta 280 µM de $HgCl_2$. Demostraron la presencia de los genes *merA, merR, merT, merP y merC* en el cromosoma bacteriano y la capacidad de volatilizar casi el 100% del mercurio presente en el medio de cultivo, mediante absorción atómica. Además, determinaron que el pH óptimo para el crecimiento de *Pseudomonas putida* y la expresión del gen *merA* diferían considerablemente, siendo de 8.5 y 5 respectivamente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Cepas bacterianas

- Cepa bacteriana *Aeromonas veronii* CTe-01 perteneciente al cepario del laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad San Luis Gonzaga de Ica.
- Cepa comercial *E. coli* BW25113 usada como control negativo en los ensayos, gentilmente proporcionada por el Dr. Claudio Vásquez de la Universidad de Santiago de Chile.

3.2. Métodos

3.2.1. Toma de muestra

Se colectaron volúmenes de 200 mL de muestras de: agua de mar de Paracas – Pisco (13°49'59.8"S 76°14'58.8"W), relaves mineros de Saramarca – Palpa (14°29'34.6"S 75°05'54.0"W) y aguas residuales de la laguna de oxidación de Cachiche – Ica (14°07'04.8"S 75°43'37.5"W) en frascos Schott de 250 ml estériles. Éstas fueron trasladadas al laboratorio dentro de las primeras 4 horas a partir de la toma de muestra, siguiendo cadena de frio (< 10°C) en un conservador.

3.2.2. Procesamiento de la muestra

3.2.2.1 Enriquecimiento de la muestra

Se utilizó la metodología descrita por Bhowmik y col. (2009). Se agregó 10 mL de la muestra de agua o 5 g de sedimento en 10 mL de agua peptonada alcalina 1 % (pH 8,6) y se incubó a 37 °C durante 24 horas.

3.2.2.2. Siembra de muestra

Pasado el tiempo de enriquecimiento, una asada de muestra enriquecida se sembró por estría y agotamiento en agar sangre suplementado con $HgCl_2$ (10 µg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas (ver anexos Flujograma 01 y Figura 06).

3.2.3. Selección de especies pertenecientes al género *Pseudomonas*

Se seleccionaron las colonias parduzcas, redondas, convexas, de 1 a 3 mm, hemolíticas o no, móviles, Gram negativas, oxidasa y catalasa positivas o negativas. Las cepas seleccionadas se sembraron en 2 mL de caldo LB suplementado con $HgCl_2$ (5 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Pasado el tiempo de incubación, los caldos fueron conservados a 5 °C para análisis posteriores.

3.2.4. Concentración mínima inhibitoria (MIC)

La obtención de los valores de MIC se realizó siguiendo la metodología descrita por Wang y *col.* (1989). Brevemente, cada cepa bacteriana se sembró en 3 mL de caldo LB y se incubó toda la noche a 37 °C. Luego se agregó 5 µL de cada cultivo en placas con agar BHI suplementado con diferentes concentraciones de $HgCl_2$ (en µM: 0, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 y 2000) y de acetato de fenilmercurio - PMA (en µM: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32. 64, 128, 200 y 300), se utilizó la cepa *E. coli* BW25113 como control negativo, la cual carece de los genes de resistencia a mercurio *merA* y *merB.* Las placas se incubaron hasta por 48 horas a 37 °C, donde la concentración mínima inhibitoria se determinó como la concentración de $HgCl_2$ o PMA a partir de la cual ya no se observó crecimiento bacteriano (Ver Anexos Flujograma 02).

3.2.5. Diseño de partidores específicos para los genes *merA* y *merB*

Se obtuvieron secuencias completas de los genes *merA* y *merB* pertenecientes a *Pseudomonas* en la base de datos del National Center for Biotechnology Information - NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (ver Anexos Figura 07). Estas fueron guardadas en formato FASTA para diseñar los partidores en el programa PRIMER3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) (Ver Anexos Figura 08). Se establecieron los siguientes parámetros: Tamaño de partidores, con un mínimo de 18 pares de bases (pb) y un máximo

de 22 pb; temperatura de melting, entre 57 °C y 63 °C y un producto de PCR esperado correspondiente al tamaño del gen completo; los partidores fueron generados automáticamente por el programa en base a los parámetros establecidos.

3.2.6. Extracción de ADN genómico

Las cepas seleccionadas y purificadas fueron sembradas en caldo LB suplementado con $HgCl_2$ (10 µg/mL) y fueron incubadas a 37°C toda la noche. Pasado el tiempo de incubación se extrajo una alícuota de 1 mL por cada cepa en tupos Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugaron a 8000 g por 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se conservaron los precipitados celulares, los cuales fueron procesados en el sistema de extracción automatizado de ácidos nucleicos QIAcube para la extracción de ADN total (ver Anexos Figura 11).

3.2.7. Identificación molecular de las cepas resistentes a mercurio aisladas.

3.2.7.1. Amplificación del 16S mediante PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC100, usando los partidores universales 16S-F: 5´- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3´,

16S-R: 5′- GGTTACCTTGTTACGACTT -3′ y el ADN genómico extraído anteriormente a cada una de las cepas.

La reacción de PCR se detalla en la Tabla 01.

Tabla 01. Componentes de la reacción de PCR para amplificar genes ribosomales 16 S.

Reactivos	Volumen (µL)
H_2O libre de nucleasas	9.5
PCR master mix (2x)	12.5
Partidor - F (20 pmol/µL)	1
Partidor - R (20 pmol/µL)	1
ADN total (0.1 ug/µL)	1
Volumen final	**25 µL**

El programa de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial (pre-PCR), a 94 °C por 5 minutos, luego 30 ciclos de PCR (desnaturalización: 94 °C por 1 minuto; hibridación de partidores a 47 °C por 45 segundos; extensión a 72 °C por 1 minuto) y extensión final (post-PCR) a 72 °C por 5 minutos. Para confirmar la correcta amplificación del gen ribosomal 16S, una alícuota de cada uno de los productos de PCR (1500 pb) fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados como se describe más adelante.

3.2.7.2. Secuenciación de los productos de PCR y análisis *In sílico* de las secuencias.

La identificación de las cepas bacterianas se realizó en base a las secuencias del gen ribosomal 16S y se siguió el análisis *in sílico* siguiente: Las secuencias fueron recibidas en formato texto y los cromatogramas en formato Snap viewer y PDF. La secuencia reversa fue procesada con el programa REVSEQ (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/revseq) (ver Anexos Figura 12). para obtener una secuencia directa adicional. Las 2 secuencias directas de cada cepa fueron alineadas con el programa CLUSTAL OMEGA (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (ver Anexos Figura 10), para obtener una secuencia consenso. En algunos casos se utilizó la información del cromatograma en formato Snap viewer para hacer las correcciones necesarias a las secuencias. Finalmente, cada secuencia procesada se ingresó al programa BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Ver Anexos Figura 09) para la búsqueda de secuencias similares en la base de datos. La especie asignada a cada una de las cepas se basó en las secuencias de mayor similitud.

3.2.8. Detección de genes *merA* y *merB* mediante PCR.

La detección de los genes *merA* y *merB* se realizó utilizando ADN genómico de cada una de las cepas, extraídas previamente y los partidores diseñados en este estudio: MerA-F 5'- CCATCTAAAAATCACCGGCA -3´ y MerA-R 5'- GCAGCAGGACARTTGYTTSA -3' para el gen *merA*, y MerB-F 5'- GATGACATGGTCTGCAACAGA -3' y MerB-R 5- TGAAAGGAGATGGAACCATGA -3' para el gen *merB.* Para estos partidores se estableció el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial (pre-PCR), a 98 °C por 30 segundos, luego 30 ciclos de PCR (desnaturalización: 98 °C por 10 segundos; hibridación de partidores a 64.1 °C por 30 segundos; extensión a 72 °C por 30 segundos) y una extensión final (post-PCR) a 72 °C por 2 minutos.

Por otro lado, se realizaron amplificaciones de segmentos de ambos genes utilizando los partidores: MerA.1F 5'- CGACTGCACCGACCAGCC-3 y MerA.1R 5'-AAGGTCTGCGCCGCGAGCT-3', diseñados por Pérez-Valdespino y col. (2013), el producto de PCR esperado fue de 461 pb. Asimismo, se utilizaron los partidores MerB.2F 5'- TCGCCCCATATATTTTAGAAC – 3' y MerB2.R 5'- GTCGGGACAGATGCAAAGAAA – 3', diseñados por Liebert y col. (1997), el producto de PCR esperado fue de 502 pb. El protocolo de PCR para ambos partidores fue el siguiente: desnaturalización inicial (pre-PCR), a 98 °C por 30 segundos, luego 30 ciclos de PCR

(desnaturalización: 98 °C por 10 segundos; hibridación de partidores a 57 °C por 30 segundos; extensión a 72 °C por 30 segundos) y una extensión final (post-PCR) a 72 °C por 2 minutos.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® pro de Eppendorf (ver Anexos Figura 13) y en un volumen de reacción de 20 µL diseñado como se indica en la Tabla 02.

Tabla 02. Componentes de la reacción de PCR para amplificar genes *merA* y *merB*.

Reactivos	**Volumen (µL)**
H_2O libre de nucleasas	6
PCR master mix (2x)	10
Partidor-F (10 µM)	1
Partidor-R (10 µM)	1
ADN genómico	2
Volumen final	**20 µL**

Como control negativo se utilizó el ADN genómico de la cepa susceptible a mercurio BW25113. La amplificación de los genes se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa como se describe más adelante.

3.2.9. Electroforesis en gel de agarosa.

Se preparó geles de Agarosa al 1% en buffer TAE (TRIS + Ácido acético + EDTA) al que se le añadió 1 µL de SYBR™ Safe stain por cada 10 mL de gel, posteriormente se licuó en horno microondas por 1 minuto y se agregó al molde para geles, donde se dejó enfriar por 15 minutos. Luego, 10 µL de los productos de PCR se mezclaron con 2.5 µL de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer y fueron cargados, se utilizó como marcador de peso molecular 5 µL de GeneRuler™ DNA Ladder Mix. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis horizontal a 60V por 60 minutos, luego se retiró el gel y las bandas fueron visualizadas en un fotodocumentador AZURE C-600 (ver Anexos Figura 14).

3.2.10. Prueba de volatilización de mercurio.

Las cepas resistentes a mercurio aisladas fueron evaluadas para determinar su capacidad de volatilización según lo descrito por Nakamura y Nakahara (1988). Para esto las cepas seleccionadas fueron sembradas en placas con agar nutritivo suplementadas con 5 µg/mL de $HgCl_2$ e incubadas a 37 °C por 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se seleccionó una colonia del cultivo de cada cepa y estas fueron diluidas en buffer fosfato 0.07 M (pH 7.0) conteniendo 0.5 mM de EDTA, 0.2 mM de acetato de magnesio, 5 mM de tioglicolato de sodio y 50 µg de $HgCl_2$ por mL. Posteriormente, se agregó 100 µL de cada colonia diluida en una microplaca de 96 pocillos, la cual fue cubierta con una lámina de

rayos X y se incubó a 37 °C hasta por 24 horas en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, la lámina de rayos X fue trasladada a un cuarto oscuro y se introdujo en 100 mL de solución de revelado durante 1 minuto, luego se enjuagó por 5 minutos en 100 mL de agua destilada y finalmente se fijó por 1 minuto en 100 mL de solución de fijación. La volatilización de mercurio se determinó cualitativamente mediante la aparición de manchas oscuras en la lámina de rayos X revelada.

IV. RESULTADOS

Tabla 03. Cepas resistentes a mercurio aisladas de las diferentes fuentes acuáticas de Ica.

Cepa	Origen	Tipo de muestra
PMe – 03	Paracas	Agua
CMe – 08	Laguna de oxidación de Cachiche	Afluente
CMe – 15	Laguna de oxidación de Cachiche	Efluente
CMe – 16	Laguna de oxidación de Cachiche	Afluente
CMe – 17	Laguna de oxidación de Cachiche	Afluente
SMe – 08	Zona de minería artesanal de Saramarca	Sedimento
SMe – 09	Zona de minería artesanal de Saramarca	Sedimento

Tabla 04. Características fenotípicas observadas en las cepas seleccionadas.

Cepa	Hemólisis	Oxidasa	Catalasa	Movilidad
PMe – 03	β	-	-	+
CMe – 08	α	+	+	+
CMe – 15	α	+	+	+
CMe – 16	α	+	+	+
CMe – 17	β	+	+	+
SMe – 08	α	+	+	+
SMe – 09	α	+	+	+

Tabla 05. Similitud entre las secuencias del gen ribosomal 16S de cada una de las cepas resistentes a mercurio aisladas y secuencias disponibles en la base de datos de GenBank.

Cepa	Especie con mayor similitud	Expentancia	Identidad	Acceso a Genbank de la cepa similar
PMe-03	*Pseudomonas monteilii*	0.0	97%	NR_024910.1
CMe-08	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	0.0	99%	NR_037000.1
CMe-15	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	0.0	99%	NR_113653.1
CMe-16	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	0.0	99%	NR_037000.1
CMe-17	*Pseudomonas pseudoalcaligenes*	0.0	99%	NR_113653.1
SMe-08	*Pseudomonas monteilii*	0.0	99%	NR_024910.1
SMe-09	*Pseudomonas monteilii*	0.0	99%	NR_114224.1

Tabla 06. Nueva denominación para las cepas aisladas después de su identificación en base a la secuenciación del gen ribosomal 16S

Codificación previa	Nueva denominación
PMe-03	*P. monteilii* PMe - 03
CMe-08	*P. pseudoalcaligenes* CMe - 08
CMe-15	*P. pseudoalcaligenes* CMe - 15
CMe-16	*P. pseudoalcaligenes* CMe - 16
CMe-17	*P. pseudoalcaligenes* CMe - 17
SMe-08	*P. monteilii* SMe - 08
SMe-09	*P. monteilii* SMe - 09

Tabla 07. Valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de los compuestos mercuriales inorgánicos ($HgCl_2$) y orgánicos (PMA) para cada una de las cepas bacterianas evaluadas.

Cepa	MIC (µM)	
	$HgCl_2$	**PMA**
P. monteilii PMe - 03	≥ 2000	300
P. pseudoalcaligenes CMe - 08	1250	32
P. pseudoalcaligenes CMe - 15	1250	64
P. pseudoalcaligenes CMe - 16	750	32
P. pseudoalcaligenes CMe - 17	750	128
P. monteilii SMe - 08	1500	300
P. monteilii SMe - 09	1750	300
Escherichia coli BW 25113	0	32

$HgCl_2$: Cloruro de mercurio
PMA: Acetato de fenilmercurio.

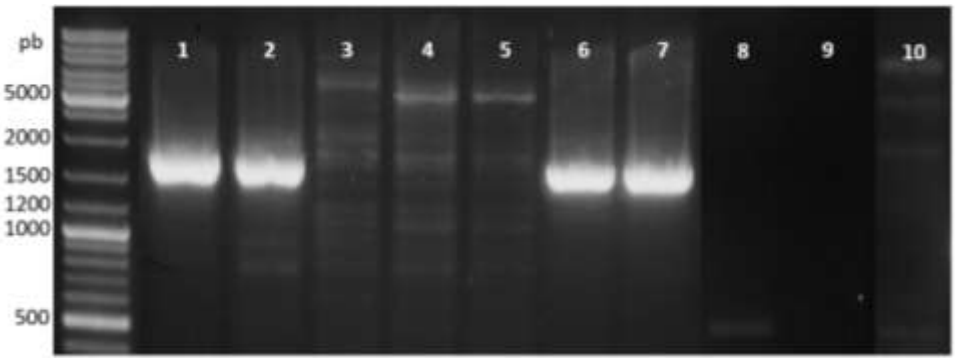


Figura 01. Detección del gen *merA* utilizando los partidores MerA-F/MerA-R, tamaño de amplicón esperado,1600 pb. **1:** *P. monteilii* PMe-03; **2:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-08; **3:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-15; **4:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-16; **5:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-17; **6:** *P. monteilii* SMe-08; **7:** *P. monteilii* SMe-09; **8:** *E.coli* BW25113; **9:** control H_2O; **10:** *Aeromonas veronii* CTe-01.

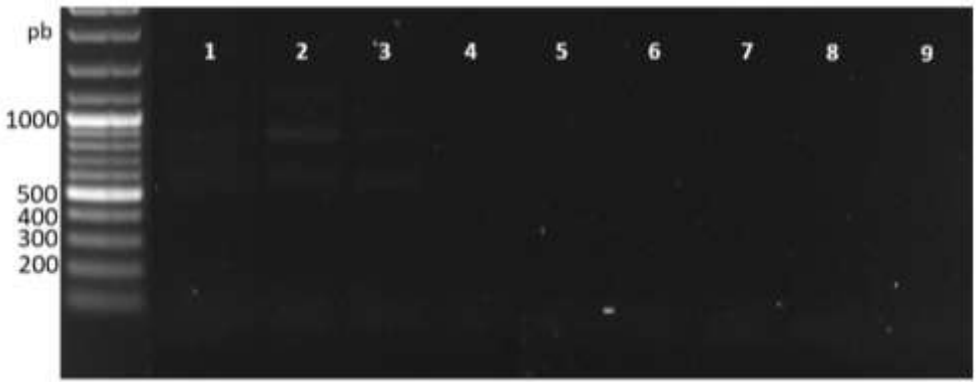


Figura 02. Detección del gen *merB* utilizando los partidores MerB-F/MerB-R, tamaño de amplicón esperado, 600 pb. **1:** *P. monteilii* PMe-03; **2:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-08; **3:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-15; **4:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-16; **5:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-17; **6:** *P. monteilii* SMe-08; **7:** *P. monteilii* SMe-09; **8:** *E.coli* BW25113; **9:** Control H_2O.

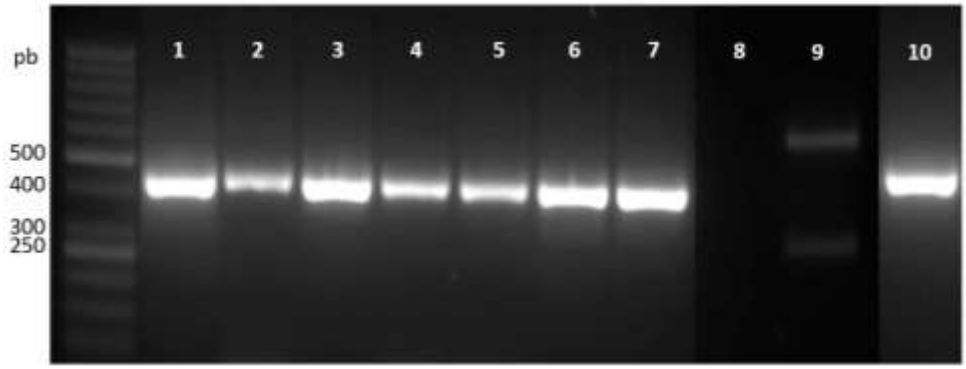


Figura 03. Detección del gen *merA* utilizando los partidores MerA.1F/MerA.1R, tamaño de amplicón esperado, 461 pb. **1:** *P. monteilii* PMe-03; **2:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-08; **3:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-15; **4:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-16; **5:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-17; **6:** *P. monteilii* SMe-08; **7:** *P. monteilii* SMe-09; **8:** *E.coli* BW25113; **9:** control H_2O; **10:** *Aeromonas veronii* CTe-01.

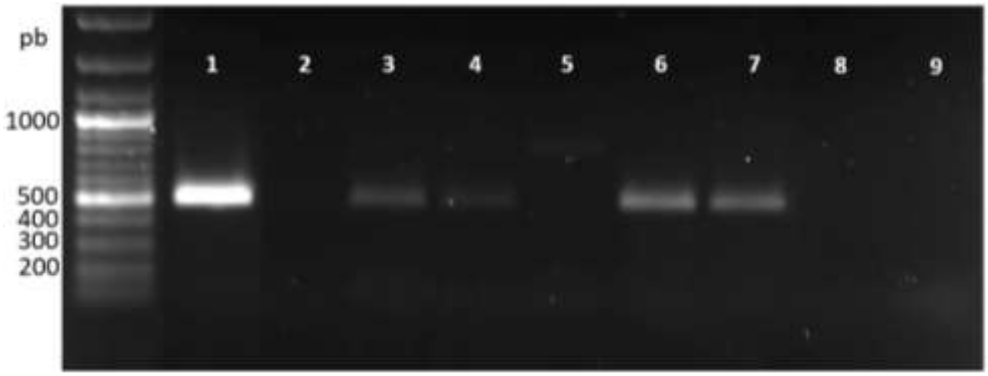


Figura 04. Detección del gen *merB* utilizando los partidores MerB.2F/MerB.2R, tamaño de amplicón esperado, 502 pb. **1:** *P. monteilii* PMe-03; **2:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-08; **3:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-15; **4:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-16; **5:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-17; **6:** *P. monteilii* SMe-08; **7:** *P. monteilii* SMe-09; **8:** *E.coli* BW25113; **9:** control H_2O.

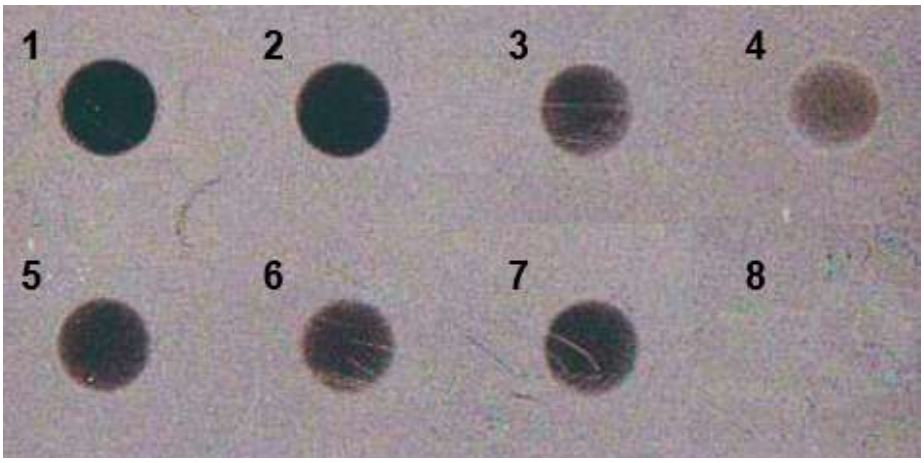


Figura 05. Marca en la película de rayos X por el mercurio volátil derivado del compuesto mercurial inorgánico $HgCl_2$. **1:** *P. monteilii* PMe-03; **2:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-08; **3:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-15; **4:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-16; **5:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-17; **6:** *P. monteilii* SMe-08; **7:** *P. monteilii* SMe-09; **8:** *E.coli* BW25113.

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se aislaron 7 cepas Gram negativas resistentes a $HgCl_2$ (15 µg/mL) de ambientes acuáticos de la Región Ica (ver Anexos Figura. 15). Del ellas, una fue aislada de las muestras obtenidas de la zona de Paracas, 4 de las muestras de la laguna de oxidación de Cachiche y 2 de las muestras de la zona de minería artesanal de Saramarca – Palpa (Tabla 03). El aislamiento de estas cepas tanto de zonas con baja (Paracas) y alta polución (Laguna de oxidación de Cachiche y Saramarca) confirma la amplia distribución ambiental y geográfica de la resistencia bacteriana a mercurio (Osborn y col., 1997). Esto debido a que los genes que confieren la resistencia se encuentran principalmente en elementos genéticos móviles como plásmidos (Hernández-Ramírez y col., 2018) y transposones (Petrovski y col., 2010).

Inicialmente se intentó realizar el aislamiento de las cepas directamente en medios selectivos como agar MacConkey y Cetrimide suplementados con $HgCl_2$. Sin embargo, no se obtuvieron aislados durante este proceso. Probablemente, los inhibidores de estos medios en adición al mercurio agregado en ellos ejercerían una presión selectiva demasiado alta para permitir el crecimiento de microorganismos. Por este motivo, se utilizó agar sangre suplementado con $HgCl_2$ para los aislamientos, un medio enriquecido que ha mostrado favorecer la resistencia a mercurio (Pike R. y col. 2002) (ver Anexos Figura 06).

Para determinar si las cepas aisladas se trataban de posibles *Pseudomonas,* se realizaron pruebas fenotípicas a cada una de ellas. Las guías de identificación

fenotípica para *Pseudomonas* están mayormente orientadas a cepas aisladas de muestras clínicas (Instituto Nacional de Salud, 2005) por lo que se realizaron las pruebas indicadas en la Tabla 04. Además se realizaron cultivos en agar MacConkey (ver Anexos Figura 15) y Cetrimide (ver Anexos Figura 16).

A pesar de haber realizado la caracterización fenotípica, esta no fue considerada determinante para establecer a las cepas como *Pseudomonas,* ya que al ser aislados medioambientales estas poseen un mayor grado de diversidad metabólica, atribuido principalmente a que no se encuentran totalmente adaptadas a condiciones de cultivos ricos en nutrientes, así como a la presencia de plásmidos que pueden conferirle características fenotípicas que no se observan en las cepas de referencia taxonómicas (Boivin-Jahns V. y col., 1995). Por este motivo, se realizó la identificación molecular mediante la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S (Ver anexos Figura 17), debido a que se conoce que es un gen ampliamente distribuido entre las bacterias y que además, presenta regiones variables específicas entre especies (Weisburg y col., 1991). De este modo, en base a las secuencias obtenidas para cada cepa (ver Anexos Figura 18 - Figura 24) se identificó a todos los aislados como pertenecientes al género *Pseudomonas*, con dos especies diferenciadas: *P. pseudoalcaligenes* y *P. monteilii* (Tabla 05).

La presencia de especies del género *Pseudomonas* en los aislados confirman la conocida ubicuidad de este grupo bacteriano en diversos ambientes como lagos, ríos, estuarios y suelos (Pandya y Desai, 2014) (Potivichayanon y col., 2017) (Ma y col. 2012). En relación a la procedencia de cada aislado, un

estudio realizado por Liu y col. (2016) documenta el aislamiento de *P. monteilii* de ambientes marinos. Sin embargo, no se tiene reportes del aislamiento de esta especie en zonas de actividad minera, como en el caso de las cepas *P. monteilii* SMe-08 y *P. monteilii* SM-09. De igual forma, no existen reportes del aislamiento de *P. pseudoalcaligenes* de aguas residuales, como fue el caso de las cepas *P. pseudoalcaligenes* CMe-08, *P. pseudoalcaligenes* CMe-15, *P. pseudoalcaligenes* CMe-16 y *P. pseudoalcaligenes* CMe-17.

Mediante los ensayos de concentración mínima inhibitoria se determinó los diversos niveles de resistencia al compuesto inorgánico mercurial $HgCl_2$, siendo la cepa *P. monteilii* PMe-03 la que mostró el mayor grado de resistencia con un valor MIC ≥ 2000 µM y las cepas *P. pseudoalcaligenes* CMe-16 y *P. pseudoalcaligenes* CMe-17 las que mostraron el menor grado de resistencia, con un valor MIC de 750 µM (Tabla 07). En relación al compuesto mercurial orgánico PMA, se observaron grados menores de resistencia, con valores MIC que variaron desde 32 µM para las cepas *P. pseudoalcalígenes* CMe-08 y *P. pseudoalcalígenes* CMe-16; hasta 300 µM para las cepas *P. monteilii* PMe-03, *P. monteilii* SMe-08 y *P. monteilii* SMe-09 (Tabla 07). Sorprendentemente, la cepa *E. coli* BW25113, susceptible a mercurio inorgánico mostró una resistencia a PMA de 32 µM, el mismo grado de resistencia mostrado por las cepas *P. pseudoalcalígenes* CMe-08 y *P. pseudoalcalígenes* CMe-16.

Aunque resulta difícil comparar los niveles de resistencia entre los diferentes estudios publicados, debido a la variedad de unidades de concentración de soluciones utilizadas, y a la composición del medio de cultivo que podría influenciar en el grado de resistencia (Pike y col. 2002); en este trabajo

se registraron valores MIC de 1250 µM para $HgCl_2$ en la especie *P. pseudoalcaligenes*, los cuales resultaron mayores al valor de 100 µM descrito por Rodríguez y col. (2013), mientras que no existen reportes del grado de resistencia de esta especie frente a compuestos mercuriales orgánicos como el PMA. De igual forma, no se han registrado reportes de valores MIC para la especie *P. monteilli* frente a los compuestos mercuriales inorgánico y orgánico utilizados en este estudio.

Las secuencias nucleotídicas utilizadas para el diseño de los partidores con la finalidad de amplificar genes *merA* y *merB*, fueron obtenidas de la base de datos de GenBank y correspondieron a las cepas *Pseudomonas aeuroginosa* S86968 (ver Anexos Figura 25) y *Pseudomonas sp*. K-62 (Ver Anexos Figura 26), respectivamente. Para ambos genes, la búsqueda de secuencias similares mediante BLAST dio 6 secuencias pertenecientes a diferentes géneros bacterianos (Ver Anexos Tabla 09 y Tabla 10). Para el caso del gen *merA* se diseñaron partidores degenerados en base a la codificación de ácidos nucleicos propuesta por IUPAC (Ver Anexos Tabla 08), debido a que la región de hibridación de los partidores poseía cierta variabilidad nucleotídica entre las secuencias de los demás géneros bacteriano relacionados (ver Anexos Figura 27).

Los partidores obtenidos para el gen *merB* no necesitaron de modificación alguna, ya que hibridaban a un segmento conservado entre las secuencias analizadas (ver Anexos Figura 28).

La detección de los genes *merA* y *merB* mediante PCR se realizó a partir del ADN total extraído de cada una de las cepas aisladas, por lo que no es posible determinar si la ubicación de los genes es cromosomal o plasmidial. Previamente, a cada uno de los partidores diseñados se le realizó un proceso de estandarización de la temperatura de hibridación de PCR, obteniendo para los partidores MerA-F/MerA-R una temperatura óptima de 64.1°C (ver Anexos Figura 29) mientras que con los partidores MerB-F/MerB-R no se obtuvo amplificados específicos en ninguna de las temperaturas evaluadas (ver Anexos Figura 30). De este modo, utilizando los partidores MerA-F/MerA-R se logró detectar el gen *merA* completo sólo en las cepas *P. monteilli* PMe-03, *P. pseudoalcaligenes* CMe-08, *P. monteilli* SMe-08 y *P. monteilli* SMe-09 (Figura 01), mientras que en las restantes no se observó un amplificado específico del tamaño esperado (1600 pb). Además, no se logró la detección del gen *merB* en ninguna de las cepas evaluadas, al emplear los partidores MerB-F/MerB-R (Figura 02).

Estudios realizados por Narita y col. (2003) y Chahain y col. (2006) demuestran la diversidad nucleotídica de los genes relacionados a la resistencia a mercurio entre cepas aisladas de la misma fuente ambiental e incluso de la misma especie. Esta variabilidad puede deberse a que el operon *mer* es un "cluster" genético presente principalmente en plásmidos (Peters y col., 1991) y transposones (Radford y col., 1981), lo que conllevaría a una alta transmisibilidad intra e inter especies. Esto podría explicar por qué los partidores diseñados en este estudio no amplificaron de forma eficiente los genes *merA* y *merB* en todas las cepas evaluadas, a pesar de haber utilizados más de una secuencia de diversos géneros bacterianos para su diseño. Para confirmar esto, se utilizaron

los partidores diseñados por Pérez-Valdespino (2013) y Libiert (1997) para los genes *merA* (MerA.1F/MerA.1R) *y merB* (MerB.2F/MerB.2R) respectivamente, los cuales fueron diseñados para amplificar fragmentos más pequeños y de secuencia nucleotídica altamente conservada entre las diversas especies bacterianas. De este modo, usando los partidores MerA.1F y MerA.1R se logró la amplificación del fragmento esperado de 460 pb correspondiente al gen *merA* en todas las cepas (Figura 03), mientras que con los partidores MerB.2F y MerB.2R también se logró detectar el fragmento de 500 pb del gen *merB* en casi todas las cepas evaluadas a excepción de *P. pseudoalcaligenes* CMe-08 y *P. pseudoalcaligenes* CMe-17 (Figura N° 04).

En un estudio realizado por Wibberg y col. (2016) se secuenció el genoma completo de una cepa de *P. pseudoalcaligenes* resistente a cianuro aislada de lodos de río. De esta forma se predijo la presencia del operon *mer*, en donde se identificó una secuencia correspondiente al gen *merA.* De igual forma, Ma Q. y col. (2012) predijeron la presencia del gen *merA* mediante la secuenciación del genoma completo de una cepa de *P. monteilii.* Sin embargo, ninguno de los dos estudios realizaron ensayos de determinación de resistencia a mercurio. Por otro lado, no existen reportes hasta la fecha de la presencia del gen *merB* en *P. pseudoalcaligenes* y *P. monteilii* como se describe en este trabajo.

En base a la detección de genes realizada, las cepas *P. monteilli* PMe-03, *P. pseudoalcaligenes* CMe-15, *P. pseudoalcaligenes* CMe-16, *P. monteilli* SMe-08 y *P. monteilli* SMe-09 tendrían un operon *mer* de amplio espectro, por poseer los genes codificantes para la reductasa mercurial (*merA*) y la liasa

organomercurial (*merB)*. Por el contrario, las cepas *P. pseudoalcaligenes* CMe-08 y *P. pseudoalcaligenes* CMe-17 corresponderían a un operon *mer* de bajo espectro al no detectarse el gen *merB* en ellas.

Los altos niveles de resistencia al compuesto mercurial inorgánico ($HgCl_2$) y orgánico (PMA) estuvieron relacionados a la presencia de los genes *merA* y *merB* respectivamente en las cepas *P. monteilli* PMe-03, *P. monteilli* SMe-08 y *P. monteilli* SMe-09. Sin embargo, esta relación no se observó en todos los aspectos. Aunque todas las cepas resistentes a $HgCl_2$ mostraron contener el gen *merA*, la resistencia a PMA no estuvo relacionada en todas las cepas con la presencia del gen *merB*. De esta forma, se observó que la cepa *P. pseudoalcaligenes* CMe-17 presentó un grado de resistencia máximo de MIC de 128 µM a PMA, a pesar de resultar negativo para la detección del gen *merB.* De igual forma, *P. pseudoalcaligenes* CMe-08 mostró un valor MIC de 32 ug/mL, un valor obtenido también para *E. coli* BW25113 usada como control susceptible a mercurio, para ambas la búsqueda del gen en cuestión resultó negativa. Estos datos sugerirían la existencia de mecanismos de resistencia a compuestos organomercuriales independientes al gen *merB*, que podrían o no actuar en sinergia con los demás genes del operon *mer;* como la desmetilación oxidativa del metilmercurio, donde este compuesto es desmetilado en las rutas metabólicas del metanol y el sulfuro de metilo (Segade y col., 2010); convirtiéndolo principalmente en CO_2 y mercurio inorgánico.

Una vez detectado el gen *merA* en todas las cepas, se realizó un ensayo de volatilización para determinar fenotípicamente la presencia de la enzima

codificada por este gen, mercurio reductasa, en las cepas resistentes a mercurio. Todas las cepas mostraron su capacidad de volatilizar el compuesto mercurial $HgCl_2$ (Figura 05), esto por la generación de las marcas producidas por la reactividad del mercurio elemental volatilizado por las bacterias con los residuos de plata presentes en la lámina de rayos X usada en el experimento. Según la literatura revisada, este es el primer reporte de la capacidad volatilizadora de mercurio para las especies *P. pseudoalcaligenes y P. monteilii.* Aunque este ensayo no determina la volatilización cuantitativamente, en base a la intensidad de las manchas generadas se podría estimar el grado de volatilización de cada cepa, ya que el tiempo de incubación de cada una de ellas fue el mismo (24 horas). Las cepas *P. monteilii* PMe-03 y *P. pseudoalcaligenes* CMe-08 tendrían mayor capacidad volatilizadora. De esta manera los grados de resistencia a mercurio observados y la confirmación del mecanismo reductor de mercurio a compuestos menos tóxicos implicarían el potencial uso de estas cepas en procesos de biorremediación.

VI. CONCLUSIONES

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

1. Se aislaron 7 cepas bacterianas resistentes a mercurio de muestras de agua de Paracas, laguna de oxidación de Cachiche y Saramarca, pertenecientes a las especies *P. pseudoalcalígenes* y *P. monteilii*.

2. Los valores MIC de cloruro de mercurio ($HgCl_2$) variaron entre 750 µM (cepas *P. pseudoalcalígenes* CMe-16 y CMe-17) y ≥ 2000 µM (*P. monteilii* PMe-03); y de acetato de fenilmercurio (PMA), entre 32 µM (cepas *P. pseudoalcalígenes* CMe-16 y CMe-08) y 300 µM (cepas *P. monteilii* PMe-03, SMe-08 SMe-09).

3. Todas las cepas de *Pseudomonas* aisladas poseen el gen *merA*, mientras que sólo las cepas *P. monteilii* PMe-03, *P. pseudoalcalígenes* CMe-15, *P. pseudoalcalígenes* CMe-16, *P. monteilii* SMe-08 y *P. monteilii* SMe-09 presentaron el gen *merB.*

4. Todas las cepas de *Pseudomonas* aisladas tuvieron la capacidad de volatilizar mercurio, lo cual estaría relacionado con la presencia del gen *merA.*

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos de cinética de crecimiento en presencia de mercurio para determinar las condiciones de cultivo que favorezcan la replicación de cada cepa.

2. Determinar cuantitativamente la volatilización del mercurio mediante absorción atómica para seleccionar las cepas con mayor capacidad volatilizadora y potencial uso en procesos de biorremediación.

3. Realizar la confirmación de la especie de cada una de las cepas de *Pseudomonas* mediante la secuenciación de otros genes como *gyrB.*

4. Confirmar la presencia de los genes *merT, merP* y *merR*; conocidos componentes importantes del operon *mer.*

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Andreani A., y Fasolato L**. *Pseudomonas* and related genera. En: The Microbiological quality of food. (eds, A. Bevilacqua, M. R. Corbo y M. Sinigaglia) 2017.

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

3. **Bazan-Lopez M.** Contaminación ambiental por mercurio en la minería artesanal en la provincia de Nazca (2011). Recuperado de: https://es.scribd.com/doc/171781345/Contaminacion-Ambiental-Por-Mercurio-en-La-Mineria-Artesanal-en-La-Provincia-de-Nazca

4. **Bhowmik P, Bag PK, Hajra TK, De R, Sarkar P y Ramamurthy T.** Pathogenic potential of *Aeromonas hydrophila* isolated from surface waters in Kolkata, India. Journal of Medical Microbiology 2009; 58: 1549-1558.

5. **Boeris P., Agustin M., Acevedo D. y Lucchesi G.** Biosorption of aluminum through the use of non-viable biomass of Pseudomonas putida. Journal of Biotechnology 2016; 236:57-63.

6. **Boivin-Jahns V., Bianchi A., Ruimy R., Garcin J., Daumsas S. y Christen R.** Comparison of phenotypical and molecular methods for the identification of bacterial strains isolated from a deep subsurface environment. Appl. Environ. Microbiol 1995; 61(9):3400-3406.

7. **Canil D., Crockford P., Rossin R., y Telmer K.** Mercury in some arc crustal rocks and mantle peridotites and relevance to the moderately volatile element budget of the Earth. Chemical Geology 2015; 396: 134–142.

8. **Chadhain S., Schaefer J., Crane S., Zylstra G. y Barkay T.** Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. Environmental Microbiology 2006; 8(10): 1746-1752.

9. **Chatziefthimiou A, Crespo-Medina M, Wang Y, Vetriani C, Barkay T.** The isolation and initial characterization of mercury resistant chemolithotropic thermophilic bacteria from mercury rich geothermal springs. Extremophiles 2007; 11:469-479.

10. **Chen J., Dong J., Chang J., Guo T., Yan Q., Jia W. y Shen S.** Characterization of an Hg(II)-volatilizing *Pseudomonas* sp. strain, DC-B1, and its potential for soil remediation when combined with biochar amendment. Ecotoxicology and Envorimental Safety 2018; 163: 172-179.

11. **Dalsgaard A., Alarcon C., Lanata F., Jensen H., Hansen J., Delgado F., Gil A., Penny. E. y Taylor D.** Clinical maniestations and molecular epidemiology of five cases of diarrhoea in children associated with *Vibrio metschnikovii* in Arequipa, Peru. J. Med. Microbiol 1996. 45:494-500.

12. **Dash H. y Das S.** Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. International Biodeterioration y Biodegradation 2012; 75: 207-2013.

13. **Dash H., Sahu M., Mallick B. y Das, S.** Functional efficiency of MerA protein among diverse mercury resistant bacteria for efficient use in bioremediation of inorganic mercury. Biochimie 2017; 142: 207–215.

14. **De Oliveira G., Favarin L., Luchese R. y McIntosh D.** Psycothrophich bacteria in milk: How much do we really now?. Brazilian Journal of Microbiol 2015; 46(2): 313-321.

15. **Georgieva T., Evstatieva Y., Savov V., Bratkova S. y Nikolova D.** Assesment of plant growth promoting activities of five rhizospheric *Pseudomonas* strains. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 2018; 16: 285-292.

16. **Giovanella P., Cabral L., Bento F., Gianello C. y Oliveira F.** Mercury (II) removal by resistant bacterial isolates and mercuric (II) reductase activity in a new strain of *Pseudomonas sp.* B50A. New Biotechnology 2015. Disponible en [http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.05.006]

17. **Henriques I., Tacao M., Leite L., Fidalgo C., Araujo S., Oliveira C. y Alves A**. Co-selection of antibiotic and metal(loid) resistance in gram-negative epiphytic bacteria from contaminated salt marshes. Marine Pollution Bulletin 2016 [Disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.05.031]

18. **Hernández-Ramírez K., Reyes-Gallegos I., Chávez-Jacobo V, Díaz-Magaña A., Meza-Carmen V., y Ramírez-Díaz M.** A plasmid-encoded mobile genetic element from Pseudomonas aeruginosa that confers heavy metal resistance and virulence. Plasmid 2018; 98: 15–21.

19. **Instituto Nacional de Salud.** Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Ministerio de Salud. Lima – Perú. 2005

20. **Jan AT, Azam M, Choi I, Ali A, Mohd Q y Haq R.** Analysis for the presence of determinants involved in the transport of mercury across bacterial membrane from polluted water bodies of India. Brazilian Journal of Microbiol 2016; 47: 55-62.

21. **Liebert C., Wireman J., Smith T. y Summers A.** Phylogeny of mercury resistance (mer) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. Appl Environ Microbiol 1997; 63: 1066-1076.

22. **Liu B., Bian C., Huang H., Yin Z., Shi Q. y Deng X.** Complete genome sequence of a marine bacterium, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain S1, with high mercury resistance and bioaccumulation capacity. Genome Announcements. 2016; 4(3).

23. **Loaiza E., Zárate H. y Galloso A.** Mineralización y Explotación Minera Artesanal en la Costa Sur Media del Perú. Lima – Perú. INGENMET, Serie E. 2008.

24. **Ma Q., Yuanyuan Q., Tang H., Yu H., Ma F., Shi S., Zhang X., Zhou J. y Xu P.** Genome sequence of a novel Indigo-Producing strain, *Pseudomonas monteilii* QM. Journal of bacteriology. 2012; 194(16):4459-4460.

25. **Mahbub K., Krishna, K., Naidu R., Andrews S., y Megharaj, M.** Mercury toxicity to terrestrial biota. Ecological Indicators 2017; 74: 451–462.

26. **Maliniaq M., Stecenko A. y McCarty N.** A longitudinal analysis of chronic MRSA and Pseudomonas aeruginosa co-infection in cystic fibrosis: A single-center study. Journal of Cystic Fibrosis 2016; 15(3): 350-356.

27. **Matté M., Baldassi L., Barbosa M., Malucelli M., Nitrini S. y Matté G.** Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. Food Control 2007; 18(6): 747: 751.

28. **Meredith M, Parry E, Guay J, Markham N, Danner G, Johnson K, Barkay T y Fekete F.** Concomitant antibiotic and mercury resistance among gastrointestinal microflora of feral brook trout, *Salelinus fontinali*. Curr Microbiol 2012; 65: 575-585.

29. Ministerio del ambiente. Minería aurífera en Madre de Dios y contaminación con mercurio (2011). Recuperado de: http://sinia.minam.gob.pe/download/file/fid/39523.

30. **Migula W.** Uber ein neues System der Bakterien. Arb Bakteriol Inst Karlsruhe 1894; 1:235-238.

31. **Naguib M., Ahmed O., El-Gendy y Khairalla A.** Microbial diversiy of *mer* operon genes and their potential rules in mercury bioremediation and resistance. The Open Biotechnology Journal 2018; 12: 56-77.

32. **Nakamura K y Nakahara H.** Simplified X-Ray fil method for detection of bacterial volatilization of mercury chloride by *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 1998; 54(11): 2871-2873.

33. **Narita M., Chiba K., Nishisawa H., Ishii H., Huang C. Kawabata Z., Silver S. y Endo G.** Diversity of mercuric resistant determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata bay. FEMS Microbiology Letters 2003; 223:73-82.

34. **Nascimento A. y Chartone-Souza E.** Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. Genet Mol Res 2003; 2(1): 92-101.

35. **Nwinyi O., Ajayi O. y Amund O.** Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of Pseudomonas. Brazilian Journal of Microbiology 2016; 47(3): 551-562.

36. **Osborn A. Bruce K. Strike P. y Ritchie D.** Distribution, diversity and evolution of bacteria mercury resistance (*mer*) operon. FEMS microbiology reviews 1997; 19:239-262.

37. **Pandya N. y Desai P.** Screening and characterization of GA producing *Pseudomonas monteilii* and its impact on plant growth promotion. International Journal of Current Microbiology and Applied Science 2014; 3(5): 110-115.

38. **Palleroni, N. J**. *Pseudomonas* (2015)**.** En Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Whitman W. (pp. 30-145). Nueva York, Estados Unidos: Jhon Wiley & Sons.

39. **Pérez-Valdespino A., Celestino-Mancera M., Villegas Rodríguez V. y Curiel-Quesada E.** Characterization of mercury-resistant clinical Aeromonas species. Brazilian Journal of Microbiology 2013; 44(4): 1279-1283.

40. **Peters S., Hobman J., Strike P. y Ritchie D.** Novel mercury resistance determinants carried by IncJ plasmids pMERPH and 391. Mol Gen Genet 1991; 228: 294-299.

41. **Petrovski S., Blackmore D., Jackson K. y Stanisich V.** Mercury(II) resistance transposons Tn502 and Tn512, from Pseudomonas clinical strains, are structurally different members of the Tn5053 family. Plasmid 2011; 65(1): 58-64.

42. **Pike R., Stapleton P., Lucas V., Roberts G., Rowbury R., Richards H. Mullany P. y Wilson M.** Effect on medium composition on the susceptibility of oral streptococci to mercuric chloride. Current Microbiology 2002; 45: 272-276.

43. **Pirrone N., Cinnirella S., Feng X., Finkelman R., Friedli H., Leaner J., Mason R., Mukherjee A., Stracher G., Streets D. y Telmer, K.** Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. Atmospheric Chemistry and Physics 2010; 10(13): 5951–5964.

44. **Potivichayanon S., Supromin N. y Toensakes R.** Development of a mixed microbial culture for thiocyanate and metal cyanide degradation. 3 Biotech 2017; 7(191).

45. **Pundogar, Sittie R., Jing R. y Franco G.** Prevalence of mercury-resistance and antibiotic-resistant bacteria found in dental amalgam. Int. Res. J. Biological Sci. 2014; 3(4): 1-4.

46. **Radford A., Oliver J., Kelly W. y Reanney D.** Translocable resistance to mercuric and phenylmercuric ions in soil bacteria. J Bacteriol 1981; 147: 1110-1112.

47. **Ramírez-Díaz M., Díaz-Magaña A., Meza-Carmen V., Johnstone L., Cervantes C. y Rensing C.** Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. Plasmid 2011; 66(1): 7-18.

48. **Ramond J., Berthe T., Lafite R., Deloffre J., Ouddane B. y Petit F.** Relationships between hydrosedimentary processes and occurrences of mercury-resistant bacteria (*merA*) in estuary mudflats. Marine Pollution Bulletin 2008; 56: 1168-1176.

49. **Rodriguez G.** Estudio proteómico y de resistencia a arsénico y mercurio en la bacteria cianotrófica *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 [Tesis de maestría]. Córdoba: Universidad de Córdoba; 2013. 43p.

50. **Roosa, S., Wattiez, R., Prygiel, E., Lesven, L., Billon, G., y Gillan, D.** Bacterial metal resistance genes and metal bioavailability in contaminated sediments. Environmental Pollution 2014; 189:143–151.

51. **Schaefer J., Yagi J., Reinfelder J., Cardona T., Ellickson K., Tel-Or S. y Barkay T.** Role of the bacterial organomercury lyase (*merB*) in controlling methylmercury accumulation in mercury contaminated natural waters. Environ Sci Technol 2004; 38:4304-4311.

52. **Segade S., Dias T. y Ramalhosa E.** Mercury methylation versus demethylation: main processes involved. En: Clampet A. Methylmercury: formation, Sources and health effects. Nova Science Publishers, Inc; 2010 p.1-30.

53. **Vivek B., Balkrishna C. y Mika S.** Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. Arch Microbiol 2011; 193:837-844.

54. **Vojktová H., Kosina M., Sedlácek I., Maslanová I., Harwotová M. y Molinková V.** Characterization of *Pseudomonas monteilii* CCM 3423 anf its physiological potential for biodegradation of selected organic pollutants. Folia Microbiologica 2015; 60(5): 411-416.

55. **Wang L, Wei Y, Yuan G, Dai M y Chen X.** Molecular characterization and virulence genes of *Aeromonas hydrophila* isolated from the chinese giant salamander (Andrias davidianus). Asian Herpeteological Research 2012; 3(4): 303-309.

56. **Wang Y, Moore M, Levinson HS, Silver S, Walsh C y Mahler I.** Nucleotide sequence of a chromosomal mercury resistance determinant from Bacillus sp. with broad-spectrum mercury resistance. Journal of Bacteriology 1989; 171: 83-92.

57. **Weisburg W., Barns S., Pelletier D. y Lane D.** 16S Ribosomal DNA amplification fot phylogenetic Study. Journal of Bacteriology 1991; 173(2): 697-7

58. **Wibberg D., Bremges A., Damman-kalinowski T, Maus I., Igeño M., vogelsang R., Koning C., Luque-Almagro V., Roldán M., Sczyrba A., Moreno-Vivián C., Blasco R., Puhler A. y Schluter A.** Finished Genome sequence and methylome of the cyanide-degrading *Pseudomonas pseudoalcaligenes* strain CECT5344 as resolved by single-molecule real-time sequencing. J Biotechnol. 2016; 232:61-68.

59. **Zeng X., Tagn J., Jiang P., Liu H., Dai Z. y Liu X.** Isolation, characterization and extraction of mer gene of Hg2+ resisting strain D2. Trans Nonferrous Met Soc China 2010; 20: 507-512.

60. **Zhang W, Chen L y Liu D.** Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. Appl Microbiol Biorechnol 2011; 92(3): 1305-1314.

IX. ANEXOS

Flujograma 01. Aislamiento y selección de cepas de *Pseudomonas* resistentes a mercurio.

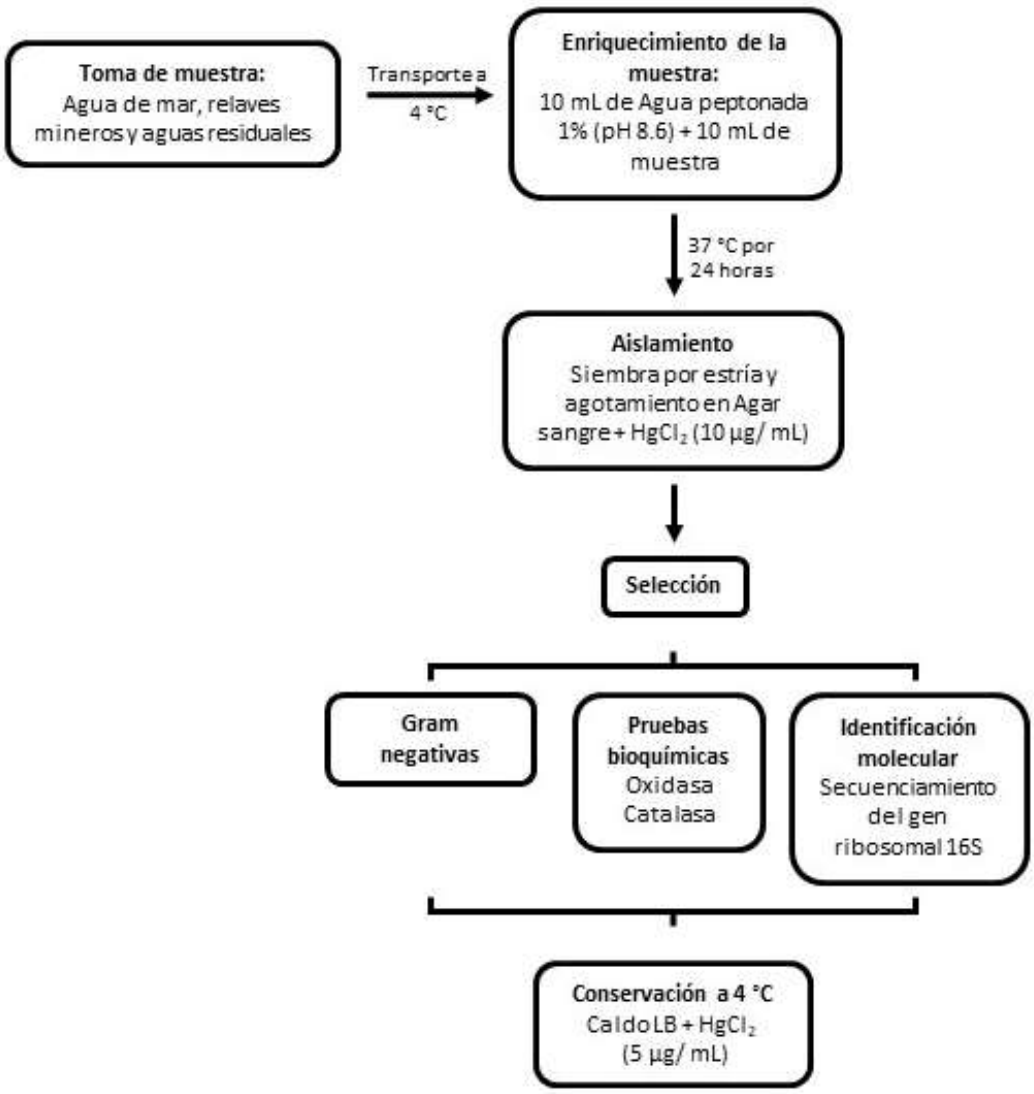


Figura 06. Aislamiento primario de bacterias resistentes a mercurio. Las muestras enriquecidas fueron sembradas en agar sangre suplementado con $HgCl_2$ (10µg/mL), nótese la presencia de colonias Beta y Gamma hemolíticas.

Flujograma 02. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

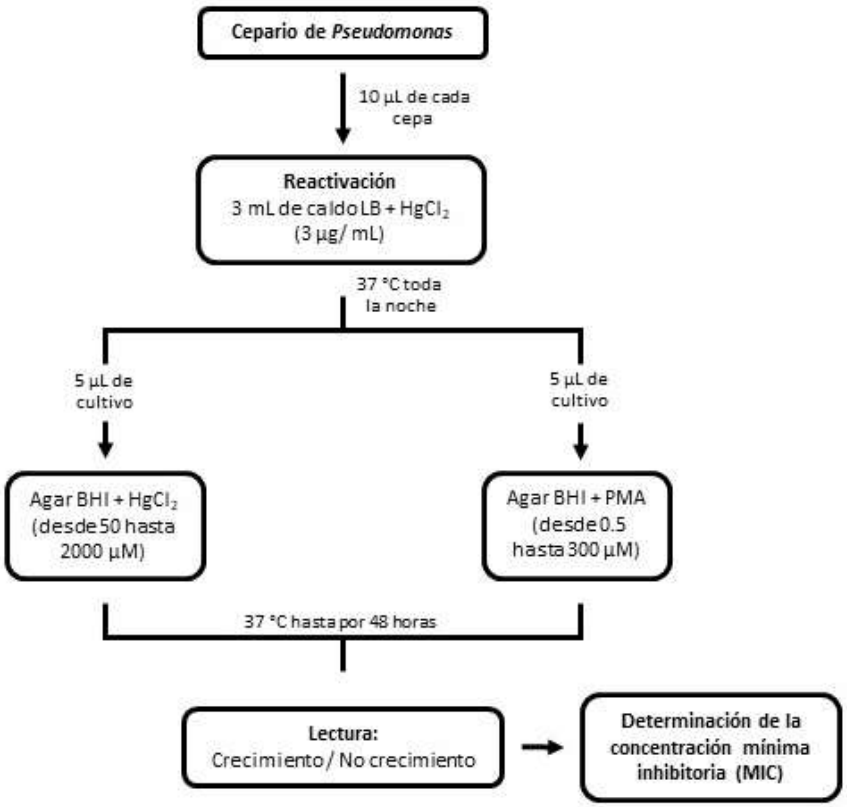


Figura 07. Página de inicio del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

Figura 08. Programa bioinformático Primer 3 utilizado para el diseño de partidores específicos a los genes de interés.

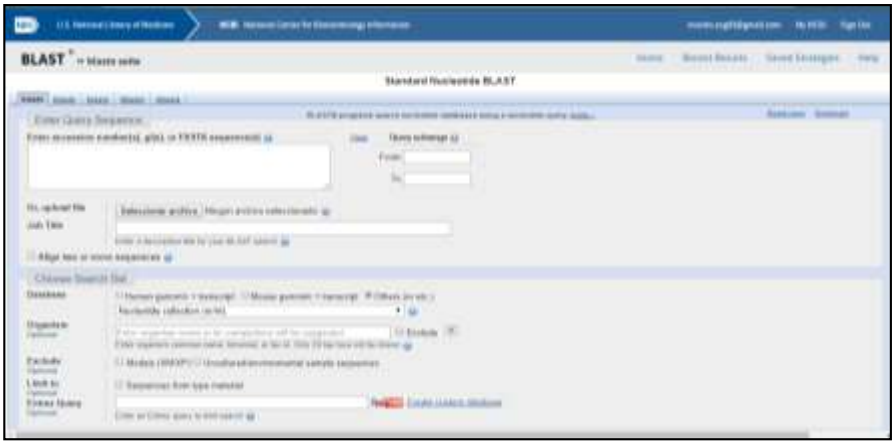


Figura 09. Programa bioinformático BLAST utilizado para la búsqueda de secuencias similares.

Figura 10. Programa bioinformático Clustal Omega utilizado para el alineamiento de las secuencias genéticas utilizadas en este estudio.

Tabla 08. Codificación internacional de ácidos nucleicos establecida por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

Código	Nucleótido
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracilo
R	A o G
Y	C o T
S	G o C
W	A o T
K	G o T
M	A o C
B	C o G o T
D	A o G o T
H	A o C o T
V	A o C o G

Figura 11. Sistema de extracción automatizado de ácidos nucleicos QIacube

Figura 12. Programa bioinformático REVSEQ utilizado para la obtención de la secuencia complementaria de las cadenas reversas secuenciadas.

Figura 13. Termociclador en gradiente Masterclycler pro de Eppendorf

Figura 14. Fotodocumentador digital Azure C600

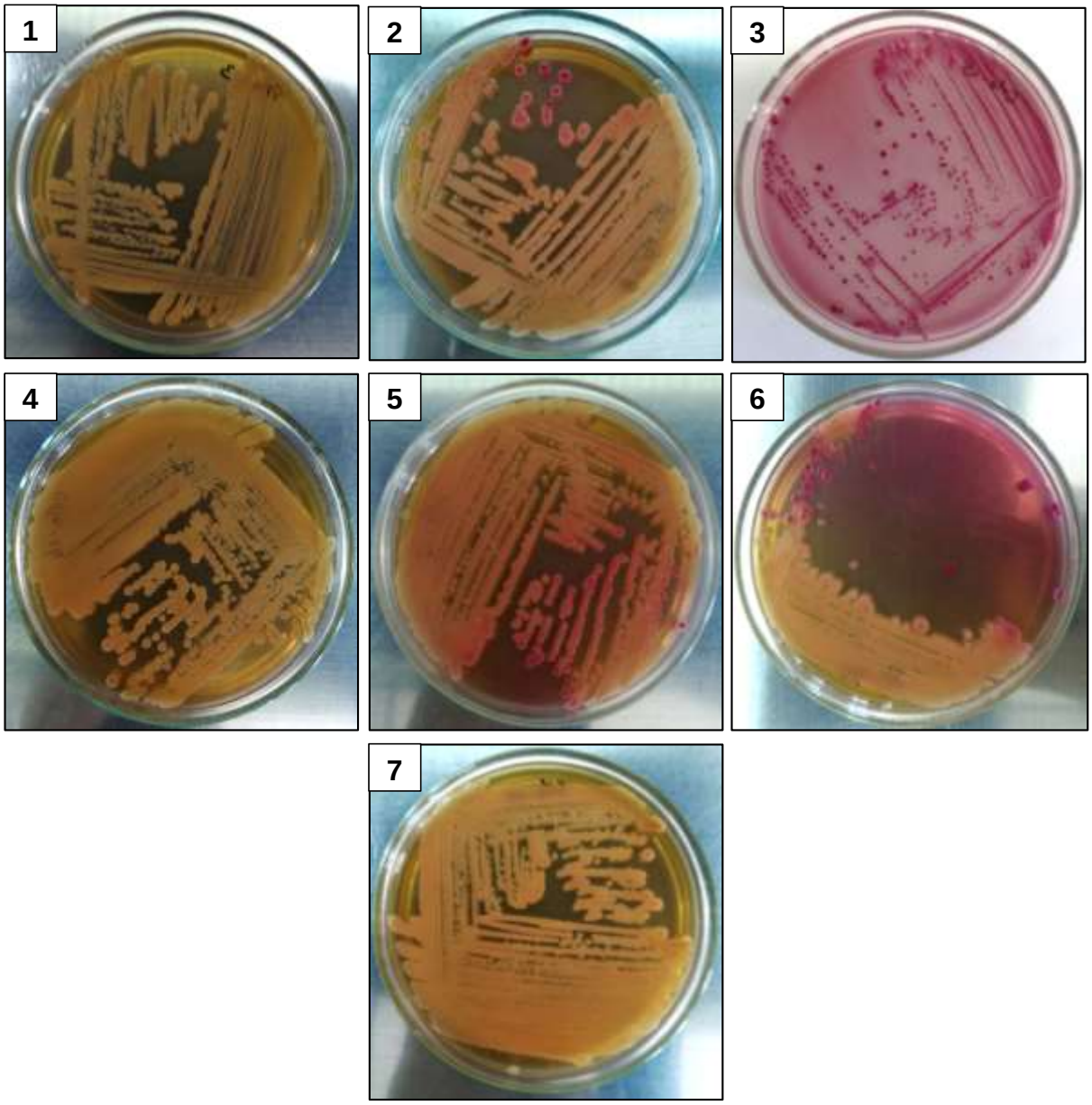


Figura 15. Crecimiento de las cepas resistentes a mercurio aisladas en Agar MacConkey. **1:** *P. monteilii* PMe-03; **2:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-08; **3:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-15; **4:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-16; **5:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-17; **6:** *P. monteilii* SMe-08; **7:** *P. monteilii* SMe-09.

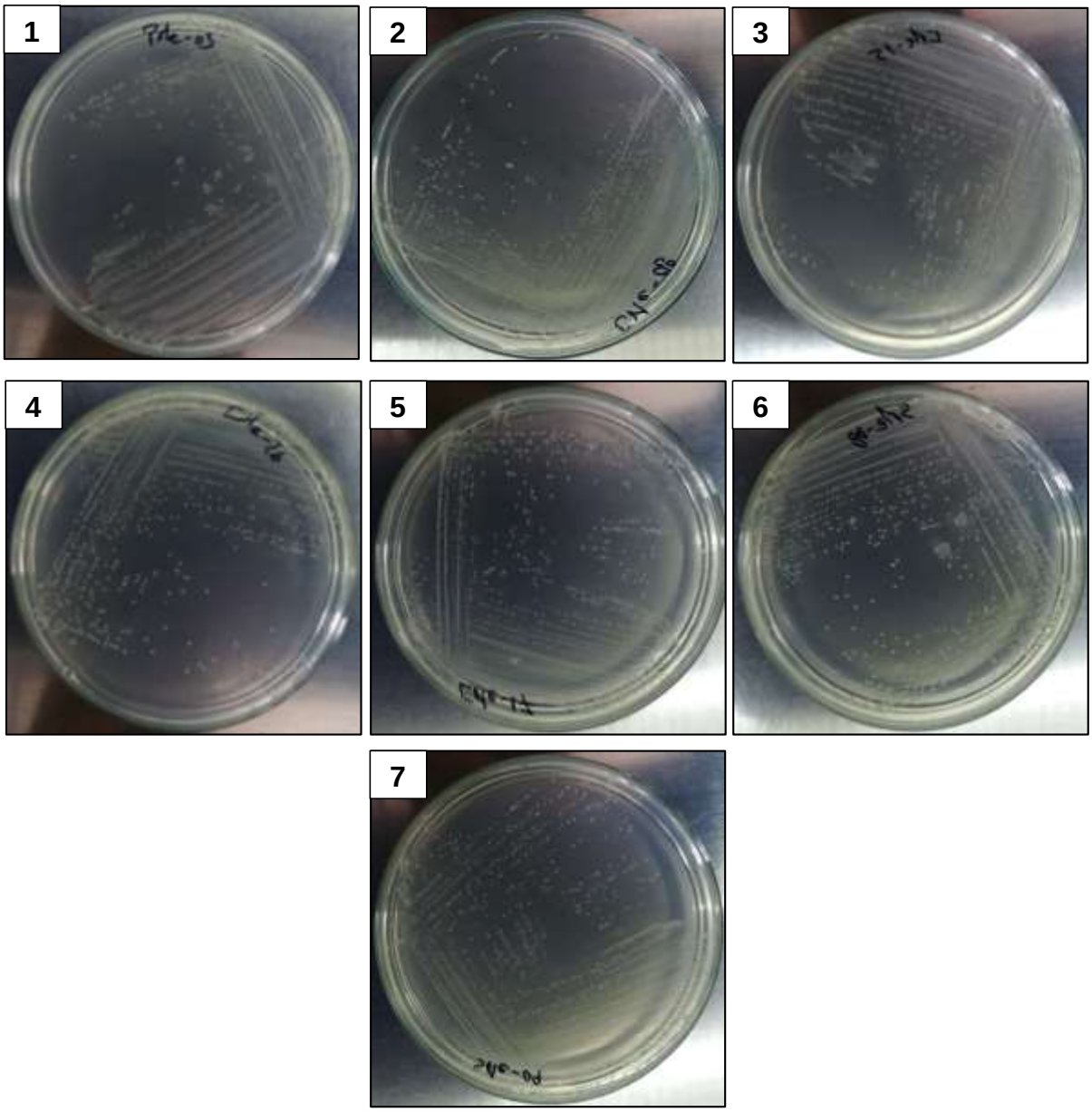


Figura 16. Crecimiento de las cepas resistentes a mercurio aisladas en Agar Cetrimide. **1:** *P. monteilii* PMe-03; **2:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-08; **3:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-15; **4:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-16; **5:** *P. pseudoalcaligenes* CMe-17; **6:** *P. monteilii* SMe-08; **7:** *P. monteilii* SMe-09.

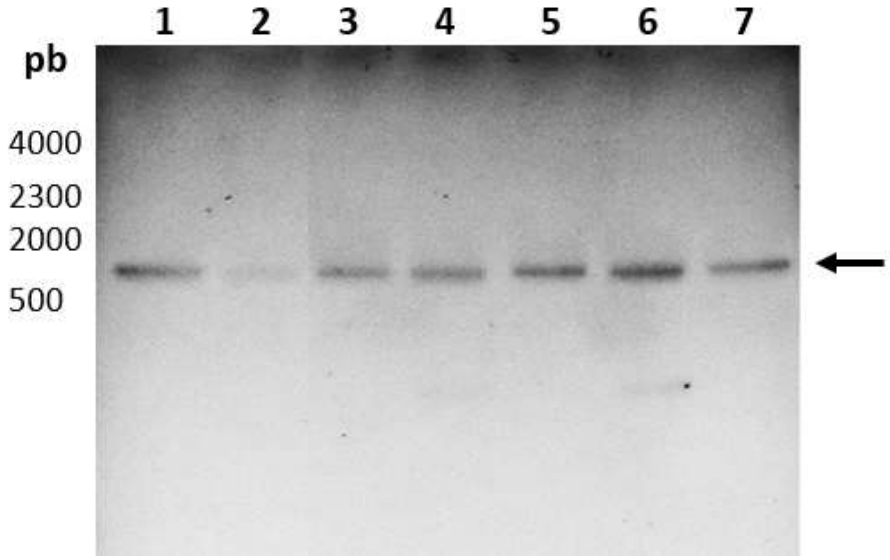


Figura 17. Productos de amplificación de genes 16S ADNr. **1:** CMe-16; **2:** CMe-08; **3:** PMe-03; **4:** CMe-15; **5:** SMe-08; **6:** SMe-09 y **7:** CMe.17. La flecha negra indica la banda del tamaño esperado (1500 pb).

```
>PMe-03
GAGACAGGTCCAGATTCTTCNGGAGGCAGCAGTGGGAATATGGACAATNGGGAAAGCCTG
ATCCAGCCATGCCGCGTGTGGAAGAAGTCTTCGGANTTTAAGCACTTTAAGTGGGANGAA
GGGCAGTAAGTTAATACCTGCTGTNTNTGACGNTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAANT
NTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA
AAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACT
GCATCCAAAACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTG
ACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTA
AGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTT
GACATGCAGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCT
GCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAAC
CCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACG
TGCTACAATGGTCGGTACAGAGGGTCTNCNATTTGTNTCCTNNTCNGTACCTTATGTGAT
GGNTTTGTAGTGTGCATAATTTTNGCCGTTTGTTGGCCCATTNGTCNGTAATCCTCATAA
TGACGAATCAGCCNGTAAGTCGGTCGGACCGGCGGNGNTGCAGTAGCGGCTTCAGTTCCT
CACCAATGCCCCCCCGCCCCCTGNC
```

Figura 18. Secuencia nucleotídica corregida del gen ribosomal 16S de la cepa PMe-03.

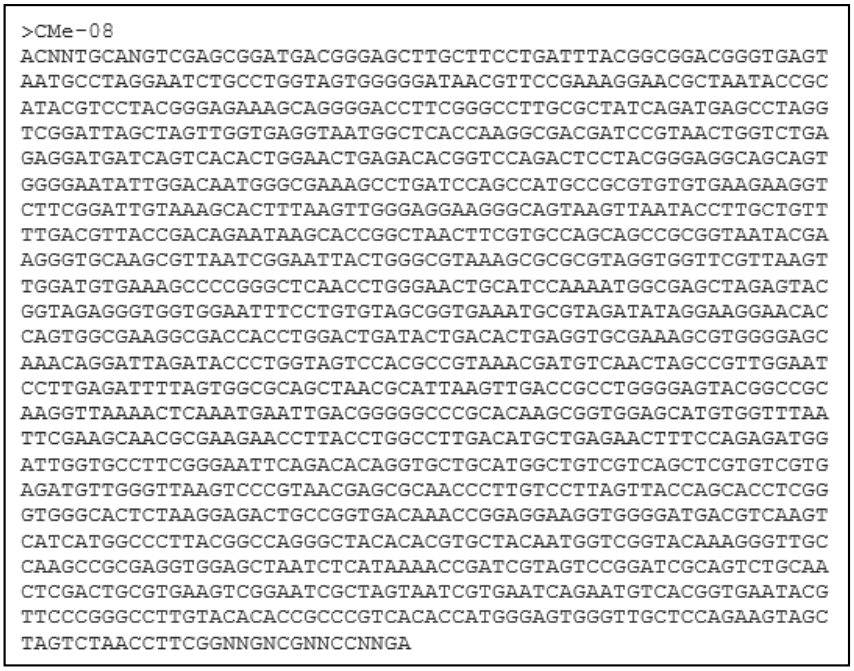


Figura 19. Secuencia nucleotídica corregida del gen ribosomal 16S de la cepa CMe-08.

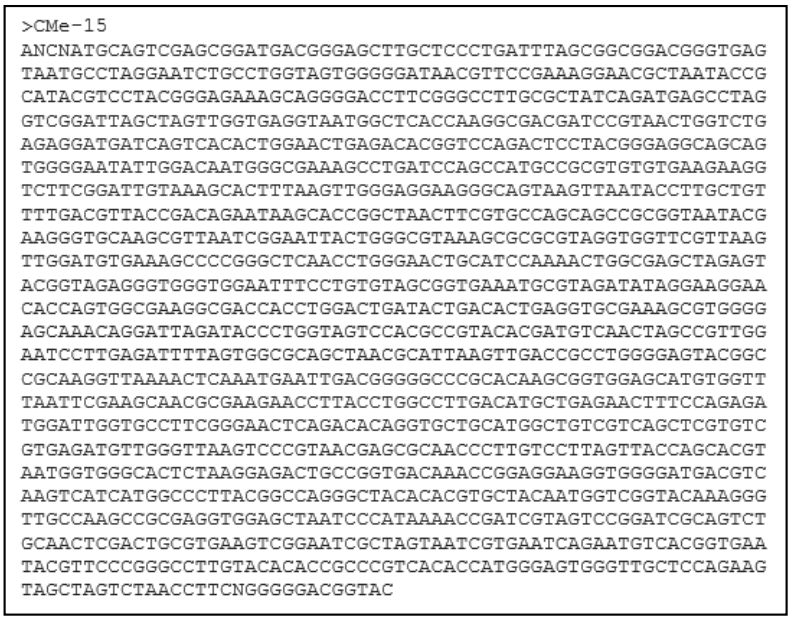


Figura 20. Secuencia nucleotídica corregida del gen ribosomal 16S de la cepa CMe-15.

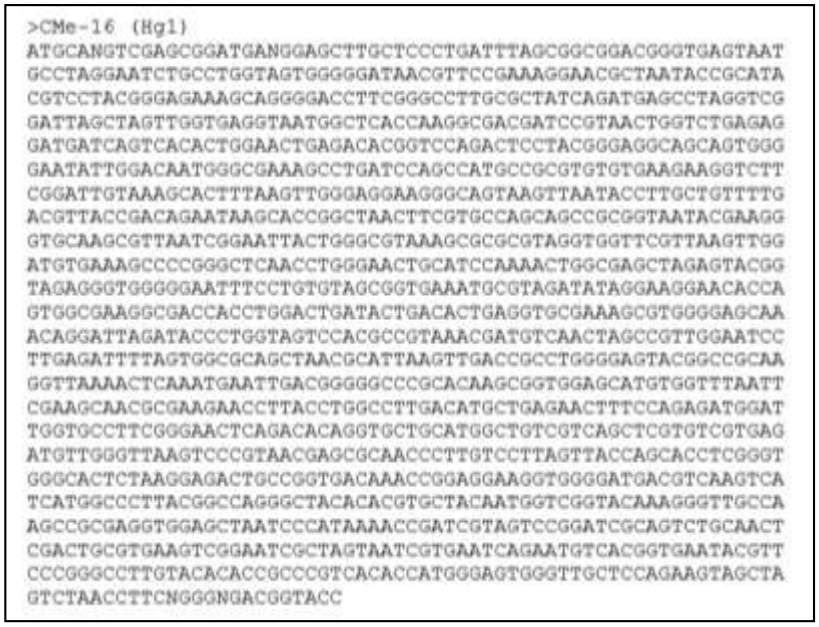


Figura 21. Secuencia nucleotídica corregida del gen ribosomal 16S de la cepa CMe-16.

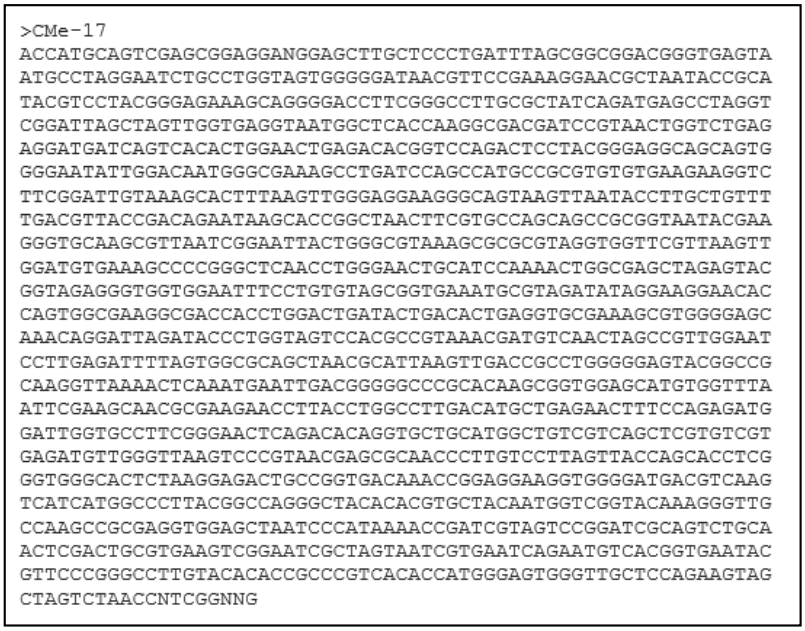
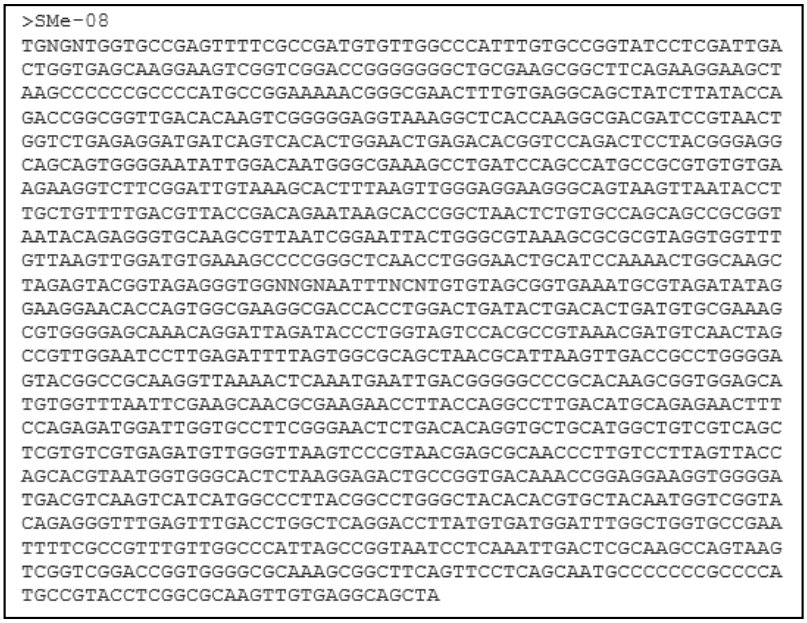


Figura 22. Secuencia nucleotídica corregida del gen ribosomal 16S de la cepa CMe-17.



>SMe-08
TGNGNTGGTGCCGAGTTTTCGCCGATGTGTTGGCCCATTTGTGCCGGTATCCTCGATTGA
CTGGTGAGCAAGGAAGTCGGTCGGACCGGGGGGGGCTGCGAAGCGGCTTCAGAAGGAAGCT
AAGCCCCCCGCCCCATGCCGGAAAAACGGGCGAACTTTGTGAGGCAGCTATCTTATACCA
GACCGGCGGTTGACACAAGTCGGGGGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACT
GGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGA
AGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCT
TGCTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTT
GTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCAAGC
TAGAGTACGGTAGAGGGTGGNNGNAATTTNCNTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG
GAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGATGTGCGAAAG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAG
CCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGA
GTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTT
CCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACC
AGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTA
CAGAGGGTTTGAGTTTGACCTGGCTCAGGACCTTATGTGATGGATTTGGCTGGTGCCGAA
TTTTCGCCGTTTGTTGGCCCATTAGCCGGTAATCCTCAAATTGACTCGCAAGCCAGTAAG
TCGGTCGGACCGGTGGGGCGCAAAGCGGCTTCAGTTCCTCAGCAATGCCCCCCCGCCCCA
TGCCGTACCTCGGCGCAAGTTGTGAGGCAGCTA

Figura 23. Secuencia nucleotídica corregida del gen ribosomal 16S de la cepa SMe-08.

>SMe-09
GGATGGTGCCGATTTCGCCGATGTGTTGGCCCTTGTGCCGGTATCCTCGATTGACTGGTG
AGCCAGGAAGACGGTCGGACCGGGGGGGCGTGGGAAGCGGCTTCAGAAGGACAGCTAAGC
CCCCCCGCCTCATGCCGGAAAATCGGGCGAACTTTGTGAGGCAGCTATCTTATATCAGAC
CGGCGGTTGACTACCTGTCGGGGGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGG
TCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCA
GCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTG
CTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
TACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGT
TAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAACTGGCAAGCTA
GAGTACGGTAGAGGGTGGGTGGAATTTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAA
GGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGT
GGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCG
TTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGNGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGT
GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACTTTCCA
GAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGC
ACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAG
AGGGTCTNCNATTTGNNCCNNNTCAGGACCTTATGTGATGGATTTGGCTGGTGCCGAATT
TNCGCCGTTTGTTGGCCCATTAGCCGGTAATCCTCAAATTGACTCGCCAGCCNGTAAGTC
GGTCGGACCGGTGGNGNTGCANTAGCGGCTTCAGTTCCTCACCAATGCCCCCCCGCCCCN
TGNCCGTACCTCTG

Figura 24. Secuencia nucleotídica corregida del gen ribosomal 16S de la cepa SMe-09.

```
>Pseudomonas aeruginosa strain S86968
ATGACCCATCTAAAAATCACCGGCATGACCTGCGACTCGTGCGCGGCGCACGTCAAGGAAGCGCTGGAAA
AAGTACCCGGCGTCCAATCTGCCATAGTGTCCTATGCCAAGGGCGCGGCCCAGCTCGCCCTTGATCCAGG
CACAGCGCCGGACGCACTGACCGCCGCCGTGGCTGGCCTGGGCTACAAAGCGATGCTCGCCGATGCCCCG
CCGACCGACAACCGCACTGGGCTGTTCGACAAGGTGCGCGGCTGGATGGGTGCCGCCGACAAGGGCAGCG
GCGGCGAGCGCCCGTTGCAAGTCGCCGTGATCGGCAGCGGTGGAGCCGCGATGGCGGCAGCACTGAAGGC
CGTCGAGCAAGGCGCGCAGGTCACGCTGATTGAGCGCGGCACCATCGGCGGCACCTGCGTCAACGTCGGT
TGTGTGCCGTCCAAGATCATGATCCGCGCCGCCCACATCGCCCATCTGCGCCGGGAAAGCCCATTCGACG
GCGGCATGCCACCCACACCGCCGACGATCTTGCGCGAGCGGCTGCTGGCCCAGCAGCAGGCCCGTGTCGA
AGAACTCCGTCATGCCAAGTACGAAGGCATCCTGGACGGCAATTCAGCCATCACCGTTCTGCACGGTGAA
GCGCGTTTCAAGGACGACCAGAGCCTTATCGTTAGTTTGAACGAGGGTGGTGAGCGCGTCGTGATGTTCG
ACCGCTGCCTGGTCGCCACGGGTGCCAGTCCGGCCATGCCGCCGATTCCGGGCCTGAAAGAGTCACCCTA
CTGGACTTCGACCGAGGCCTTGGTCAGCGACACCATTCCCGAACGCCTGGCCGTCATCGGCTCGTCGGTG
GTGGCGCTGGAACTGGCGCAAGCCTTCGCCCGGCTGGGTAGCCAGGTCACGATCCTTGCGCGCAGCACGC
TGTTCTTCCGCGAAGACCCTGCCATCGGCGAGGCCGTCACAGCCGCCTTCCGTGCCGAAGGAATCAAGGT
ACTGGAACATACGCAAGCCAGCCAAGTCGCCCATGTGGACGGCGAATTCGTGCTGACCACTGGACAGGGC
GAAGTGCGCGCCGACAAGCTGCTGGTCGCCACCGGCCGGACACCGAACACGCGCAGCCTGGCATTGGAAG
CGGCGGGGGTAGCCGTCAATGCGCAGGGGGCCATCGTCATCGACAAGGGCATGCGCACCAGTAGCCCGAA
CATCTACGCGGCCGGCGACTGCACCGACCAGCCGCAGTTCGTCTATGTGGCGGCAGCGGCCGGCACTCGT
GCGGCCATTAACATGACCGGCGGCGACGCCGCCATCAATCTGACCGCGATGCCGGCCGTGGTGTTCACCG
ACCCGCAAGTGGCGACCGTGGGCTACAGCGAGGCGGAAGCGCACCACGATGGCATCGAAACCGACAGCCG
CACGCTGACGCTCGACAACGTGCCGCGTGCGCTCGCCAACTTCGATACCCGCGGCTTCATCAAGCTGGTC
ATCGAGGAAGGCAGCGGACGGCTGATTGGCGTACAGGTGGTGGCCCCGGAAGCGGGCGAACTGATCCAGA
CGGCTGTTCTCGCCATTCGCAACCGCATGACGGTGCAGGAACTAGCCGACCAGTTGTTCCCCTACCTAAC
GATGGTCGAGGGCTTGAAGCTCGCGGCGCAGACCTTCAGCAAGGACGTGAAGCAACTGTCCTGCTGCGCC
GGAT
```

Figura 25. Secuencia del gen *merA* seleccionada para el diseño de los partidores merA-F/merA-R. Código de acceso en GenBank: CP008865.2

```
>Pseudomonas sp. K-62 plasmid pMR26
TCACGGTGTCCTAGATGACATGGTCTGCAACAGATGTCGATTAAACTCCTGGCCCAAGCCGAAAGCCTCGT
GGACACTGACGATCGCCAATCCTTCCAATCCTTGATGCTTGGAGGCCCAGTCTTCCGCCGTCGGGACAGAT
GCAAAGAAATGTACATGGCAACAGAAGGACTGACGAACGTCGGCTGCTTCCTGCGGCAATACCAAGGACAC
CGCCATGCCGGCAGGTTCGACAGCCTGTATCTCGCTGGGTGAAACCGTGAGTGAAACCGGTGCTCCGGTTG
CAGCGCAATGCGATGATACGCGAGCTGTACGGCCGATCAGCGCCGGAAATATCAAGGTGTCCAGCGCGCAC
CAGGCATACAGACGGCGGTCGTCAATTTCAAAGACATACGAAGTCTCGCGCAAGGTGAGGCCGTAGCCGAT
GATGTTCCCATCTTTGTCATATTCGGTACTGGTGGCCTGTTCGAGTACGGCGGCCACTCGCTCACCGGGCC
AGTCGAGAATCCCGGCAAGTGTCGTTCGTGAAACCGGACGCCCCTTGGCGAGTTCCCGCAGTAGCGGGACC
AAGAGATCCGCAGTACCATTGGTACGATTGACCGAAGTGAGACGTTCTAAAATATATGGGGCGAGCTTCAT
GGTTCCATCTCCTTTCAT
```

Figura 26. Secuencia del gen *merB* seleccionada para el diseño de los partidores merB-F/merB-R. Código de acceso en GenBank: AB013925.1

Tabla 09. Géneros bacterianos con secuencias similares al gen *merA* de la cepa *Pseudomonas aeuroginosa* S86968 usada para el diseño de los partidores merA-F/merA-R.

Especie	Expentancia	Identidad	Acceso a Genbank
Aeromonas hydrophila	0.0	100%	CP028563.1
Sallmonella enterica	0.0	95%	CP012599.1
Vibrio parahaemolyticus	0.0	95%	KP688397.1
Serratia marescens	0.0	97%	AP013064.1
Achromobacter xylosoxidans	0.0	100%	JX448550.1
Escherichia coli	0.0	95%	CP015139.1

Tabla 10. Géneros bacterianos con secuencias similares al gen *merB* de la cepa *Pseudomonas sp.* K-62 usada para el diseño de los partidores merB-F/merB.

Especie	Expentancia	Identidad	Acceso a Genbank
Aeromonas salmonicida	0.0	99%	KJ909290.1
Citrobacter freundii	0.0	99%	CP017058.1
Salmonella enterica	0.0	99%	CP012599.1
Escherichia coli	0.0	99%	KU997026.1
Enterobacter hormaechei	0.0	99%	AP018352.1
Vibrio alginolyticus	0.0	99%	KU160531.1

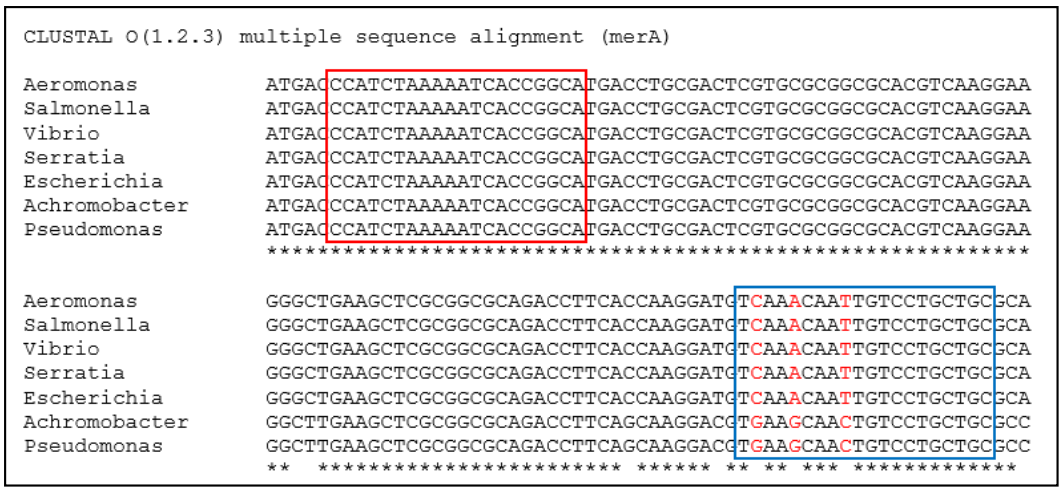


Figura 27. Regiones de hibridación de los partidores MerA-F (rojo) y MerA-R (Azul) en el gen *merA.* Las secuencias utilizadas para el diseño de los partidores fueron alineadas, luego las regiones complementarias de cada partidor fueron buscadas al inicio y al final del alineamiento. Los asteriscos representan las zonas de homología nucleotídica.

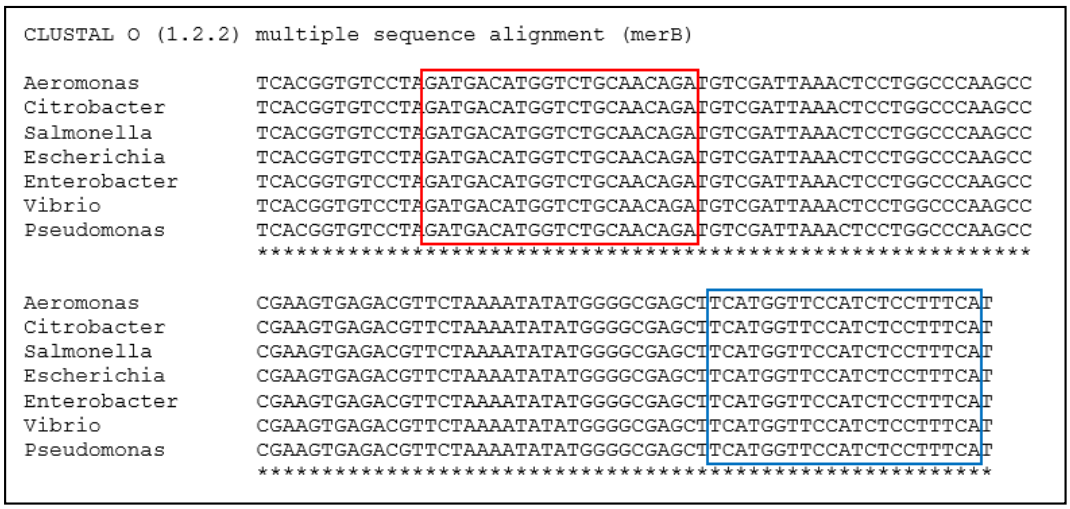


Figura 28. Regiones de hibridación de los partidores MerB-F (rojo) y MerB-R (Azul) en el gen *merB.* Las secuencias utilizadas para el diseño de los partidores fueron alineadas, luego las regiones complementarias de cada partidor fueron buscadas al inicio y al final del alineamiento. Los asteriscos representan las zonas de homología nucleotídica.

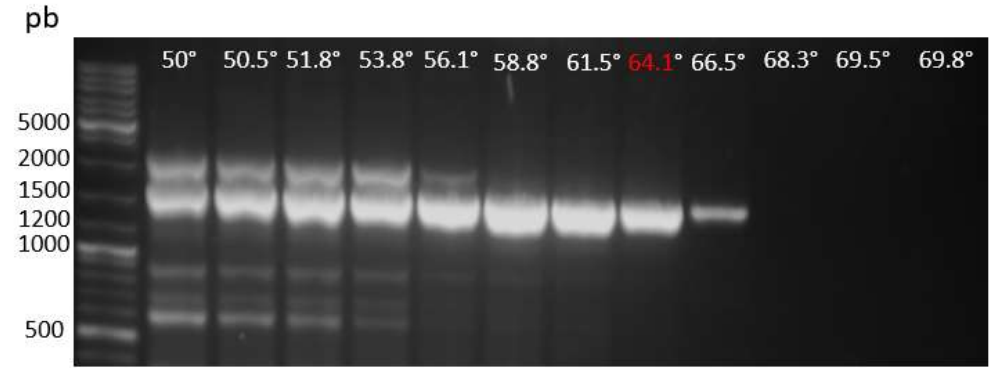


Figura 29. Proceso de estandarización de la temperatura de hibridación de los partidores MerA-F/MerA-R diseñados en este trabajo. Se realizaron reacciones de PCR a diferentes temperaturas de hibridación en un termociclador de gradiente. La temperatura óptima se eligió en base a la presencia de un producto de PCR intenso y único, de este modo se determinó que 64.1°C es la temperatura óptima de hibridación.

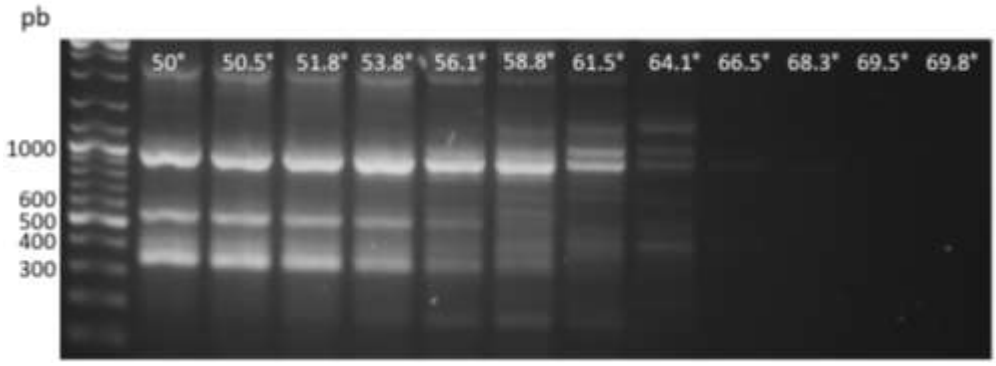


Figura 30. Proceso de estandarización de la temperatura de hibridación de los partidores MerB-F/MerB-R diseñados en este trabajo. Se realizaron reacciones de PCR a diferentes temperaturas de hibridación en un termociclador de gradiente. No observó una amplificación específica del producto esperado de 500 pb.