

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

**Evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a
antibióticos provenientes de bacterias ambientales**

Patricio Alejandro Valencia Cano

Proyecto Final como requisito para la obtención del título de Ingeniería en

Procesos Biotecnológicos

Quito, diciembre 2009

Universidad San Francisco de Quito
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a
antibióticos provenientes de bacterias ambientales**

Patricio Alejandro Valencia Cano

Gabriel Trueba, **Ph.D.**

Director de Tesis y Miembro del Comité de Tesis

María de Lourdes Torres, **Ph.D.**

Miembro del Comité de Tesis

Verónica Barragán, **M.Sc.**

Miembro del Comité de Tesis

Decanato de Ciencias Biológicas y Ambientales

Stella de la Torre, **Ph.D.**

Decana del Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Quito, diciembre 2009

© Derechos de autor

Patricio Alejandro Valencia Cano

2009

Dedicatoria

A aquellas personas que algún momento estuvieron en mi vida y dejaron importantes enseñanzas en ella. Para quienes todavía están junto a mí por ser el sustento de cada día.

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que conocí durante el desarrollo de mi carrera, que de una u otra manera fueron formando mi criterio y la manera de concebir el mundo. A Gabriel Trueba y Verónica Barragán por su apoyo ávido e incondicional para la realización del presente proyecto.

A mis padres Marco y María por haber trazado siempre el mejor camino para mi vida, con amor y cariño. A mis hermanos Marco y Paola por siempre ser el ejemplo a seguir, y la muestra viva de que todo se puede. Y cómo olvidarme de mis amigos Diego, Anita, Belén, Homero, Cris y Estefi, por haber estado siempre en los momentos buenos y malos compartiendo penas, alegrías, fracasos y triunfos.

Resumen

Se piensa con frecuencia que la amplia distribución de bacterias con resistencia a antibióticos es el resultado del uso masivo de éstos en áreas médicas y agrícolas. Sin embargo, los genes de resistencia a antibióticos están presentes en bacterias que se encuentran en zonas remotas, sugiriendo que el medio ambiente fue el escenario natural para el origen y la evolución de estos genes, precediendo incluso la era de los antibióticos. El presente estudio brinda evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales hacia *E. coli* K12. Con este fin, se recolectaron muestras de agua y suelo de zonas prístinas de la Amazonía ecuatoriana (provincias de Sucumbíos, Napo y Orellana) las cuales fueron inoculadas en un medio de grano de trigo (WGM), obteniendo así cultivos multi-bacterianos mixtos. Se seleccionaron los cultivos mixtos que contenían bacterias con capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos y se aislaron las cepas responsables de la transferencia de estos genes. Veinte y ocho aislados bacterianos provenientes del ambiente contenían genes de resistencia a antibióticos, pero solo 10 fueron capaces de transferir sus genes mediante conjugación. Las cepas aisladas se identificaron mediante el secuenciamiento del 16S rDNA, después de lo cual se determinó que las cepas correspondían a los géneros bacterianos *Serratia*, *Pseudomona*, *Listonella*, y *Aeromonas*. Las bacterias ambientales fueron capaces de transferir resistencia a ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y trimetroprin sulfametoxazol.

Abstract

It is often thought that the wide distribution of bacterial antibiotic resistance is the result of widespread use of anti-microbial therapy in medical and agricultural fields. However, antibiotic resistance genes are present in bacteria from remote areas and it is likely that the environment was the natural scenario of the origin and evolution for antibiotic genes and predates the antibiotic therapy era. This study provides evidence of horizontal transference of antibiotic resistance genes from environmental bacteria to *E. coli* k12. Water and soil samples were collected from pristine areas of the Ecuadorian Amazon (Sucumbíos, Napo and Orellana) and inoculated them into a wheat grain medium (WGM) obtaining a multi-bacterial mixed cultures. Mixed cultures containing bacteria able to transfer antibiotic resistance genes were selected, and bacterial isolates responsible for antibiotic resistance transference were isolated. Twenty eight bacterial environmental isolates contained antibiotic resistance genes but only 10 were able to transfer the genes by conjugation. DNA sequence of the 16S rDNA gene indicated that isolates belonged to the genera *Serratia*, *Pseudomonas*, *Listonella*, and *Aeromonas*. Environmental bacteria were able to transfer ampicillin, tetracycline, chloramphenicol and sulfamethoxazole trimetroprin resistance.

Tabla de contenido

Tabla de contenido

.....	1
1. Introducción	3
1.1. Resistencia a antibióticos en bacterias	4
1.1.1. Mecanismos de resistencia	4
1.1.2. Evolución de la resistencia	4
1.1.3. Genes de resistencia	5
1.1.4. Condiciones ambientales para la transferencia de genes	6
1.2. Cambios genéticos en bacterias	7
1.2.1. Métodos de transferencia horizontal de material genético	7
1.3. Bacterias ambientales con genes de resistencia a antibióticos	9
2. Objetivos	10
2.1. Objetivo general	10
2.2. Objetivos específicos	11
3. Justificación	11

4. Área de estudio	12
.....	12
5. Materiales y Metodología	12
.....	12
5.1. Materiales	12
.....	12
5.1.1. Bacterias	12
.....	12
5.1.2. Medios	13
.....	13
5.1.3. Conjugaciones	13
.....	13
5.1.4. Kit de PCR	14
.....	14
5.1.5. Extracción de ADN	14
.....	14
5.1.6. Precipitación de ADN	14
.....	14
5.1.7. Primers	14
.....	14
5.1.8. Identificación de bacterias	15
.....	15
5.2. Metodología	15
.....	15
5.2.1. Recolección de muestras	15
.....	15
5.2.2. Tamizaje de poblaciones bacterianas con genes de resistencia	16
.....	16
5.2.3. Identificación de cepas donadoras	17
.....	17

6. Resultados	18
.....	18
6.1. Recolección de muestras	18
.....	18
6.2. Tamizaje de poblaciones bacterianas con genes de resistencia	18
.....	18
6.3. Identificación de cepas donadoras	19
.....	19
7. Discusión	21
.....	21
8. Conclusiones	24
.....	24
9. Recomendaciones	25
.....	25
10. Bibliografía	27
.....	27
11. Figuras	31
.....	31
12. Tablas	3
.....	3
5	
13. Anexos	4
.....	4
4	

1. Introducción

Los antibióticos son producidos naturalmente por diversos organismos, especialmente bacterias y hongos. En el siglo XX de manera accidental se descubrió la penicilina (producida por el hongo *Penicillium*) y desde este evento se empezó a utilizar para el tratamiento de ciertas infecciones en seres humanos (Davison, 2000). De manera similar fueron descubiertos otros antibióticos, cada uno con diversas características y especificidades para determinado tipo de microorganismo.

Poco tiempo, luego de la introducción de los antibióticos a la terapéutica, aparecieron resistencias en algunas bacterias. Esto suscitó el interés de la comunidad científica, razón por la cual los estudios acerca de la resistencia a antibióticos en el campo médico han sido cada vez más frecuentes. Por ejemplo, cuando se empezó a usar penicilina para el tratamiento de enfermedades generadas por *Staphylococcus aureus* solo el 10% de los aislados eran resistentes al antibiótico, sin embargo en la actualidad se considera que este porcentaje ha aumentado al 90% de aislados resistentes (Orman, 2006).

Es importante considerar también que la mayoría de los antibióticos usados en la actualidad tienen su origen en compuestos antibacterianos producidos por otros microorganismos como armas para la protección de su territorio (Bennet, 2008). A lo largo de millones de años los microorganismos han tenido que enfrentar el reto de sobrevivir a la presencia de diversas sustancias que atentan contra su supervivencia, incluyendo a los antibióticos.

1.1. Resistencia a antibióticos en bacterias

Desde que inició la era de los antibióticos la evolución de la resistencia a antibióticos por parte de los microorganismos ha sido amplia (al igual que el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos). Nada se ha podido hacer para prevenir la aparición de nuevas resistencias, pues son eventos que ocurren al azar y representan un aspecto particular en la evolución bacteriana. La ocurrencia de una resistencia depende en gran medida de la ventaja selectiva que esta molécula presente en el medio ambiente (Courvalin, 2008).

1.1.1. Mecanismos de resistencia

La resistencia a un antibiótico en particular puede ser natural o intrínseca (inaccesibilidad al blanco, inactivación de las drogas, etc.), por mutaciones (modificación en del blanco, permeabilidad reducida, variación en las rutas metabólicas, etc.) o por genes que inactivan o modifican el blanco, o por cambios en las rutas metabólicas (LeJeune, 2003).

1.1.2. Evolución de la resistencia

La evolución de la resistencia a antibióticos en los microorganismos asociados a humanos depende del medio ambiente y de las costumbres sociales, por lo cual se requiere de una aproximación epidemiológica. Los estudios relacionados no solo se realizan tomando en cuenta la transmisión de genes de resistencia a antibióticos a

bacterias patógenas entre humanos, sino analizando todas las rutas posibles, entre estas las ambientales. El enfoque de los estudios de la evolución de la resistencia a antibióticos debería dirigirse a las fuentes de la resistencia (humanos, animales, plantas y medio ambiente), los factores que influyen en la transferencia de resistencias y finalmente al costo biológico de la adquisición de resistencia a antibióticos.

La gran mayoría de los antibióticos que se utilizan en la actualidad para el tratamiento de infecciones y los genes de resistencia adquiridos por patógenos de los seres humanos podrían tener un origen ambiental (Guillemot, 2001). Los cambios que se dan en los ecosistemas, pueden desencadenar en el aumento de agentes antimicrobianos y la alteración de la dinámica poblacional de los microorganismos, llevando así a un aumento en el apareamiento de cepas bacterianas que presenten resistencias a diversos antibióticos (Martínez, 2008).

1.1.3. Genes de resistencia

Existen diversos genes de resistencia a distintos antibióticos, entre los más estudiados son los relacionados con los antibióticos beta lactámicos. Es interesante analizar el ejemplo de los genes TEM-1 (pertenece al grupo de genes blaTEM), puesto que estos han evolucionado hasta producir 90 distintos genes descendientes (Molina, 2003), lo cual permite que las bacterias portadoras sean resistentes a un rango más amplio de beta lactámicos, que aquellas que poseían el gen ancestral. Esto es lo que ha guiado básicamente al modelo clásico de que los genes de resistencia a antibióticos tienen el potencial de evolucionar al mismo ritmo al cual lo hace una empresa farmacéutica. El problema que existe con esto es que los datos respecto a la rapidez en la cual los genes evolucionan en presencia de un nuevo antibiótico son escasos (Hall, 2004).

Solo existen 2 posibilidades para el apareamiento de nuevos genes de resistencia: las modificaciones de un gen de resistencia ya existente y la presencia de genes de resistencia crípticos, los cuales no han sido detectados en los genomas de los microorganismos. Se suele pensar que los genes de resistencia a antibióticos han evolucionado recientemente en respuesta al uso humano de antibióticos, pero este no es el caso. Análisis filogenéticos indican que los genes de resistencia evolucionaron hace millones de años, y estos han estado presentes en plásmidos y se han movido entre las bacterias por muchos millones de años (Barlow, 2002).

1.1.4. Condiciones ambientales para la transferencia de genes de resistencia

La transferencia de genes de resistencia a antibióticos ocurre en diversos ambientes. Existen ciertos estudios en los cuales se ha tratado de identificar “hot spots” de conjugación sin embargo en la mayoría de estos se considera a las bacterias del ambiente como receptoras, mas no como donadoras, con lo cual el seguimiento del gen de importancia se hace mucho más sencillo. Los biofilms son considerados “hot spots” para procesos de conjugación, sin embargo existen muchos factores que se deben tomar en cuenta para los procesos de conjugación en un ambiente natural, los cuales varían entre factores geofísicos, humedad, temperatura, pH, entre otros (Sorensen, 2005).

Análisis comparativos entre bacterias y arqueas sugieren que una fracción significativa de los genes de los organismos procariotas han estado sujetos al proceso de transferencia horizontal. En algunos casos, este mecanismo incluso se constituye en el generador de un estilo de vida para determinado microorganismo. La fijación y la larga persistencia de genes transferidos horizontalmente depende que de las ventajas selectivas que estos genes proveen al receptor de los mismos. En base a análisis

filogenéticos se puede establecer la prevalencia de determinados genomas (Koonin, 2001).

La emergencia de la resistencia a antibióticos se ve favorecida por la facilidad con la que los determinantes de resistencia y las bacterias resistentes pueden diseminarse por cambios a nivel social, tecnológico y microbiológico, los cuales influyen en el ambiente. El aumento de la población resistente se ve a su vez favorecido por la presión selectiva aplicada por la presencia de antibióticos, así como de metales y agentes biocidas. (Okeke, 1999)

1.2. Cambios genéticos en bacterias

Los cambios genéticos que se pueden transferir por herencia entre las bacterias se dan por dos mecanismos principales: el primero se relaciona con las mutaciones en el ADN codificante de moléculas diana y el segundo se refiere a la adquisición de nuevo material genético (Avison, 2005). Los métodos por los cuales se da la transferencia de material genético entre microorganismos son tres: transformación, transducción y conjugación.

1.2.1. Métodos de transferencia horizontal de material genético

La transformación bacteriana se la entiende como aquel proceso en el cual ADN libre ingresa a la célula del microorganismo; aquellos microorganismos capaces de transformarse son conocidos como competentes. Por otro lado, la transducción es un proceso que se lleva a cabo mediante un bacteriófago el cual puede movilizar secuencias de ADN de la célula anfitriona hacia otra. Finalmente, el proceso de conjugación se lleva a cabo por plásmidos que codifican todo un mecanismo que

incluye un tubo de emparejamiento conocido como pili, una membrana y una bomba de ADN mediante la cual una cadena de ADN se transfiere al microorganismo receptor en donde se sintetizará la cadena complementaria (Summers, 2006).

1.2.1.1. Elementos genéticos móviles

Existen varias estructuras que utilizan los microorganismos para transferir material genético, en este caso genes de resistencia a un antibiótico. Los genes de resistencia pueden ser transferidos entre bacterias pertenecientes a diferentes grupos filogenético mediante elementos móviles tales como bacteriófagos, plásmidos, ADN desnudo, mediante transposones o por cassettes que forman parte de integrones (Levy, 2004).

Los cassettes genéticos constituyen un grupo diverso de pequeños elementos móviles que usualmente contienen sólo un marco de lectura abierta completo sin promotor y presentan un sitio de recombinación específico. Estos cassettes pueden codificar múltiples resistencias a antibióticos. El nivel de resistencia a un determinado antibiótico, codificado por un cassette genético de resistencia, depende de su posición en el integrón (estructuras genéticas móviles con capacidad de integrar la información de uno o varios genes de resistencia a antimicrobianos y facilitan la diseminación horizontal de la resistencia) (González, 2004).

1.2.1.1.1. Plásmidos

Los plásmidos bacterianos son aquellos elementos que mueven varios genes desde una célula bacteriana hacia otra y constituye uno de los principales mecanismos de transferencia horizontal de genes (plásmidos conjugativos). Los plásmidos pueden portar una gran cantidad de genes que confieren a los organismos resistencia a antibióticos, resistencia a compuestos tóxicos tales como metales pesados, factores de virulencia, enzimas que confieren la capacidad de reparación del ADN o que amplíen el rango de alimentación (Stanisich, 1988).

Los plásmidos presentan forma circular o lineal y su tamaño puede variar ampliamente, sin embargo, en general aquellos que confieren resistencia a antibióticos no superan los 10 kb de tamaño, sin embargo cuando el plásmido incluye el material genético necesario para que se lleve a cabo la conjugación el tamaño puede llegar a los 30 Kb. Los plásmidos conjugativos están ampliamente difundidos en bacterias gram negativas (Wilkins, 1995).

1.3. Bacterias ambientales con genes de resistencia a antibióticos

Hasta la fecha la mayoría de estudios de patrones de resistencia se han enfocado en poblaciones de bacterias patógenas, sin embargo ahora se conoce que las bacterias comensales también son reservorios comunes de genes de resistencia a antibióticos. Por esta razón la información derivada de los estudios en bacterias patógenas no es representativa para la totalidad de bacterias. (Esiobu, 2002)

El estudio de bacterias en ecosistemas naturales es muy relevante, y una serie de estudios alrededor del mundo se han llevado a cabo con la finalidad de identificar reservorios ambientales que posean bacterias que presenten genes de resistencia a antibióticos. La presión ejercida por estos microorganismos podría llevar a la dispersión de genes de resistencia a antibióticos mediante plásmidos y transposones, los cuales no

solo contienen determinantes de resistencia a antibióticos, sino también otros determinantes tales como los que confieren resistencia a determinados metales pesados. Adicionalmente, en el ambiente existen una serie de bacterias que no han sido cultivadas, por lo cual la mayor parte de genes de resistencia a antibióticos caracterizados provienen de bacterias cultivables. La mayor parte de estudios previos han ignorado el gran potencial de bacterias no cultivadas como reservorio de genes de resistencia a antibióticos. (Bittencourt, 2007)

En un estudio realizado por McKeon 1995, se determinó que una de las familias bacterianas en muestras de agua fresca y suelo con gran cantidad de microorganismos que presentan genes de resistencia a antibióticos es la Enterobacteriaceae, tomando en cuenta la facilidad que se presenta para el cultivo de las mismas en condiciones de laboratorio. Entre los géneros más importantes correspondiente a esta familia de bacterias se encuentran las siguientes: *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Morganella*, and *Serratia*. En estas bacterias se encontró que un 93% de los aislados presentó resistencia a al menos un antibiótico, mientras que el 61 % de ellos presentaba multi – resistencias (McKeon, 1995).

En el presente estudio se investigó la capacidad de las bacterias ambientales aisladas en zonas remotas para transferir genes de resistencia a antibióticos a *E. coli* k12 mediante transferencia horizontal de genes. Con este fin se recolectaron muestras ambientales de agua y suelo en la Amazonía ecuatoriana las cuales fueron sembradas en un medio empobrecido en nutrientes, con lo cual se obtuvo cultivos mixtos correspondientes a las muestras recolectadas. Se identificaron los cultivos mixtos que poseían bacterias con la capacidad de transferir los genes de interés mediante conjugación. Finalmente, se aislaron las cepas bacterianas ambientales que transfirieron genes de resistencia a antibióticos hacia *E. coli* k12, logrando así evidenciar la presencia

de genes de resistencia a antibióticos con actividad en contra de la ampicilina, la tetraciclina, cloranfenicol, entre otros.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Investigar la capacidad de las bacterias ambientales para transferir genes de resistencia a antibióticos a *Escherichia coli* mediante conjugación bacteriana.

2.2. Objetivos específicos

- Aislar bacterias ambientales resistentes a antibióticos de localidades remotas.
- Realizar conjugación bacteriana entre las cepas ambientales aisladas y la cepa de *E. coli k12 mut* resistente a ácido nalidíxico.
- Captura de genes de resistencia a antibióticos.
- Identificación de los microorganismos donantes mediante la secuenciación del rDNA16s de cada cepa ambiental y el análisis de los genes de resistencia a antibióticos transferidos.

3. Justificación

La resistencia bacteriana a los antibióticos está directamente ligada al incremento en las tasas de mortalidad y morbilidad además del aumento en los costos de hospitalización en pacientes con infecciones de bacterias resistentes a antibióticos cuando se compara con infecciones similares que son ocasionadas por bacterias no resistentes a antibióticos (Gérvás, 2000). Tomando en cuenta lo antes mencionado se han realizado gran cantidad de estudios sobre resistencia a antibióticos relacionados con

muestras clínicas, sin embargo no se ha considerado la importancia de las bacterias ambientales como fuente de nuevos genes de resistencia a antibióticos.

El impacto de los seres humanos en los ecosistemas es cada vez más amplio. Las zonas hoy consideradas remotas o prístinas en un mediano o largo plazo ya no lo serán, y las bacterias de estas zonas estarán en estrecha relación con aquellas bacterias que hoy son de importancia para los humanos, por lo cual se haría más factible la transferencia de genes provenientes de bacterias ambientales (por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos). Desde este punto de vista el interés en la comprensión de la estructura y evolución de los genes de resistencia a antibióticos de las bacterias ambientales, además del papel del medio ambiente en la generación de nuevos genes gana importancia pues permite elucidar hacia dónde deberían enfocarse los esfuerzos para las investigaciones y estudios actuales.

Por ésta razón el fin del presente estudio fue el determinar la posibilidad real de que una bacteria que se encuentre en una zona remota del ambiente sea capaz de transferir genes de resistencia a antibióticos hacia otros microorganismos, tales como *E. coli* k12, la cual funciona como un modelo para estudios de conjugación bacteriana. Para lo cual fue necesario en primer lugar el aislar bacterias ambientales que posean genes de resistencia a antibióticos comercialmente conocidos y probar su capacidad de transferir estos genes. Mediante este procedimiento se intentó evidenciar la presencia de nuevos genes de resistencia a antibióticos en bacterias ambientales, abriendo así la posibilidad de estudiar el origen evolutivo de estos, la influencia del ambiente en la generación de los mismos y su función como reservorio de nuevas resistencias.

4. Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo durante los años 2008 y 2009 en el Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, financiado por el Instituto de Microbiología en su totalidad. Las muestras fueron tomadas de zonas prístinas pertenecientes a 3 provincias del Ecuador (Sucumbíos, Napo y Orellana).

5. Materiales y Metodología

5.1. Materiales

5.1.1. Bacterias

- Cepa de *Escherichia coli* k12 mut resistente a ácido nalidíxico
- Cepa de *Escherichia coli* k12 mut resistente a rifampicina
- Bacterias ambientales recolectadas (muestras de agua y suelo) en las provincias de Napo, Pastaza y Sucumbíos (Ecuador)

5.1.2. Medios

- Agar nutritivo: Bacto Agar (Difco Laboratorios, Detroit, MI, USA), Tryptic Soy Broth (TSB) (Difco Laboratorios, Detroit, MI, USA)
- Mueller Hinton (Laboratorios Merck)
- Tubos con medio de grano de trigo (WGM) (modificación del medio descrito por Sainos 2006)
- Caldo nutritivo: Tryptic Soy Broth (Difco Laboratorios, Detroit, MI, USA)
- Antibióticos para medios: Ampicilina (Grünenthal), Ácido Nalidíxico, Tetraciclina (Grünenthal), Kanamicina, Rifampicina (MK)
- Agar (Difco Laboratorios, Detroit, MI, USA)
- Caldo cerebro – corazón BHI (Laboratorios Merck)
- WGM: 5 gramos de tierra, 8 ml de agua destilada y un grano de trigo.

5.1.3. Conjugaciones

- Frascos de 500 ml
- Incubadora Heraeus electronic (Latirencio)
- Cajas petri
- Discos de antibióticos: ampicilina, tetraciclina, cloramfenicol, eritromicina, gentamicina, trimetoprin sulfametoxazol y ciprofloxacina (Becton Dickinson, Sparks, USA)
- Glicerol
- Tubos crioconservación

5.1.4. Kit de PCR

- Buffer de PCR (Invitrogen) (20 mM Tris-HCl; 50 mM KCl)
- MgCl₂ (Invitrogen)
- dNTP's (Invitrogen)
- Taq Polimerasa (Invitrogen)
- Agua para PCR

5.1.5. Extracción de ADN

- PBS 1X
- Solución CTAB (CTAB 2 % , NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH 8, HCl 100 mM pH 8)
- Cloroformo : Alcohol isoamílico (24:1).
- Acetato de sodio 3M, pH 5
- Etanol 100 % helado.
- Etanol 70 %.
- Buffer TE estéril (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1 mM EDTA)

- Agua libre de DNAsas.

5.1.6. Precipitación de ADN

- Acetato de sodio 3M
- Alcohol etílico al 100 % helado
- Alcohol etílico al 80 %

5.1.7. Primers

- 16sV3 f 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
- 16sV3 r 5'-ATTACCGCGGTGCTGG-3'
- TEM F 5'-TCGGGGAAATGTGCGCG-3'
- TEM R 5'-TGCTTAATCAGTGAGGCACC-3'

5.1.8. Identificación de bacterias

- Tinción gram: microscopio, asa metálica, portaobjetos, cristal violeta, solución de yodo, solución alcohol acetona, safranina y agua
- Prueba oxidasa: palillos estériles, tiras comerciales para prueba de oxidasa
- Prueba catalasa: palillos estériles, portaobjetos, agua oxigenada.
- Baterías API: solución salina, aceite, reactivos para revelación de pruebas, batería comercial API 20E.
- Discos de antibióticos: ampicilina, tetraciclina, cloramfenicol, eritromicina, gentamicina, trimetoprin sulfametoxazol y ciprofloxacina (Becton Dickinson, Sparks, USA)

5.2. Metodología

5.2.1. Recolección de muestras

Se recolectaron muestras de agua y tierra en sitios en donde no se había identificado contacto continuo con humanos o probable contaminación con antibióticos

comerciales. Los sitios seleccionados para la recolección de las muestras fueron los siguientes: Provincia de Napo (Saladero y Tena), Provincia de Sucumbíos (Aguas Negras y Lago Agrio) y Provincia de Orellana (Tiputini) (Ver Figura 1).

En cada uno de los sitios se recolectaron las muestras utilizando materiales estériles. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente en el recipiente de recolección y fueron llevadas al laboratorio en un período inferior a 12 horas para proceder al enriquecimiento en medio de cultivo.

5.2.2. Tamizaje de poblaciones bacterianas con genes de resistencia a antibióticos

Se tomó 2 gramos de cada muestra de suelo o 1 ml de cada muestra de agua, se colocó en un tubo que contenía 8ml de WGM y se cultivó a temperatura ambiente entre 2 a 3 semanas en presencia de luz blanca. Cada una de las muestras de agua y suelo sembradas en medio WGM se las llamó cultivos mixtos por poseer una mezcla de bacterias ambientales. Un mililitro del cultivo mixto en medio WGM fue colocado en un tubo que contuvo 4 ml de caldo BHI y se incubó por 24 horas a 37°C. Para la conjugación se añadió al tubo del cultivo mixto (en BHI) un volumen similar de caldo BHI en el que se cultivó (24horas a 37°C) la cepa receptora *E. coli* k12 resistente a ácido nalidíxico (K12RAN). Finalmente se tomó 100ul del caldo de conjugación y se lo extendió en dos tipos de medios: 1) placas agar nutritivo con ácido nalidíxico (15 ug/ml) y ampicilina (50 ug/ml) y 2) agar nutritivo con ácido nalidíxico (15 ug/ml) y tetraciclina (12 ug/ml).

Aquellos cultivos mixtos a partir de los cuales se obtuvo crecimiento de transconjugados en los medios 1) y 2) descritos previamente fueron seleccionados para

ser utilizados en la etapa siguiente del procedimiento por poseer bacterias ambientales capaces de transferir genes de resistencia a antibióticos.

Adicionalmente, todas las colonias que crecieron en los medios con antibióticos identificadas como *E. coli* fueron seleccionadas, cultivadas y almacenadas en congelación para ser analizadas posteriormente.

5.2.3. Identificación de bacterias donadoras

Aquellos cultivos mixtos en WGM que demostraron tener bacterias donadoras de genes de resistencia a antibióticos según se indica en 5.2.2. fueron extendidas en dos tipos de placas petri que contuvieron ampicilina (50 ug/ml) o tetraciclina (12 ug/ml). Cada colonia aislada fue sembrada en un tubo que contuvo 4 ml de caldo BHI y se incubó por 24 horas a 37°C. Para la conjugación se añadió al tubo del cultivo mixto (en BHI) un volumen similar de caldo BHI en el que se cultivó (24 horas a 37°C) la cepa receptora *E. coli* K12RAN. Se tomó 100ul de cada caldo de conjugación y se lo extendió en dos tipos de medios: 1) placas agar nutritivo con ácido nalidíxico (15 ug/ml) y ampicilina (50 ug/ml) y 2) agar nutritivo con ácido nalidíxico (15 ug/ml) y tetraciclina (12 ug/ml).

La capacidad de cada bacteria aislada para transferir genes de resistencia a antibióticos se determinó por el crecimiento o no de transconjugados en los medios 1) o 2) indicados previamente. Las colonias bacterianas resistentes a antibióticos y capaces de transferir genes fueron cultivadas individualmente para su identificación y sometidas a congelación. La identificación bioquímica se realizó mediante diversas pruebas (ver Anexo 1).

Para la identificación genética se extrajo ADN utilizando CTAB (Anexo 2) de cada cepa ambiental con capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos. Posteriormente se amplificó para cada muestra de ADN el segmento 16S rDNA (tamaño aproximado de 200 pares de bases) que corresponde a la posición 341 – 534 en *E. coli* (Muyzer, 1993), mediante PCR (polymerase chain reaction) utilizando los primers 16SV3f y 16SV3r. Las condiciones programadas en el termociclador para la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, elongación a 72 °C durante 30 segundos y una extensión final a 72 °C durante 20 minutos.

Los volúmenes y concentraciones de los reactivos de la PCR se muestran en la Tabla 1 y 2, para los volúmenes de reacción de 25 ul y 50 ul respectivamente. Los amplicones precipitados según se muestra en el Anexo 3 se enviaron a MACROGEN (Korea) para el secuenciamiento en tubos eppendorf de 1.5 ml cubiertos con parafilm. Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa en red BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con la finalidad de identificar los microorganismos a los cuales correspondió cada una de los amplicones enviados.

6. Resultados

6.1. Recolección de muestras

Se recolectaron 10 muestras (6 de agua/A y 4 de suelo/T) en las regiones de Saladeo, Aguas Negras, Yiputini, Lago Agrio, Tena y Papallacta. En la Tabla 3 se observa la lista de muestras recolectadas.

6.2. Tamizaje de poblaciones bacterianas con genes de resistencia bacteriana

De los cultivos mixtos en WGM provenientes de las 10 muestras recolectadas solo de 8 (1A, 2A, 3A, 3T, 4A, 4T, 5A y 5T) se obtuvieron transconjugados en los medios 1) y 2) después del proceso de conjugación entre estos cultivos y la cepa *E. coli* K12RAN. Estos transconjugados presentaban resistencia a ampicilina o tetraciclina (en la Tabla 4 se observa el patrón de sensibilidad a antibióticos de cada transconjugado), con lo cual se comprobó la transferencia de genes de resistencia a estos antibióticos desde las bacterias que se encontraban en el cultivo mixto hacia la cepa receptora. Mediante antibiogramas se determinó que un 100 % de estos transconjugados tuvo resistencia a ácido nalidíxico y eritromicina, un 75 % mostró resistencia a ampicilina y solo un 25 % presentó resistencia a tetraciclina. En la Tabla 5 se muestran los diámetros de los halos de sensibilidad de las muestras conjugadas.

6.3. Identificación de bacterias donadoras

De los 8 cultivos mixtos provenientes de muestras ambientales en los que se comprobó la capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos a la cepa *E. coli* K12RAN se aislaron 28 cepas (las cepas fueron numeradas según el orden de aislamiento) en medio sólido que contenía ampicilina o tetraciclina. Mediante antibiogramas se estableció que de las 28 cepas aisladas el 87.5% presentó resistencia a la eritromicina, un 50% presentó resistencia a la tetraciclina y un 62.5% presentó resistencia a la ampicilina. De estas 28 cepas aisladas solo 10 (cepas 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 y 14) fueron capaces de transferir sus resistencias a *E. coli* K12RAN mediante proceso de conjugación. La descripción fenotípica y la identificación de estos aislados se muestran en la Tabla 6.

Con antibiogramas para cada cepa aislada se determinó que un 100 % de ellas mostró resistencia a ampicilina, mientras que un 80 % presentó resistencia a

tetraciclina. Un 70 % de las cepas mostró resistencia a eritromicina, sin embargo esta resistencia no fue sujeta a análisis puesto que la cepa *E. coli* K12RAN tenía esta resistencia. En la Tabla 7 se pueden apreciar los patrones de sensibilidad de las cepas aisladas para el grupo de antibióticos utilizado.

Tras la conjugación entre las cepas aisladas y *E. coli* K12RAN se realizaron antibiogramas en los transconjugados resultantes. Se estableció que un 50 % de los transconjugados presentó resistencia a ampicilina (2_{C1}, 4_{C1}, 5_{C1}, 6_{C1} y 12_{C1}), mientras que un 40 % mostró resistencia a tetraciclina (7_{C1}, 8_{C1}, 9_{C1} y 12_{C1}). A la denominación de las cepas se incrementó un subíndice _{C1} que indica que las cepas son resultado de un proceso de conjugación entre una cepa aislada y la cepa *E. coli* K12RN. Los patrones de sensibilidad de los transconjugados se presentan en la Tabla 8 (en la tabla 9 se aprecian los patrones de sensibilidad de los transconjugados obtenidos tras una repetición del procedimiento).

Se utilizaron los transconjugados como donadores de genes de resistencia en un nuevo proceso de conjugación en donde la cepa repectora fue *E. coli* k12 resistente a rifampicina. Los genes de resistencia a antibióticos presentes en los transconjugados no fueron transferidos en su totalidad a la nueva cepa receptora. La capacidad de transferencia se redujo en un 50 % respecto al proceso de conjugación realizado entre las cepas ambientales aisladas y la cepa *E. coli* K12RN. Los patrones de sensibilidad de estos transconjugados se muestran en la Tabla 10. En la Tabla 11 se pueden apreciar los patrones de sensibilidad de los conjugados respecto al control (*E. coli* k12).

Mediante PCR se amplificó un segmento de 200 pb perteneciente a la región 16s rDNA en cada una de las 10 cepas ambientales aisladas utilizando los primers 16SV3f y 16SV3r (Figuras 2, 3 y 4).

El Blast Highest Hit para las secuencias correspondientes a cada una de las 12 cepas ambientales arrojó los siguientes resultados:

- La cepa 2 corresponde a *Serratia marcescens* RS25.
- La cepa 4 corresponde a *Pseudomona aeruginosa* LCB53.
- La cepa 5 corresponde a *Listonella anguillarum* MHK 12.
- La cepa 6 corresponde a *Serratia marscescens* RI42.
- La cepa 7 corresponde a *Serratia nematodiphila* P36.
- La cepa 8 corresponde a *Serratia marcescens* RS25.
- La cepa 9 corresponde a *Serratia marcescens* RI42.
- La cepa 10 corresponde a *Aeromonas sp.* A33.
- La cepa 12 corresponde a *Serratia marcescens* RS25. L
- La cepa 14 corresponde a *Serratia marcescens* RI42.

En la Tabla 12 se muestra también el sitio de aislamiento de las muestras, el fenotipo y el Blast Highest Hit correspondiente. Otras especificaciones relacionadas con las muestras identificadas se muestran en la Tabla 13.

7. Discusión

En el presente estudio se encontró bacterias ambientales de la región Amazónica ecuatoriana capaces de transferir genes de resistencia a antibióticos tales como la ampicilina o la tetraciclina a *E. coli* K12RN. El método utilizado demostró ser eficiente para evidenciar la presencia de genes de resistencias a antibióticos de origen ambiental, no solo de los antibióticos antes mencionados sino de otros como lo son el trimetoprim sulfametoxazol, cloranfenicol, ciprofloxacina, etc. Este estudio se relaciona con los

resultados de investigaciones realizadas en otras regiones remotas del mundo como Alaska en donde se encontró nuevos genes de resistencia a antibióticos (Allen, 2009).

Es muy probable que los genes de resistencia a antibióticos, cuya presencia se evidenció mediante esta investigación correspondan a nuevos genes. Esto se corrobora ya que en las cepas ambientales aisladas durante este estudio que presentaron resistencia a ampicilina, en una investigación piloto, se probaron primers que amplifican una región que codifica para la producción de beta lactamasas (primers TEMf y TEMr), las cuales son enzimas que se producen comúnmente en cepas clínicas que presentan resistencia a ampicilina y solo se obtuvieron bandas inespecíficas. La inespecificidad de estos primers en las cepas ambientales aisladas en el presente trabajo sugieren la existencia de nuevos genes de resistencia a antibióticos diferentes a los encontrados en cepas clínicas, no obstante con el fin de confirmar este hecho es necesaria la caracterización de los genes capturados durante el estudio (Hall, 2004).

El tamizaje inicial se realizó para determinar si en los cultivos mixtos existían o no bacterias capaces de transferir genes de resistencia a antibióticos tales como la ampicilina o la tetraciclina. La obtención de transconjugados tras la conjugación que se llevó a cabo entre los cultivos mixtos (donadores de genes de resistencia) y *E. coli* K12RN (cepa receptora) confirmó la presencia de bacterias con capacidad de transferir los genes de interés. De los 10 cultivos mixtos provenientes de las muestras recolectadas en el ambiente, en 8 se logró obtener transconjugados con resistencia a ampicilina o tetraciclina. El tamizaje inicial permitió identificar los cultivos mixtos en los que existían bacterias con capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos, mas no qué bacterias específicamente transfirieron los genes de resistencia.

De los cultivos mixtos que mostraron capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos tras el proceso de conjugación, se obtuvieron 28 cepas aisladas en los medios con ampicilina o tetraciclina. De las 28 cepas aisladas el 87.5% presentó resistencia a la eritromicina, un 50% presentó resistencia a la tetraciclina y un 62.5% presentó resistencia a la ampicilina. En porcentajes inferiores también se observó resistencia al trimetoprim sulfametoxazol y a la ciprofloxacina. Esto se sustenta con estudios realizados por Endang 2008, en donde indica que los antibióticos a los cuales se verifican mayores frecuencias de resistencia en bacterias ambientales son eritromicina, ampicilina y tetraciclina.

De las 28 muestras, 10 mostraron la capacidad de transferir sus genes de resistencia a *E. coli k12 mut*, lo cual representa un 35.7 % del total de las muestras intentadas, según datos de Bustos 1985, el porcentaje de transferencia en conjugaciones realizadas in vitro corresponde a un 34 % cuando se trabaja con *E. coli* como receptora. Es interesante mencionar que las 10 cepas aisladas correspondían a bacilos gram negativos, lo cual indica la importancia de la estructura para la transferencia horizontal de genes, tomando en cuenta que la cepa receptora utilizada en los procesos de conjugación fue *E. coli* cuya estructura corresponde a la de un bacilo gram negativo.

Sin duda alguna la resistencia a ampicilina ha sido una de las más observadas, sobre todo en bacterias Gram negativas como *Pseudomonas* y *Escherichia coli*. Además, se ha observado la presencia de genes de resistencia a la ampicilina en organismos pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Serratia*, los cuales cuentan con especies patógenas para los humanos (Correa, 2007). Es por esto que se reconoce que la resistencia a los beta

lactámicos (a este grupo pertenece la ampicilina) es quizás la más difundida entre las bacterias ambientales (Suntarasamit, 2007).

Tomando en cuenta que la transferencia horizontal de genes es un mecanismo común en el ambiente para el paso de información entre bacterias es importante mencionar que según estudios realizados, resistencias a antibióticos como la tetraciclina y la ampicilina se encuentran con alta frecuencia en plásmidos conjugativos (Esiobu, 2002). Esto es importante ya que la mayor frecuencia de resistencia a antibióticos mostrada en las cepas ambientales aisladas durante esta investigación correspondió a los 2 antibióticos en cuestión.

Para la identificación de las muestras ambientales se utilizó una secuencia de ADN 16SV3. El secuenciamiento del ADN ribosomal es una herramienta que se ha utilizado desde el año 2001 y ha facilitado la identificación exacta de una gran cantidad de bacterias (Jorgen, 2005). Las secuencias del ADN ribosomal aparecen en todos (o en la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o sólo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por esta razón en el presente proyecto se consideró trabajar con estas secuencias, las cuales permiten un gran nivel de diferenciación para la identificación de los microorganismos. En un 99% (Blast Highest Hit) de similitud las secuencias de las bacterias ambientales aisladas fueron identificadas como pertenecientes a 4 diferentes géneros bacterianos: *Serratia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Listonella sp.* y *Aeromonas sp.*

8. Conclusiones

- Las bacterias ambientales de las muestras recolectadas en zonas remotas de la Amazonía ecuatoriana poseen genes transferibles que codifican resistencia a antibióticos, siendo las resistencias a ampicilina, tetraciclina y eritromicina las más

difundidas.

- La modificación del medio de grano de trigo (WGM) utilizada en el presente estudio demostró ser útil para el aislamiento de bacterias ambientales y su conservación durante un tiempo extenso a diferencia de lo que se puede alcanzar con la utilización de un medio comercial.
- La conjugación es un proceso común en la naturaleza, pues un importante porcentaje de los aislados fue capaz de transferir genes de resistencia a antibióticos mediante este mecanismo. Es interesante considerar que todos los donadores correspondieron a bacilos gram -, así como la cepa donadora (*E. coli k12*) lo cual indica que la factibilidad de un proceso de conjugación en estructuras similares es mayor.
- El secuenciamiento de las regiones de ADN pertenecientes al ribosoma brindan una importante herramienta para la identificación de microorganismos con un alto porcentaje de precisión.
- El acercamiento realizado en este estudio es útil para la recuperación de potenciales genes de resistencia a antibióticos y para el estudio de la evolución de la resistencia a los antibióticos.

9. Recomendaciones

Es muy importante que se profundice en el estudio de los genes que brindan resistencia a los diferentes antibióticos, no únicamente los beta lactámicos, sino los relacionados con resistencia a la eritromicina, tetraciclina, cloramfenicol, entre otros antibióticos a los cuales se demostró resistencia por parte de las cepas aisladas del ambiente en el presente proyecto.

Para el estudio de los genes de resistencia a antibióticos se recomienda trabajar en el proceso de transposición mutagénesis. Este proceso permite que una cepa bacteriana que posea un transposón (*E. coli* con transposón Tn5), lo transmita a la cepa deseada (cepas ambientales con capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos aisladas en el presente proyecto), apagando o modificando el gen de interés. En este caso se buscaría mediante sucesivas conjugaciones que el transposón se inserte en el gen que codifica para la resistencia a algún antibiótico, ampicilina por ejemplo. Una vez que se haya logrado esto y conociendo la secuencia del transposón insertado se podrían elaborar primers a partir de estas secuencias con la finalidad de amplificar las regiones que flanquean al transposón, en donde se encontrará seguramente la secuencia del nuevo gen de resistencia a antibiótico y mediante secuenciamiento se podrá conocer con exactitud las características del mismo.

El medio utilizado para cultivar las bacterias ambientales fue el de grano de trigo (WGM), sin embargo los procesos subsiguientes se realizaron en TSB (Tryptic Soy Broth), por lo que muchas bacterias ambientales pudieron perderse durante el procedimiento. El realizar las conjugaciones en WGM sería importante pues se podrían identificar otras importantes donadoras de resistencia a antibióticos que incluso no sean cultivables (metagenómica).

10. Bibliografía

- Adam, M., Murali, B., et. al., Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria, Biomed Central Evolutionary Biology, 8:52 (2008).
- Allen, K., Functional metagenomics reveals diverse beta lactamases in a remote Alaskan soil, ISME Journal, 3, 243:251 (2009).
- Avison, M., et. al., Bacterial genetics, Microbiology & Microbial Infections, 1, 80–135 (2005).

- Barlow, M. & Hall, B. G. Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years, Journal of Molecular Evolution, 55, 314:321 (2002).
- Bennet, P., Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria, British Journal of Pharmacology, 153, 347:357 (2008).
- Bittencourt, C, et. al., Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater, Genetics and Molecular Research Journal, 3, 510:521 (2007).
- Bustos, E., Transferencia plasmidial de multirresistencias en cepas enteropatógenicas de *E. coli*, Revista Chilena de Pediatría, 56, 445:449 (1985).
- Cabrera, E., et. al., La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación, Colombia Médica, 28 (2007).
- Correa, G., Impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo de la medicina contemporánea, Revista Med, 16, 9:10 (2008).
- Courvalin, P., Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance, Journal of Internal Medicine, 264, 4:16 (2008)
- Davison, H., et al., What is antibiotic resistance and how we can measure it?, Trends Microbiology, 554:559 (2000).
- Dutta, C., et. al., Horizontal gene transfer and bacterial diversity, Indian Academy of Sciences, 27 (2002).
- Esiobu, N., et. al., Antibiotic resistance in soil and water environments, International Journal of Environmental Health Research, 12, 133:144 (2002).

- Gervas, J., La resistencia a los antibióticos un problema de salud pública, Atención Primaria, 25, 589:596 (2000).
- González, G., Integrones y cassettes genéticos de resistencia, Revista Médica Chilena, 619-626 (2004).
- Guillemot, D., Better Control of Antibiotic Resistance, Clinical Infectious Diseases, 33, 542:547 (2001).
- Hall, B., Predicting the evolution of antibiotic resistance genes, Nature, 2, 430:435 (2004).
- Jorgen, J., Ribosomal DNA sequencing, APMIS, 113, 621:628 (2005).
- Lawrence, J. Horizontal and vertical gene transfer, Microbiology, 2005, 255:271 (2005).
- LeJeune, J., Antibiotic Resistance, Ohio State University, Agricultural Administration, (2003).
- Levy, S., et. al., Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, Nature, 10 (2004).
- Marraffini, L., Interference Limits Horizontal Gene Transfer in Staphylococci by targeting DNA, Science, 1843.1845 (2008).
- Martinez, J., Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments, Science, Vol. 321, (2008).
- McKeon, D., et. al, Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in rural groundwater supplies, Water Research, 29, 1902:1908 (1995).
- Mims, C., et. al., Medical Microbiology, Ed. Elsevier, ed. tercera, España. (2004).
- Molina, J., Haemophilus influenza and betalactam resistance: Description of blaTEM gene deletion, Revista española de Quimioterapia, 16, 195:203 (2003).

- Muyzer, G., Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl Environ Microbiol*, 59, 695:700 (1993).
- Okeke, I, et. al., Socioeconomical and behavioral factors leading the acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries, *Emerging Infectious Diseases*, 5, 18:27 (1999).
- Piddock, L., Quinolone resistance and *Campylobacter* spp., *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 36, 891:898 (1995).
- Sainos, E., Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat-grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculums, *Applied Microbiology Biotechnology*, 72, 812:815 (2006).
- Sorensen, J., Studying plasmid horizontal transfer in situ, *Nature*, Vol. 3 (2005).
- Stanisich, V., Identification and analysis of plasmids at the genetic level, *Methods in Microbiology*, Vol. 21, *Plasmid Technology* 2nd edn. Academic Press: London, pp 11–47 (1988).
- Summers, A., Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multiresistance problem, *Animal Biotechnology*, 17, 125:135 (2006).
- Suntarasamit, P., Characterization of extended spectrum beta lactamases enzyme, Mahidol University (2007).
- Wilkins, B., Gene transfer by bacterial conjugation: diversity of systems and functional specifications, *Society for General Microbiology Symposium 52, Population Genetics of Bacteria*, 59:88 (1995).

11.Figuras

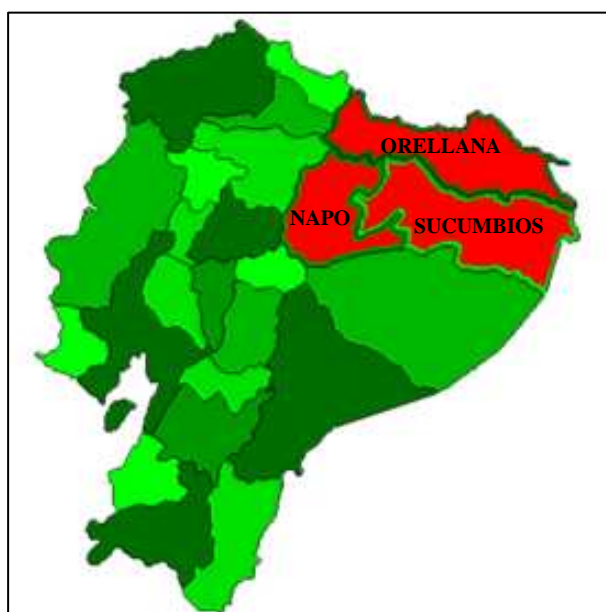


Figura 1: Sitios de recolección de las muestras ambientales

Este mapa indica las provincias (en rojo) en las cuales se realizó la recolección de las muestras ambientales. Estas provincias corresponden a la Amazonía ecuatoriana (Napo, Sucumbíos y Orellana).

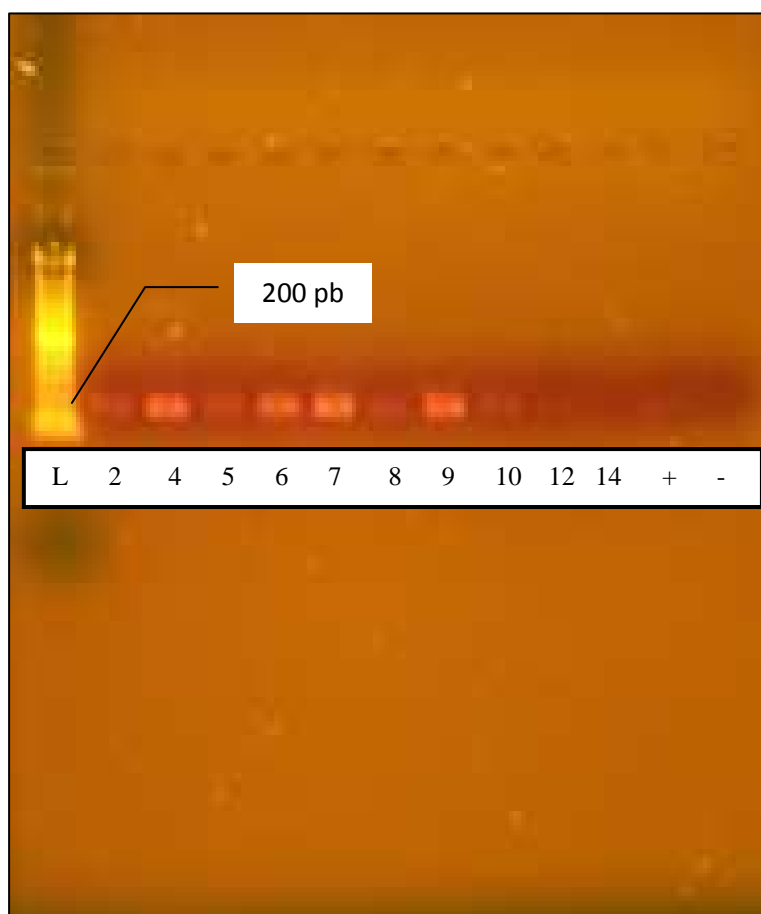


Figura 2: Gel de agarosa al 1 % que muestra las bandas correspondientes a la amplificación mediante PCR con los primers 16SV3f y 16SV3r del ADN de las cepas ambientales con capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos

En este gel se aprecian bandas que corresponden a la amplificación de la región 16SV3 del rDNA. En las muestras 4,6,7 y 9 se observan bandas con buena definición; en las muestras 2,5, 8, 10, 12, 14 y control + las bandas son de mediana definición; y en la muestra 14 no se presenta ninguna banda. Las bandas poseen un tamaño aproximado de 200 pb.

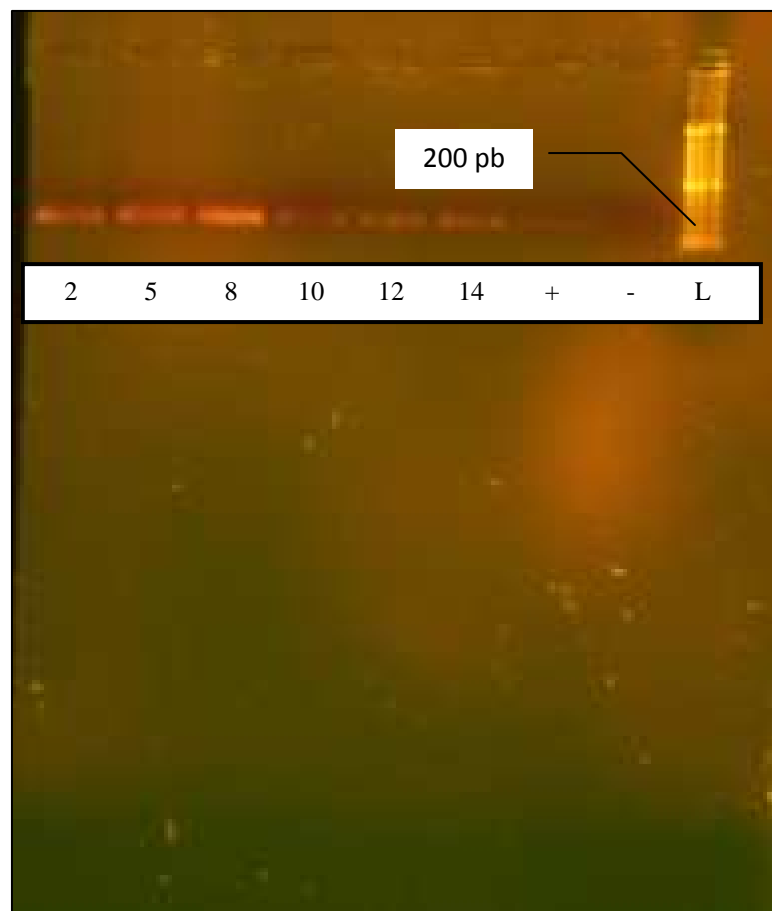


Figura 3: Gel de agarosa al 1 % que muestra las bandas correspondientes a la amplificación mediante PCR con los primers 16SV3f y 16SV3r del ADN en concentración 1:10 de las cepas ambientales 2, 5, 8, 10, 12 y 14 con capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos

En este gel se aprecian bandas que corresponden a la amplificación (utilizando una concentración de ADN 1:10) de la región 16sV3 del rDNA. En las muestras 2,5 y 8 se observan bandas con buena definición; sin embargo en las muestras 10, 12, 14 y control + la definición es mediana. Las bandas poseen un tamaño aproximado de 200 pb.

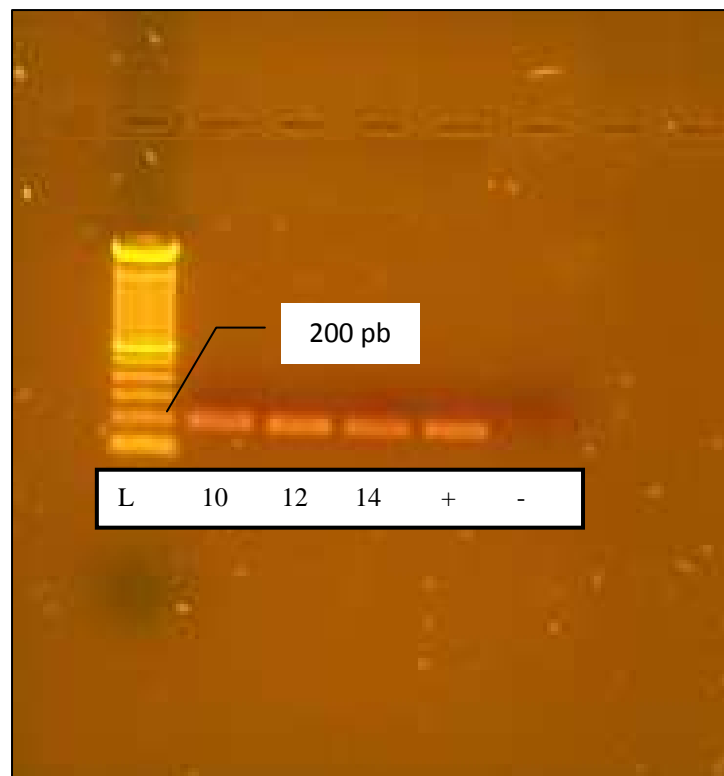


Figura 4: Gel de agarosa al 1 % que muestra las bandas correspondientes a la amplificación mediante PCR con los primers 16SV3f y 16SV3r del ADN de las cepas ambientales 10, 12 y 14 con capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos

En este gel se aprecian bandas que corresponden a la amplificación (utilizando 3 ul de ADN en cada reacción) de la región 16sV3 del rDNA. En las muestras 10, 12, 14 y control + se observan bandas de alta definición. Las bandas poseen un tamaño aproximado de 200 pb.

12. Tablas

Tabla 1: Volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados para la amplificación de la región 16s del ADNr de las cepas ambientales con capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos mediante PCR utilizando los primers 16SV3f y 16SV3r para un volumen final de reacción de 25 ul

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen (13 reacciones)
H2O PCR	-	-	430,3 ul
Buffer	-	-	65 ul
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	19,5 ul
Primer fV3	10 uM	0,3 uM	26 ul
Primer rV3	10 uM	0,3 uM	26 ul
dNTP's	10 uM	200 uM	52 ul
Taq	1 U	1 U	5,2 ul
Volumen c/tubo			24 ul + 1 ul ADN

Tabla 2: Volúmenes y concentraciones de los reactivos utilizados para la amplificación de la región 16s del ADNr de las cepas ambientales con capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos mediante PCR

utilizando los primers 16SV3f y 16SV3r para un volumen final de reacción de 50 ul

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen (6 reacciones)
H2O PCR	-	-	192,6 ul
Buffer	-	-	30 ul
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	9 ul
Primer fV3	10 uM	0,3 uM	24 ul
Primer rV3	10 uM	0,3 uM	24 ul
dNTP's	10 uM	200 uM	24 ul
Taq	1 U	1 U	2,4 ul
Volumen c/tubo			47 ul + 3 ul ADN

Tabla 3: Muestras recolectadas en zonas remotas de la Amazonía ecuatoriana. La letra A en la identificación de las muestras indica que son muestras de agua, mientras que la letra T indica que son muestras de suelo.

Denominación	Tipo de muestra	Sitio de recolección
1A	Agua	Saladeo
2A	Agua	Aguas Negras
3A	Agua	Tiputini
3T	Suelo	Tiputini
4A	Agua	Lago Agrio
4T	Suelo	Lago Agrio
5A	Agua	Tena
5T	Suelo	Tena
6A	Agua	Papallacta
6T	Suelo	Papallacta

Tabla 4: Patrón de sensibilidad a antibióticos cepa *E. coli* k12 mut resistente a ácido nalidíxico (receptora de los genes de resistencia a antibióticos). Se muestra el tamaño del halo de sensibilidad para cada antibiótico y su respectivo patrón de sensibilidad (resistente-R, sensible-S o intermedio-I)

Cepa	Diámetro de halos de sensibilidad (mm)													
	TE		C		AM		SXT		GM		CIP		E	
<i>E. coli</i> K12 mut	19	S	19	S	19	S	22	S	19	S	28	S	0	R

TE (Tetraciclina), C (Cloranfenicol), AM (Ampicilina), SXT (Trimetroprin sulfametoxazol), GM (Gentamicina), CIP (Ciprofloxacina), E (Eritromicina).

Tabla 5: Patrones de sensibilidad a antibióticos de los transconjugados obtenidos a partir de la conjugación entre bacterias de cultivos mixtos y *E. coli* K12RN. Para cada transconjugado en las columnas se muestra el tamaño del halo de sensibilidad para cada antibiótico y su correspondiente patrón (resistente-R, sensible-S o intermedio-I)

Cepas	Diámetro de halos de sensibilidad
-------	-----------------------------------

	(mm)							
	AMP		TE		E		NA	
1A _{1C}	0	R	26	S	0	R	7	R
2A _{1C}	25	S	21	S	9	R	6	R
3A _{1C}	0	R	22	S	0	R	5	R
3T _{1C}	0	R	23	S	0	R	0	R
4A _{1C}	0	R	0	R	0	R	0	R
4T _{1C}	0	R	9	R	0	R	0	R
5A _{1C}	0	R	29	S	0	R	0	R
5T _{1C}	14	I	25	S	31	S	2	R

AM (Ampicilina), TE (Tetraciclina), E (Eritromicina), NA (Ácido nalidíxico)

Tabla 6: Características fenotípicas de las 28 cepas aisladas de los cultivos mixtos provenientes de las muestras recolectadas en zonas remotas de la Amazonía ecuatoriana

Cepa	Fenotipo	Pruebas
1	Colonia blanquecina, uniforme, mediana	Oxidasa -, bacilo gram -
2	Colonia no regular, blanquecina	Oxidasa +, bacilo gram -
3	Colonia rosada, regular	Oxidasa +, coco gram -
4	Colonia uniforme, amarillenta, pequeña	Oxidasa +, bacilo gram -
5	Colonia no uniforme, amarilla, grande	Oxidasa +, bacilo gram -
6	Colonia amarillenta, grande	Oxidasa +, bacilo gram -
7	Colonia blanquecina, mediana	Oxidasa -, bacilo gram -
8	Colonia blanquecina	Oxidasa -, bacilo gram -
9	Colonia amarillenta	Oxidasa -, bacilo gram -
10	Colonia blanquecina, uniforme	Oxidasa +, bacilo gram -
11	Colonia blanquecina, regular, mediana	Oxidasa -, coco gram -
12	Colonia violeta, halo blanquecino	Oxidasa -, bacilo gram -
13	Colonia blanquecina, pequeña, uniforme	Oxidasa -, bacilo gram -
14	Colonia blanquecina, grande, uniforme	Oxidasa -, bacilo gram -
15	Colonia pequeña, uniforme	Oxidasa -, coco gram -
16	Colonia blanquecina, grande, uniforme	Oxidasa -, bacilo gram -
17	Colonia pequeña, blanquecina	Oxidasa -, bacilo gram -
18	Colonia blanquecina, grande	Oxidasa -, bacilo gram +
19	Colonias amarillentas, pequeñas	Oxidasa -, bacilo gram -
20	Colonia blanquecina, pequeña	Oxidasa -, coco gram -
21	Colonia blanquecina, mediana	Oxidasa -, coco gram -

22	Colonia violeta, mediana	Oxidasa +, coco gram -
23	Colonia blanquecina, pequeña	Oxidasa -
24	Colonia blanquecina, grande	Oxidasa -, coco gram -
25	Colonia blanquecina, mediana	Oxidasa -, bacilo gram +
26	Colonia blanquecina, mediana	Oxidasa -, coco gram -
27	Colonia blanquecina, mediana	Bacilo gram +
28	Colonia blanquecina, mediana	Bacilo gram -

Tabla 7: Patrón de sensibilidad a antibióticos correspondiente a las 10 cepas ambientales que mostraron la capacidad de transferir genes de resistencia a antibióticos. El color rosado indica que la cepa es resistente para el antibiótico correspondiente, el color celeste indica un valor intermedio de resistencia, mientras que el color verde indica que la cepa es sensible para el antibiótico correspondiente.

Antibiótico / cepas	2	4	5	6	7	8	9	10	12	14
Ampicilina	0	8	0	8	0	10	0	10	0	12
Tetraciclina	9	20	8	8	0	11	10	15	13	14
Ciprofloxacina	21	31	22	26	20	24	24	19	23	22
Gentamicina	18	26	15	17	20	21	17	14	19	15
Cloramfenicol	17	17	11	15	18	19	16	20	17	18
Eritromicina	10	14	12	15	12	9	0	10	10	16
Trimetoprin sulfametoxazol	0	24	19	19	20	17	18	15	21	18

Tabla 8: Patrón de sensibilidad a antibióticos correspondiente a los 10 transconjugados obtenidos de la conjugación entre las 10 cepas ambientales aisladas y *E. coli* K12RN. El color rosado indica que la cepa es resistente para el antibiótico correspondiente, el color celeste indica un valor intermedio de resistencia, mientras que el color verde indica que la cepa es sensible para el antibiótico correspondiente.

Antibiótico / cepas	2 _c 1	4 Cl	5 Cl	6 Cl	7 Cl	8 Cl	9 Cl	10 Cl	12 Cl	14 Cl
Ampicilina	0	0	0	0	2	2	2	19	0	16

Tetraciclina	2 0	2 1	1 6	1 7	0 0	1 1	1 0	1 0	21	12	17
Ciprofloxacina	2 6	3 0	3 0	2 9	2 9	2 4	3 0	0	12	25	30
Gentamicina	1 8	1 5	1 8	1 5	1 7	1 7	1 7	0	19	16	14
Cloramfenicol	1 7	1 7	1 0	1 5	1 8	1 9	1 6	0	20	17	18
Eritromicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trimetoprin sulfametoxazol	0	2 3	2 3	2 4	2 0	2 0	1 7	0	10	19	17

Tabla 9: Patrón de sensibilidad a antibióticos de transconjugados cepas obtenidas a partir de conjugación (repetición) de cepas ambientales aisladas capaces de transferir genes de resistencia a antibióticos y *E. coli* K12RN. El color rosado indica que la cepa es resistente para el antibiótico correspondiente, el color celeste indica un valor intermedio de resistencia, mientras que el color verde indica que la cepa es sensible para el antibiótico correspondiente.

Antibiótico / Cepas	2c1	4c1	5c1	6c1	7c1	8c1	9c1	10c1	12c1	14c1
Ampicilina	0	0	0	0	23	21	23	18	0	18
Tetraciclina	22	20	17	16	0	11	10	21	12	17
Ciprofloxacina	26	29	31	29	30	24	30	12	24	29
Gentamicina	19	24	22	19	19	19	17	28	18	18
Cloramfenicol	17	17	10	15	18	19	16	20	17	18
Eritromicina	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0
Trimetoprin sulfametoxazol	0	26	22	17	22	24	21	0	22	19

Tabla 10: Patrón de sensibilidad a antibióticos de cepas obtenidas a partir de conjugación de los transconjugados que se muestran en la tabla anterior y la cepa receptora *E. coli* K12 mut resistente a rifampicina con la finalidad de mostrar si se conserva la capacidad de transferir los genes de resistencia a antibióticos de las cepas ambientales. El color rosado indica que la cepa es resistente para el antibiótico correspondiente, el color celeste indica un valor intermedio de resistencia, mientras que el color verde indica que la cepa es sensible para el antibiótico correspondiente.

Antibiótico / Cepas	2c2	4c2	5c2	6c2	7c2	8c2	9c2	10c2	12c2	14c2
Ampicilina	0	16	0	16	17	18	17	18	14	15
Tetraciclina	20	20	17	21	0	19	10	20	17	20
Ciprofloxacina	26	24	23	23	28	24	24	22	23	25
Gentamicina	19	17	17	17	18	18	16	18	16	15
Cloramfenicol	19	17	21	18	22	21	17	22	17	19
Eritromicina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trimetoprin sulfametoxazol	23	24	24	23	19	21	17	20	19	20

Tabla 11: Patrones de sensibilidad a antibióticos de los transconjugados respecto al control (*E. coli k12 mut*). La disminución de 2 mm en el halo de sensibilidad en cada transconjugado respecto al control indica que éste es resistente a determinado antibiótico (recuadros con color rosado).

Repetición conjugación Antibiótico / cepa	2c1	4c1	5c1	6c1	7c1	8c1	9c1	10c1	12c1	14c1	k12 mut
Ampicilina	0	0	0	0	23	21	23	18	0	18	19
Tetraciclina	22	20	17	16	0	11	10	21	12	17	19
Ciprofloxacina	26	29	31	29	30	24	30	12	24	29	28
Gentamicina	19	24	22	19	19	19	17	28	18	18	19
Cloramfenicol	17	17	10	15	18	19	16	20	17	18	19
Eritromicina	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0
Trimetoprin sulfametoxazol	0	26	22	17	22	24	21	0	22	19	22

Tabla 12: Resultado del secuenciamiento de las muestras

Número de cepa	Aislado en	Fenotipo	BLAST HIGHEST HIT
2	AGUAS NEGRAS	BACILO GRAM -, OXIDASA -,	<i>Serratia marcescens strain RS25</i>
4	RÍO TIPUTINI	BACILO GRAM -, OXIDASA +,	<i>Pseudomonas aeruginosa strain LCB52</i>
5	RÍO TIPUTINI	BACILO GRAM -, OXIDASA +,	<i>Listonella anguillarum strain MHK12</i>
6	RÍO TIPUTINI	BACILO GRAM -, OXIDASA -,	<i>Serratia marcescens strain RI42</i>
7	LAGO AGRIO	BACILO GRAM -, OXIDASA -,	<i>Serratia nematodiphila strain P36</i>
8	LAGO AGRIO	BACILO GRAM -, OXIDASA -,	<i>Serratia marcescens strain RS25</i>
9	LAGO AGRIO	BACILO GRAM -, OXIDASA -,	<i>Serratia marcescens strain RI42</i>
10	TENA	BACILO GRAM -, OXIDASA +,	<i>Aeromonas sp. A33</i>
12	AGUAS NEGRAS	BACILO GRAM -, OXIDASA -,	<i>Serratia marcescens strain RS25</i>
14	RÍO TIPUTINI	BACILO GRAM -, OXIDASA -,	<i>Serratia marcescens strain RI42</i>

Tabla 13: Especificaciones muestras ambientales aisladas identificadas capaces de transferir genes de resistencia a antibióticos

Código de recolección	Número de cepa	Sitio de aislamiento	Fecha	Medio de cultivo de	Medio de cultivo para	Fenotipo de la cepa original
-----------------------	----------------	----------------------	-------	---------------------	-----------------------	------------------------------

				aislamiento	conjugación	
2A	2	AGUAS NEGRAS	29/03/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA BLANQUECINA, UNIFORME, MEDIANA, OXIDASA -, BACILO GRAM -
3A	4	RÍO TIPUTINI	29/03/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA AMARILLA, UNIFORME, MEDIANA, OXIDASA +, BACILO GRAM -
3A	5	RÍO TIPUTINI	29/03/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA AMARILLA, NO UNIFORME, GRANDE, OXIDASA +, BACILO GRAM -
3A	6	RÍO TIPUTINI	29/03/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA AMARILLA, GRANDE, OXIDASA -, BACILO GRAM -
3A	7	LAGO AGRIO	03/04/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA BLANQUECINA, MEDIANA, OXIDASA -, BACILO GRAM -
4A	8	LAGO AGRIO	03/04/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA BLANQUECINA, OXIDASA -, BACILO GRAM -
4T	9	LAGO AGRIO	03/04/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA AMARILLA, OXIDASA -, BACILO GRAM -
5A	10	TENA	04/04/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA BLANQUECINA, UNIFORME, OXIDASA +, BACILO GRAM -
2A	12	AGUAS NEGRAS	29/03/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA VIOLETA, OXIDASA -, BACILO GRAM -
3A	14	RÍO TIPUTINI	29/03/08	WHEAT GRAIN MEDIUM	CALDO NUTRITIVO <i>TRIPTIC SOY BROTH</i>	COLONIA BLANQUECINA, GRANDE, OXIDASA -, COCO GRAM -

13.Anexos

Anexo 1

Pruebas bioquímicas

Tinción gram.- El proceso de tinción se realizó de la siguiente manera para cada uno de los aislados obtenidos: el frotis fijado con calor se tiñó durante 1 minuto con cristal violeta, se lavó con agua y se cubrió con solución de yodo durante 1 minuto y se lava de nuevo con agua, se decoloró con una mezcla alcohol y acetona. Se dejó secar la placa y se colocó safranina durante 30 segundos. Se lavó la placa y se dejó secar. Una vez terminado esto se observó al microscopio, con una gota de aceite de inmersión.

Prueba de oxidasa.- Esta prueba se realizó para la detección de la enzima citocromo – c – oxidasa. Con este fin se utilizaron tiras de ensayo. En esta tira se inoculó una colonia bien diferenciada utilizando un palillo estéril. La aparición de un color azul violeta indicó la presencia de microorganismos oxidasa positivos.

Prueba de catalasa.- Esta prueba se utilizó para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Con el asa de siembra se tomó una muestra de una colonia y se colocó en un portaobjetos. Se agregó una gota de agua oxigenada (H_2O_2). Se observó la formación de burbujas lo cual indica un resultado positivo, en el caso contrario se indicó un resultado negativo.

Anexo 2

Protocolo de extracción ADN con CTAB

El protocolo de extracción de ADN con solución CTAB se realizó durante 2 días. El primer día se resuspendieron las células bacterianas en PBS, se centrifugó durante 3 minutos a 10.000 rpm, se digirió el pellet celular en 700 ul de solución CTAB y se incubó por 30 minutos a 65 °C, agitando las muestras cada 15 minutos. Para la extracción del ADN genómico total se enfriaron las muestra a temperatura ambiente, se agregó 700 ul de cloroformo:alcohol isoamílico y se mezcló invirtiendo vigorosamente hasta formar una emulsión, se centrifugaron las muestras por 5 minutos a 12000 rpm. Se obtuvieron 2 fases, la inferior u orgánica, la superior o acuosa con el ADN en suspensión, y una interfase que contiene las proteínas celulares. Se transfirió la fase superior a un nuevo Eppendorf rotulado. Al final del primer día se precipitó el ADN de la solución acuosa agregando 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2 a 2.5 volúmenes de etanol 100 % helado. Se dejó a – 20 °C toda la noche.

En el segundo día del protocolo se centrifugaron las muestras a 14000 rpm por 10 minutos, se lavaron los pellets de ADN adicionando 1000 ul de etanol 70 % y se resuspendió, se centrifugaron las muestras a 14000 rpm por 10 minutos y se repitió el procedimiento de lavado 3 ocasiones. Se dejaron secar los tubos y se conservaron las muestras a -20 °C. Para utilizar el ADN fue necesario resuspender la muestra con 50 ul de buffer TE estéril.

Anexo 3

Precipitación del ADN para secuenciamiento

Una vez que se obtuvo el volumen de amplicón (150 ul) requerido para cada muestra se procedió a la precipitación del ADN para su posterior secuenciamiento. En un tubo con el volumen final de amplicón se colocó acetato de sodio 3M, se agitó en vortex brevemente y se dejó reposar durante varias ocasiones. Se colocaron de 2 a 2.5 volúmenes de alcohol etílico al 100 % helado y se agitó la muestra en vortex. Se colocaron los tubos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Finalmente (por 3 ocasiones), se centrifugó durante 5 minutos a 12000 RPM, se extrajo el sobrenadante, se lavó con alcohol etílico al 80 % y se secó al ambiente.

Anexo 4

Carta interpretativa de halos de sensibilidad provista por el productor de los discos de antibióticos Becton Dickinson, Sparks, USA

ANTIBIÓTICO	RESISTENTE	INTERMEDIO	SUSCEPTIBLE
Ampicilina	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Gentamicina	6	7 - 9'	≥ 10
Tetraciclina	≤ 14	15 - 18'	≥ 19
Cloramfenicol	≤ 15	16 - 20'	≥ 21
Ciprofloxacina	≤ 12	13 - 17'	≥ 18
Trimetroprin sulfametoxazol	≤ 10	11 - 15'	≥ 16
Eritromicina	≤ 13	14 - 22'	≥ 23