



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas

**“Frecuencia del *operón mer* en plásmidos conjugativos
presentes en *Escherichia coli* aislados de ambientes
marinos de Lima y su relación con la resistencia a
antimicrobianos clínicos”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Microbiología y Parasitología

AUTOR

Marcos Alejandro SULCA LÓPEZ

ASESOR

Débora ALVARADO IPARRAGUIRRE

Lima, Perú

2008

Este trabajo está dedicado especialmente a mis padres, Marcos y Gertrudis, quienes con mucho esfuerzo me apoyaron siempre en mis estudios, conmigo como también con mis hermanos; depositando en mi persona plena confianza durante mi formación profesional.

Los conocimientos, son el conjunto de experiencias que se obtienen en las actividades diarias de la vida; a la vez, la experiencia tiene su origen después de una sin fin cadena de errores, que por más que duelan, siempre nos enseñan algo positivo; por lo que, metafóricamente puedo decir:

“Las experiencias son los libros que necesitamos”

AGRADECIMIENTOS

- Mi agradecimiento a la profesora Mag. Biol. Débora Elizabeth Alvarado Iparraguirre, por brindarme la oportunidad de desarrollar el presente trabajo de tesis y por su asesoramiento, compartiendo conmigo sus experiencias y conocimientos en el campo de la investigación.
- A la Dra Anne O. Summers, de *The University of Georgia – Department of Microbiology* (Athens, Georgia), por la donación de la cepa patrón *E. coli* DU1040 (NR1), con el cual pude concluir mi trabajo de tesis.
- Al Biol. Ronnie Gustavo Gavilán Chávez, quién me brindó su ayuda y conocimientos en el campo de la Microbiología Molecular.
- A la estudiante Bía Margarita Peña Peralta, quien me apoyó al comienzo del trabajo.

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
°C	Grados centígrados
CH ₃ Hg	Metil mercurio
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogénica
F ⁻	Cepa bacteriana receptora de plásmidos
F ⁺	Cepa bacteriana donadora de plásmidos
G	Gravedad
Hg ²⁺	Ión mercurio o mercurio iónico
Hg ⁰	Mercurio elemental
HgCl ₂	Cloruro de Mercurio
LB	Luria-Bertani
M	Mol
Mg ²⁺	Iones de Magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimol

mV	Milivoltio
NaCl	Cloruro de Sodio
#	Número
PCR	Reacción en Cadena por la Polimerasa
pmol	Picomol
p/v	Peso/volumen
%	Por ciento
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
seg	Segundo
TAE	Tris-base, ácido acético, EDTA
TE	Tris-EDTA
μL	Microlitro
μM	Micromol
W ^r	Ácido Nalidíxico resistente

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Significado del mercurio en el ambiente.	3
2.2 Efecto del mercurio en organismos multicelulares.	5
2.3 Efecto del mercurio en el humano.	5
2.4 Resistencia bacteriana al mercurio.	6
2.5 Genes que otorgan resistencia al mercurio (genes <i>mer</i>).	8
2.6 Tipos de resistencia al mercurio.	9
2.7 Relación: Resistencia al mercurio y antibióticos.	1
	0
	1
III. ANTECEDENTES	2
	1
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	9
4.1 Cepas bacterianas.	1
	9
4.2 Reactivación de cepas.	1
	9
4.3 Seroagrupación de los aislados de <i>E. coli</i> .	2

	1
	2
4.4 Determinación de la resistencia a antimicrobianos clínicos.	1
	2
4.4.1 Discos de antibióticos probados.	1
	2
4.4.2 Metodología para la evaluación de la resistencia microbiana	2
	2
4.4.3 Lectura y análisis del antibiograma	3
	2
4.5 Determinación de la resistencia al mercurio.	3
	2
4.5.1 Metodología para la evaluación de la resistencia microbiana al Mercurio.	3
	2
4.5.2 Determinación de la Concentración Mínima de Mercurio a tomar.	3
	2
4.6 Curado de las cepas.	4
	2
4.7 Aislamiento del ADN plasmídico.	5
	2
4.7.1 Preparación de las células.	5
	2
4.7.2 Lisis de las células.	6

4.7.3 Recuperación del ADN plasmídico.	2
	7
4.8 Determinación de los pesos moleculares de los plásmidos aislados.	2
	8
4.9 Prueba de conjugación bacteriana.	2
	8
4.10 Cálculo de la frecuencia de transferencia de plásmidos de resistencia al mercurio.	2
	9
4.11 Amplificación por PCR del gen <i>merA</i> .	3
	0
4.11.1 <i>Primers</i> o iniciadores.	3
	0
4.11.2 <i>Mix Master</i> para la Amplificación.	3
	1
4.11.3 Condiciones del <i>Hot Star</i> PCR.	3
	2
4.11.4 Visualización del Producto de PCR.	3
	2
V. RESULTADOS	3
	3
5.1 Seroagrupación de las cepas en estudio	3
	3
5.2 Resistencia al mercurio.	3

	4
5.3 Resistencia a antimicrobianos clínicos.	3
	6
5.4 Frecuencia de resistencia a cada antibiótico probado.	3
	7
5.5 Presencia de plásmidos.	3
	9
5.6 Curado de las cepas.	4
	0
5.7 Conjugación bacteriana.	4
	2
5.8 Frecuencia del operón <i>mer</i>	4
	3
VI. DISCUSIÓN	4
	4
VII. CONCLUSIONES	5
	0
VII. RECOMENDACIONES	5
	1
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
	2
ANEXOS	6
	6

RESUMEN

Se investigó la resistencia bacteriana al ión mercurio (Hg^{2+}) en 55 cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes ambientes marinos de la costa limeña: Bahía de Pucusana, Bahía de Miraflores y Bahía del Callao (Lima-Perú). Se determinaron los diferentes serogrupos de las cepas, utilizando sueros polivalentes EPEC, EIEC y EHEC; la resistencia al mercurio fue evaluada realizando pruebas de MIC a cloruro de mercurio: 30, 50, 80, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{M}/\text{mL}$ disuelto en caldo LB. Se evaluó las cepas mercurio-resistentes frente a antibióticos clínicos por la técnica de difusión en placa usando los siguientes antibióticos en discos: Cloramfenicol (C), 30 μg ;

Norfloxacin (Nor), 10 µg; Amikacina (Ak), 30 µg; Kanamicina (K), 30 µg; Ampicilina (A), 10 µg; Sulfaperazone (Sfp), 30 µg; Tetraciclina (Te), 30 µg; Aztreonam (Az), 30 µg; Ceftazidima (Caz), 30 µg; Gentamicina (Ge), 10 µg; Amoxicilina (Amx), 25 µg; Sulfametoxazol-trimetoprim (Sxt), 25 µg; Ácido Nalidíxico (W), 30 µg; Ciprofloxacina (Cip), 5 µg. El origen de la resistencia al mercurio mediada por plásmidos se comprobó mediante la técnica de curación con SDS (10 % p/v); se realizó la técnica de conjugación de plásmidos tomando la cepa receptora *E. coli* DH5α. Para la visualización de los plásmidos conjugativos se realizó la técnica de extracción de plásmidos con el método de Lisis Alcalina con SDS en las cepas receptoras mercurio-resistentes. Así mismo se evaluó la presencia del gen *merA*, que se encuentra en el operón *mer*, por el método del PCR tomando como DNA molde los plásmidos aislados. Del total de las cepas de *E. coli* (n=55) estudiadas, el 29,1 % (n=16) resultaron ser positivas para los serogrupos EPEC, de éstas: 31,25 % EPEC poliA, 50 % EPEC poliB, 18,75 % EPEC poliC. El 74,54 % (n=41) son resistentes al mercurio en distintas concentraciones, de éstas el 34,15 % son resistentes a antibióticos; se observó la resistencia al mercurio mediada por plásmidos en el 80,5 %. De las cepas mercurio resistentes, el 14,63 % (n=6) mostraron ser portadores de plásmidos conjugativos, observándose la presencia de estos en las cepas receptoras mercurio resistentes. Se observó la presencia truncada o aberrante del gen *merA* en los plásmidos aislados, confirmando la frecuencia del operón *mer* en el 14,63 % de las cepas mercurio resistentes.

Palabras clave: *Escherichia coli*, resistencia al mercurio, resistencia a antimicrobianos, plásmidos de resistencia, bacteria alóctona marina.

ABSTRACT

The bacterial resistance to mercury (Hg^{2+}) in 55 *Escherichia coli* strains isolates from different Lima's marine environments: Pucusana, Miraflores and Callao Bay (Lima-Perú) were assessed, the strains's serogroups were obtained using polyvalent serums: EPEC, EIEC y EHEC; the resistance to mercury was observed doing a MIC to different concentrations of mercury chloride: 30, 50, 80, 100, 200, 300 and 400 $\mu M/mL$ in LB broth. The resistance to clinical antibiotics in resistant-mercury strains were assessed using the plaque diffusion method with the following antibiotics: Chloramphenicol (C), 30 μg ;

Norfloxacin (Nor), 10 µg; Amikacin (Ak), 30 µg; Kanamycin (K), 30 µg; Ampicillin (A), 10 µg; Sulphaperazone (Sfp), 30 µg; Tetracycline (Te), 30 µg; Aztreonam (Az), 30 µg; Ceftazidime (Caz), 30 µg; Gentamicin (Ge), 10 µg; Amoxicillin (Amx), 25 µg; Sulphamethoxazole-trimethoprim (Sxt), 25 µg; Nalidixic Acid (W), 30 µg; Ciprofloxacin (Cip), 5 µg. The plasmid mercury resistance was assessed for curing technique with SDS (10 % p/v), the conjugation test was tested with *E. coli* DH5α strain. The physical nature of the conjugative plasmids, were demonstrated extracting with alkaline lyses method with SDS. Thus, the presence of *merA* gen was assessed with PCR method taking plasmidic DNA as template. From every strains (n=55), 29,1 % (n=16) were positives to EPEC serogroups; from these, 31,25 % were EPEC poliA, 50 % EPEC poliB, 18,75 % EPEC poliC. 74,54 % (n=41) from every strains are resistant to mercury, of these, 34,15 % are resistant to antibiotics too; presence of plasmids were observed in 80,5 %. The transference plasmidic was observed in 14,63 % (n=6) from mercury-resistant strains. The presence of *merA* gen was observed, having some truncated form *merA*, comproved from plasmids isolated with PCR method to confirm the resistance to mercury by *mer* operon. Frequency of this operon in all mercury-resistant strains was 14,63 %.

Keywords: *Escherichia coli*, resistance to mercury, resistance to antibiotics, resistance plasmids, allochtone marine bacteria.

I. INTRODUCCIÓN

La contaminación por metales pesados en las zonas costeras de Lima y el efecto sobre la microbiota acuática no han sido profundamente estudiadas en aguas peruanas, por eso también la importancia de estudiar los fenotipos y sus genotipos bacterianos que otorgan resistencia a los diferentes metales pesados; en este caso, evaluar la resistencia al mercurio iónico (Hg^{2+}) en cepas de *E. coli*. El mercurio es un metal pesado que reacciona con tioles activos y disminuye la concentración de antioxidantes celulares, tal metal pesado existe en la naturaleza en pequeñas cantidades y no tiene función

biológica, pero sus niveles en el ambiente aumentan debido a la actividad humana que produce contaminación de suelos, aire y agua, siendo este elemento altamente tóxico para todas las formas de vida (Cursino. *et al*, 2003; Nascimento *et al*, 2003; Simbahan *et al*, 2005; Silver & Hobman, 2007). La presencia de iones mercurio en ecosistemas acuáticos, origina la bioacumulación de éste en organismos vivos multicelulares presentes en el medio, acumulándose también a través de la cadena trófica, que puede afectar la salud pública por intoxicación al consumir recursos extraídos de ambientes marinos neríticos a la costa (Bae *et al*, 2001; De y Ramaiah, 2007).

En este trabajo de investigación se busca obtener la frecuencia del operón *mer* en plásmidos conjugativos en cepas de *Escherichia coli* aisladas de ambientes marinos de la costa limeña, evaluando la frecuencia de transconjugación a la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (W^r) como receptora de plásmidos, evaluando el nivel de resistencia de cada cepa hacia dicho metal y a diferentes antibióticos de uso clínico, para observar si hay una relación entre la resistencia al mercurio y a antibióticos en los mismos plásmidos conjugativos. Confirmar por PCR la presencia del gen *merA* -que sintetiza la enzima Mercurio reductasa que reduce al ión mercurio a mercurio elemental, para confirmar si tal resistencia al mercurio se debe por la presencia del operón *mer*.

Además de confirmar que tales resistencias son de origen plasmídico, se aislarán los plásmidos para contar con genes de resistencia al mercurio y

realizar estudios posteriores en el campo de la biotecnología, debido a que tales cepas ambientales son de interés para la ecología microbiana no sólo por validar la presencia de la resistencia al mercurio en la microbiota de las bahías de Lima, sino también para entender la evolución y la significancia de esta resistencia.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Significado del mercurio en el ambiente

El mercurio y la gran variedad de compuestos donde se encuentra presente, ingresa a diversos ambientes acuáticos debido al lixiviado natural, lavado de suelos, rocas; desde la atmósfera, procedente de las lluvias; la acción antropogénica que produce cloro-álcalis, instrumentos de manufactura, residuos de laboratorios químicos y odontológicos (De *et al*, 2003). El mercurio es de uso muy difundido, para la extracción de oro, producción de vacunas,

antimicrobianos, amalgamas y electrónicos; siendo el cloruro de mercurio (HgCl_2) el más empleado en estudios experimentales debido a que es soluble (Schelert *et al*, 2004).

Así mismo en el ambiente, el mercurio puede existir bajo una de sus tres formas: mercurio iónico (Hg^{2+}), mercurio elemental (Hg^0), y el más notable, el metilmercurio (CH_3Hg) que causa problemas de toxicidad (Schaefer *et al*, 2002). Los procesos bióticos y abióticos facilitan el ciclo del mercurio, desde suelos y aguas a la atmósfera y de regreso a la superficie (Barkay *et al*, 2003) (Ver Figura 1).

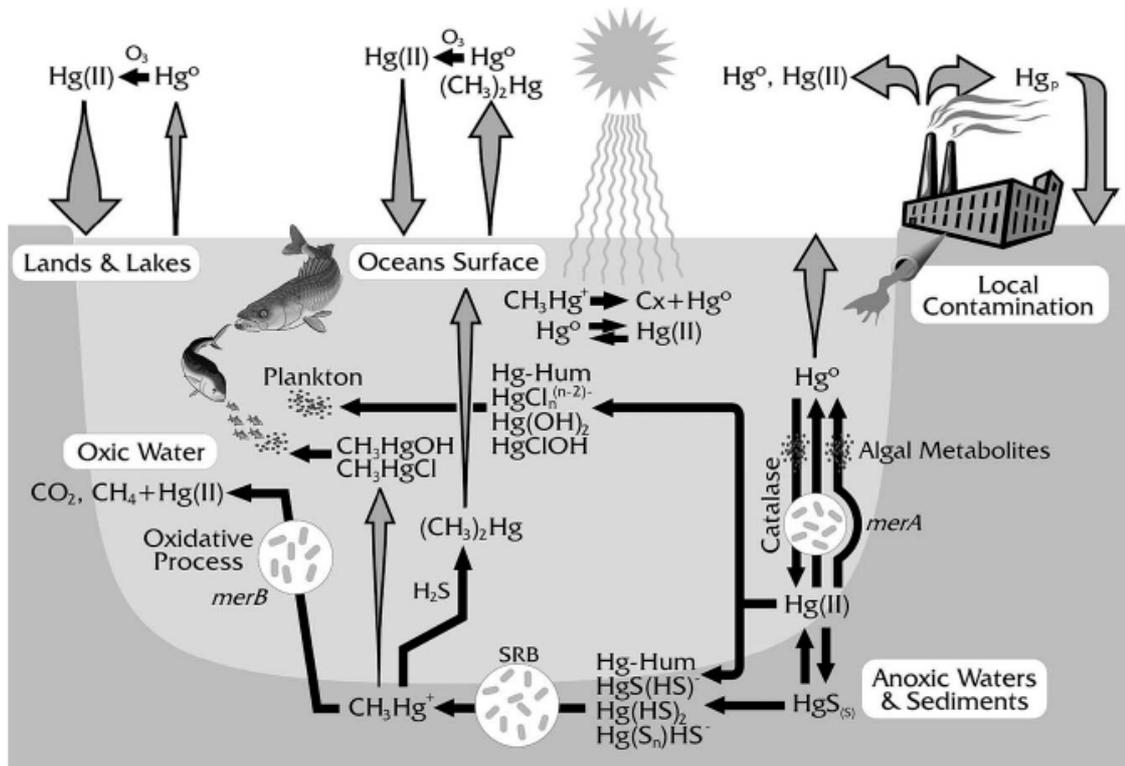


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del mercurio en el ambiente. Las flechas oscuras representan la transformación o ruta que sigue el mercurio. Las flechas claras indica el flujo de mercurio en diferentes compartimentos en el ambiente. La anchura de las flechas claras es aproximadamente proporcional a la importancia relativa del flujo del mercurio en la naturaleza. La especiación del Hg^{2+} en aguas oxigénicas y anóxicas está controlada por los cloruros, hidróxidos, y por los sulfitos respectivamente. La transformación conocida del mercurio, está mediada por microorganismos que están representadas por círculos describiendo las células bacterianas, SRB representa a las bacterias sulfito reductores, y *merB* y *merA* refiere a la actividad de los genes que codifican la Órgano mercurial liasa y la Mercurio reductasa respectivamente. Un grupo de puntos indican la involucración de algas unicelulares. La transformación del mercurio dada en las columnas de agua iluminadas por los rayos solares está ubicada bajo el sol. La fotodegradación del CH_3Hg^+ da como producto, mayormente, Hg^0 y una especie de carbono desconocido detallado como C_x (Barkay et al, 2003).

2.2 Efecto del mercurio en organismos multicelulares

El mercurio presente en la biota acuática, produce la bioacumulación o biomagnificación de éste, en organismos como en el zooplancton, peces, mamíferos marinos y otros; por lo que el mercurio bajo la forma de metilmercurio es bioacumulable en la biota acuática, siendo altamente tóxico y letal para los humanos cuando consumen peces con altos niveles de este compuesto (Kirk *et al*, 2006; Al-Reasi *et al*, 2007; Guentzel *et al*, 2007). Los efectos residuales que producen los metales pesados cuando se presentan a altas concentraciones en la biota acuática, se dan a largo plazo y tales metales al formar parte de algún compuesto orgánico no son fácilmente eliminados de estos ecosistemas. La presencia de bacterias de origen marino, resistentes a antibióticos y/o metales pesados, en la costa marina y aguas, son frecuentemente usados como indicadores de contaminación (De Souza *et al* 2006; Zhang *et al*, 2006).

2.3 Efecto del mercurio en el humano

En el hombre, la peligrosidad del mercurio metálico o elemental (Hg^0) reside en su punto de evaporación, que es alcanzado a temperatura ambiente ($13^\circ C$), al ser volátil puede ser absorbido fácilmente por las vías respiratorias hacia los pulmones, donde el mercurio elemental (Hg^0) es oxidado a mercurio iónico (Hg^{2+}), ligándose inmediatamente a las proteínas. El mercurio puede

acumularse en riñones, hígado, bazo y huesos; algunos estudios han informado sobre el deterioro psicomotor en trabajadores mineros; además, la exposición a este metal puede contribuir a patologías asociadas con la homeostasis de la glucosa (Barnes y Kircher, 2005; Ramírez, 2006).

Se encontró que aquellos grupos humanos cuya dieta se basaba en pescado contaminado, presentaban una concentración de mercurio en la sangre mayor que en poblaciones con dieta que no lo incluía (Ramírez, 2006). El envenenamiento por metilmercurio afecta particularmente el desarrollo del sistema nervioso en fetos y niños pequeños, así también produce la enfermedad de Minamata (Bae *et al*, 2003; Ekino *et al*, 2007). En estudios realizados sobre la contaminación de mercurio en la cuenca del Madre de Dios (Perú), la presencia del mercurio es alarmante, sobrepasando los límites permisibles en peces y seres humanos, debido a la extracción artesanal del oro cuyos residuos son descargados directamente al río (Tello, 2002). Además residuos mercuriales y otras sales metálicas producidas en la actividad minera son descargados indirectamente al mar a través de los ríos de la costa del Perú.

2.4 Resistencia bacteriana al mercurio

Los microorganismos transforman el mercurio a sus tres diversos estados de oxidación: 0, +1, +2, presentes tanto en la forma de mercurio

orgánico e inorgánico; así mismo los microorganismos influyen la toxicidad y movilidad del mercurio en el ambiente; la resistencia bacteriana al mercurio se debe a la producción de la enzima mercurio reductasa, que reduce el ión mercurio (Hg^{2+}) a su forma volátil elemental (Hg^0); estando esta enzima presente en diversos grupos de bacterias (Barkay *et al*, 1985; Misra, 1992, Vetriani *et al*, 2005).

La resistencia al mercurio está ampliamente distribuida en diferentes grupos bacterianos tanto en Gram negativos y Gram positivos aislados del ambiente, como en comensales y en aislados clínicos, asociados con la resistencia a antibióticos como en las enterobacterias, tal resistencia también es encontrada en arqueas como *Sulfolobus solfataricus*, y macrofitas. (Laddaga *et al*, 1987; Hobman *et al*, 2002; Schelert *et al*, 2004; Caslake *et al*, 2006). Este mecanismo de resistencia es frecuentemente codificado en plásmidos –que también pueden portar genes de resistencia a antimicrobianos clínicos- o transposones como el transposón *Tn501* (de *Pseudomonas aeruginosa*, alojado en el plásmido pVS1); el *Tn21* (de *Shigella* alojado en el plásmido R100, que es idéntico a los plásmidos NR1 y R222); el *Tn5044*, que otorga resistencia al mercurio a 30°C, siendo la resistencia altamente específica contra el ión mercurio o al mercurio ligado covalentemente a un componente orgánico como el fenilmercurio acetato (PMA) (Nucifora *et al*, 1989; Hamlett *et al*, 1992; Summers *et al*. 1993; Kholodii & Bogdanova, 2002).

2.5 Genes que otorgan resistencia al mercurio (genes *mer*)

Los genes que codifican las enzimas que confieren la resistencia y permite la transformación del mercurio son: *merA*, que codifica la enzima mercurio reductasa, dependiente de NADPH, cuyo sitio activo es la región más conservada de la enzima; *merT*, *merP*, *merC* o *merF*, que codifican proteínas transportadoras de mercurio; *merB*, que codifica la organomercurial liasa; *merR*, *merD*, con funciones regulatorias y *merG*, implicado también a la resistencia a fenilmercurio; todos ellos forman el operón *mer* que es utilizado en estudios de ecología molecular microbiana, en estudios y procesos de biorremediación (Misra, 1992; Liebert *et al*, 1997; Kiyono & Pan-Hou, 1999; Palmer, 2001; Felske *et al*, 2003; Schelert *et al*, 2004). Los genes *merRTPA* son genes esenciales para la resistencia al mercurio, mientras que los demás son genes accesorios ya que no se encuentran en todas las cepas con el operón *mer*, como se mencionó, los operones *mer* varían en estructura y están compuestos por diferentes genes (Liebert *et al*, 1997; Nascimento & Chartone-Souza, 2003) (Ver Figura 2).

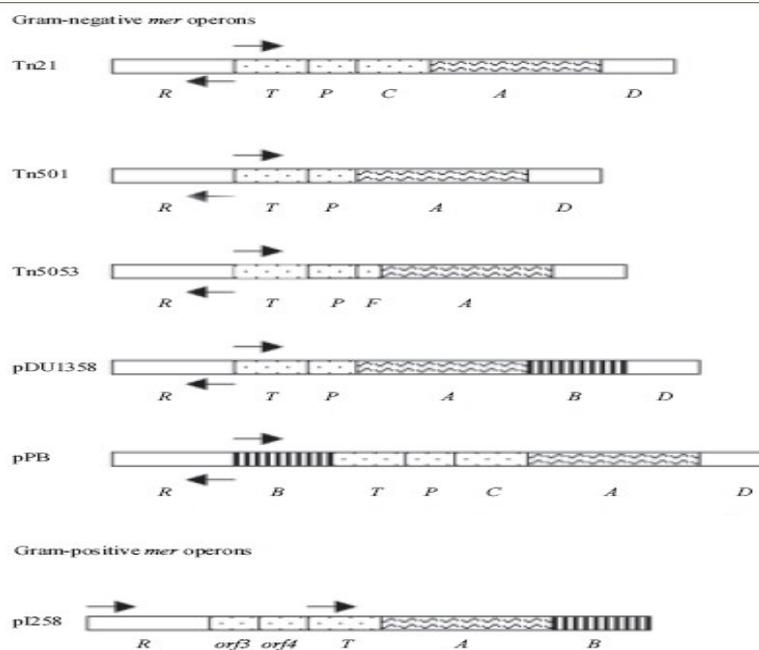


Figura 2. Representación esquemática de operones *mer* Gram negativos y positivos, entre ellos: transposón Tn21 del plásmido NR1 de *Shigella flexneri*, transposón Tn501 del plásmido pVS1 de *Pseudomonas aeruginosa*, plásmido pDU1358 de *Serratia marcescens*, transposón Tn5053 del plásmido pMR de *Xanthomonas* sp. , plásmido pPB de *Pseudomonas stutzer*, y plásmido pI258 de *Staphylococcus aureus* (Nascimento & Chartone-Souza, 2003).

2.6 Tipos de resistencia al mercurio

Hay dos tipos de resistencia ante la presencia de compuestos con mercurio: la resistencia sólo al mercurio inorgánico, llamado de espectro angosto y resistencia al mercurio orgánico y organomercuriales llamado de amplio espectro, en éste último se sintetiza una segunda enzima: la organomercurial liasa, que convierte, por ejemplo, el fenilmercurio acetato a benceno -menos tóxico- y Hg^{2+} , este último reducido por la mercurio reductasa acompañante (Foster & Ginnity, 1985; Laddaga *et al*, 1987; Nucifora *et al*,

1989; Bogdanova *et al*, 1998). Otros tipos de resistencia podemos mencionar: la producción de metalotioninas, fitoquelatinas, que son proteínas enlazadoras, que se unen e inmovilizan iones metálicos por los que poseen gran afinidad, evitando sus interacciones con otras proteínas esenciales para el microorganismo, otro mecanismo de resistencia está basado en la producción de proteínas de membrana que actúan como bombas de flujo evitando la bioacumulación, la síntesis de una gran cantidad de polifosfatos también provee resistencia hacia compuestos orgánicos e inorgánicos que contienen mercurio en su composición, esto debido tal vez por la actividad quelante del polifosfato hacia el mercurio; estos diferentes tipos de resistencia permiten a los microorganismos tolerar diferentes concentraciones de mercurio (Bae *et al*, 2001, 2003; Barkay *et al*, 2003; Kiyono *et al*, 2003; Pan-Hou *et al*, 2002; Achard-Joris *et al*, 2006).

2.7 Relación: Resistencia al mercurio y antibióticos

La frecuencia de resistencia al mercurio en aislados hospitalarios es atribuido también al uso de organomercuriales en detergentes y desinfectantes líquidos que seleccionan a microorganismos con plásmidos de resistencia al mercurio, y la disminución de la frecuencia de esta resistencia se evidencia dejando de usar tales organomercuriales (fenilmercurio, timerosal) (Porter *et al*, 1982); en tal caso, el uso de mercurio como desinfectante ha sido sugerido como seleccionador de la resistencia al mercurio en ambientes hospitalarios.

Esta resistencia se encuentra también relacionada a la resistencia a antimicrobianos clínicos. Así mismo el medio ambiente contaminado con mercurio incluyendo la amalgama dental, promueve y mantiene la resistencia a antimicrobianos clínicos ligada también con la resistencia al mercurio en la microbiota normal humana (Österblad *et al*, 1995).

III. ANTECEDENTES

Erb *et al* (2007), determinaron que la prevalencia de resistencia a diferentes antibióticos en *E. coli* es muy variable en diferentes poblaciones y países, observándose una prevalencia muy alta en los últimos años, siendo el riesgo de adquisición de cepas resistentes a antibióticos más alta en los hospitales que en la comunidad, aunque la población general también constituye un gran reservorio de cepas resistentes a antibióticos. Actualmente diferentes estudios muestran una frecuencia mayor de resistencia en *E. coli* a Ampicilina; por ejemplo, en Perú y Bolivia se observó la prevalencia de cepas resistentes a Ampicilina en el 95 %, 18 % para Ciprofloxacina, 94 % para Cotrimoxazol. Hay pocos reportes sobre la epidemiología de *E. coli* resistentes a cefalosporinas aunque también hay estudios que informan la adquisición de infecciones debido a *E. coli* productores de Beta lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Watkinson *et al* (2007), evaluaron diferentes métodos como el uso de agar cromogénico modificado, suplementado con diferentes antibióticos para el aislamiento e identificación de cepas de *E. coli* resistentes a antimicrobianos clínicos en muestras de aguas ambientales, mostrando una alta incidencia de resistencia múltiple a antibióticos, observando que tales fenotipos son más frecuentes en localidades adyacentes a zonas de descargas de aguas procedentes de los centros de tratamientos de aguas servidas; habiendo

muchos estudios donde mostraron resultados similares, demostrando la importancia de las fuentes de descarga por la adición de bacterias resistentes a antibióticos en ambientes acuáticos.

Barkay *et al*, (2003) describen que en 1960 se reportó por primera vez la resistencia al ión mercurio y penicilina en un aislado clínico de *Staphylococcus aureus*, demostrándose después que el origen de la resistencia se debía a los plásmidos, lo que fue reportado también posteriormente en un aislado clínico de *E. coli*. La población biológica resistente al mercurio es muy variada y extensa, estas bacterias son fácilmente aisladas en una variedad de muestras, ya sea suelos, agua, sedimento así como en animales y humanos. El material genético encontrado en genes *mer* tanto en bacterias Gram positivas y Gram negativas (típicamente *merA*) puede ser encontrado en cromosomas o plásmidos de estas cepas. Este fenómeno de resistencia y transformación del mercurio es muy estudiado y está mayormente asociado al operón *mer*.

Porter *et al* (1982), reportaron que la frecuencia de resistencia a metales pesados es encontrada en un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y esta resistencia puede ser transferida por conjugación, a través de genes o plásmidos de resistencia a metales pesados. La transferencia de plásmidos por conjugación de varios microorganismos Gram negativos a *E. coli* K-12, dio un porcentaje de cepas transformadas (después de dicha transferencia) lo cuales expresaron resistencia a antimicrobianos, al mercurio y algunos organomercuriales en las cepas receptoras transformadas.

Gauthier *et al* (1985), determinaron que el desarrollo de varios mecanismos de resistencia bacteriana a iones mercurio se debe principalmente a la polución urbana e industrial, siendo esta resistencia comúnmente dependiente de plásmidos; la transferencia de estos plásmidos de resistencia al mercurio y otros metales a cepas de *E. coli* ya fueron demostrados. La transferencia de plásmidos de resistencia al mercurio, por parte de bacterias de origen marino a cepas de *E. coli* K-12, en condiciones de laboratorio, parece ser un fenómeno común pero el proceso es lento. La transferencia de plásmidos de resistencia es también afectada por la temperatura y la concentración de sales en el medio de cultivo *in vitro*.

Hermansson *et al* (1987), determinaron que la frecuencia más alta de bacterias mercurio-resistentes se debe a la alta concentración de mercurio concentrado en el lugar de muestreo. En el caso de bacterias aisladas de ambientes marinos, la frecuencia de resistencia a metales pesados como el Cadmio (Cd), Zinc (Zn), Cromo (Cr); no muestra diferencia alguna en bacterias aisladas de la superficie marina o del resto de masa de agua; pero, en cuanto a la resistencia al mercurio, la frecuencia más alta se encuentra en la superficie marina debido a la mayor concentración de mercurio en la interfase que en el resto de masa de agua, esto podría sugerir que la más alta frecuencia de resistencia -codificada por plásmidos- se da en la superficie marina.

Poiată *et al* (2000), evaluaron la frecuencia de resistencia al mercurio y otros antimicrobianos clínicos como Ampicilina, Cefalexina, Cefotaxime,

Gentamicina, Tetraciclina y Cloramfenicol en 363 cepas de *E. coli* aislados en muestras de heces y orina; donde el 29,2 % fueron mercurio resistentes, de éstas el 91,5-23,6 % fueron resistentes a los antibióticos probados, concluyendo que la resistencia al mercurio está ligada a antimicrobianos clínicos.

Sabry *et al* (1997), determinaron la tolerancia a metales pesados y antibióticos en comunidades heterotróficas mercurio-resistentes procedentes de aguas marinas, siendo en la mayoría cepas sensibles al cadmio, mercurio, zinc y cobalto; y en menor proporción a plomo, níquel, arsenato, y cobre; la mayoría de las cepas resistentes probadas presentaron también resistencia múltiple a diferentes metales pesados, y en relación con la resistencia a antibióticos, el 70,38 % presentaron la resistencia múltiple a antibióticos.

Bass *et al* (1999), determinaron que la resistencia a diversos antibióticos en *E. coli* de origen aviar, se debía a la presencia de integrones de clase I (*intI1* y *qacED1*), cuyos amplicones portaban el gen *aadA1* que otorga resistencia a Espectomicina y Estreptomina, así mismo un porcentaje de los aislados mostró la presencia del gen *merA*, con esto sugirieron que estos integrones estaban presentes en el transposón *Tn21*.

Essa *et al* (2003), reportan que los genes de los diversos operones *mer*, codificados desde un transposón, llevado por un plásmido conjugativo de donde se codifica la resistencia al mercurio y también a sulfonamidas y

estreptomicina-espectinomicina; hospedado en el plásmido NR1 (R100), siendo éste y otros parecidos encontrados en *E. coli* de fuentes no clínicas, así como por la exposición a las amalgamas dentarias.

Simbahan *et al* (2005), reportan que la resistencia al mercurio es común entre las bacterias, el origen de este mecanismo de resistencia es por la acción de la enzima mercurio reductasa (*merA*), quien reduce el ión mercurio a mercurio elemental. La presencia de los genes *mer* en plásmidos, puede explicar el porqué algunas bacterias poseen genes *mer* aún no estando en ambientes ricos en mercurio. Este *merA*, puede también existir bajo dos formas de mercurio reductasa procarióticas: una bacteriana y la otra arqueana; siendo *merA* arqueana igualmente esencial para resistir en medios ambientales ricos en mercurio.

Ramaiah *et al* (2003), reportan que los investigadores han usado a las bacterias, para evaluar las descargas de efluentes en ambientes marinos y costeros, observando también la distribución de la microbiota nativa capaz de tolerar a los metales pesados presentes, esto es de gran importancia para la ecología microbiana. Los estudios en bacterias mercurio-resistentes también mostraron resistencia adicional a muchos antibióticos y otros químicos tóxicos, llevando plásmidos y/o transposones que codifican la resistencia a metales pesados, ligado también a la resistencia a antibióticos, siendo posible por el incremento de la actividad industrial, agrícola y la continua descarga de

efluentes en ambientes marinos; esto podría originar la selección de comunidades microbianas capaces de tolerar el mercurio.

Saha *et al* (2006), reportan en aislados clínicos, microorganismos mercurio resistentes cuya resistencia está mediada por plásmidos, pero también determinan que dicha resistencia está relacionada a algunos genes cromosómicos. La expresión de la resistencia al Hg^{2+} se debe a que estos aislados poseen el operón *mer*, y la expresión de éste es inducible y dependiente de la presencia de iones mercurio como inductor; tales operones poseen genes como el *merA* y el *merB* cuyos productos son la mercurio reductasa y la organomercurial liasa respectivamente, en éstos, la mercurio reductasa reduce el Hg^{2+} a Hg^0 en la presencia de $NADPH + H^+$.

Ojo *et al* (2004), determinaron la presencia de genes *merA* de bacterias Gram positivas en bacterias Gram negativas de origen clínico resistentes al mercurio, así mismo, estas últimas podían transferir la resistencia al mercurio a la cepa receptora *Enterococcus faecalis*, observándose cepas transconjugantes mercurio resistentes; además que estos genes *merA* Gram positivos incluían también la resistencia a tetraciclina y macrólidos que también pueden transferirse a bacterias Gram negativas.

Najera *et al* (2005), compararon la resistencia al mercurio en cultivos de *E. coli* 055 en estado planctónico y *biofilm*, siendo estos últimos más resistentes al mercurio que las bacterias en estado planctónico.

Rani y Mahadevan (1994), clonaron el determinante de la resistencia al mercurio en *Pseudomonas* sp. strain MR1, que posee el plásmido pMR1, al vector pUC18, logrando volatilizar los iones mercurio, cuando los plásmidos se presentaban en las cepas receptoras.

López *et al.* (1997), aislaron cuatro plásmidos conjugativos que otorgaban la resistencia a iones mercurio a bacterias aisladas en aguas del Mar Mediterráneo, todos los plásmidos mostraron resistencia de espectro angosto, así mismo tres de éstos también mostraron resistencia al cadmio y dos a la estreptomicina; además también determinaron la expresión de los plásmidos en las cepas receptoras de *E. coli* JGL1.

Reyes *et al* (1999), caracterizaron los mecanismos de resistencia al mercurio en comunidades bacterianas de sedimentos marinos, siendo las Gram negativas las que presentaban mayor frecuencia de resistencia, teniendo genes homólogos al *mer* (Tn21) y otros mostraban genes que no exhibían homología con genes *mer* conocidos, indicando la presencia de genes *mer* divergentes.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas.

Las cepas de *E. coli* (n=55) evaluadas en este estudio, pertenecen a la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aisladas de diferentes ambientes marinos de la costa limeña, en las bahías de Pucusana, Miraflores y El Callao (Lima-Perú) (Alvarado *et al*, 2000; Vicente *et al*, 2003). Ver Tabla 1.

4.2 Reactivación de cepas.

Las cepas se reactivaron en caldo LB por 18-24 horas a temperatura ambiente, después se cogió una alícuota de cada cepa bacteriana y se sembró por el método de estriado en placas con Agar Mac Conkey, escogiendo las colonias que presentaban las características culturales de *E. coli* lactosa positivas y por lo tanto trabajar con colonias puras.

Tabla 1. Cepas y lugar de aislamiento de *E. coli* de origen marino (Lima-Perú)

Cepas de <i>E. coli</i>	Lugar de origen	Cepas de <i>E. coli</i>	Lugar de origen
Ec4a	Callao	EMB8-5	Callao
Ec6a	Callao	EMB8-6	Callao
Ec8i	Callao	EMB9-1	Callao
Ec8m	Callao	EMB9-4	Callao
Ec8o	Callao	EMB10-1	Callao
Ec8s	Callao	EMB10-2	Callao
Ec8u	Callao	EMB21-2	Callao
Ec9b	Callao	EMB21-4	Callao
Ec21e	Callao	EMB22-1	Callao
Ec21i	Callao	EMB22-3	Callao
Ec21j	Callao	EMB D-1	Callao
Ec21sa	Callao	Ec21c	Callao
Ecl1-1a	Pucusana	Ec21g	Callao
Ecl1-10d	Pucusana	Ec9a	Callao
Ecl3-10d	Pucusana	Ec8k	Callao
Ecl3-10e	Pucusana	Man(-)10M-2	Callao
Ecll3-(-1)a	Miraflores	EMB 9-3	Callao
Ecll3-(-1)b	Miraflores	EMB 6-1	Callao
Ecll3-10b	Miraflores	EMB 8-3	Callao
Eclll3-1a	Callao	Ecl1-1b	Pucusana
Eclll3-10a	Callao	Ecl1-10a	Pucusana
Eclll3-10c	Callao	Ecl1-10g	Pucusana
Eclll3-10d	Callao	Ecl3-1a	Pucusana
Eclll4-10b	Callao	Ecl3-1b	Pucusana
EcDd	Callao	Ecl3-10f	Pucusana
EcDe	Callao	Ecll-(-1)c	Miraflores
EMB8-2	Callao	Eclll4-10a	Pucusana
EMB8-4	Callao		

4.3 Seroagrupación de los aislados de *E. coli*.

La determinación de los diferentes serogrupos de *E. coli* en las cepas seleccionadas para este estudio, se realizó utilizando sueros polivalentes EPEC, EIEC y EHEC (Probac do Brasil). La prueba se realizó mediante la técnica de aglutinación en lámina, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para la lectura se utilizaron como controles cepas de *E. coli* positivas para cada serogrupo proporcionadas por la Dra. Nora Bravo (Univ. Nac. Federico Villarreal). Fueron consideradas negativas cuando:

- Los cultivos no aglutinaron con los sueros polivalentes.
- Cuando la reacción de aglutinación demoró más de dos minutos y fuera parcial (no mostrando la aglutinación característica).

4.4 Determinación de la resistencia a antimicrobianos clínicos.

4.4.1 Discos de antibióticos probados.

Todos los discos de antimicrobianos de uso clínico y la concentración de éstos utilizados en el presente estudio fueron: Cloramfenicol (C), 30 µg; Norfloxacin (Nor), 10 µg; Amikacina (Ak), 30 µg; Kanamicina (K), 30 µg; Ampicilina (A), 10 µg; Sulfaperazone (Sfp), 30

µg; Tetraciclina (Te), 30 µg; Aztreonam (Az), 30 µg; Ceftazidima (Caz), 30 µg; Gentamicina (Ge), 10 µg; Amoxicilina (Amx), 25 µg; Sulfametoxazol-trimetoprim (Sxt), 25 µg; Ácido Nalidíxico (W), 30 µg y Ciprofloxacina (Cip), 5 µg. Todos fueron de la marca Oxoid. Previamente se comprobó la calidad de los antibióticos frente a la cepa *E. coli* ATCC25922.

4.4.2 Metodología para la evaluación de la resistencia microbiana

La sensibilidad y la lectura de la resistencia microbiana en las cepas de estudio, se realizó siguiendo el método de disco difusión en placa con agar Müller Hinton (Sacsquispe y Velásquez, 2002).

Las cepas reaisladas del agar Mac Conkey fueron cultivados en caldo LB a temperatura ambiente hasta alcanzar la turbidez del 0,5 de la escala de Mc. Farland ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL para *E. coli* ATCC25922). Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión presionándolo por las paredes del tubo para eliminar el exceso del inóculo, inoculando sobre la superficie seca de la placa con agar Müller Hinton, se estrió el hisopo en tres direcciones diferentes para asegurar la distribución uniforme del inóculo. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente por unos minutos para que el exceso de humedad sea absorbida, los discos se colocaron sobre la superficie del agar con ayuda de una aguja estéril, presionando sobre cada disco para asegurar el contacto completo con la superficie del agar. Las placas se incubaron a 37°C por 18-24 horas

4.4.3 Lectura y análisis del antibiograma

Para la lectura del antibiograma, se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco) usando una regla milimetrada. El tamaño de los halos fueron comparados con la tabla de: Antibióticos y Diámetros Críticos para Enterobacterias del Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión (Sacsquispe y Velásquez, 2002); e interpretados como sensible, intermedia o resistente.

4.5 Determinación de la resistencia al mercurio.

4.5.1 Metodología para la evaluación de la resistencia microbiana al Mercurio

Para determinar la resistencia al mercurio se trabajó primeramente en medios de cultivos sólidos agarizados suplementados con cloruro de mercurio a diferentes concentraciones, pero los resultados no mostraban una concordancia relacionada con las diferentes concentraciones de mercurio; por esto, la prueba definitiva de resistencia a iones mercurio se realizó en medio líquido, trabajando con una solución Stock de 0,1M de cloruro de mercurio almacenada en frío.

Se tomó algunas colonias sembradas previamente en Agar MacConkey, y sembradas a caldo LB libre de mercurio por 18-24 horas a temperatura ambiente, se tomó 20 μL de este cultivo inicial y se sembró en 2 mL de caldo LB suplementado con cloruro de mercurio, éste por ser soluble en medio líquido (Summers *et al*, 1993), a diferentes concentraciones: 30, 50, 80, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de HgCl_2 ; incubados a temperatura ambiente por 24-48 horas, considerando a las cepas resistentes al mercurio cuando éstas mostraron crecimiento en caldo conteniendo mercurio. Se usó como control negativo a las cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 y *Escherichia coli* DH5 α (W^r).

4.5.2 Determinación de la Concentración Mínima de Mercurio a tomar

En este trabajo se consideró 30 μM de HgCl_2 como concentración mínima de inhibición para considerar a las cepas resistentes al mercurio, debido a que ensayos previamente realizados, se observó que los controles negativos no mostraron crecimiento a partir de 25 μM de HgCl_2 hasta después de 72 horas.

4.6 Curado de las cepas.

Para la curación de las cepas se utilizó el surfactante dodecil sulfato de sodio (SDS) a una concentración del 10 % (p/v) en caldo LB (Gerhardt *et al*, 1994). Se tomaron alícuotas de 20 μ L de las cepas resistentes al mercurio cultivadas en caldo LB con 30 μ M de HgCl₂ por 24 horas, cultivándolos en tubos con 2 mL del mismo medio libre de mercurio pero suministrado con SDS (10 % p/v) por un tiempo de 24-48 horas a temperatura ambiente; después del tiempo de incubación se tomó 20 μ L del cultivo curado y se sembró en caldos suministrado con 30 μ M de cloruro de mercurio para comprobar si el origen de la resistencia a iones mercurio esté mediada por plásmidos; paralelamente se sembró también en caldo LB sin mercurio, para comprobar la viabilidad de las cepas.

4.7 Aislamiento del DNA plasmídico.

Se confirmó primero la presencia de plásmidos siguiendo la metodología de Lisis Alcalina con SDS modificada de Sambrook *et al* (2001) en las cepas de *E. coli* mercurio-resistentes (n=6), que conjugaron con las cepas receptoras.

4.7.1 Preparación de las células:

1. Se preparó 4 mL de caldo LB suplementado con 30 μM de HgCl_2 , inoculando 40 μL de un cultivo inicial de *E. coli* e incubados a temperatura ambiente por 24 horas.
2. Se cogió 40 μL del cultivo anterior y se sembró en 4 mL de caldo LB sin HgCl_2 por 24 horas a temperatura ambiente.
3. Se colocó 1,5 mL del cultivo a un tubo de microcentrífuga, centrifugándolo a 13000 x g por 3 min para sedimentar las células.
4. Se removió el sobrenadante por aspiración, dejando el *pellet* bacteriano lo más seco posible.

4.7.2 Lisis de las células:

5. Se resuspendió el *pellet* bacteriano con 100 μL de Solución para Lisis Alcalina I fría con agitación vigorosa.
6. Se agregó 200 μL de Solución para Lisis Alcalina II a la suspensión bacteriana, cerrando fuertemente el tubo y homogenizando el

contenido invirtiendo el tubo 10-15 veces (rápidamente), incubándolo a temperatura ambiente por 5 min.

7. Se agregó 150 μL de Solución para Lisis Alcalina III, se cerró fuertemente el tubo y se homogenizó con el lisado bacteriano invirtiendo el tubo varias veces, incubando el tubo en frío a temperatura ambiente por 3-5 min.
8. Se centrifugó el lisado bacteriano a 13000 x g por 10 min en una microcentrífuga.
9. Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante con la ayuda de una micropipeta a un tubo nuevo.

4.7.3 Recuperación del DNA plasmídico

10. Se precipitó los ácidos nucleicos del sobrenadante agregando dos volúmenes de etanol puro a temperatura ambiente, homogenizando la solución con vortex y dejando después el tubo en posición vertical por 5 min a temperatura ambiente.
11. Se colectó los ácidos nucleicos precipitándolo por centrifugación a 13000 x g por 10 min en una microcentrífuga.

12. Se removió cuidadosamente el sobrenadante por aspiración dejando después el tubo en posición invertida sobre un papel secante para permitir que los fluidos se sequen.

13. Se agregó 1 mL de etanol 70 % al *pellet* y se homogenizó suavemente, recuperando el DNA por centrifugación a 13000 x g por 10 min, removiendo todo el sobrenadante por aspiración, dejando el tubo abierto a temperatura ambiente por 10-15 min hasta que el etanol se evapore y no se observe algún fluido.

14. Se disolvió los ácidos nucleicos con 50 μ L de Agua Ultra Pura libre de nucleasas, se vortexó la solución suavemente por pocos segundos, almacenándolo a -20°C hasta su utilización.

4.8 Determinación de los pesos moleculares de los plásmidos aislados.

El peso molecular de los plásmidos aislados fueron comparados con el marcador de peso molecular Lambda DNA/HindIII (Promega Madison), para la visualización se tomó 4 μ L de buffer carga y 4 μ L del plásmido aislado, que fueron electroforizados en geles con 1 % de agarosa en buffer TAE 1X a 70 mV por 80 min, el gel fue teñido con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 5 min, y

luego fotografiado. Posteriormente el peso molecular de los plásmidos fue determinado con el Software BioNumerics 4,5 (Applied Maths BVBA, Bélgica).

4.9 Prueba de conjugación bacteriana.

Comprobando que la resistencia a iones de mercurio está mediada por plásmidos -después del proceso de curación-, se realizó la prueba de conjugación modificada de Gerhardt *et al* (1994) tomando como cepa receptora a *E. coli* F⁻ DH5 α (W^r). Las cepas en estudio se sembraron en 4mL de caldo LB suplementado con 30 μ M HgCl₂ a temperatura ambiente hasta llegar al 0,5 de la Escala de Mac Farland, la cepa receptora *E. coli* DH5 α (W^r) se reactivó en 4 mL de caldo LB suministrado con 15 μ L de Ácido Nalidíxico (W) a 37°C por 2-4 horas, también hasta llegar a 0,5 de la Escala de Mac Farland. Para el proceso de conjugación se añadió 2 mL del caldo LB que portaban las cepas donadoras (F⁺) a un tubo con 4 mL de caldo LB que contenía a las cepas receptoras (F⁻), se agitó en un vortex por 20 seg y se incubó a temperatura ambiente por 12-18 horas; previo a esto se tomó una alícuota del caldo con las bacterias donadoras para su recuento por diluciones, sembrándolos después por difusión en Agar LB suministrado con 30 μ M de HgCl₂. Pasado el tiempo de incubación para el proceso conjugativo en el tubo que contenía las cepas receptoras y donadoras, se agitó el tubo en el vortex por 30 seg para separar las células que aún estuvieran unidas en el proceso de conjugativo, se realizó diluciones para la selección y recuento de las transconjugantes y se sembró

por difusión en Agar LB suministrado con Ácido Nalidíxico (3,75 µL/mL) y cloruro de mercurio (30 µM), incubándolas a temperatura ambiente por 48-72 horas.

4.10 Cálculo de la frecuencia de transferencia de plásmidos de resistencia al mercurio.

Esto se realizó tomando el número de cepas receptoras transconjugantes y el número de cepas donadoras de plásmidos, siguiendo la fórmula (Ramírez *et al*, 2005):

$$\text{Frecuencia de Transconjugantes} = \frac{\# \text{ transconjugantes/mL}}{\# \text{ donadoras/mL}} \times 100$$

4.11 Amplificación por PCR del gen *merA*.

4.11.1 Primers o iniciadores

Para la amplificación del gen *merA*, localizado en el operón *mer*, los iniciadores o *primers* para amplificación que se usaron fueron el A1f: 5'-ACCATCGGCGGCACCTGCGT-3' y el A5r: 5'-ACCATCGTCAGGTAGGGGAACAA-3' específicos para el gen *merA*, cuyo tamaño de amplificación es de 1238 pb (Liebert *et al*, 1997). La

ubicación de los iniciadores en el gen *merA* se observan en la Figura 3. La localización del operón *mer* en el plásmido NR1 (plásmido que posee el gen *merA*) se puede observar en la Figura 4.



Figura 3. Mapa del operón *mer* en el plásmido NR1. La cabeza de flecha indica la ubicación de la secuencia utilizada para la confirmación por PCR, cuya longitud de amplificación es de 1238 pb. Gráfico obtenido por el programa Lasergen-Seqbuilder (DNASStar).

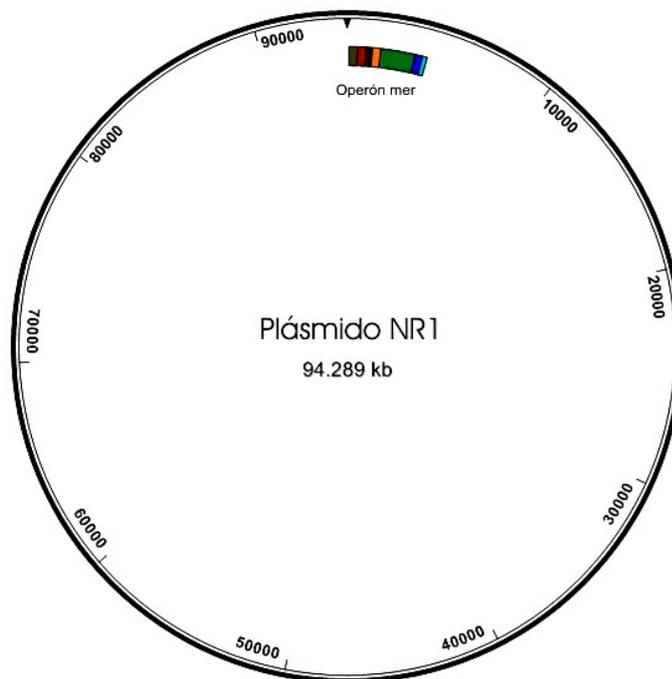


Figura 4. Plásmido NR1 (también conocida como plásmido R100), donde se observa la ubicación del operón *mer* (región 92...4054). Gráfico obtenido por el programa Lasergen-Seqbuilder (DNASStar).

4.11.2 Mix Master para la Amplificación

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un *Mix Master* conteniendo: 20 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato, 10-12,5 mM de MgCl₂, 0,5 U de *Taq* polimerasa (Eppendorf), Buffer 1X (15 mM Mg²⁺) para PCR. Del *mix master* se tomó 24 µL para depositarlo en tubos Ependorf para PCR.

4.11.3 Condiciones del Hot Star PCR

- Se tomó como temperatura de inicio de 94°C por 4 min.

Las condiciones de cada ciclo fueron:

- Temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min.
- Temperatura de *annealing* o hibridación de 63°C cada ciclo por 1 min.
- Temperatura de extensión o amplificación de 72°C por 1,5 min.

Se realizó un total de 33 ciclos.

- Paso de extensión final de 72°C por 10 min.

Los productos de amplificación fueron finalmente almacenados a -20°C hasta su visualización.

4.11.4 Visualización del Producto de PCR

Para la visualización del producto de PCR, se tomó 4 μL de Buffer Carga y 6 μL del producto amplificado, los cuales fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 1 % en Buffer TAE 1X a 70 mV por 120 min, el gel fue teñido con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 min luego lavado, observándose en un Transiluminador y luego fotografiado. Para observar el peso molecular de cada amplificación, se comparó con el marcador Lambda DNA/HindIII (Promega Madison), tomando como control positivo la cepa *E. coli* DU1040 (NR1) *merA* positiva, donada por la Dra. Anne O. Summers de *The University of Georgia – Department of Microbiology* (Athens, Georgia).

V. RESULTADOS

5.1 Seroagrupación de las cepas en estudio

Del total de las cepas de *E. coli* (n=55) estudiadas, el 29,1 % (n= 16) resultaron ser positivas para los serogrupos EPEC; de éstas, el 31,25 % son EPEC (poliA), el 50 % EPEC (poliB) y el 18,75 % son EPEC (poliC). Las demás cepas no aglutinaron con los sueros polivalentes para la detección de EIEC y EHEC. En la Tabla 2 se reseñan las cepas que dieron reacción positiva para alguno de los sueros agrupadores utilizados.

Tabla 2. Serotipo de la cepas de estudio de *E. coli* de origen marino (Lima-Perú).

Cepas de <i>E. coli</i>	Serotipo		
	EPEC	EIEC	EHEC
Ec21c	PoliB	-	-
Ec21g	PoliA	-	-
Ec9a	PoliB	-	-
Ec8k	PoliB	-	-
Man(-)10M-2	PoliA	-	-
EMB 9-3	PoliA	-	-
EMB 6-1	PoliB	-	-
EMB 8-3	PoliC	-	-
Ecl1-1b	PoliA	-	-
Ecl1-10a	PoliC	-	-
Ecl1-10g	PoliA	-	-
Ecl3-1a	PoliC	-	-
Ecl3-1b	PoliB	-	-
Ecl3-10f	PoliB	-	-
Ecll(-1)c	PoliB	-	-
Eclll4-10a	PoliB	-	-

5.2. Resistencia al mercurio.

Inicialmente se trabajó con un total de 55 cepas de *E. coli* aisladas de las Bahías de Miraflores, Pucusana y Callao, después de enfrentarlas a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio en caldo LB, el 74,54 % (n=41) fueron resistentes a distintas concentraciones de cloruro de mercurio, de éstas el 78,05 % fueron resistentes a 30 μM de Hg^{2+} ; el 2,44 % fue resistente hasta 50 μM de Hg^{2+} ; el 2,44 % hasta 80 μM de Hg^{2+} ; 2,44 % hasta 100 μM de Hg^{2+} y el 14,63 % fueron resistentes hasta 300 μM de Hg^{2+} ; no hubo crecimiento en caldo LB suministrado con 400 μM de Hg^{2+} , los resultados se muestran en la Figura 5. La relación de las cepas mercurio resistentes se muestran en la Tabla 3.

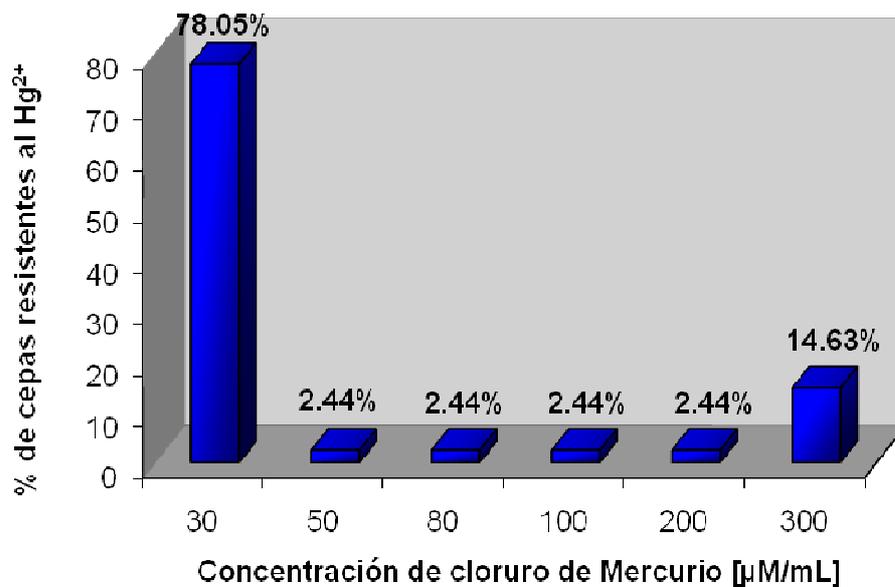


Figura 5. Niveles de resistencia al Hg^{2+} en las cepas de *E. coli* mercurio resistentes (n=41).

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) con cloruro de mercurio en cepas de *E. coli* de origen marino (Lima, Perú).

Cepas de <i>E. coli</i>	Cloruro de mercurio [μM / mL]					
	30	50	80	100	200	300
Ec6a	+	-	-	-	-	-
Ec8i	+	-	-	-	-	-
Ec8m	+	+	+	+	-	-
Ec8o	+	+	+	+	+	+
Ec8s	+	+	+	+	+	+
Ec8u	+	+	+	-	-	-
Ec9b	+	-	-	-	-	-
Ec21j	+	+	+	+	+	+
Ec21sa	+	-	-	-	-	-
Ecl3-10e	+	+	-	-	-	-
Ecll3-10d	+	+	+	+	+	+
Ecll3-(-1)b	+	-	-	-	-	-
Ecll3-10b	+	-	-	-	-	-
Ecll3-1a	+	+	+	+	+	+
Ecll3-10a	+	+	+	+	+	+
Ecll3-10d	+	-	-	-	-	-
Ecll4-10b	+	-	-	-	-	-
EcDd	+	-	-	-	-	-
EcDe	+	-	-	-	-	-
EMB8-5	+	-	-	-	-	-
EMB8-6	+	-	-	-	-	-
EMB9-1	+	-	-	-	-	-
EMB10-1	+	-	-	-	-	-
EMB22-3	+	-	-	-	-	-
EMB D-1	+	-	-	-	-	-
Ec21	+	-	-	-	-	-
Ec21g	+	-	-	-	-	-
Ec9a	+	-	-	-	-	-
Ec8k	+	-	-	-	-	-
Man(-)10M-2	+	-	-	-	-	-
EMB 9-3	+	-	-	-	-	-
EMB 6-1	+	-	-	-	-	-
EMB 8-3	+	-	-	-	-	-
Ecl1-1b	+	-	-	-	-	-
Ecl1-10a	+	-	-	-	-	-
Ecl1-10g	+	-	-	-	-	-
Ecl3-1a	+	-	-	-	-	-
Ecl3-1b	+	-	-	-	-	-
Ecl3-10f	+	-	-	-	-	-
Ecll(-1)c	+	-	-	-	-	-
Ecll4-10a	+	-	-	-	-	-

+: Crecimiento.

-: No crecimiento.

5.3 Resistencia a antimicrobianos clínicos.

Así mismo se relacionó la resistencia de las cepas mercurio-resistentes (n=41) con la resistencia a antimicrobianos de uso clínico y se observó que el 34,15 % fueron resistentes a algún antibiótico, de éstas, el 2,44 % es resistente a cinco antibióticos, el 7,32 % son resistentes a cuatro antibióticos, el 9,76 % son resistentes a tres antibióticos, el 4,88 % a dos antibióticos, el 9,76 % a un antibiótico y el 65,85 % de las cepas fueron sensibles al total de antibióticos probados (Figura 6).

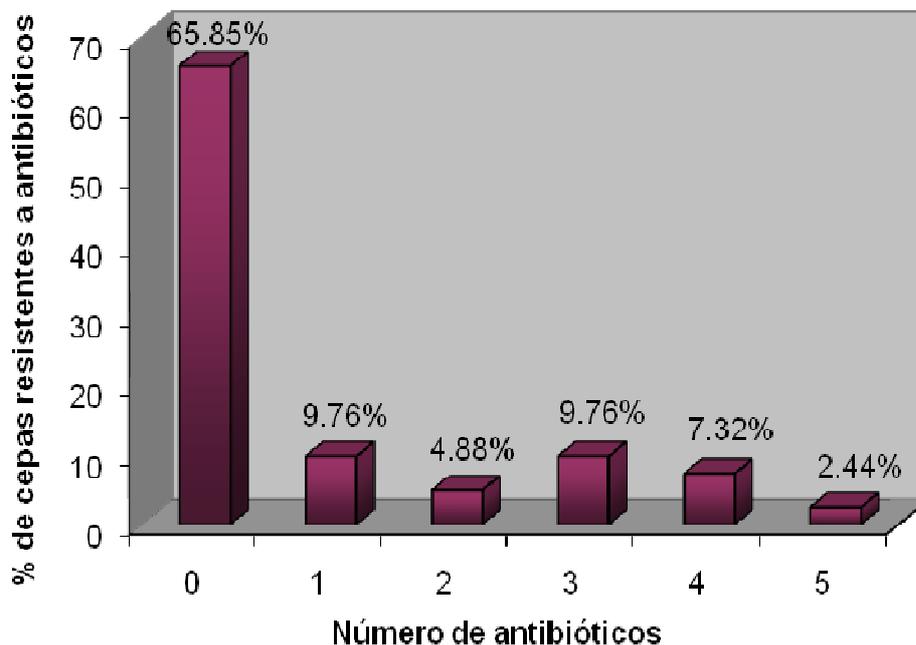


Figura 6. Resistencia a antibióticos en las cepas de *E. coli* mercurio resistentes (n=41).

5.4 Frecuencia de resistencia a cada antibiótico probado.

De las cepas mercurio resistentes (n=41), se observó que el 19,51 % es resistente a Ampicilina (A), 17,07 % a Amoxicilina (Amx), 17,07 % a Tetraciclina (Te), 17,07 % al Sulfametoxazol-trimetoprim (Sxt); siendo este primer grupo de cuatro antibióticos donde se observó mayor frecuencia de resistencia; 7.32 % al Ácido Nalidíxico (W), 4,88 % a Amikacina (Ak), 2,44 % a Cloramfenicol (C), 2,44 % a Aztreonam (Az), 2,44 % a Kanamicina (K). Ninguna de las cepas mostró resistencia a Gentamicina (Ge), Norfloxacin (Nor), Sulfaperazone (Sul), Ceftazidima (Caz), Ciprofloxacina (Cip). Los resultados se muestran en la Figura 7. La relación de las cepas resistentes a los antibióticos probados se encuentra en la Tabla 4.

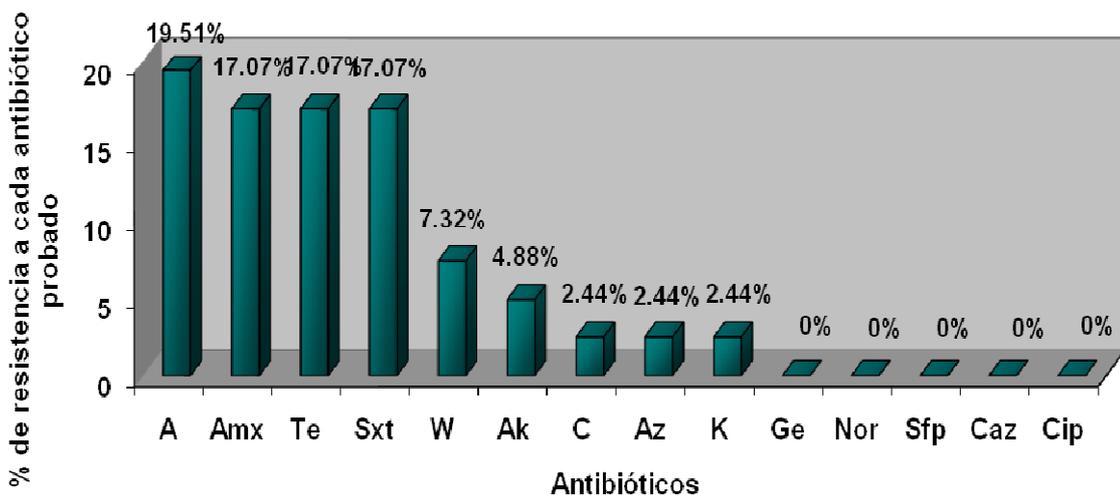


Figura 7. Frecuencia de resistencia a cada antibiótico probado en las cepas de *E. coli* mercurio resistentes (n=41).

Tabla 4. Patrones de resistencia a antimicrobianos de uso clínico en cepas de *E. coli* de origen marino (Lima, Perú).

Cepas de <i>E. coli</i>	Resistencia a antibióticos
Ec6a	A, Sxt, Amx
Ec8i	Te
Ec8s	Sxt
Ec21j	A, Te, Amx
Ec21sa	A, Ak
EcI3-10e	Sxt
EcIII3-10d	A, Te, Sxt, Amx
EcII3-(-1)b	A, Sxt, Amx, K
EcII3-10b	A, Sxt, Amx
EcIII3-1a	A, Te, Amx, W
EcIII3-10a	W, Ak, Az
EcIII3-10d	A, Te, Sxt, Amx, C
EcDe	Te, W
EMB D-1	Te

C: Cloramfenicol; Ak: Amikacina; K: Kanamicina; A: Ampicilina; Te: Tetraciclina; Az: Aztreonam; Amx: Amoxicilina; Sxt: Sulfametoxazol-trimetoprim; W: Ácido Nalidíxico

5.5 Presencia de plásmidos.

Realizada la extracción de plásmidos, se observó que las cepas de *E. coli* F⁻ DH5 α (W^r) receptoras transconjugantes hospedaban plásmidos, observándose plásmidos cuyo peso molecular oscilaba entre 1,3Kb y 24Kb. Los plásmidos aislados se pueden apreciar en la Figura 8.

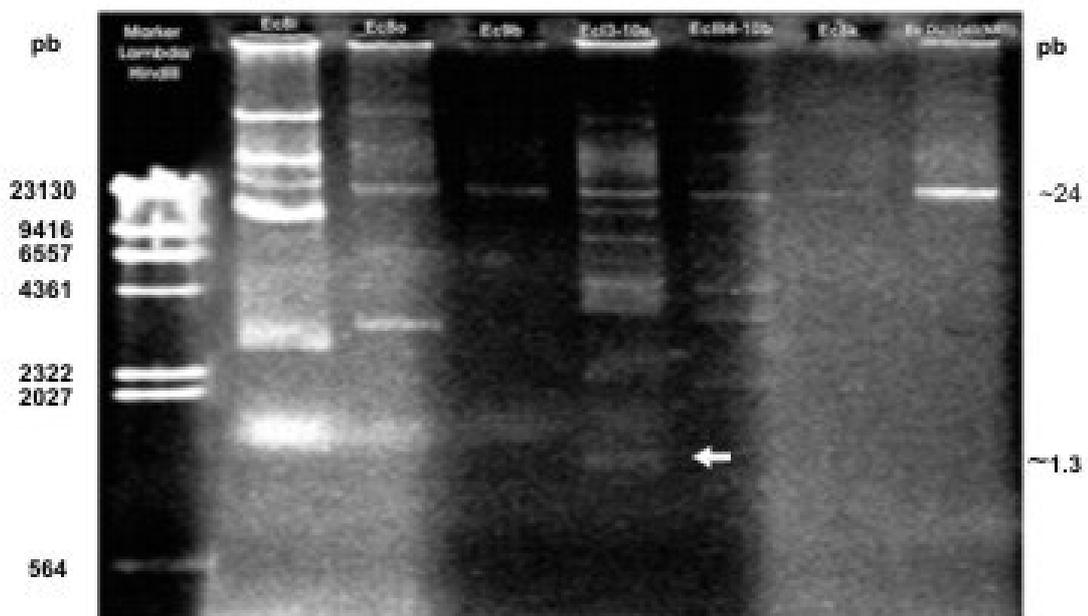


Figura 8. Plásmidos aislados en las cepas transconjugantes: Ec8i, Ec8o, Ec9b, Ec13-10e, Ec114-10b, Ec8k; el peso molecular de los plásmidos aislados oscila entre 1,3 Kb y 24 Kb.

5.6 Curado de las cepas.

Los resultados del curado de las cepas mercurio-resistentes con SDS (10 % p/v), mostraron que el 19,50 % mantuvieron la resistencia al mercurio, mostrando que la resistencia no es de origen plasmídico y el 80,50 % perdieron la resistencia, confirmando que el origen de la resistencia está mediada por algún plásmido (Figura 9).

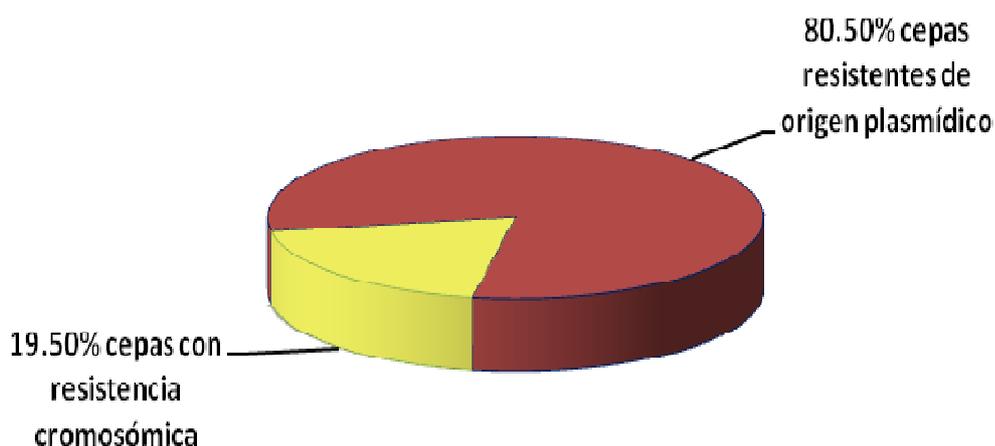


Figura 9. Resultados después del curado en las cepas de *E. coli*.

En relación a la pérdida de resistencia a antibióticos clínicos en las cepas mercurio-resistentes después de la curación, del 34,15 % de las cepas resistentes a algún antibiótico, el 35,71 % no perdieron la resistencia inicial a los antibióticos probados, en cambio el 64,29 % perdieron la resistencia a uno o varios antibióticos probados. Los resultados de la curación en las cepas se encuentran en la Tabla 5.

Tabla 5. Curado de la cepas de *E. coli* de origen marino (Lima, Perú).

Cepas de <i>E. coli</i>	Resistencia al mercurio y antibióticos post-curación	
	Hg	Antibióticos
Ec6a	S	A, Sxt, Amx
Ec8i	S	-
Ec8m	S	-
Ec8o	S	-
Ec8s	R	Sxt
Ec8u	S	-
Ec9b	S	-
Ec21j	S	A, Te, Amx
Ec21sa	S	-
Ecl3-10e	S	-
EcIII3-10d	R	A, Te, Sxt, Amx
EcII3-(-1)b	S	A, Sxt, Amx
EclI3-10b	R	-
EcIII3-1a	R	Te
EcIII3-10a	R	W
EcIII3-10d	R	-
EcIII4-10b	S	-
EcDd	S	-
EcDe	R	Te, W
EMB8-5	S	-
EMB8-6	S	-
EMB9-1	S	-
EMB10-1	S	-
EMB22-3	S	-
EMB D-1	S	Te
Ec21	S	-
Ec21g	S	-
Ec9a	S	-
Ec8k	S	-
Man(-)10M-2	S	-
EMB 9-3	S	-
EMB 6-1	S	-
EMB 8-3	R	-
Ecl1-1b	S	-
Ecl1-10a	S	-
Ecl1-10g	S	-
Ecl3-1a	S	-
Ecl3-1b	S	-
Ecl3-10f	S	-
EcII(-1)c	S	-
EcIII4-10a	S	-

S: Sensible al mercurio.

R: Resistente al mercurio.

5.7 Conjugación bacteriana.

Se realizó la frecuencia de conjugación tomando como cepa receptora a la *E. coli* (F⁻) DH5 α (W^r) y se observó que sólo el 14,63 % de las cepas mercurio resistentes pudieron transferir el plásmido de resistencia hacia el Hg²⁺, mostrando que la frecuencia de transferencia de plásmidos oscila entre 4,76x10⁻² y 9,41x10⁻⁴ %. Las cepas donadoras de plásmidos y la frecuencia de transconjugación se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Frecuencia de transconjugación (%).

Cepa de <i>E. coli</i>	%
Ec8i	1,56x10 ⁻³
Ec8o	1,76x10 ⁻²
Ec9b	4,76x10 ⁻²
Ecl3-10e	1,94x10 ⁻³
Eclll4-10b	3,88x10 ⁻²
Ec8k	9,41x10 ⁻⁴

5.8 Frecuencia del operón *mer*

Los resultados del PCR mostraron pequeñas bandas de aproximadamente 600pb, en comparación con el control positivo de *E. coli* 1040(NR1) *Hg^r merA⁺*, cuyo amplificado es de 1238 pb, observando que los amplificados en las cepas en estudio son una forma aberrante o truncada del gen *merA* y por lo tanto, la frecuencia del operón *mer* en las cepas de estudio -quienes poseen plásmidos conjugativos y a la vez resistencia al mercurio- es del 14,63 %. Los resultados de las amplificaciones se observan en la Figura 10.



Figura 10. Amplificación del gen *merA* en las cepas de *E. coli* transconjugantes.

VI. DISCUSIÓN

Los microorganismos de ambientes marinos están constantemente bajo presión selectiva en el medio que los rodea, y particularmente cuando en ésta se evidencia la presencia de ciertos contaminantes tóxicos -en este caso al mercurio- o compuestos antimicrobianos, cuya presencia puede modificar la microbiota local, induciendo la selección de aquellos genotipos, que puedan sobrellevar dicho estrés, desarrollando o adquiriendo algún tipo de resistencia (Moraga y col, 2003; Gupta *et al*, 2004; De *et al*, 2007). Ramaiah (2003), propone que los determinantes de la resistencia a metales pesados preexisten paralelamente con las actividades humanas; la polución por actividad humana, en centurias recientes, revela la adquisición de resistencias por parte de los procariotas. Hay varios estudios que confirman el origen genómico de la resistencia múltiple a antibióticos y metales pesados, frecuentemente localizados en elementos móviles, capaces de transferirse horizontalmente en la comunidad microbiana local, siendo la polución ambiental por mercurio la que contribuye también a incrementar la resistencia a otros inhibidores microbianos (Nascimento y Chartone-Souza, 2003; Ready *et al*, 2003; Davis *et al*, 2005; Ball *et al*, 2007).

Así mismo, no hay reportes publicados sobre el origen genómico de la resistencia bacteriana a metales pesados y los efectos nocivos que producen en la cadena trófica en diferentes ambientes marinos de la costa de Lima

(Perú). Este trabajo reporta una alta frecuencia de resistencia al mercurio (74,54 %) en el total de las cepas estudiadas (n=55) -pudiendo ser un indicador de contaminación por mercurio- y a antimicrobianos de uso clínico en el 34,15 % en las cepas de *E. coli* mercurio resistentes (n=41). Se observaron los más altos niveles de resistencia al mercurio en las cepas aisladas de la bahía del Callao, esto debido probablemente a la cercanía de la desembocadura del Río Rímac, que porta aguas residuales de origen urbano e industrial, debiendo ser ésta la causa que contribuya a la selección de grupos bacterianos con los más altos niveles de resistencia contra los inhibidores microbianos utilizados en el presente estudio; siendo la resistencia de origen cromosómico y/o plasmídico. En los resultados obtenidos en las cepas de estudio, se comprobó el origen plasmídico de la resistencia al mercurio y a algunos de los antibióticos clínicos utilizados por el método de curado con SDS (10 % p/v). Los resultados obtenidos mostraron una relación entre la resistencia al mercurio y a antibióticos de uso clínico en las cepas de origen marino, tanto a nivel plasmídico y cromosómico, observándose una mayor frecuencia de resistencia a ampicilina, tetraciclina, amoxicilina y Sulfametoxazol-trimetoprim. Poiată *et al* (2000), también reporta, pero para cepas clínicas, resistencia al mercurio y a antimicrobianos como la ampicilina y tetraciclina, pero concluye que la resistencia al mercurio está ligada a la de antimicrobianos de uso clínico.

Del total de las cepas resistentes al mercurio (n=41), el 14,63 % (n=6) presentaron plásmidos conjugativos, en el que también se observó que la

resistencia a ambos inhibidores microbianos (mercurio y cualquiera de los antibióticos probados) no está presente en un mismo plásmido conjugativo, que fue uno de los objetivos de este estudio, tales resistencias se encontrarían en plásmidos diferentes, siendo probable en este caso la presencia de resistencia a la tetraciclina en la cepa Ec8i y a Sulfametoxazol-trimetoprim en la cepa Ec13-10e en plásmidos no conjugativos, esto por no presentar la resistencia a tales antimicrobianos después del proceso de curación y conjugación respectivamente, no pudiendo encontrar algún marcador de resistencia que relacione la resistencia al mercurio con los antibióticos probados. Previamente, Seol *et al* (2002), reportaron en aislados de *Shigella sonnei* de origen clínico, un plásmido de resistencia no conjugativo de 18,3 Kb que portaba además de la resistencia a tetraciclina, resistencia a estreptomycin y sulfisomidina.

La presencia de resistencia al mercurio y antibióticos a nivel cromosómico en cepas ambientales, se debería a la adquisición de genes que se incorporan a nivel cromosómico por la transferencia horizontal de genes que también otorgan resistencia a diferentes metales pesados y a una gran variedad de antibióticos (De *et al*, 2003).

Muchas especies bacterianas, mostraron desarrollar diferentes tipos de resistencias al mercurio y también a otros metales pesados, así mismo, se han reportado varias especies que poseen resistencia al mercurio, mayormente a 10 ppm (50 μ M Hg) o niveles más bajos (De & Ramaiah, 2007). En el presente

estudio, el 65,85 % de las cepas mercurio resistentes no mostró resistencia a algún antibiótico y a la vez mostraron un bajo nivel de resistencia al mercurio (hasta 30 μM HgCl_2), así mismo el 14,63 % mostró tener un nivel resistencia hasta diez veces mayor (300 μM HgCl_2). Los diferentes niveles de resistencia hacia el mercurio, se deberían a los diferentes tipos de resistencia que presentan las bacterias, como la producción de metalotioninas, que inmovilizan iones metálicos a nivel intracelular, originando la bioacumulación (Bae *et al*, 2001; 2003), producción de proteínas de membrana que también evitan la bioacumulación (Barkay *et al*, 2003; Achard-Joris y Bourdineaud, 2006), la síntesis de polifosfatos (Pan-Hou *et al*, 2002, Kiyono *et al*, 2003); estos tipos de resistencia permiten a los diferentes grupos bacterianos tolerar la presencia de metales pesados en diferentes ecosistemas.

Los resultados de la prueba de conjugación mostraron una baja frecuencia de transconjugantes mercurio resistentes, así como Paul *et al* (1991) reporta que es frecuente la presencia de plásmidos no conjugativos en bacterias de origen marino, observándose la presencia de plásmidos conjugativos sólo en el 14,63 % de las cepas mercurio-resistentes. Los resultados mostraron también un alto índice de transferencia de plásmidos (entre $4,76 \times 10^{-2}$ y $9,41 \times 10^{-4}$ %) en comparación con los resultados obtenidos por Gupta *et al* (2004), entre 2×10^{-8} y $4,6 \times 10^{-8}$ %. La transferencia de plásmidos no se vería afectada por el tamaño del plásmido, pues se mostró que el tamaño de los plásmidos aislados oscila entre de 1,3 Kb y 24 Kb en las cepas receptoras mercurio resistentes; Gupta *et al* (2004) reportan también

plásmidos de 24Kb aproximadamente. Las cepas portadoras de plásmidos conjugativos tendrían la capacidad de conjugar, pudiendo haber un intercambio genético de éstas con otros microorganismos autóctonos (Moraga *et al*, 2003).

Ramaiah y De (2003), sugieren que es común que muchas especies de bacterias de estuarios y de ambientes marinos continúen adquiriendo la resistencia al mercurio por transferencia horizontal de genes, tanto con los de su misma especie como también con otras especies bacterianas; siendo de interés la transferencia de diferentes tipos de resistencia con especies bacterianas potencialmente patogénicas para el ser humano, no sólo por el contacto con estos microorganismos, sino también por la presencia de compuestos tóxicos que pueden formar los metales pesados en los ambientes marinos (Ball *et al*, 2007), originando la intoxicación de las personas por la exposición a estos compuestos. Los amplificados por PCR obtenidos (~600 pb) demostrarían que las cepas en estudio poseen alguna forma de gen *merA* truncada o aberrante, siendo la proteína producto de este gen no viable; comparte esta opinión la Dra. A. Summers de la Universidad de Georgia (correspondencia personal).

Cabe señalar, que estas cepas de *E. coli* aisladas de ambientes marinos de Lima, al ser portadores de diferentes mecanismos de resistencia, pueden también presentar algún tipo de riesgo en la salud pública, cuando las personas entran en contacto con aguas contaminadas o consumen productos hidrobiológicos que portan tales microorganismos, causando diferentes tipos

de enfermedades e infecciones, principalmente diarreicas. ya que algunas pertenecen a serotipos patogénicos (EPEC). Así mismo, la resistencia a iones metálicos y antimicrobianos clínicos involucra varios elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones conjugativos y no conjugativos y los más recientemente estudiados, integrones y *cassettes* genéticos de resistencia, los cuales se constituyen en acopiadores de información genética que pueden ser transferidos a especies más distantes filogenéticamente y de ecosistemas diferentes (González y col, 2004).

Este trabajo es la continuación de trabajos anteriores realizados en el Laboratorio de Microbiología Molecular en relación a la potencialidad de transferencia genética, en cepas microbianas introducidas al mar por contaminación antrópica, en relación a la resistencia a metales pesados (Vicente, 2003).

VII. CONCLUSIONES

1. Las cepas de *E. coli* estudiadas mostraron una mayor resistencia a mercurio que a los antibióticos clínicos utilizados para esta investigación.
2. La resistencia al mercurio y antibióticos clínicos en las cepas de *E. coli* estudiadas, tienen origen cromosómico y/o plasmídico.
3. La resistencia al mercurio a nivel plasmídico no está relacionada con la resistencia a antibióticos de uso clínico.
4. Las cepas resistentes al mercurio portaban plásmidos conjugativos en baja frecuencia.
5. La frecuencia de la transferencia horizontal de plásmidos a la cepa receptora de *E. coli* DH5 α es alta, alcanzando valores de $4,76 \times 10^{-2} \%$ en la cepa Ec9b.
6. Los resultados sugieren la presencia de una forma aberrante o truncada del gen *merA* en las cepas de estudio.

VIII. RECOMENDACIONES

- Determinar la concentración del mercurio y de los diferentes metales pesados, en las playas de Lima para evitar que alcancen niveles tóxicos para la vida.
- Se recomienda implementar un monitoreo continuo para evaluar la presencia de microorganismos resistentes al mercurio y a otros metales pesados, ya que éstos también tienen la capacidad de actuar como posibles agentes patogénicos, tanto en ambientes marinos y alimentos de origen marino, en las playas de Lima.
- Al observarse formas truncadas del *merA* después de la prueba de PCR, sería necesario realizar un secuenciamiento de los amplificadores obtenidos para observar las variaciones de bases existentes en las cepas de estudio.
- Se necesita urgentemente el tratamiento de los residuos de origen humano antes de ser vertidos en el mar, para evitar la introducción de flora alóctona potencialmente patogénica al ecosistema.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achard-Joris M, Bourdineaud J-P. Heterologous expression of bacterial and human multidrug resistance proteins protect *Escherichia coli* against mercury and zinc contamination. *Biometals*. 2006; 19: 695-704.

Al-Reasi H, Ababneh F, Lean R. Evaluating mercury biomagnification in fish from a tropical marine environment using stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). *Environ Toxicol Chem*. 2007; 26(8):1572-1581.

Alvarado D, Orozco R, Flores L, Guerrero A, Vicente Z, Ibarra, J, Contreras G, Pineda W, Galvez G, Bravo N, Ramirez P, García R. Significado del uso de coliformes como indicadores de contaminación en áreas de pesca. Res. IX Reunión Científica ICBAR. Lima - Perú. 2000; p. 87.

Applied Maths BVBA. BioNumerics 4,5. <http://www.applied-maths.com>. Bélgica. 2002.

Bass L, Liebert C, Lee M, Summers A, White D, Thayer S, Maurer J. Incidence and characterization of integrons, genetic elements

mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*.
Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43(12): 2925–2929.

Bae W, Mehra R, Mulchandani A, Chen W. Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67 (11): 5335–5338.

Bae W, Wu C, Kostal J, Mulchandani A, Chen W. Enhanced mercury biosorption by bacterial cells with surface-displayed *merR*. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69(6):3176–3180.

Ball M, Carrero P, Castro D, Yarzabal L. Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolívar State, Venezuela). Current Microbiol. 2007; 54:149–154.

Barkay T, Fouts D, Olson B. Preparation of a DNA gene probe for detection of mercury resistance genes in Gram-negative bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol. 1985; 49(3):686-692.

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

Barnes D, Kircher E. Effects of mercuric chloride on glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Toxicol In Vitro*. 2005. 19(2):207-214.

Bogdanova E, Bass A, Minakhin L, Petrova M, Mindlin S, Volodin A, et al. Horizontal spread of *mer* operons among Gram-positive bacteria in natural environments. *Microbiology* 1998; 144:609–620.

Caslake L, Harris S, Williams C, Waters N. Mercury-resistant bacteria associated with macrophytes from a polluted lake. *Water, air, and soil pollution*. 2006. 174: 93–105.

Cursino L, Mattos S, Silva N, Chartone-Souza E, Nascimento A. Measurement of volatilized mercury by a Mini-system: a simple, reliable and reproducible technique. *Braz. arch. biol. technol*. 2003; 46(4):731-734.

Davis I, Roberts A, Ready D, Richards H, Wilson M, Mullany P. Linkage of a novel mercury resistance operon with streptomycin resistance on a conjugative plasmid in *Enterococcus faecium*. *Plasmid*. 2005; 54: 26–38.

DNASTAR Lasergene. <http://www.dnastar.com>, USA. 2006.

De J, Ramaiah N. Characterization of marine bacteria highly resistant to mercury exhibiting multiple resistances to toxic chemicals. *Ecol. Indicators* 2007; 7:511–520.

De J, Ramaiah N, Mesquita A, Verlekar X. Tolerance to various toxicants by marine bacteria highly resistant to mercury. *Mar. Biotechnol.* 2003; 5, 185-193.

De Souza M, Nair S, Bharathi L, Chandramohan D. Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology*, 2006; 15:379-384.

Ekino S, Susa M, Ninomiya T, Imamura K, Kitamura T. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *J Neurol Sci.* 2007; 262 (1-2):131-144.

Erb A, Stürmer T, Marre R, Brenner H. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: overview of geographical, temporal, and methodological variations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007; 26:83–90.

Essa A, Julian D, Kidd S, Brown N, Hobman J. Mercury resistance determinants related to Tn21, Tn1696, and Tn5053 in Enterobacteria from the Preantibiotic Era. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47 (3): 1115-1119.

Felske A, Fehr W, Pauling B, Canstein H, Wagner-Döbler I. Functional profiling of mercuric reductase (*mer A*) genes in biofilms communities of a technical scale biocatalyzer. *BMC Microbiology.* 2003; 3:22. 11 pp <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/3/22>.

Foster T, Ginnity F. Some mercurial resistance plasmids from different incompatibility groups specify merR regulatory functions that both repress and induce the mer Operon of plasmid R100. *J. Bacteriol.* 1985; 162(2): 773-776.

Gauthier M, Cauvin F, Breitmayer J. Influence of salts and temperature on the transfer of mercury resistance from a marine *Pseudomonad* to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985; 50(1):38-40.

Gerhardt P, Murray R, Wood W, Krieg N. Methods for molecular bacteriology. ASM. Washington, EUA. 1994.

González G, Mella S, Zemelman R, Bello H, Domínguez M. Integrones y *cassettes* genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. Rev Méd Chile. 2004; 132: 619-626.

Guentzel J, Portilla E, Keith K, Keith E. Mercury transport and bioaccumulation in riverbank communities of the Alvarado Lagoon System, Veracruz State, Mexico. Sci Total Environ. 2007; 388(1-3): 316-324.

Gupta N, Ali A. Mercury volatilization by R Factor Systems in *Escherichia coli* isolated from aquatic environments of India. Current Microbiol. 2004; 48:88–96.

Hamlett N, Landale E, Davis B, Summers A. Roles of the Tn21 *merT*, *merP*, and *merC* gene products in mercury resistance and mercury binding. J. Bacteriol. 1992; 174(20): 6377-6385.

Hermansson M, Jones G, Kjelleberg S. Frequency of antibiotic and heavy metal resistance, pigmentation, and plasmids in bacteria of the marine air-water interface. Appl. Environ. Microbiol. 1987; 53(10):2338-2342.

Hobman J, Essa A, Brown N. Mercury resistance (*mer*) operons in enterobacteria. Biochem Soc Trans. 2002; 30(4):719-722.

Kholodii G, Bogdanova E. Tn5044-conferred mercury resistance depends on temperature: the complexity of the character of thermosensitivity. *Genetica*. 2002; 115(2):233-241.

Kiyono M, Pan-Hou H. The *merG* gene product is involved in phenylmercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62. *J. Bacteriol.* 1999; 181(3):726–730.

Kiyono M, Omura H, Omura T, Murata S, Pan-Hou H. Removal of inorganic and organic mercurials by immobilized bacteria having mer-ppk fusion plasmids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003; 62(2-3):274-278.

Kirk J, St Louis V, Sharp M. Rapid reduction and reemission of mercury deposited into snowpacks during atmospheric mercury depletion events at Churchill, Manitoba, Canada. *Environ Sci Technol.* 2006; 40(24):7590-7596.

Laddaga R, Chu L, Misra T, Silver S. Nucleotide sequence and expression of the mercurial-resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1987; 84:5106-5110.

Liebert C, Wireman J, Smith T, Summers A. Phylogeny of mercury resistance (*mer*) operons of Gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63(3):1066–1076.

López R, Vives J, García J. Exogenous isolation of HgR plasmids from coastal Mediterranean waters and their effect on growth and survival of *Escherichia coli* in sea water. *Microbios.* 1997; 92(371):109-122.

Misra T. Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid.* 1992; 27(1): 4-16.

Moraga R, Merino C, Mondaca M. Resistencia a metales pesados en bacterias aisladas de la bahía de Iquique. *Invest. Mar.* 2003; 31(1): 91-95.

Najera I, Lin C, Kohbodi G, Jay J. Effect of chemical speciation on toxicity of mercury to *Escherichia coli* biofilms and planktonic cells. *Environ Sci Technol.* 2005; 39(9): 3116-3120.

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

Nucifora G, Chu L, Siver S, Misra T. Mercury operon regulation by the merR gene of the organomercurial resistance system of plasmid pDU1358. *J. Bacteriol.* 1989; 171(8):4241-4247.

Ojo K, Tung D, Luis H, Bernardo M, Leitao J, Roberts M. Gram-positive merA gene in Gram-negative oral and urine bacteria. 2004 FEMS Microbiology Letters 238 (2), 411–416.

Österblad M, Leistevuo J, Leistevuo T, Jarvinen H, Pyy L, Tenovuo J, et al. Antimicrobial and mercury resistance in aerobic Gram-negative bacilli in fecal flora among persons with and without dental amalgam fillings. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995; 39(11):2499–2502.

Palmer M. Cloning and characterization of a mer Operon from natural aquatic bacteria. *Journal of undergraduate research* 2001; 4: 193-198.

Pan-Hou H, Kiyono M, Omura H, Omura T, Endo G. Polyphosphate produced in recombinant *Escherichia coli* confers mercury resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 207(2):159-64.

Paul J, Frischer M, Thurmond J. Gene transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991; 57(5): 1509-1515.

Poiată A, Bădicuț I, Indreș M, Biro M, Buiuc D. Mercury resistance among clinical isolates of *Escherichia coli*. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2000; 59(1-2):71-79.

Porter F, Siver S, Ong C, Nakahara H. Selection for mercurial resistance in hospital settings. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1982; 22(5):852-858.

Ramaiah N, De J. Inusual rise in mercury-resistant bacteria in coastal environs. *Microb. Ecol.* 2003; 45: 444-454.

Ramírez A. Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. *An. Fac. Med. Lima.* 2006; 67(1):49-58.

Ramírez P, García R, Alvarado D. Curso de genética microbiana. Manual de Prácticas. 4ta Edición. Lima-Peru; 2005.

Rani D, Mahadevan A. Cloning and expression of the mercury resistance genes of marine *Pseudomonas* sp. strain MR1 plasmid pMR1 in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 1994; 145(2):121-127.

Ready D, Qureshi F, Bedi R, Mullany P, Wilson M. Oral bacteria resistant to mercury and to antibiotics are present in children with no previous exposure to amalgam restorative materials. *FEMS Microbiology Letters*. 2003; 223: 107-111.

Reyes N, Frischer M, Sobecky P. Characterization of mercury resistance mechanisms in marine sediment microbial communities. *FEMS Microbiology Ecology*. 1999; 30: 273-284.

Sabry S, Ghozlan H, Abou-Zeid D. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J Appl Microbiol*. 1997; 82(2):245-252.

Sacsquispe R, Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N° 30. Lima-Perú. 2002.

Saha D, Ghosh S, Chaudhuri J, Mandal A. Mercury resistance in bacterial strains isolated from hospitals and clinics. *Environ. Contam. Toxicol*. 2006; 77: 88-95.

- Sambrook & Russell.** Molecular cloning a laboratory manual. 2001; 3ra Edición, Volumen 1.
- Schaefer J, Letowski J, Barkay T.** *mer*-Mediated resistance and volatilization of Hg (II) under anaerobic conditions. Geomicrobiol J. 2002; 19:87–102.
- Schelert J, Dixit V, Hoang V, Simbahan J, Drozda M, Blum P.** Occurrence and characterization of mercury resistance in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* by use of gene disruption. J. Bacteriol. 2004; 186(2):427–437.
- Seol S, Jeong Y, Kang H, Yu H, Lee Y, Cho D.** Epidemiologic analysis of *Shigella sonnei* Isolates by using Antimicrobial Resistance Gene Probes. J Bacteriol Virol. 2002; 32(4):347-354.
- Silver S, Hobman J.** Mercury microbiology: Resistance systems, environmental aspects, methylation, and human health. Microbiol Monogr. 2007.
- Simbahan J, Kurth E, Schelert J, Dillman A, Moriyama E, Jovanovich S, et al.** Community analysis of a mercury hot spring supports occurrence of domain-specific forms of mercuric reductase. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(12):8836–8845.

Summers A, Wireman J, Vimy M, Lorscheider F, Marshall B, Levy S.

Mercury released from dental "Silver" fillings provokes an increase in mercury- and antibiotic-resistant bacteria in oral and intestinal floras of primates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(4):825-834.

Tello S. Situación actual de la pesca y la acuicultura en Madre de Dios.

Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), Programa de Ecosistemas Acuáticos (PEA). 2002. p. 1-22.

Vetriani C, Chew Y, Miller S, Yagi J, Coombs J, Lutz R, Barkay T.

Mercury adaptation among bacteria from a deep-sea hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. 71(1): 220-226.

Vicente Z, Alvarado D. Evidencia de la resistencia a iones metálicos de

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) y enteroinvasiva (EIEC) aisladas de agua de mar. Res. XII Reunión Científica ICBAR. Lima - Perú. 2003. p. 172.

Watkinson A, Micalizzi G, Bates J, Costanzo S. Novel method for rapid

assessment of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from environmental waters by use of a modified Chromogenic Agar. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(7): 2224–2229.

Zhang R, Wang Y, Gu J-D. Identification of environmental plasmid-bearing *Vibrio* species isolated from polluted and pristine marine reserves of Hong Kong, and resistance to antibiotics and mercury. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2006; 89: 307–315.

ANEXOS

<u>Agar Mac Conkey</u>	g/L
• Peptona de caseína	17,0
• Peptona de carne	3,0
• Cloruro de Sodio	5,0
• Lactosa	10,0
• Sales Biliares	1,5
• Rojo Neutro	0,03
• Cristal Violeta	0,001
• Agar-Agar	13,5
• Agua destilada	1000 mL

<u>Agar Müller Hinton</u>	g/L
• Infusión de carne	2,0
• Hidrolizado de caseína	7,5
• Almidón	1,5
• Agar-agar	13,0
• Agua destilada	1000 mL
• pH	7,4 ± 0,2

<u>Caldo Luria-Bertani</u>	g/L
• Peptona	10,0
• Extracto de levadura	5,0
• NaCl	5,0
• Agua destilada	1000 mL
• pH	7± 0,5

<u>Bromuro de Etidio (1µg/mL)</u>	
• Bromuro de Etidio	1,0µg
• Agua destilada	hasta 1 mL

<u>Solución TAE 50X</u>	
• Tris base	20 mM
• EDTA de sodio	0,5 mM
• Ajustar a pH 8,0 con ácido acético glacial	
Usar a 0.5X	

<u>Buffer de carga 2X (DNA)</u>	
• SDS	0,5 %
• Glicerol	25 %
• EDTA de sodio	12 mM
• Azul de bromofenol	0,05 %
• pH	8,0

Agarosa 1 %

- Buffer TAE 1X 100 mL
- Agarosa 1,0 g

Disolver la solución de agarosa en Baño María a 100 °C.

Agarosa 0.8 %

- Buffer TAE 1X 100 mL
- Agarosa 0,8 g

Disolver la solución de agarosa en Baño María a 100 °C.

SDS (10 %)

- SDS 1 gr
- Agua bidestilada 10 mL

Solución de Ácido Nalidíxico

La solución de ácido nalidíxico contiene:

- Ácido nalidíxico (Sigma Chemical Co.) 250 mg
- Solución de NaOH (1M) 2 ml
- Agua destilada 8 ml

El ácido nalidíxico se disuelve en la solución de NaOH y se añade el agua destilada. Después se esteriliza por filtración a través de

una membrana filtrante de 0,22 μm . La solución de ácido nalidíxico debe utilizarse antes de 8 horas si se almacena a $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, y si se almacena a $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ puede guardarse durante 6 meses.

El ácido nalidíxico es una sustancia altamente tóxica. Deben tomarse las medidas de seguridad oportunas para la manipulación de este reactivo.

Solución de Lisis Alcalina I

50 mM de Glucosa

25 mM de Tris-HCl (pH 8,0)

- Tris Base
- HCl
- 10 mM EDTA (pH 8,0)

Para preparar EDTA 0.5 M (pH 8,0), agregar 186,1g de disodium EDTA.2H₂O a 800mL de H₂O. Agitar y mezclar. Ajustar a pH 8,0 con NaOH (Esterilizar).

Solución de Lisis Alcalina II

- 0,2N (NaOH)

Recién diluido de una solución Stock de 10 N.

- 1 % (w/v) SDS

Coger de una Solución Stock 20 % (w/v), si es necesario ajustar a pH 7,2 agregando HCl concentrado.

La esterilización no es necesaria, de hacerlo, hacerlo por filtración.

Solución de Lisis Alcalina III

- 5 M de Acetato de Potasio, 60 mL del Stock 8 M
- Ácido acético glacial, 11,5 mL
- H₂O, 28,5 mL

El resultado de la solución es 3 M de Potasio y 5 M con respecto al Acetato.

Para el Acetato de K: preparar una solución Stock de 8 M, disolviendo 78,5 g de Acetato de Potasio (PM = 98,14) en 30 mL de Agua desionizada. Agregar H₂O desionizada o destilada hasta llegar a un volumen total de 100 mL. Esterilizar por filtración. Almacenar a Temperatura ambiente.

Solución Salina Fisiológica (0.08 %)

- NaCl 8,0 gr

- Agua destilada 1000 mL
- pH $7.0 \pm 0,5$