



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado en Ciencias Biológicas



Resistencia/tolerancia de cinco cepas bacterianas que crecen en presencia de compuestos azo y análisis preliminar de su ADN plasmídico

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de:

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta: Rodrigo Pérez Rivera

Directora de tesis: Dra. Alba Mónica Montiel González

Tlaxcala, Tlax.

Octubre 2017



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado en Ciencias Biológicas



Resistencia/tolerancia de cinco cepas bacterianas que crecen en presencia de compuestos azo y análisis preliminar de su ADN plasmídico

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de:

Maestro en Ciencias Biológicas

Presenta: Rodrigo Pérez Rivera

Comité Tutorial: Dra. Alba Mónica Montiel González

Dra. Yendi Ebenezer Navarro Noya

Dr. Arturo Estrada Torres

Tlaxcala, Tlax.

Octubre 2017

Hoja de financiamiento

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, bajo la dirección de la Dra. Alba Mónica Montiel González.

El Programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala está registrado en el Programa Nacional de Posgrado-CONACyT (PNP 00-30-03).

Para la realización del presente estudio se contó con una beca para estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 588009 y número de beca No. 708954



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Rodrigo Pérez Rivera** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Resistencia/tolerancia de cinco cepas bacterianas que crecen en presencia de compuestos azo y análisis preliminar de su ADN plasmídico”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 4 DE 2017

DRA. ALBA MÓNICA MONTIEL GONZÁLEZ

DR. ARTURO ESTRADA TORRES

M. EN C. LAURA VERÓNICA HERNÁNDEZ CUEVAS

DR. RENÉ ZEMPOALTECA RAMÍREZ

DRA. EDELMIRA GARCÍA NIETO



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas del (CTBC-UAT), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado a través de la beca para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, por el espacio brindado en el laboratorio de biología molecular para la realización de mi investigación de maestría.

Agradezco a mi director de tesis Dra. Alba Mónica Montiel González por las palabras de aliento, sus enseñanzas y asesorías que sin ellas este trabajo de investigación no habría sido posible.

A la Dra. Edelmira García Nieto por su excelente papel como sinodal y revisor de tesis, gracias por sus acertados y puntuales comentarios que ayudaron a complementar y concluir el presente escrito de tesis.

A los miembros del comité.

Agradecimientos a título personal

A mis padres Maria Elena Rivera Madrigal y Armando Pérez Saucedo por su apoyo en mis decisiones y amor incondicional.

A mi novio Mario Moreno Montaña (Kayle) por tu tiempo, dedicación, amor incondicional, apoyo en los momentos difíciles, realmente no tengo palabras para agradecer todo el apoyo que me has brindado.

Agradezco a mis amigos Tykko Kerensky Stamatiadis Doch, Marcos Montiel Infante (Tharos Rof), Mariana González Muñoz, Enrique M. Vega Parra, Karla Mishel Rojas Pérez por su ayuda en los momentos difíciles, gracias a ustedes es que pude levantarme, seguir adelante y concluir este proceso de mi desarrollo personal y profesional.

A ustedes es a quien dedico este logro de mi vida.

Gracias

Si mi vida va a significar algo, tengo que ser yo quien la viva.

Percy (Rick Riordan)

Resumen

Las bacterias son los organismos más abundantes y ubicuos del planeta, habitan en sitios bajo condiciones extremas y con altos grados de perturbación, sitios contaminados, suelo, agua y aire. Esta capacidad de subsistencia en ambientes hostiles está relacionada con el despliegue de distintos mecanismos de tolerancia y/o resistencia que le ayudan a contener el efecto dañino de diferentes compuestos presentes en su hábitat. En este sentido, podemos definir a la resistencia como la capacidad que poseen los organismos para sobrevivir en presencia de un agente de presión sin que el organismo vea afectadas sus actividades metabólicas. El caso contrario, en el que los organismos habitan ambientes en presencia de un factor de presión y esto les obliga a cesar su crecimiento y reproducción para lograr subsistir en el medio, es conocido como tolerancia. En algunos organismos, estos mecanismos son otorgados y se encuentran codificados en el ADN plasmídico, que son moléculas de ADN extra cromosómico, con la capacidad de auto replicación independiente a la división celular.

Un ejemplo de sustancias tóxicas que son depositadas en el ambiente y que generan un medio hostil para la sobrevivencia de los organismos, son los colorantes del tipo azo; dichas sustancias son productos de desecho de industrias como las del papel, textiles, cosméticas y alimenticias, que terminan depositadas en los suelos de los efluentes circundantes a ellos y que imponen un factor selectivo para el crecimiento de algunos organismos.

Las cepas bacterianas seleccionadas para la realización del presente estudio, han sido aisladas a partir de efluentes de desecho (que incluyen a los de la industria textil) y son capaces de crecer en presencia de los colorantes azo de grado analítico rojo Congo y rojo de metilo, que son también usados en este tipo de industrias. El objetivo de este trabajo fue determinar si las cepas bacterianas seleccionadas poseen mecanismos de tolerancia y/o de resistencia al crecer en presencia de estos dos colorantes y si es el ADN plasmídico quien les otorga esta capacidad de subsistencia sobre ellos.

Durante el desarrollo de la investigación se realizó la identificación molecular de las cepas aisladas, utilizando la secuencia de la región 16S del ADNr para su análisis comparativo con las secuencias depositadas en las bases de datos mundiales (GeneBank y Greengenes).

Las pruebas de tolerancia se diseñaron para determinar la capacidad que las cepas poseen para crecer en un medio con una fuente de carbono de fácil asimilación, adicionado con el colorante, mientras que las pruebas de resistencia tuvieron como objetivo determinar cuáles de las cepas eran capaces de crecer utilizando al compuesto azo como única fuente de carbono. En ambas pruebas los parámetros determinados fueron la densidad óptica (DO_{600}) y el porcentaje de desaparición de los colorantes mediante espectrofotometría, evaluados en micro cultivos líquidos incubados durante 96 h a 30 °C. Para confirmar la participación del ADN plasmídico en la capacidad de las cepas para crecer en presencia de dichos colorantes, se realizó el curado de las mismas, despojándolas de sus plásmidos y sometiénolas nuevamente a crecimiento usando las pruebas de tolerancia y de resistencia.

Finalmente, el material plasmídico obtenido fue linealizado mediante digestión enzimática, con el fin de determinar el número y tamaño de los plásmidos. Para el análisis preliminar del ADN plasmídico, los plásmidos fueron digeridos enzimáticamente con el fin de clonar sus fragmentos en un vector y secuenciarlos, para posteriormente, realizar un análisis comparativo con la información de bases de datos mundiales y determinar, en lo posible, los genes que se encuentran en dichos plásmidos. Las cepas aisladas fueron identificadas como *Acidovorax Anthurii* (similitud del 99% con GenBank: KP641171.1), *Ralstonia pikettii* (similitud del 99% con GenBank: CP006668.1), *Agrobacterium* sp. (99% de similitud con GenBank: KT894723.1), *Ralstonia* sp. (99% de similitud con GenBank: AY238507.1) y *Cupravidus* sp. (99% similitud con GenBank: KT461854.1). Se pudo observar, que las cuatro primeras cepas fueron sólo tolerantes a crecer en presencia de los colorantes azo en medio LB, alcanzando un crecimiento máximo de $5.05e+08$ células/mL y un porcentaje de decoloración entre el 91% y 95% durante las 96 h del cultivo.

Sólo *Cupravidus* sp. mostró ser resistente al rojo Congo, alcanzando un máximo crecimiento de $1.83e+08$ células/mL y un 90.74% de decoloración, durante las 96 h del cultivo. Se logró determinar que el ADN plasmídico presente en las cepas no les otorga la capacidad de crecer en presencia de estos colorantes, al obtener valores similares en los parámetros de crecimiento con las cepas curadas con respecto a los observados en los cultivos realizados con las cepas que mantienen sus plásmidos.

Para el análisis de los elementos génicos del material plasmídico se utilizó solamente el ADN plasmídico de la cepa *Acidovorax anthurii*, debido a que en dicha cepa, si fue posible

definir la presencia de sólo un plásmido y su tamaño, con la gama de enzimas de restricción probadas. Se determinó que el plásmido que posee tiene un tamaño de aproximadamente 18,601 pb y los fragmentos que pudieron ser secuenciados poseen 92% de similitud con un fragmento de un gen de resistencia a ampicilina, perteneciente a un plásmido de la cepa *Klebsiella pneumoniae* plncR_DHQ1300920 de 70,830 pb. Al respecto, se ha sugerido que estos genes suelen ser útiles a las bacterias para su subsistencia haciendo frente a sus competidores de nicho, los cuales pueden secretar alguna especie de agentes antimicrobianos.

Contenido

I. Introducción	1
II. Marco teórico.....	4
2.1 Bacterias del suelo.....	4
2.2 Identificación molecular asistida por PCR.....	5
2.3 Mecanismos de tolerancia y resistencia a compuestos antimicrobianos.....	6
2.3.1 Compuestos tipo azo	9
2.4 Plásmidos bacterianos	11
2.5 Clasificación.....	12
2.6 Curado plasmídico	13
2.7 Aislamiento de ADN plasmídico y metodologías para su estudio.....	14
2.7.1 Aislamiento por lisis alcalina	14
2.7.2 Lisis celular de colonias en gel de agarosa	14
2.7.3 Electroforesis en geles de agarosa.....	15
2.7.4 Restricción enzimática del ADN.....	15
III. Antecedentes	17
IV. Planteamiento del problema.....	21
V. Preguntas de investigación	22
VI. Justificación	22
VII. Objetivos.....	23
7.1 Objetivo general	23
7.2 Objetivos específicos.....	23
VIII. Metodología	24
8.1 Diagrama de trabajo	24
8.2 Microorganismos.....	25
8.3 Recuperación y propagación del material biológico	26
8.4 Pruebas de tolerancia y/o resistencia a los compuestos azo	26
8.5 Amplificación de la región génica 16S	27
8.6 Curado plasmídico	28
8.7 Determinación de resistencia a antibióticos de las cepas nativas y curadas.....	29
8.8 Determinación de los elementos génicos del ADN plasmídico	30
8.8.1 Obtención del ADN plasmídico de las cepas aisladas.....	30
8.8.2 Extracción de ADN plasmídico mediante método de miniprep.....	30

8.8.3 Restricción enzimática	32
8.8.4 Clonación de fragmentos de restricción	32
8.8.5 Transformación de E coli DH5 α	32
8.8.6 Análisis bio-informáticos	34
9. Resultados	35
9.1 Identificación molecular.....	35
9.2 Pruebas de resistencia y tolerancia.....	37
9.3 Pruebas de Curado plasmídico.	43
10 Discusiones	56
11 Conclusiones	61
12 Perspectivas.....	62
Bibliografía	63
Anexos.....	70
Anexo 1	70
Anexo 2	75
Publicación.....	76

Índice de tablas	Página
Tabla 1. Composición del medio LB.....	26
Tabla 2. Composición de medio mineral.....	27
Tabla 3. Diseño experimental del curado plasmídico con BrEt.....	29
Tabla 4. Resultados obtenidos a través del análisis mediante Blast	35
Tabla 5. Resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. a diferentes concentraciones para la cepa RS1	36
Tabla 6. Resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. a diferentes concentraciones para la cepa M20	43
Tabla 7. Resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. a diferentes concentraciones para la cepa 201	44
Tabla 8. Resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. a diferentes concentraciones para la cepa 1NR	44
Tabla 9. Resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. a diferentes concentraciones para la cepa RS2	44
Tabla 10. Resultados de crecimiento sobre compuestos azo de las cepas curadas.....	45
Tabla 11. Datos de presencia/ausencia de crecimiento bacteriano sobre medio con antibiótico de las cepas nativas.....	46
Tabla 12. Datos de presencia/ausencia de crecimiento bacteriano sobre medio con antibiótico de las cepas curadas.....	47

Índice de figuras	Página
Figura 1. Gel para el análisis de peso molecular por densitometría.....	34
Figura 2. Empalme de las secuencias.....	35
Figura 3. Gel agarosa al 1.5% presencia de ADN plasmídico.....	48
Figura 4. Digestión enzimática con PuvII del plásmido de la cepa RS2.....	49
Figura 5. Digestión enzimática con NcoI del plásmido de la cepa RS2.....	50
Figura 6. Mapa del Plásmido pJET 1.2/ Blunt.....	51
Figura 7. Colonias de <i>Escherichia coli</i> DH5 α transformadas.....	51
Figura 8. Análisis Blast de la secuencia obtenida del plásmido RS2 congruencia para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	52

Figura 9. Análisis Blast de la secuencia obtenida del plásmido RS2 similitud a briobrick de resistencia a kanamicina	52
Figura 10. cepas de <i>Acidovorax anthurii</i> crecidas en ampicilina.....	53
Índice de Gráficos	Página
Gráfica 1. Curva de crecimiento de la cepa M20 y desaparición del colorante RM.....	36
Gráfica 2. Curva de crecimiento de la cepa 201 y desaparición del colorante RM.....	36
Gráfica 3. Curva de crecimiento de la cepa RS1 y desaparición del colorante RC.....	37
Gráfica 4. Curva de crecimiento de la cepa 1NR y desaparición del colorante RC.....	37
Gráfica 5. Curva de crecimiento de la cepa RS2 y desaparición del colorante RC.....	38
Gráfica 6. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC, Cepa 1NR.....	39
Gráfica 7. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC, Cepa RS2	39
Gráfica 8. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC, Cepa RS1.....	40
Gráfica 9. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RM, Cepa 201.....	41
Gráfica 10. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RM, Cepa M20.....	41
Gráfica 11. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC en medio LB por la cepa RS1 curada.....	45
Gráfica. 12 Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC en medio LB por la cepa RS2 curada.....	45
Gráfica. 13 Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC en medio LB por la cepa 1NR curada.....	45
Gráfica. 14 Curva de crecimiento y desaparición del colorante Rm en medio LB por la cepa M20 curada.....	45
Gráfica. 15 Curva de crecimiento y desaparición del colorante Rm en medio LB por la cepa 201 curada.....	45
Gráfica. 16 Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC en medio mineral por la cepa RS1 curada.	46
Gráfica. 17 Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC en medio mineral por la cepa RS2 curada.....	46
Gráfica. 18 Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC en medio mineral por la cepa 1NR curada.....	46
Gráfica. 19 Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC en medio mineral por la cepa M20 curada.....	46

Gráfica. 20 Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC en medio mineral por la cepa 201 curada..... 46

I. Introducción

Se sabe que dentro de la dinámica de la vida en el planeta las especies sufren múltiples adaptaciones a lo largo del tiempo como respuesta a los estímulos externos que las circundan. Todos estos procesos de adaptación al medio pueden considerarse como parte de un mecanismo intrínseco de los organismos, que a través del funcionamiento de sus genes, es capaz de expresarse en circunstancias particulares. Estos genes pueden ser obtenidos gracias a la carga génica heredada dentro del genoma a partir del organismo progenitor o bien ser generados por cambios endógenos (mutaciones por errores en la replicación del ADN) o por alguna causa exógena (mutaciones por cambios provocados por fuentes químicas, físicas o biológicas) y que al formarse, en un momento determinado, tienen la posibilidad de causar efectos patológicos sobre otros organismos, de ser útiles para la especie incrementando su acervo de estrategias metabólicas frente a agentes estresantes u hostiles en el medio o bien simplemente ser perdidos en los procesos naturales de selección (Freeman y Herron 2002).

Aunque estos procesos son de índole general para todos los organismos, son muy evidentes en algunos grupos, tal es el caso de las bacterias, que son los organismos más abundantes del planeta debido a su versatilidad para colonizar una gran gama de hábitats. Son ubicuas, se encuentran en todos los ambientes terrestres y acuáticos; crecen hasta en los más extremos como en los manantiales de aguas termales y ácidas, en desechos radioactivos, en las profundidades tanto del mar como de la corteza terrestre, etc. (Rinkie y cols. 2013). En este contexto, es inevitable adjudicar a estos organismos una capacidad extraordinaria de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Adicionalmente a dichas condiciones que pudiéramos considerar naturales, en las que las bacterias muestran esta gran capacidad de adaptabilidad, son las perturbaciones en su medio quienes las obligan a poner a prueba sus mecanismos metabólicos para adaptarse de manera acelerada e inesperada a condiciones xenobióticas extremas (Hansel y cols. 2008).

En este sentido, existe una gran inquietud por conocer acerca de los procesos mediante los cuales las bacterias adquieren la capacidad para hacer frente a las inclemencias del ambiente donde se desarrollan, en los que los genes deben jugar un papel fundamental.

Para comprender la esencia de las múltiples capacidades de estos grupos bacterianos, es importante conocer sus características genómicas, es decir, cómo está organizada la información dentro de su genoma, cómo realizan y regulan su expresión y qué mecanismos de variación génica poseen. Se ha descrito que en ocasiones esta adaptabilidad les es conferida por sus plásmidos, que son unidades extracromosomales de ADN circular con capacidad para auto-replicarse de forma controlada e independiente a la división celular (Sambrook 2001).

Entre los grupos bacterianos descritos como habitantes de los suelos que presentan este tipo de elementos están los pertenecientes a los filos de α -proteobacteria, β -proteobacteria, δ -proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes (Wakene y cols. 2015), sin embargo, poco se ha estudiado al respecto de la capacidad que tienen todos estos grupos de bacterias para crecer en presencia de por ejemplo, compuestos contaminantes, así como acerca de los beneficios particulares que dicho material les confiere o si son algunos productos de los genes contenidos en los plásmidos, los que les permiten vivir en ambientes contaminados. Los géneros de *Cupravidus*, *Rizobium*, *Sphingobium*, *Acidovorax* y *Pseudomonas*, se han encontrado en suelos de zonas cercanas a las descargas de desechos de los corredores industriales del estado de Tlaxcala, mismos que contienen entre otros compuestos, colorantes tipo azo provenientes de la industria textil. Algunas cepas de estos géneros son capaces de crecer en cultivos adicionados con este tipo de colorantes, particularmente con rojo de metilo y rojo Congo, en condiciones de laboratorio. Esta característica presente en estas especies, puede ser conferida por un mecanismo de resistencia y/o tolerancia, codificado a partir de genes directamente del genoma o puede ser consecuencia del actuar de algunos genes presentes en el ADN plasmídico, como sucede con otros géneros bacterianos (*Lactobacillus*), sin embargo, no se han realizado aún estudios que nos permitan contestar esta incógnita.

En este sentido, el estudio del ADN plasmídico es una de las áreas de investigación con grandes avances en los últimos años. Existe una cantidad considerable de información sobre sus secuencias, así como de sus aplicaciones y del despliegue de modificaciones que se les han realizado para poder utilizarlos como vectores en proyectos de Ingeniería Genética, por lo que la búsqueda de nuevos elementos génicos es una de las líneas de investigación con grandes oportunidades.

Por tales razones, la detección de los mecanismos por lo que estas cepas de bacterias son capaces de crecer en presencia de compuestos azo, la determinación de la participación del ADN plasmídico en dichos mecanismos y la aproximación al tipo de genes que los plásmidos puedan poseer, contribuirá al planteamiento de investigaciones que permitan conocer más acerca de los procesos y mecanismos que estos microorganismos usan para su adaptación y supervivencia.

II. Marco teórico.

2.1 Bacterias del suelo

Las bacterias son los microorganismos más numerosos en la superficie del suelo y su cantidad y tipo varían dependiendo de las condiciones ambientales en él. Se estima que la población bacteriana del suelo puede llegar a exceder de las 10^{10} células por gramo de suelo. Estos microorganismos pueden ser cultivables (de éstos se presume que existen de 10^7 a 10^8 células por gramo de suelo) y no cultivables (Maier y cols. 2009). Los filos bacterianos más frecuentemente encontrados son Acidobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia y Bacteroidetes, entre otros (Uroz y cols. 2016). En comparación con ambientes acuáticos, hay una gran proporción de bacterias Gram-positivas, aunque en números absolutos predominan las bacterias Gram-negativas en el suelo (Atlas y Bartha 2002).

La identificación de géneros o especies bacterianas es muy útil cuando se requiere aprovechar sus funciones o metabolitos en planteamientos biotecnológicos, lo que además es necesario para asignar las características estudiadas a un tipo de bacterias específico. Existen aspectos, generalmente fisiológicos o metabólicos, que permiten clasificar y distinguir a las poblaciones de microorganismos presentes en el suelo. Uno de estos aspectos es la utilización del oxígeno, las bacterias del suelo pueden ser aerobias, anaerobias y anaerobias facultativas (Pepper y Gerba 2005).

Como parte de los estudios donde se realiza la identificación de los grupos bacterianos del suelo, se utilizan algunas pruebas bioquímicas que determinan diversas capacidades metabólicas al usar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno por los organismos o su capacidad reactiva al oxígeno como último aceptor de electrones en su proceso de respiración (Bergey 1994). Para poder evaluar dichos parámetros, es necesario cultivar a los organismos en el laboratorio, lo que limita por mucho el esfuerzo de identificación de la composición de bacterias en muestras ambientales o médicas, en donde se desconocen las condiciones y requerimientos especiales para su cultivo. Una forma de compensar esta limitante es a través del uso de herramientas moleculares con fines de identificación.

2.2 Identificación molecular asistida por PCR

Conocer la identidad de cepas bacterianas aisladas a partir de muestras ambientales es uno de los principales objetivos para el inicio de una investigación. Siguiendo este fin, se debe identificar ampliamente y clasificar taxonómicamente a dichas cepas. Los métodos fenotípicos son altamente dependientes del ambiente en el cual crecen los microorganismos, sin embargo, el estudio del genotipo es un camino complementario y seguro de mapeo de interrelaciones y es independiente de las condiciones de crecimiento ambiental. La identificación molecular bacteriana se fundamenta en el conocimiento de la secuenciación de regiones de ADN con suficiente variabilidad como para discriminar una especie de otra y tan conservadas que permitan restringir a nivel de especie.

En el caso de los organismos procariotas, entre las regiones más comúnmente amplificadas y posteriormente secuenciadas, se encuentran las correspondientes a los genes que codifican ARN ribosomal (16S). El gen ribosomal 16S tiene una secuencia altamente conservada, pero con la variabilidad suficiente para hacer distinciones entre géneros y especies (Sambrook 2001). En las bacterias, este gen posee alrededor de 1,5 kilopares de bases (kb). Se ha propuesto que entre procariotas cuyas secuencias del gen 16S del ADN ribosomal (ADNr) cuenten con un 97% de similitud o más es muy probable que pertenezcan a la misma especie (Kim y cols. 2014). Por amplificación selectiva de esta secuencia a partir del ADN genómico y comparando los resultados con los depositados en las bases de datos, los microorganismos pueden ser caracterizados como filotipos y utilizados en la construcción de un árbol filogenético de especies bacterianas (de Melo y cols. 2016).

Actualmente el gen 16S del ADNr es el gen “blanco” más utilizado en estudios de diversidad bacteriana en diferentes ambientes naturales o sometidos a intervención humana, así como en estudios de filogenia bacteriana.

La secuenciación del ADNr es el método de elección para determinar relaciones taxonómicas. Debido a que la molécula de ADNr 16S contiene también algunas regiones altamente variables, esto hace posible el encontrar regiones de 20 a 30 bases que son completamente exclusivas de una sola especie de bacterias. La caracterización filogenética de los organismos es más que un ejercicio de taxonomía, puesto que las relaciones evolutivas están establecidas en una forma creíble y cuantitativa. Se espera que los organismos

cercanamente relacionados sean similares en sus propiedades bioquímicas generales; por el contrario, la diversidad en las secuencias de ADN_r indica diferencias bioquímicas potenciales (Matsumoto y Sugano 2013).

Para la identificación molecular de una especie de interés es necesario tener material genómico suficiente para su estudio. El empleo de técnicas complementarias como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del gen 16S satisface este requisito y permite mayor porcentaje de éxito en la posterior secuenciación. Esta técnica de amplificación se basa en el mecanismo de la replicación *in vivo* del ADN, con las modificaciones propias de una técnica *in vitro*. Con el material en cantidades suficientes, se lleva a cabo la secuenciación y comparación de ésta con la información contenida en las bases de datos, lo que permite tener información respecto al porcentaje de similitud entre las secuencias y aproximarnos hacia la identidad del organismo de estudio.

Como en muchos estudios, la identificación permite saber qué organismos son los que se están manejando, con la finalidad de otorgarles al final, las propiedades, características y hallazgos que resulten de la investigación, lo que puede ser de utilidad en el momento en el que se desee inferir parte de su actuar en el ambiente.

2.3 Mecanismos de tolerancia y resistencia a compuestos antimicrobianos

El término resistencia microbiana, es un concepto que abarca intrínsecamente múltiples aspectos sobre la fisiología de un microorganismo y es necesario desglosar este concepto para poder definir a lo que se les conoce como “resistencia microbiana” (Labarca y Araos 2009). Las bacterias son capaces de desarrollar mecanismos de resistencia, que está definida como la capacidad de un organismo a desarrollarse de manera óptima en presencia de un agente antibiótico, por el contrario, si el organismo tiene la capacidad sólo de subsistir en el medio a costa de alterar su crecimiento óptimo se habla de un mecanismo de tolerancia (Marsolek y Rittman 2016).

Han sido descritos para las bacterias algunos mecanismos de tolerancia, éstos particularmente son dependientes de gastos energéticos durante su acción, uno de ellos es la modificación de las propiedades físicas de las membranas, como el aumento de la rigidez o la disminución de la permeabilidad. Ésto debido a la isomerización de ácidos grasos

insaturados, modificaciones en los grupos fosfolípidos o lipopolisacáridos, cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular, carencia de porina OprF, y alteración de la tasa de recambio de los componentes de membrana (Fernandes y cols. 2003). Sin embargo, éstos son mecanismos de acción breve y se requieren otros de largo plazo para poder persistir en la presencia de agentes antibióticos.

Es por ello que se han descrito mecanismos sobre la extrusión de compuestos tóxicos a través de procesos dependientes de energía, en donde se provee un transporte activo de los compuestos deletéreos desde la membrana citoplasmática hacia el medio externo. Esto se realiza por medio de la actividad de proteínas transportadoras de membrana o las bombas de eflujo.

Dichos mecanismos exportan compuestos tóxicos a través de las membranas interna y externa, en un paso acoplado a energía de tres partes: una proteína transportadora localizada en la membrana citoplasmática, unida a través de una proteína de fusión de membrana a una proteína de membrana externa. Esta última es un canal que permite la salida del compuesto tóxico al exterior. La proteína de membrana externa es intercambiable entre diferentes sistemas de extrusión que se pueden unir a diferentes bombas, a diferencia de las proteínas de fusión de membrana, que interactúan específicamente con la proteína transportadora correspondiente; teniendo un rango restringido de sustratos (Shrivastava y Mande 2008).

Las bombas de eflujo se pueden dividir en varias familias y diferentes funciones metabólicas, lo que se traduce en un gran número, éstas estarán presentes en cada célula y están determinadas por la extensión del genoma que las pueda codificar.

Estos mecanismos de respuesta dan pauta a que, en condiciones hostiles con una fuente de carbono asimilable como fuente energética primordial y la presencia de compuestos tóxicos, las células bacterianas promuevan la síntesis de algunas enzimas que les ayuden a metabolizar parte de estos compuestos, en donde si la fuente de carbono se ve limitada esta respuesta se verá atenuada o nula produciendo la muerte celular del cultivo (Arbeli 2009).

Por el contrario, la resistencia microbiana se entiende como la interacción molecular entre una célula bacteriana, con todo su arsenal genético y metabólico, y una sustancia antibiótica determinada. Donde el arsenal genético y metabólico está definido como la capacidad que tiene un microorganismo de poseer uno o varios genes que codifiquen para un mecanismo de resistencia en particular. Ese gen o esos genes deben ser expresados en

cantidad y calidad suficiente, muchas veces deben interactuar distintos mecanismos de resistencia para alcanzar la sobrevivencia bacteriana.

Estos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos y transmisibles, éstos son los más importantes y consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan a los antibióticos o durante la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas (Hancock y Sahl 2006).

Un ejemplo de dicha expresión génica son las betalactamasas de clase C de *Escherichia coli*, que se encuentran en un gen específico para esta enzima, que es capaz de romper distintos antibióticos betalactámicos. Dicho gen se encuentra naturalmente codificado en el cromosoma de la bacteria, sin embargo, la expresión de esta enzima es mínima debido a que este microorganismo carece del promotor natural Amp-R, siendo esto un carácter inductivo, donde *E. coli* posee un gen capaz de producir un mecanismo de resistencia, de escasa expresión y está asociado a la acción residual de algún promotor que se encuentra situado corriente arriba dentro del cromosoma bacteriano, haciendo que el microorganismo pueda comportarse como sensible a ampicilina (Ramona y cols. 2003).

La resistencia antibiótica puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todos los microorganismos Gram negativos son resistentes a la vancomicina y esta situación no es variable (Miranda y cols. 2006). La “resistencia adquirida” es variable y es adquirida a partir de una cepa de una especie bacteriana que la posee. Así, existen cepas de *Streptococcus pneumoniae* que han adquirido resistencia a la penicilina, cepas de *E. coli* resistentes a la ampicilina, cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (Montemayor y cols. 2014). Esta resistencia adquirida está dada por características externas al grupo, como lo son elementos móviles y los mecanismos de transferencia horizontal de genes.

Otros mencionan que los genomas bacterianos poseen una enorme plasticidad y ésta frecuentemente se encuentra asociada a la transferencia horizontal de genes entre bacterias de la misma o de diferentes especies (Faddeeva-Vakhrusheva y cols. 2016). En este tráfico de ADN entre bacterias, juegan un papel determinante los plásmidos y los virus, que

mediante procesos de conjugación o transducción respectivamente, pueden transferir fácilmente material genético entre bacterias. Este hecho es particularmente relevante, puesto que por este medio se transfiere gran parte de la resistencia a antimicrobianos (Peixuan y cols. 2014).

En este entendido se puede decir, que la aparición de cepas resistentes es un fenómeno natural que ocurre cuando los microorganismos se reproducen de forma errónea o se intercambian características de resistencia.

Estos hechos abren más preguntas sobre cómo abordar estudios de este gran grupo, de las que resalta que existe un gran porcentaje de características metabólicas que no se encuentran codificadas en el genoma cromosómico de las bacterias, sino en las unidades plasmídicas que llegan a poseer estos organismos y que confieren beneficios importantes que les permiten vivir en presencia de tóxicos.

2.3.1 Compuestos tipo azo

Existe una gran gama de compuestos contaminantes para el ambiente. En muchos de los casos poseen estructuras de aminas aromáticas, alifáticas, compuestos de hidrocarburos halogenados con enlaces sulfuro y dobles enlaces C-C, así como compuestos, quinolonas, penicilinas, tetraciclinas etc. por mencionar algunos. Lo que permite que enzimas tales como el citocromo p450 monooxigenasa, presentes en todos los organismos, puedan degradarlos, a través de hidroxilaciones aromáticas y alifáticas, N- y S-oxidaciones, epoxidaciones, O-, N- y S-desalquilaciones, desaminaciones, desulfuraciones, deshalogenaciones y deshidrogenaciones (Guengerich 2008). Sin embargo, existen otros compuestos con estructuras más complejas, que no pueden ser afectados por la acción de las enzimas mencionadas, tal es el caso de los colorantes tipo azo.

Los compuestos tipo azo son compuestos aromáticos con una o más conformaciones del grupo $-N=N-$. Éstos presentan una intensa coloración cuando el compuesto azo se encuentra en conjugación con un par de anillos aromáticos, debido a que el compuesto resultante absorbe radiación de tipo electromagnética en la banda del espectro visible. Debido a esta característica, los azo-derivados suelen ser utilizados como colorantes en diferentes campos de la industria, tan dispares, como pueden ser la industria alimentaria o la textil,

pasando por la industria del papel, etc. (Robinson y cols. 2001). Éstos son compuestos que se ven depositados en los efluentes debido a los desechos provenientes de las industrias antes mencionadas.

Los colorantes son compuestos estables y de larga vida debido a su estructura aromática, además, contienen grupos nitro y sulfónico, siendo esto de carácter recalcitrante para la mayoría de las bacterias (Claus y cols. 2002), por lo tanto, impide el ataque de las enzimas oxigenasas al enlace azo, mismas que catalizan la incorporación del oxígeno al anillo aromático de compuestos orgánicos, provocando la ruptura de los compuestos aromáticos (Mandigan y cols. 2003).

Debido a esto, su degradación se torna en un proceso complejo. En las bacterias se ha demostrado que poseen un sistema enzimático de azo-reductasas, con el que son capaces de llevar a cabo la degradación de colorante azo en condiciones anaeróbicas (Van der Zee, 2002). La decoloración de los colorantes azo es una reacción de reducción que rompe los enlaces azo; el resultado de lo anterior son aminas aromáticas; mismas que carecen de color, por lo que la azo reducción es equivalente a la decoloración (Van der Zee 2002), la ruptura del enlace azo involucra la transferencia de cuatro electrones en dos etapas sucesivas, en cada etapa se transfieren dos electrones al colorante azo, que actúa como aceptor final de electrones (Dos Santos y cols., 2004). Algunos microorganismos pueden desarrollarse en presencia de compuestos azo, debido a su alta versatilidad y a que poseen un sistema enzimático para la decoloración y mineralización de los mismos (Van der Zee y Villaverde, 2005).

Algunas bacterias pertenecientes al género de *Lactobacillus* poseen la capacidad para decolorar los componentes azo por medio de la azo-reducción y mineralización de éstos, dicha facultad está otorgada por la presencia de genes que codifican para azo-reductasas presentes en sus plásmidos (Elbanna y cols. 2010). Además, existen cepas del género de *Pseudomonas* aisladas a partir de lodos activados que han sido estudiadas durante la decoloración de componentes azo (figura 1) y han mostrado que son altamente eficientes en la decoloración del compuesto RedX-B3 mediante mecanismos génicos expresados en los plásmidos que éstas poseen (Zeng y cols. 2013).

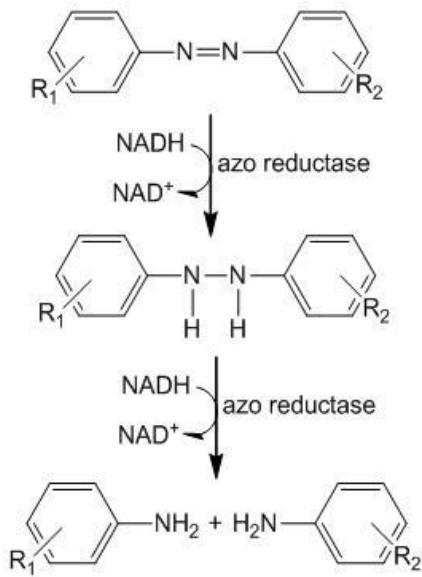


Figura 1 Mecanismo de Azo-reducción (Chandrappay cols. 2010)

2.4 Plásmidos bacterianos

Muchas de las características de resistencia a ambientes hostiles que presentan algunas bacterias son provistas por sus plásmidos (Vogan y Higgs 2011). Éstos son elementos genéticos extra cromosómicos con capacidad para auto replicarse de forma controlada, con ayuda de factores codificados en el ADN cromosómico del hospedero y de forma coordinada con la división celular. En la mayoría de los casos son circulares y bicatenarios, pudiendo variar en tamaño (<1-500 Kb) y en número de copias (1-30 copias/célula), manteniéndose estables en las poblaciones bacterianas a través de procesos de transferencia vertical y horizontal (Harmer y Hall 2015). Aunque se suele considerar material genético dispensable, la mayoría de los plásmidos proporcionan una gran variedad de fenotipos a sus hospederos, reportándoles algún tipo de ventaja evolutiva a través de una relación simbiótica (Tolmasky y Juan 2015).

Ejemplos de ello pueden ser la capacidad para degradar compuestos orgánicos, fijar nitrógeno, conferir resistencia a radiación, antibióticos o metales pesados (Brujin 2013). Los plásmidos pueden constituir entre un 1 y un 15% del genoma de muchas especies bacterianas

y representan vehículos portadores de genes que, dependiendo del número de copias de plásmido, se encuentran en dosis más elevadas que en el cromosoma y además pueden dispersarse por transferencia genética horizontal.

2.5 Clasificación de plásmidos

Existen diferentes estrategias para clasificar y establecer relaciones entre plásmidos, el primer sistema de clasificación atendía a características relacionadas con la capacidad de transferencia por conjugación y con la capacidad de inhibir la transferencia del plásmido F (Factor de fertilidad). Sin embargo, el descubrimiento y estudio de nuevos plásmidos, incluyendo aquellos que no pertenecen a enterobacterias o no son auto-transmisibles, requería un nuevo esquema.

Dado que es posible encontrar varios plásmidos en una célula, surgió una clasificación basada en grupos de incompatibilidad (Datta y Hedges 1971), incluyendo en una misma familia a aquellos plásmidos relacionados que no son capaces de mantenerse y de ser heredados de forma estable en la misma línea celular, debido a que comparten los mecanismos de replicación y control. Hoy día, este análisis de incompatibilidad ha quedado obsoleto debido a: i) el gran número de plásmidos identificados que no se pueden replicar en un hospedero común, y ii) mutaciones puntuales en los elementos de control que hacen que se pierda la incompatibilidad (Lopez y cols. 1989).

Sin embargo, la secuenciación de ADN ha permitido el diseño de estrategias muy fiables de clasificación, basadas en el análisis y comparación de las regiones del plásmido que codifican funciones de replicación y transferencia horizontal. Según la base de datos de replicones plasmídicos (DPR, Database Plasmid Replicons), pueden definirse 17 familias de plásmidos que replican por el mecanismo de círculo rodante (RC) y cinco familias con replicación tipo theta.

Se puede clasificar a los plásmidos basándose en su función.

- a) Plásmidos de fertilidad (F) que tienen la capacidad de conjugación.
- b) Plásmidos de resistencia (R) los cuales contienen los genes que pueden expresar una resistencia contra antibióticos o venenos.

- c) Plásmidos-Col que contienen genes que codifican colicinas, proteínas que pueden matar a otra bacteria.
- d) Plásmidos degradativos que permiten la digestión de sustancias tóxicas.
- e) Plásmidos de virulencia siendo éstos los que promueven la patogénesis de la bacteria.

Para definir las características bacterianas conferidas por el genoma o por el material genético plasmídico *in vivo*, es necesario el estudio de éstas con los plásmidos fuera de la célula, para lo que se requiere poner en práctica algunas técnicas como el curado plasmídico.

2.6 Curado plasmídico

Los plásmidos no suelen ser indispensables para la viabilidad de la bacteria y muchos de ellos se pierden en ausencia de una presión selectiva. Una bacteria puede ser “curada” de su(s) plásmido(s), es decir, se le pueden eliminar, bien de forma espontánea o bien por una serie de tratamientos, en los que incubando a las bacterias a temperaturas cercanas a la máxima de tolerancia de crecimiento o adicionando al medio agentes químicos como el naranja de acridina y/o bromuro de etidio, que se insertan entre las bases del ADN, (Achtman y Skurray 1977; Spengler y cols. 2016), tienden a perderlos. El fundamento de los tratamientos mencionados consiste en que los compuestos usados interfieren con la replicación del plásmido sin afectar a la replicación del cromosoma. Esto hace que en sucesivas divisiones de una bacteria, el plásmido se vaya “diluyendo” en la población resultante.

Del mismo modo, para el análisis de los elementos genéticos que componen a los plásmidos es necesario realizar estrategias que permitan obtener su secuenciación completa, de tal forma que pueda analizarse mediante ensamblaje bio-informático y permita la identificación de los elementos de interés mediante comparaciones con elementos contenidos en las bases de datos. Para poder realizar todos estos análisis el primer paso es extraer y purificar el ADN plasmídico.

2.7 Aislamiento de ADN plasmídico y metodologías para su estudio

2.7.1 Aislamiento por lisis alcalina

Uno de los métodos utilizados para la obtención de ADN plasmídico se denomina “lisis alcalina”, que se basa en la desnaturalización selectiva del ADN cromosómico mediante alcalinización con NaOH y adición de SDS (detergente), en condiciones en las que el ADN plasmídico permanece próximo a su estructura nativa, debido principalmente a su pequeño tamaño y a su naturaleza circular y súper-enrollada. Al neutralizar el medio y añadir una alta concentración de sal (acetato potásico), se produce la precipitación de gran parte de las proteínas debido también al tratamiento con SDS. También precipita el ADN cromosómico, probablemente porque se producen re-asociaciones al azar entre las diferentes regiones de este ADN y así se forman agregados insolubles. Por el contrario, no precipita el ADN plasmídico, que queda en el sobrenadante (Sambrook 2001).

2.7.2 Lisis celular de colonias en gel de agarosa

Este método(Eckhardt 1978), es uno de los más utilizados para el estudio del ADN plasmídico y consiste en una electroforesis en gel de agarosa en la cual se procede a la lisis de una colonia bacteriana dentro del pocillo del gel de agarosa, a un voltaje de 35 V durante 15-30 min, posterior a eso se continúa con el procedimiento normal de la electroforesis para ADN.

Al finalizar los métodos de aislamiento de ADN plasmídico, es necesaria la recuperación de los fragmentos de ADN resueltos en la matriz de agarosa o como resultado de la amplificación por PCR, mediante la eliminación de la agarosa portadora o los residuos de la mezcla de reacción de la amplificación, esto con la finalidad de tener la oportunidad de realizar con ellos algunas otras estrategias o procedimientos encaminados a su análisis. Para ello existen varios métodos, sin embargo, el fundamento de muchos de los que se utilizan actualmente consiste en resinas con afinidad selectiva por el ADN, que al final son tratadas con el fin de disociar de ellas al ADN utilizando una solución amortiguadora (Coll y cols. 2005).

2.7.3 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es un método general bastante utilizado para separar, analizar y purificar fragmentos de ADN (Sambrook 2001).

Las moléculas de ADN de 50 pb a varias megabases en longitud pueden ser separadas en geles de agarosa en función de sus concentraciones y configuraciones. Fragmentos pequeños de ADN (50–20,000 pb) son separados en geles de agarosa corridos en configuración horizontal en un flujo eléctrico de fuerza y dirección constante. Bajo estas condiciones, la velocidad de los fragmentos de ADN decrece a medida que incrementa la longitud de éstos y es proporcional a la fuerza del flujo eléctrico (Sambrook 2001).

2.7.4 Restricción enzimática del ADN

El corte con enzimas de restricción es muchas veces el primer paso para estudiar un gen y en el caso del ADN plasmídico, es necesario para poder hacer estimaciones de tamaño, encontrar posibles sitios de flanqueo para el diseño de cebadores para la amplificación de material genómico y así obtener información sobre los elementos que componen dicho material.

Para la digestión del ADN es necesaria una secuencia específica, a la cual se le conoce como sitio de restricción. Cuando se digiere una molécula de ADN con una enzima de restricción se obtienen un número de fragmentos equivalentes a las veces en que se encuentra repetido el sitio de restricción a lo largo de la molécula. Esta frecuencia depende del número de pb correspondientes con la secuencia que conforma el sitio de restricción, así como de la proporción relativa de los nucleótidos ATGC de dicho sitio, en relación con la del ADN digerido.

La estimación del tamaño molecular de un plásmido se realiza por comparación de la movilidad electroforética en geles de agarosa de su forma circular CCC, por sus siglas en inglés (covalently closed circular DNA) y lineal con la de plásmidos de tamaño molecular conocido o por la suma del tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos tras digestión enzimática (Coll y cols. 2005). Estos fragmentos obtenidos son clonados en un vector bacteriano con la finalidad de tener el mayor número posible de copias fieles de dicho

material para su posterior secuenciación, para la obtención de dichas secuencias se pueden tomar dos diferentes metodologías, “shotgun” o por enfoque jerárquico.

La metodología de shotgun secuencia al azar los clones, desde ambos extremos del ADN clonado. Este enfoque genera un gran número de fragmentos de ADN secuenciados, donde, el número de fragmentos al azar tiene que ser elevado, tan grande, que los fragmentos de ADN se solapan lo suficiente como para cubrir todo el genoma. Éste requiere de un robusto programa de ensamblaje para unir las piezas de fragmentos aleatorios en una única secuencia de todo el genoma.

El enfoque de la secuenciación jerárquica es similar al shotgun, pero en una escala más pequeña. El material génico se mapea inicialmente utilizando la estrategia del mapeo físico. Fragmentos más largos de ADN genómico (100 a 300 Kb) se obtienen y se clonan en un vector bacteriano. Basándose en los resultados de mapeo físico, las ubicaciones y órdenes de los clones en un vector pueden ser determinados, mediante la secuenciación sucesiva de fragmentos de clones. La secuencia completa de cada clon individual puede ser obtenida usando shotgun, obteniendo la superposición de clones que posteriormente se ensambla en una secuencia completa del genoma (Norris 1998).

Para ensamblar una secuencia de todo el genoma, estos fragmentos cortos se unen para formar fragmentos más grandes después de la eliminación de las superposiciones. Estas secuencias más largas, fusionadas se denominan “contigs”, que son orientadas unidireccionalmente a lo largo de un mapa físico final.

Algunos ejemplos sobre la información que otorga esta técnica son en la elaboración de un mapa de restricción de un plásmido o bacteriófago con la finalidad de determinar los elementos génicos que los conforman, estimar un tamaño en bp, además de fragmentar ADN genómico para separación de electroforesis y “Southern Blot”, generación de fragmentos de ADN para ser usados como sondas marcadas en “Southern” y “Northern” blotting, generación de fragmentos para ser subclonados en los vectores apropiados y la creación de ADN recombinante.

III. Antecedentes

Damaceno y cols. (2015), aislaron cepas bacterianas identificadas dentro de los géneros *Yersinia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Hafnia*, provenientes de muestras de alimentos de los establecimientos comerciales de Río de Janeiro, de las cuales siete poseen resistencia antibiótica a cefotaxime, ampicilina y tetraciclina. Así mismo en un análisis del perfil de presencia de ADN plasmídico, se reporta que todas las cepas aisladas presentan plásmidos con un intervalo de tamaño de 1 a 10 kb. Ramos y cols. (2014) realizaron un análisis comparativo del genoma completo de *Klebsiella pneumoniae* indicando los marcadores de virulencia y mecanismos de resistencia, encontrando seis plásmidos con tamaños que oscilan entre las 2,459 y 294,493 pb. Entre los plásmidos encontrados, el denominado Kp13 da resistencia a enzimas de inactivación microbiana a través de la beta-lactamasa para amoxicilina, ampicilina, tircacilina y carbecilina dadas por los altos niveles de polimorfismo de sus nucleótidos en su estructura genómica.

Dziewit y cols. (2014), secuenciaron y analizaron el genoma de *Paracoccus aminophilus*. Observaron la presencia de ocho plásmidos (pAMI1, pAMI2, pAMI3, pAMI4, pAMI5, pAMI6, pAMI7, pAMI8,) en los que se encuentran secuencias que codifican para once factores sigma alternativos, éstos están encargados del reconocimiento de secuencias promotoras en el ADN para la transcripción de genes como respuesta a cambios adversos que obligan a la bacteria a promover una respuesta metabólica particular. Esta capacidad presente en *P. aminophilus* dada por los plásmidos encontrados, se encuentra dentro de diferentes fila incluyendo Actinobacteria, Bacterioidetes, Chloroflexi, Cianobacteria, proteo bacterias, espiroquetas y la especie *Deinococcus thermus*.

Es notorio el avance que se tiene en el campo médico en cuanto a la caracterización de estas especies debido a la importancia del área. Sin embargo, justamente por la forma en la que se evidencia la expresión de genes potencialmente nuevos por presiones ambientales, las zonas contaminadas o expuestas a compuestos xenobióticos son particularmente interesantes para esta búsqueda, pues no están desprovistas de crecimiento microbiano mismo que resiste dichas condiciones y que seguramente posee una gran gama de estrategias de sobrevivencia.

En este sentido, se han realizado estudios en donde se reporta la presencia de bacterias con genes de interés biotecnológico provenientes de muestras de ambientes contaminados o alterados y que poseen plásmidos con diferentes características génicas.

Anjum y cols. (2011), reportan que existen plásmidos en 35 cepas bacterianas aisladas en suelos de cultivo contaminados por el uso de pesticidas y concluyen que los plásmidos existentes en éstas, otorgan los factores de tolerancia y resistencia a metales pesados como el Cd, Zn, Fe, Ni, Cu y Cr. Así como la resistencia a diferentes antibióticos tales como ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cloramfenicol, co-trimoxazole, doxiciclina, gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomina, tetraciclina, nitrofurantoina, eritromicina y ciprofloxacino. En 2012, Preethy y Nilanjana, aíslan cepas de *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporonas ahii* y *Rhodotorula mucilaginosa* de suelos contaminados por hidrocarburos.

Éstas poseen una actividad enzimática de citocromo P450 monoxigenasa, NADPH citocromo C reductasa, aminopirina N dimetilasa, alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, naftaleno dioxigenasa, catalasa y glutatión S transferasa, que juegan un papel muy importante en la degradación de los compuestos derivados del petróleo, de igual manera encuentran plásmidos de aproximadamente 12 kb los cuales poseen la maquinaria para la producción de estos factores metabólicos en la degradación del diésel, siendo éste el primer reporte para plásmidos y su papel en la degradación de compuestos hidrocarbonados.

Algunos de los compuestos xenobióticos presentes en las industrias en gran medida son colorantes que contienen grupos azo, diazo, antroquinona y complejos metálicos, que al momento de ser tratados para su remoción por métodos convencionales tienden a permanecer en los efluentes y son bio-acumulados por organismos mayores o depositados en los sedimentos de los cuerpos hídricos donde son desechados (Robinson y cols. 2001), algunos de los trabajos realizados al respecto se tratan a continuación.

Cortazar-Martínez (2012) reporta bacterias de los géneros *Proteus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Bacillus* y *Streptomyces*, que son utilizados en tratamientos para la degradación de colorantes de carácter xenobiótico mediante distintos mecanismos de acción. De igual forma se han reportado algunas bacterias que pueden romper el enlace azo de algunos colorantes bajo condiciones aerobias y anaerobias, dando lugar a la decoloración y formación de aminas aromáticas (Chung y cols. 1992).

El cristal violeta (colorante trifenilmetano) puede ser degradado a través de una mineralización aeróbica por bacterias aisladas de suelos como *Pseudomonas mendocina* y *Pseudomonas putida* (Chen y cols. 2007). Yu y cols. (2001) aislaron cepas de lodos activados de un sistema aerobio-anaerobio logrando la degradación de colorantes azo con diferentes estructuras químicas, utilizando cepas de *Pseudomonas*.

Es evidente que muchos de estos organismos poseen elementos génicos que les proveen de resistencia a los ambientes hostiles. Sin embargo, en estos casos se ha realizado poco trabajo en cuanto a la caracterización del ADN plasmídico, que permita contribuir al conocimiento de dichos elementos. En las siguientes líneas se muestra la información correspondiente con potencialidades y presencia de plásmidos en las cepas seleccionadas para el presente trabajo.

Se ha reportado que *Sphingobium* posee resistencia a metales pesados, así como la presencia de ADN plasmídico, pero los estudios realizados sobre la composición de sus plásmidos sólo se ocupan de algún gen específico como *copA* para resistencia a cobre (Altimira 2012). Siguiendo con ese tipo de trabajos se han encontrado plásmidos como el p-YAN2 con 2,888 a 2,958 pb con un sitio *repA* de 77 pb up stream (Hayashi 2014), este último ofreciendo la posibilidad de construcción de un plásmido estable para la transformación de sistemas en *E. coli*. Para el caso del género de *Rhizobium* es más que conocida la relación que existe entre sus plásmidos y la capacidad de transformación de organismos como lo son las leguminosas (Stasiak 2014), así como que existe un porcentaje del 35 al 65% del genoma total de este género que es correspondiente a ADN plasmídico. Esto le confiere a las bacterias resistencia y adaptabilidad en el suelo, de igual manera Neudorf (2015) indica que durante su desarrollo de *Rhizobium* podría presentar genes hipotéticos existentes en transposones y operones que en un momento pudieron pertenecer a plásmidos que ahora están integrados a su genoma.

Cupravidus es una bacteria que posee resistencia al cobre (Bergey 1994); en estudios del 2014 por Sakai, se analizó en su totalidad la secuencia del plásmido pM7012 el cual se relaciona con la degradación de 2,4-diclorofenoxiacético, presente en las bacterias de la familia *Burkholderia* entre ellas *Cupravidus* aisladas en Japón y Estados Unidos con un tamaño aproximado de 600 a 900 kb, demostrando de igual manera que existen plásmidos que pueden estar distribuidos en distintas especies bacterianas en varias partes del mundo.

Existen muchos estudios donde se enmarcan los múltiples plásmidos que posee el género de *Pseudomonas*, tales plásmidos como los encontrados en *Pseudomonas aeruginosa* son de un tamaño variable y se ha descrito que tienen una función de regulación de las propias poblaciones bacterianas (San Millan 2014), así como algunos otros son los responsables de la degradación de compuestos como el naftol y carbaril, usados en la industria de los pesticidas (Chapalamadugu y Chaudhry 1991), dando una apertura a la continua búsqueda de las múltiples capacidades que pueden ofrecer los plásmidos a la poblaciones bacterianas.

También existen reportes de la presencia del género de *Acidovorax* en suelos contaminados con la capacidad de metabolizar naftaleno y fenantreno como única fuente de carbono, a través de la actividad Catecol 2,3-dioxigenasa (Kaplan y Kitts 2004), de igual forma se ha reportado la existencia de un plásmido con la capacidad de degradar el ácido 2,4-diclorofenoxiacético aislado de un grupo de algas donde se encontraba una especie de *Acidovorax* (Kim y cols. 2013).

Algunos antecedentes más específicos reportan bacterias con la capacidad de mineralizar los componentes azo mediante mecanismos de azo-reducción mediados por la expresión de genes presentes en ADN plasmídico propio de las cepas. Al respecto, estudios en bacterias ácido lácticas muestran que algunas cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* poseen cuatro plásmidos con pesos moleculares de 2.5, 3, 8 y 16 kb, éstos poseen genes que otorgan la capacidad de decolorar los componentes azo. Dichas cepas al ser curadas pierden la capacidad para degradar los componentes azo, sustentando el hecho de que son los plásmidos los elementos que otorgan algunas de las capacidades de sobrevivencia en ambientes xenobióticos con fuentes de carbono adversas (Elbanna y cols. 2010).

En cuanto a otros grupos bacterianos con capacidades similares (Zeng y cols. 2013) se ha reportado que *Pseudomonas* sp expresa genes que le otorgan la facultad de degradar a los compuestos azo, dichos genes muestran que están presentes en los plásmidos que poseen. Tras hacer un experimento de transformación con el material plasmídico de éstas, en una cepa de *Escherichia coli* DH5 α competente, dichas características de decoloración de compuestos azo se ven expresada, demostrando que dicha facultad fue conferida por la incorporación de estos plásmidos.

Actualmente hay aún escasa información acerca de los elementos génicos presentes en los plásmidos de estos géneros bacterianos.

IV. Planteamiento del problema

Existen muchos estudios sobre bacterias de interés médico y se han descrito casi en su totalidad sus genomas y los mecanismos enzimáticos que poseen. Sin embargo, en recursos microbianos potenciales, que están presentes en ambientes bajo presión extrema por actividades antropogénicas como los suelos, se han realizado pocos estudios con el fin de encontrar y contribuir al conocimiento de los mecanismos que ejercen para subsistir en ellos.

Las perturbaciones que provocan los compuestos xenobióticos en el ambiente son un gran problema y a su vez una gran oportunidad para la investigación en el país y en el estado en las áreas biológicas, biotecnológicas y moleculares, sin embargo, para poder formular propuestas es necesario conocer desde la identidad de dichos recursos, hasta los detalles del material genético que rige su fisiología para poder dirigir con mayor certeza los planteamientos de estudio, por ejemplo, estudios que aporten conocimiento acerca de nuevos genes presentes en microorganismos capaces de hacer resistir y degradar tóxicos, ofreciendo nuevas posibilidades en los procesos de biorremediación o mejorando las metodologías de selección y transformación de organismos.

Dichas condiciones extremas pueden estar presentes en los suelos cercanos a los efluentes industriales, dadas por las descargas de la industria, las agrícolas y domésticas que se vierten en los ríos donde, por mecanismos de escorrentía e infiltración, se ven expuestos los suelos circundantes y es aquí donde pueden existir bacterias que posean características génicas de interés biotecnológico, sin embargo, este tipo de estudios apenas inicia.

V. Preguntas de investigación

¿Las cepas aisladas son resistentes o tolerantes a la presencia de rojo Congo y rojo de metilo en el medio de cultivo?

¿En qué cepas la resistencia y/o tolerancia a compuestos tipo azo es conferida por el ADN plasmídico?

¿Qué elementos génicos del ADN plasmídico presente en dichas cepas pueden estar participando en los mecanismos de tolerancia y/o resistencia?

Si los plásmidos no fueran quienes confieren esta característica a las cepas bacterianas...

¿A qué tipo de genes corresponden aquellos que se encuentren en los plásmidos de estudio y cuál sería el beneficio potencial que otorguen a las cepas de bacterias que viven en ambientes expuestos a compuestos contaminantes?

VI. Justificación

El presente trabajo es de gran importancia debido a que contribuirá a la generación de conocimiento básico en un área poco estudiada en el país, que involucra la determinación de cepas bacterianas capaces de vivir en ambientes con alto grado de perturbación, conocer los mecanismos mediante los cuales adquieren dicha capacidad, determinar si el ADN plasmídico tiene participación en la manifestación de dicha capacidad y una aproximación al estudio de los elementos génicos presentes en este tipo de material genético, que permitirán en el futuro la evaluación de sus posibles usos biotecnológicos.

VII. Objetivos

7.1 Objetivo general

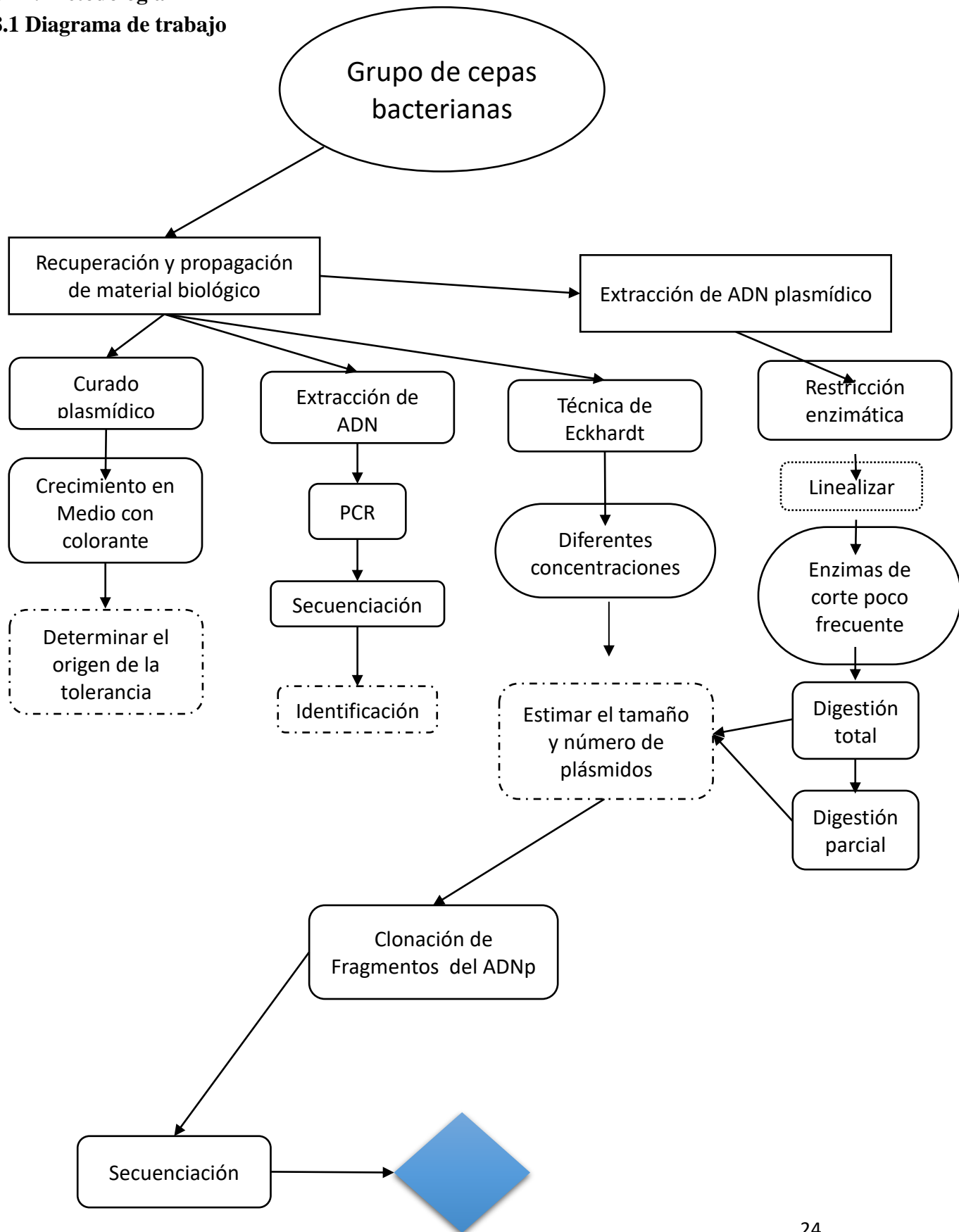
- Determinar en las cepas aisladas el mecanismo que les otorga la capacidad de crecer en presencia de colorantes azo, así como la influencia de ADN plasmídico en este fenómeno y su caracterización génica.

7.2 Objetivos específicos

- Identificar molecularmente a las bacterias aisladas de los efluentes industriales.
- Evaluar si las cepas bacterianas del estudio toleran o resisten la presencia de los compuestos tipo azo, rojo Congo y rojo de metilo.
- Identificar en qué cepas el ADN plasmídico confiere la tolerancia y/o resistencia.
- Determinar el número y tamaño de los plásmidos presentes en cada cepa de bacterias capaces de crecer en presencia de compuestos tipos azo.
- Determinar los elementos génicos presentes en los plásmidos aislados.
- En su caso, determinar las ventajas potenciales que estos elementos pueden conferir a las cepas de bacterias del estudio.

VIII. Metodología

8.1 Diagrama de trabajo



8.2 Microorganismos

El Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación en Genética y Ambiente cuenta con una colección de cinco cepas bacterianas aisladas a partir de muestras del suelo circundante al Río Zahuapan, en la comunidad de Santa María Texcalac, Apizaco, Tlaxcala., ubicado a 3 kilómetros río abajo de la Ciudad Industrial Xicotécatl II. Dos de los sitios de aislamiento de estas cepas están ubicados a la orilla del río, donde el suelo se encuentra en constante exposición a los diferentes compuestos contaminantes que el efluente contiene, son sitios separados por aproximadamente un kilómetro de distancia y un tercer sitio a media distancia entre los sitios 1 y 2, a cuarenta metros separado del cauce en pendiente, el cual no posee aparente contacto con dicho efluente y que sirvió como un testigo en el presente estudio. Cada una de las cepas posee un código de identificación, RS1, RS2, 1NR, 201 y M20.

Clave	Sitio de aislamiento	Colorante [10 mg/L]	ID preliminar
RS1	Sitio 1	Rojo Congo	<i>Rhizobium</i>
RS2	Sitio 2	Rojo Congo	<i>Acidovorax</i>
1NR	Sitio control	Rojo Congo	<i>Cupravidus</i>
201	Sitio 2	Rojo de metilo	<i>Ralstonia</i>
M20	Sitio 2	Rojo de metilo	<i>Sphingobium</i>

8.3 Recuperación y propagación del material biológico

Se realizó la reactivación de las cepas bacterianas congeladas cultivándolas en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio LB y caldo nutritivo a una agitación constante de 140 rpm a una temperatura de incubación de 30 °C durante 48 h. Terminado este proceso, se revisó la estabilidad de la cepa en medios de agar nutritivo y agar-agua adicionados con el compuesto azo (RM, RC) en el que fueron aisladas, para revisar las características de morfología colonial, con el fin de corroborar que correspondieran con la cepa antes descrita. Terminado este proceso, se hicieron resiembras de estos recuperados cada 30 días, con la finalidad de mantener la viabilidad de las cepas.

La tabla 1 muestra la composición del medio LB.

Tabla 1. Composición del medio LB.

Medio LB	Cantidad en gramos por cada 1000 mL de H ₂ O destilada
Cloruro de Sodio	5.0
Triptona	10.0
Extracto de levadura	5.0
pH final	7.0

8.4 Pruebas de tolerancia y/o resistencia a los compuestos azo

Como parte del proyecto se tuvo el objetivo de determinar si el mecanismo que les permite a las cepas bacterianas aisladas crecer en presencia de rojo Congo (RC) o rojo de metilo (RM), es un mecanismo de tolerancia o uno de resistencia. Para evaluar el fenómeno de tolerancia, se cultivaron las cepas bacterianas en medio LB (que permite tener una fuente de carbono en el medio obtenida a partir de la triptona), adicionado con el compuesto azo (RC, RM) sobre el que las cepas fueron aisladas y se evaluó el crecimiento celular cada 12 h, medido por densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Simultáneamente, se midió el porcentaje de desaparición del colorante mediante los valores de absorbancia a 580 nm. Para la determinación del fenómeno de resistencia, se evaluó el crecimiento de las cepas de manera similar, con la diferencia de que se sustituyó el medio LB por un medio mineral (MM) cuya composición de muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Composición de medio mineral.

Medio mineral	Cantidad en gramos por cada 1000 mL de H ₂ O destilada
Cloruro de Sodio	24
Cloruro de Potasio	0.7
Fosfato di ácido de Potasio	2.0
Sulfato de Magnesio Hepta hidratado	1.0
Fosfato ácido di Sódico	3.0
Nitrato de Amonio	1.0
pH final	7.0

Éste fue suplementado con RC y RM como única fuente de carbono, respectivamente, según el colorante sobre el que fue aislada cada cepa. Las condiciones del cultivo, tiempo de muestreo y medición de los parámetros de crecimiento y decoloración se evaluaron del modo descrito anteriormente.

Simultáneamente, como parte de la corroboración de la identidad de las cepas bacterianas se procedió a la identificación molecular mediante el análisis de la secuencia del gen 16S mediante un juego de iniciadores universales para la región 16S utilizados para la exploración de la diversidad bacteriana.

8.5 Amplificación de la región génica 16S

La amplificación se llevó a cabo mediante PCR en un termociclador con gradiente de temperatura (T100™ Thermal Cycler Bio-Rad). Para la amplificación de la región 16S los iniciadores fueron seleccionados por su efectividad reportada en trabajos relacionados con la búsqueda de nuevos grupos bacterianos presentes en el suelo (Brujin 2013). Las secuencias son las siguientes:

Nombre del iniciador	Secuencia
27F	5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´
1391R	5´-GACGGGCGGTGWGTRCA-3´

Dichos iniciadores flanquean la región 16S con un amplicón esperado de 1364 pb

La mezcla de reacción ajustada a un volumen final de 50 μ L fue la siguiente:

Reactivos	Unidades en μ L
Agua grado PCR	35.6
Buffer 10X 10mM Tris-HCl + 50 mM KCl	5.0
Cloruro de magnesio 50 mM	1.5
dNTPs 10 mM	1.0
Iniciador 27F. 20 mM (Brujin 2011)	1.0
Iniciador 1392R 20 mM (Brujin 2011)	1.0
Taq-polimerasa 5 u/ μ L	0.4
ADN muestra 50 ng/ μ	4.0

El protocolo establecido en el termociclador fue el siguiente:

Programa	Temperatura	Tiempo en minutos	ciclos
Apertura de ADN	95 °C	4	1
Desnaturalización	95 °C	1	30
Alineamiento	52 °C	1	
Polimerización	72 °C	1	
Acción nucleasa	72 °C	10	1
Reposo	4 °C	∞	1

Los amplicones obtenidos fueron enviados para su secuenciación al Laboratorio Divisional de Biología Molecular del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. La secuenciación automática se realizó en un equipo ABI Prism3100 (Applied Biosystems).

8.6 Curado plasmídico

Para determinar la participación del ADN plasmídico en la capacidad de las cepas de crecer en presencia de colorantes azo, las cinco cepas se probaron con una técnica de curado plasmídico utilizando bromuro de etidio (BrEt) (Sabaté y cols. 2004). Se realizaron cultivos

en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio LB conteniendo BrEt con las siguientes concentraciones de 0, 10, 20, 30, 40 y 80 mg/mL durante dos semanas a 30 °C con agitación constante a 140 rpm. Terminado el proceso se procedió a la verificación de la pérdida del material plasmídico mediante su extracción por miniprep de los cultivos de cada una de las cepas. Posteriormente, las bacterias fueron crecidas en un medio Agar-agua adicionado con el compuesto azo, para corroborar si el material plasmídico es quien le otorga la capacidad de crecer, en presencia de dicho compuesto. El diseño de la prueba consideró cuatro réplicas de cada uno más un control con sólo medio LB como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Diseño experimental del curado plasmídico con BrEt.

Concentración cepa	10 mg/L	20 mg/L	30 mg/L	40 mg/L	80 mg/L	0 mg/L
RS1	4	4	4	4	4	4
RS2	4	4	4	4	4	4
1NR	4	4	4	4	4	4
M20	4	4	4	4	4	4
201	4	4	4	4	4	4

8.7 Determinación de resistencia a antibióticos de las cepas nativas y curadas

Con la finalidad de obtener toda la información posible acerca de las características que le otorga el ADN plasmídico a las cepas del estudio, una vez obtenidas las cepas bacterianas curadas, se crecieron en agar nutritivo adicionado con antibióticos a niveles séricos basales utilizando los siguientes antibióticos, cefadroxil 30 µg/mL, amoxicilina 17 µg/mL, nitrofurantoina 20 µg/mL, a una temperatura de 30 °C durante un periodo de 96 h, en el entendido de que múltiples de las características de resistencia antibiótica están dadas por los plásmidos propios de las bacterias.

8.8 Determinación de los elementos génicos del ADN plasmídico

Una vez obtenido el material biológico suficiente se procedió a aislar el ADN plasmídico, por medio de lisis enzimática y lisis alcalina, que son las técnicas de extracción específicas para la obtención de dicho material génico (Sambrook 2001).

8.8.1 Obtención del ADN plasmídico de las cepas aisladas

Para la obtención de ADN plasmídico se utilizaron los métodos de extracción por lisis alcalina utilizando el kit comercial “Gen Jet Plasmid miniprep Kit” siguiendo las instrucciones del proveedor y por las técnicas de mini y megaprep (Sambrook 2001).

8.8.2 Extracción de ADN plasmídico mediante método de miniprep

Se seleccionó una de las colonias de cada cultivo puro y fueron inoculadas en un tubo eppendorf con medio LB, se incubaron a 34 °C durante 72 h a 200 rpm. Se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 minuto, se decantó, re-suspendiendo la pastilla en 350 µL de STET (8% sacarosa, 5% Tritón X-100, 50mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8.0), se agregaron 10 µL de lisozima a una concentración de 10 µg/mL mezclando suavemente durante 30 segundos, el tubo se colocó en baño María a ebullición durante un minuto, se centrifugaron nuevamente a 14,000 rpm durante 10 minutos, la pastilla formada en la parte inferior del tubo se retiró del sobrenadante, se agregaron 40 µL de acetato de sodio 3M a pH 5.2 y 600 µL de isopropanol, se mezclaron y mantuvieron durante 15 min a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 5 minutos, finalmente el sobrenadante se desechó y la pastilla se re-suspende en 30 µL de agua libre de ARNsas.

Posteriormente el ADN plasmídico se linealizó mediante su digestión con enzimas de restricción para sitios de corte frecuente y corte raro (infrecuente), con el fin de obtener una digestión del material génico y estimar el tamaño del elemento extra cromosómico. El patrón de bandeo de cada plásmido sirvió para determinar el mejor método para su estudio. Una vez

obtenido el producto de la digestión enzimática se purificaron las bandas usando un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit) y se procedió a la clonación de los fragmentos obtenidos en un vector comercial para su posterior secuenciación.

Otro planteamiento para realizar dicho estudio, en cuanto a determinar el tamaño aproximado y número de plásmidos por cepa bacteriana, se llevó a cabo mediante la realización de la técnica de geles Eckhardt (Eckhardt 1978). Se crecieron los cultivos bacterianos toda la noche en medio LB. Posteriormente, se realizó un sub cultivo en medio LB y se crecieron hasta una densidad óptica (DO) de 0.6. Los cultivos obtenidos fueron colocados en hielo, se adicionaron 150 μ L de cada cultivo a 500 μ L de sakrosil al 0.3%, frío, se centrifugó a máxima velocidad por 90 segundos, cuidadosamente se retiró el sobrenadante, se re-suspendió en 20 μ L de buffer de lisis SBE e inmediatamente se colocaron las muestras dentro del gel de agarosa al 0.7%, el cual se corrió a 23 V durante 10 minutos y posteriormente a 100 V durante 90 minutos. El gel obtenido se tiñó con BrEt para su posterior visualización en un equipo foto-documentador Gel-Doc (Bio-Rad), utilizando el software Quantity One, donde se realizaron las mediciones por densitometría para determinar el tamaño de las bandas de ADN plasmídico.

También las técnicas de Shot Gun Sequencing (Larson y Messing 1982), fueron consideradas como una estrategia para la obtención de la secuencia de los plásmidos, en donde a partir del ADN plasmídico obtenido por los métodos de miniprep se procedió a la fragmentación (mecánica y/o enzimática), para la obtención de segmentos pequeños del material plasmídico, posterior a eso, usando oligodesoxiribonucleótidos universales como iniciadores para el caso de fragmentación mecánica y en el caso de la fragmentación enzimática, el uso de iniciadores de la enzima de restricción usada para dicho proceso, para su amplificación por método de PCR. Posterior a la obtención de este material se procedió a la secuenciación de los fragmentos y a un análisis *in silico* para la obtención del mapeo de los plásmidos.

8.8.3 Restricción enzimática

Para la restricción enzimática del ADN plasmídico se utilizaron distintas enzimas de restricción siguiendo el protocolo del proveedor para cada enzima, las enzimas a probar fueron las siguientes.

Enzimas

<i>Alu</i> I	<i>Pvu</i> II	<i>BanH</i> I	<i>Kspa</i> I
<i>NCo</i> I	<i>BsuR</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Pst</i> I

8.8.4 Clonación de fragmentos de restricción

Para la ligación y clonación de los fragmentos obtenidos del material plasmídico, se utilizó el kit Clone JET PCR Cloning siguiendo el protocolo Sticky-End Cloning Protocol, usando para la amplificación del inserto, los iniciadores pJET1.2 Forward/Reverse sequencing primer incluidos en el kit.

Nombre del iniciador	Secuencia
pJET1.2 forward sequencing primer	5' -CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
pJET1.2 reverse sequencing primer	5' -AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

Los cuales flanquean el sitio de inserción.

8.8.5 Transformación de *E. coli* DH5 α

Utilizando una alícuota de células ultra competentes y una alícuota sin constructo como control, se inocularon placas con medio LB y medio LB con ampicilina a 10 μ g/mL , una placa sin antibiótico para las células no transformadas y transformadas como control de supervivencia al tratamiento, una placa con antibiótico y 400 μ L de células transformadas con una densidad óptica entre los 0.4 y 0.6, una placa con antibiótico y 200 μ L de células transformadas y una placa igual pero con las células control como control negativo, una placa con antibiótico inoculada con 100 μ L de las células transformadas.

Las colonias que crecieron con antibiótico en las placas inoculadas en 200 y 100 μ L fueron seleccionadas para ser plaqueadas en parches para su posterior uso y en tubos de 1.5 mL para sus análisis de ADN plasmídico por miniprep de lisis alcalina con buffer Tens (Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM, NaOH 0.1 N, SDS 0.5%).

8.8.6 Análisis bio-informáticos

Para la edición, ensamblaje y análisis de las secuencias se utilizaron los programas Bioedit v7.2.5, DNASTAR Lasergen 11 Core Suit, DNA Baser v4.2.8.y Vector Friends 1.2.0. Para la comparación de las secuencias se utilizaron las bases de datos GenBank database y The Greengenes database, usando el software Alignment Search Tool (BLAST).

9. Resultados

9.1 Identificación molecular

Para la totalidad de las cepas se obtuvo un amplicón de aproximadamente 1400 pb estimados a partir del gel de agarosa. De manera particular, por densitometría, se calcularon los pesos moleculares en pares de bases para cada uno de los amplicones obtenidos, mismos que se muestran en la Figura 1.

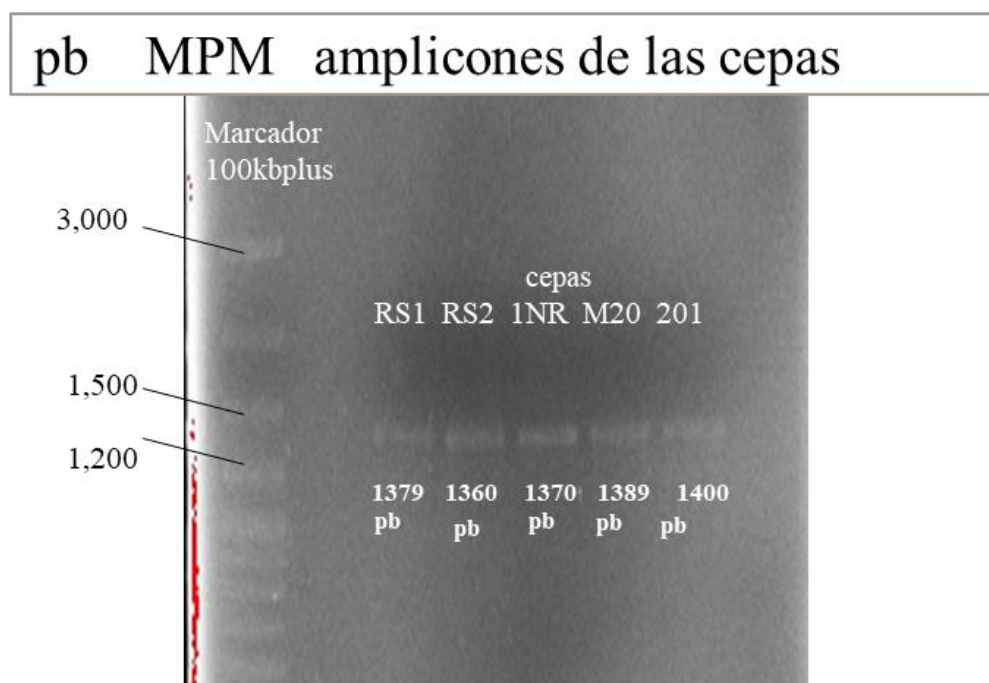


Figura 1. Imagen de las bandas de ADN obtenidas por PCR para el análisis de peso molecular por densitometría. Se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder de Thermo Scientific 100 a 3000 pb, en el carril 2-6 se muestran los amplicones obtenidos de las cepas RS1, RS2, 1NR, M20 y 201 respectivamente.

Las secuencias obtenidas a partir de dichos amplicones, fueron empalmadas y analizadas para obtener el total de la secuencia del amplicón, usando el programa DNA Baser V4.20.0. Fig. 2

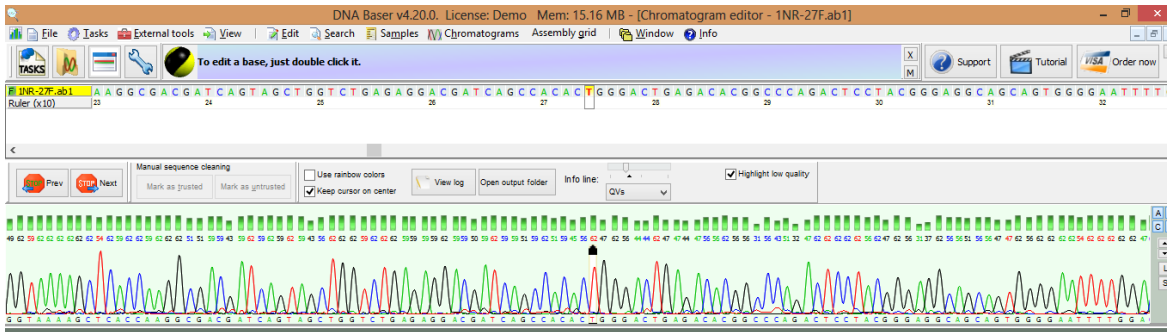


Figura 2. Imagen que muestra el empalme de las secuencias. Secuencias obtenidas para la cepa 1NR y empalme para la obtención de las secuencias completas del gen 16S a partir de las secuencias obtenidas usando el juego de iniciadores seleccionado.

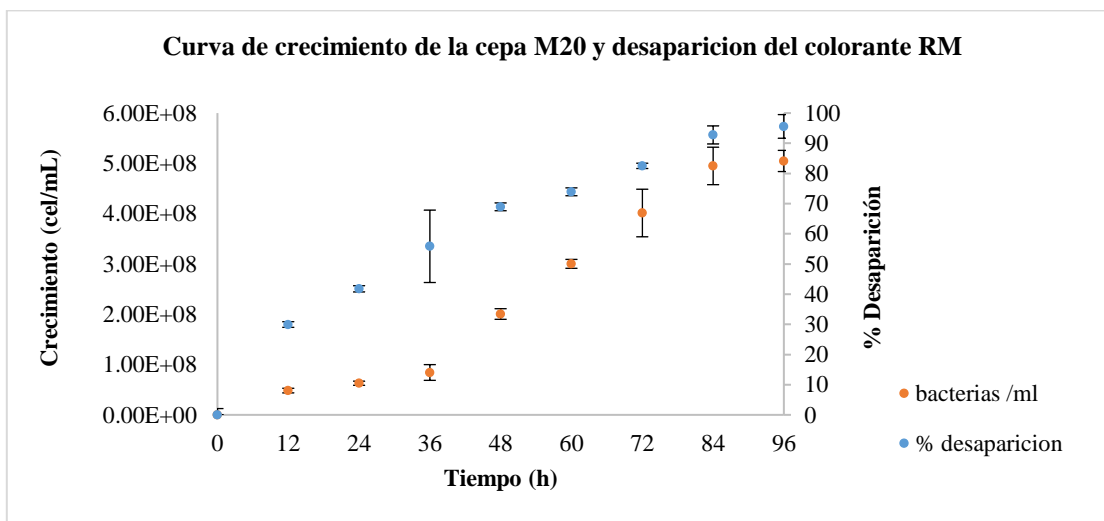
Se obtuvo la identificación de las cinco cepas del estudio a través del análisis con BLAST, las secuencias obtenidas, mostraron un porcentaje de similitud del 99% con algunas secuencias de las bases de datos. En el anexo 1, se muestran las secuencias obtenidas y en la tabla 4, las especies de bacterias con las que se obtuvo el mayor porcentaje de similitud.

Tabla 4. Resultados obtenidos a través del análisis mediante Blast, de cada una de las secuencias de las cepas aisladas.

Pb estimadas por densitometria	Cepa / pares de bases secuenciadas	Resultado de Blast
1379 pb	Rs1 / 1242pb	Agrobacterium tumefaciens strain JSD-RHCu-7A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% Rhizobium sp. H1-44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99%
1360 pb	Rs2 / 1281pb	Acidovorax anthurii strain XD-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99%
1389 pb	201/ 1287 pb	Ralstonia pickettii DTP0602 chromosome 2, complete sequence 99% Cupriavidus sp. 194 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99%
1408 pb	M20/ 1281pb	Cupriavidus sp. 194 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% Ralstonia pickettii DTP0602 chromosome 2, complete sequence 99%
1370 pb	1NR/ 1283pb	Cupriavidus sp. 4HB-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% Ralstonia sp. 80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99%

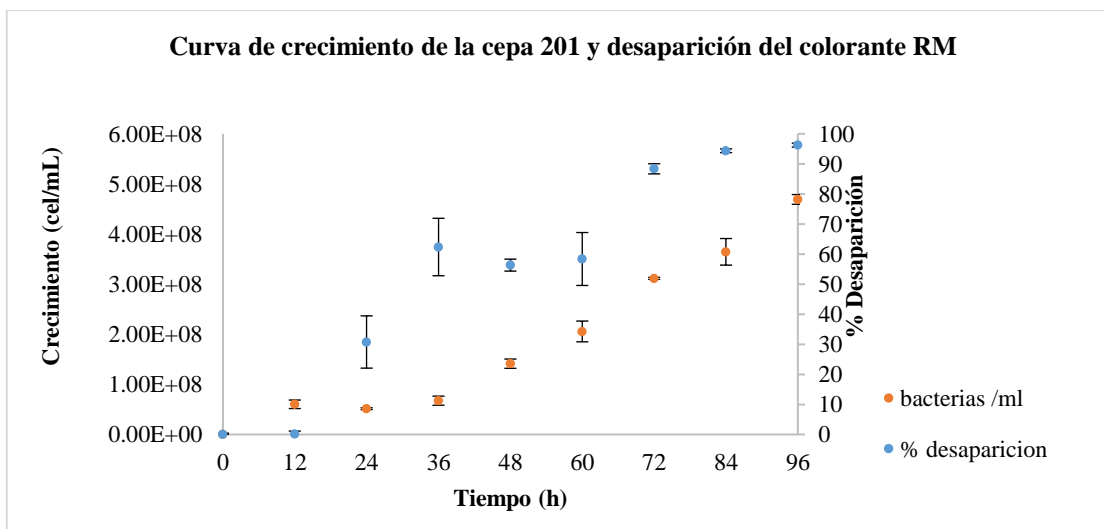
9.2 Pruebas de resistencia y tolerancia

Las curvas de crecimiento y porcentaje de desaparición del colorante azo para cada una de las cepas de estudio, obtenidas en medio LB adicionado éste con dichos colorantes, se muestran en las gráficas 1-5.



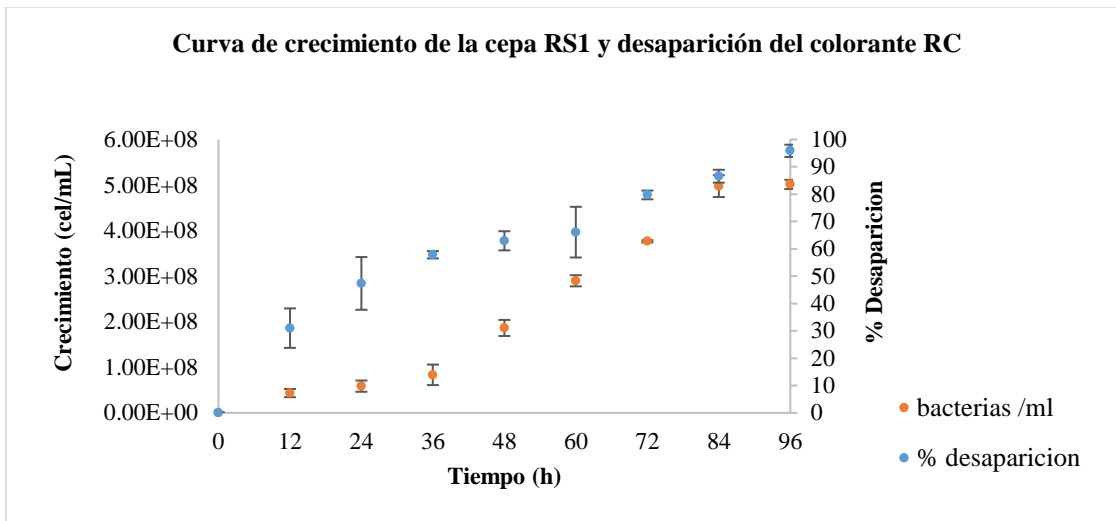
Gráfica 1. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RM de la cepa M20.

La cepa M20 inicia la fase de crecimiento exponencial a partir de las 36 h, alcanzando una biomasa máxima de 5.05×10^8 células/mL a las 96 h, alcanzando la fase estacionaria luego de las 84 h, obteniendo un porcentaje de decoloración del 95.5% del colorante RM.



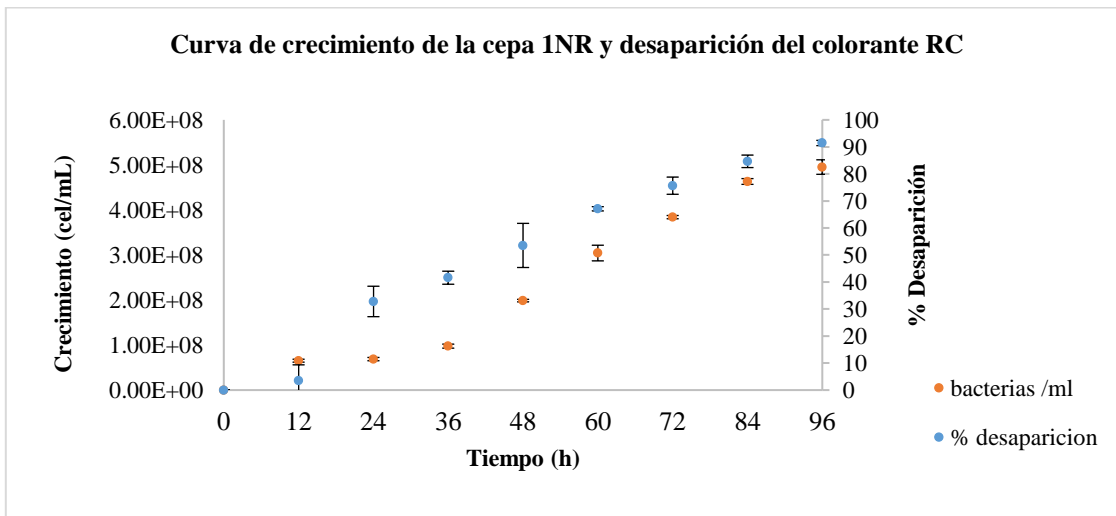
Gráfica 2. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RM de la cepa 201.

La cepa 201 muestra un patrón de crecimiento exponencial pasadas las 24 h de cultivo, alcanzando una biomasa máxima de $4.69E+08$ células/mL y un porcentaje de decoloración de 96.2% a las 96 sin llegar a la fase estacionaria.



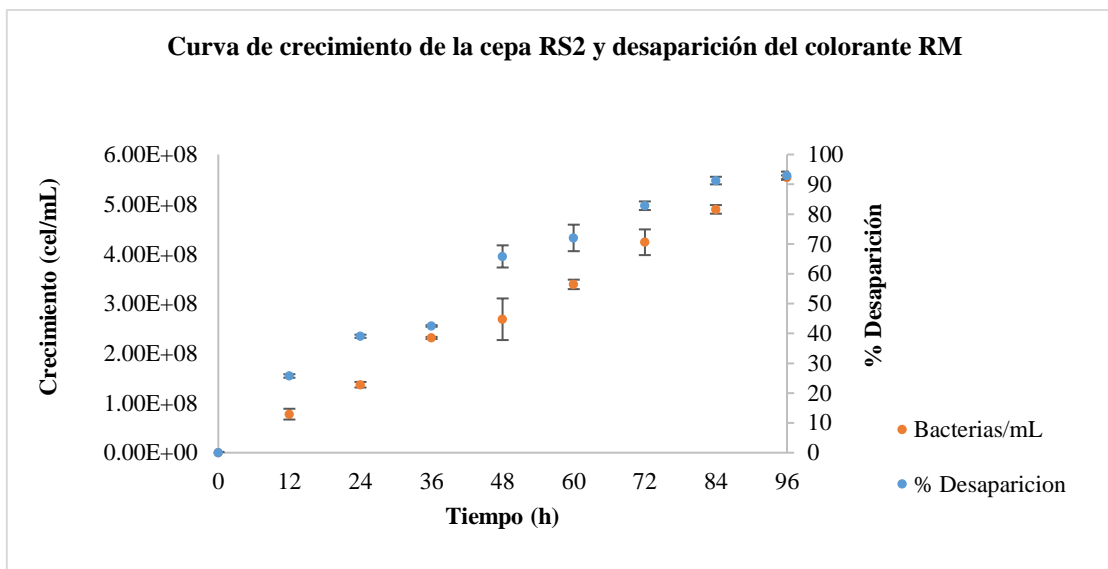
Gráfica 3. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC de la cepa RS1.

La fase estacionaria de la cepa RS1 se presentó a las 84 h con una biomasa máxima de $4.98e+08$ células/mL, continuando la decoloración del compuesto RC hasta las 96 h con un porcentaje de decoloración máximo de 95.8%



Gráfica 4. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC de la cepa 1NR.

La cepa 1NR crecida en presencia de RC no alcanzó la fase estacionaria. Los valores máximos de biomasa y porcentaje de decoloración a las 96 h son de $4.95e+08$ células/mL y 91.44% decoloración respectivamente.

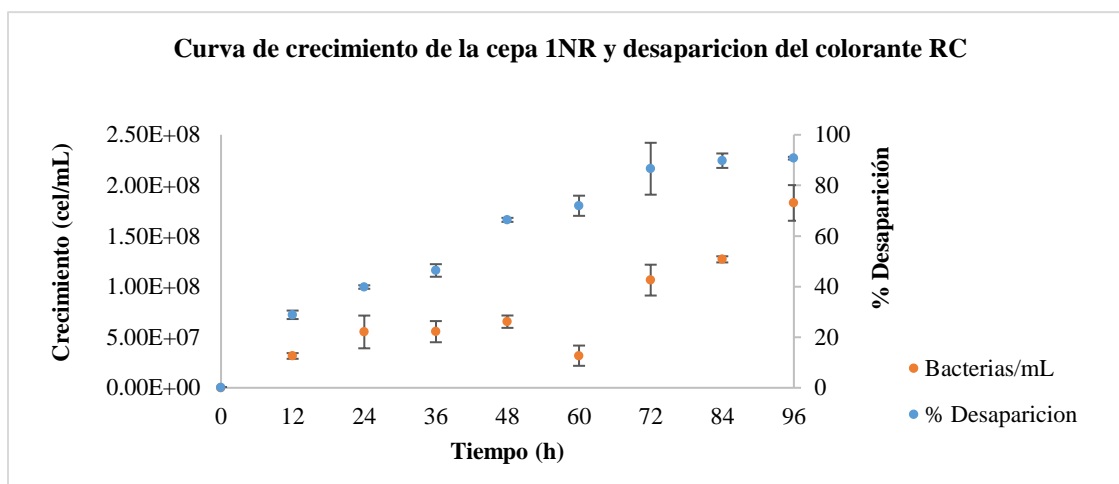


Gráfica 5. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC de la cepa RS2.

La fase exponencial de la cepa RS2 inicio a las 12 h obteniendo un valor máximo de biomasa y porcentaje de decoloración a las 96 h con valores de 5.54×10^8 células/mL y una decoloración del 92.9% respectivamente.

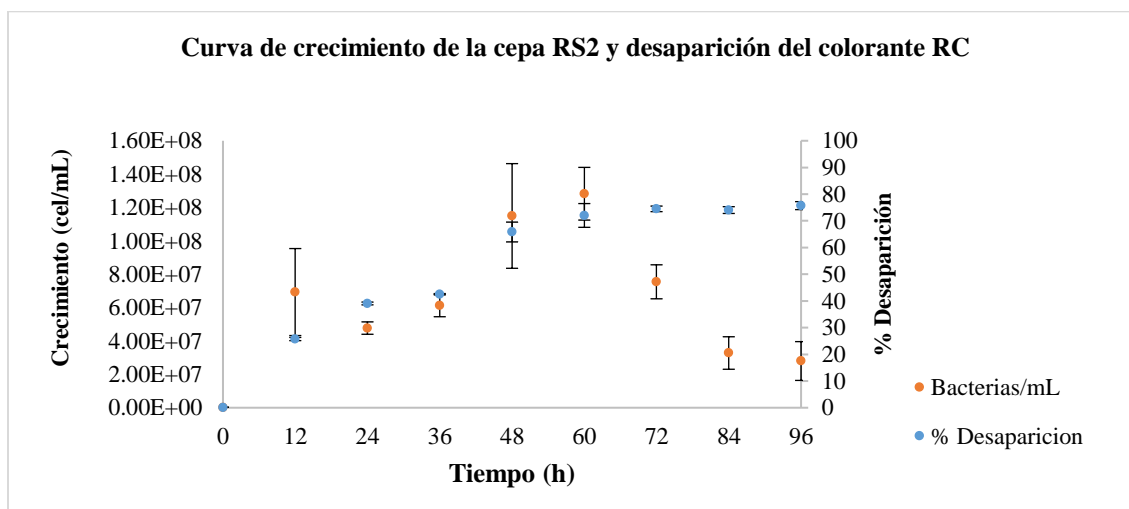
En el medio LB adicionado con el compuesto azo respectivo para cada cepa, tras las primeras 12 h, se observa la desaparición del colorante así como el incremento de microorganismos de manera exponencial a partir de las 36 h, con excepción de la cepa RS2, la cual a las 12 h presentó su fase de crecimiento exponencial, relacionado directamente a la desaparición del colorante. En los demás casos, también existe una relación directa para la desaparición del colorante mientras aumenta el crecimiento bacteriano. En condiciones de laboratorio, estas cepas lograron decolorar entre un 94-95% el colorante y obtuvieron valores promedio de 5.00×10^8 células/mL transcurridas las 96 h del experimento, esto nos muestra que en un medio de crecimiento nutritivo, al cual se le fue añadido un compuesto recalcitrante como cualquiera de los colorantes RM y RC, las cepas bacterianas tienen la capacidad de crecer, además de tolerar y decolorar el compuesto en el medio.

Para el caso de las pruebas de resistencia al compuesto RM y RC adicionados como única fuente de carbono a un medio mineral, se presentan los resultados en las gráficas 6-10.



Gráfica 6. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC de la cepa 1NR.

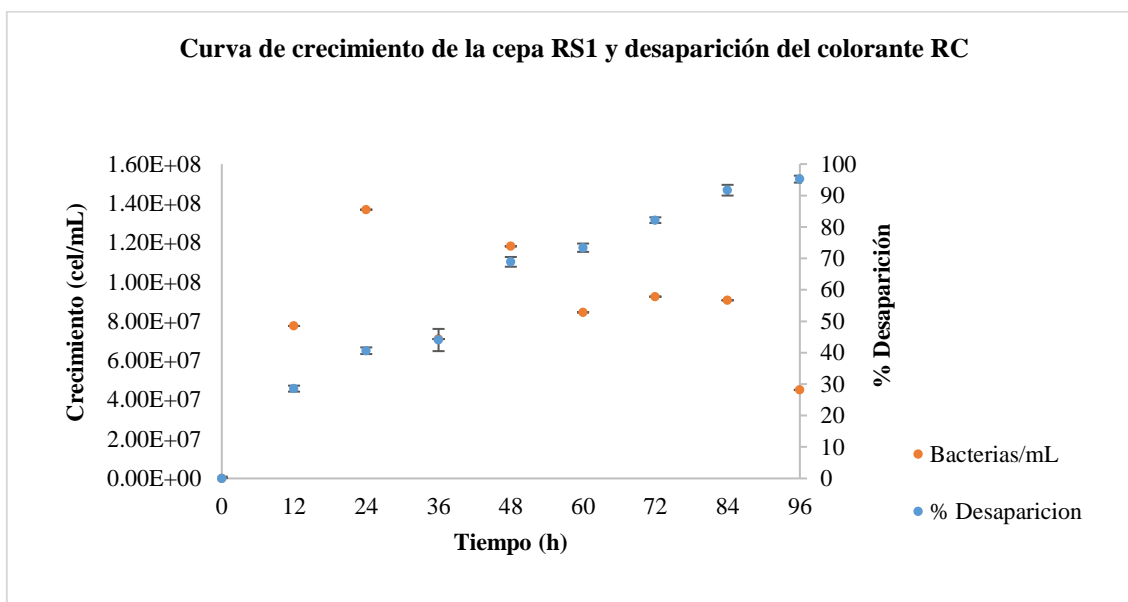
En la gráfica se puede apreciar que la fase de adaptación al medio se prolonga hasta las 72h, transcurrido ese tiempo se aprecia un patrón de crecimiento exponencial con respecto a la hora 0, los valores de biomasa máxima obtenidos a las 96 h son de $1.8E+08$ con un porcentaje de decoloración de 90.74%.



Gráfica 7. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RC de la cepa RS2.

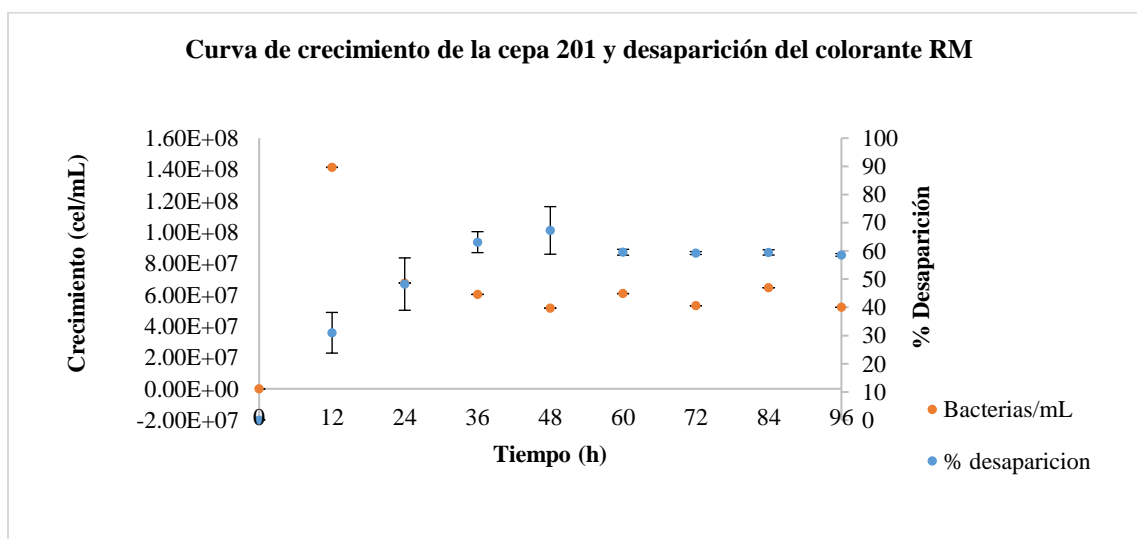
En la gráfica se muestran los valores de biomasa máxima expresada en células/mL, donde se observa que a la 60 h alcanza su valor máximo de $1.8E+08$ y el porcentaje de desaparición del colorante es de 74% permaneciendo estos valores las siguientes 72 h del cultivo; a las 60 h se logra observar un decremento de los valores de biomasa, pudiendo

indicar que las células tratan de subsistir al medio recurriendo a la fagocitosis en el cultivo, dejando en evidencia la fase de muerte celular.



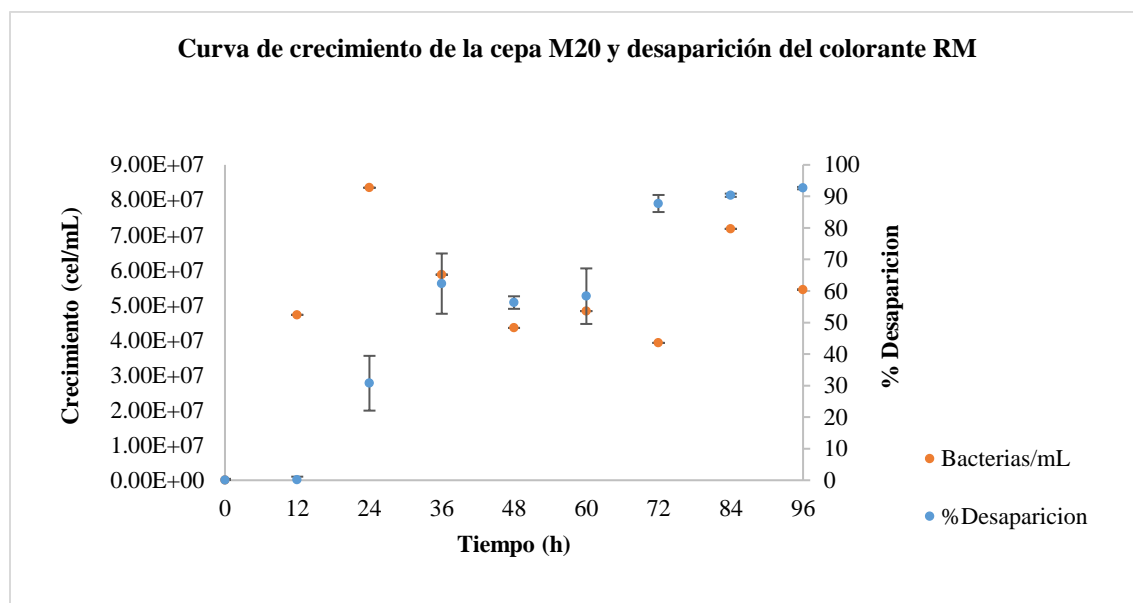
Gráfica 8. Curva de crecimiento y desaparición del colorante Rc de la cepa RS1.

Los valores de biomasa en la gráfica muestran la fase de adaptación y de crecimiento exponencial en las primeras 12 h, a partir de las 36 h se ve como los valores de biomasa se mantienen hasta las 84 h, alcanzando un valor máximo de $9.08E+07$ células/mL, mientras que en los valores de desaparición del colorante alcanzan un porcentaje del 95% transcurridas las 96 h de cultivo.



Gráfica 9. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RM de la cepa 201.

En la gráfica se muestran los valores biomasa celular en donde en las primeras 12 h el microorganismo mostró un bajo crecimiento, transcurrido eso se aprecia la fase estacionaria y muerte celular a las 48h, sin llegar a valores superiores a $6.75E+007$ de células/mL, llegando a un porcentaje de desaparición máximo del 67% a partir de las 36 h.



Gráfica 10. Curva de crecimiento y desaparición del colorante RM de la cepa M20.

En la gráfica, los valores de biomasa celular máximos obtenidos fueron a las 84 h en donde el porcentaje de decoloración es de 90.36% alcanzando un valor máximo de decoloración del 92.63% a las 96 h.

Con respecto a este experimento se pudo determinar que el crecimiento y desarrollo de las cepas se vio restringido cuando la única fuente de carbón añadida fue el colorante. Todas las cepas tuvieron la capacidad de desaparecer el colorante del medio en hasta un 93% en promedio a excepción de la cepa 201 la cual sólo obtuvo un valor máximo de 67%.

9.3 Pruebas de curado plasmídico

El tratamiento de las cepas con el agente de curado plasmídico BrEt, permitió la liberación de dicho material bajo las condiciones mostradas como sigue respectivamente para cada cepa (Tabla 5-9).

Donde; 1 significa presencia de ADN plasmídico y 0 ausencia de ADN plasmídico

Tabla 5. Tabla de resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. A diferentes concentraciones para la cepa RS1.

Concentraciones de BrEt.		Días					
		3	5	7	9	11	14
CEPA RS1	0 mg/L	1	1	1	1	1	1
	10 mg/L	1	1	1	1	1	1
	20 mg/L	1	1	1	1	1	1
	30 mg/L	1	1	1	0	0	0
	40 mg/L	1	1	1	0	0	0
	80 mg/L	1	1	1	0	0	0

Tabla 6. Tabla de resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. A diferentes concentraciones para la cepa M20.

Concentraciones de BrEt.		3	5	7	9	11	14
CEPA M20	0 mg/L	1	1	1	1	1	1
	10 mg/L	1	1	1	1	1	1
	20 mg/L	1	1	1	1	1	1
	30 mg/L	1	1	1	0	0	0
	40 mg/L	1	1	0	0	0	0
	80 mg/L	1	1	0	0	0	0

Tabla 7. Tabla de resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. A diferentes concentraciones para la cepa 201.

Concentraciones de BrEt.	3	5	7	9	11	14
CEPA 201	0 mg/L	1	1	1	1	1
	10 mg/L	1	1	1	1	1
	20 mg/L	1	1	1	1	1
	30 mg/L	1	1	1	0	0
	40 mg/L	1	1	0	0	0
	80 mg/L	1	1	0	0	0

Tabla 8. Tabla de resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. A diferentes concentraciones para la cepa 1NR.

Concentraciones de BrEt.	3	5	7	9	11	14
CEPA 1NR	0 mg/L	1	1	1	1	1
	10 mg/L	1	1	1	1	1
	20 mg/L	1	1	1	1	01
	30 mg/L	1	1	1	0	0
	40 mg/L	1	1	1	0	0
	80 mg/L	1	1	1	0	0

Tabla 9. Tabla de resultados de la prueba de curado plasmídico con BrEt. A diferentes concentraciones para la cepa RS2.

Concentraciones de BrEt.	3	5	7	9	11	14
CEPA RS2 0 mg/L	1	1	1	1	1	1
10 mg/L	1	1	1	1	1	1
20 mg/L	1	1	1	1	1	01
30 mg/L	1	1	1	0	0	0
40 mg/L	1	1	1	0	0	0
80 mg/L	1	1	1	0	0	0

En las tablas 5-9 podemos observar que las concentraciones inferiores a 30 mg/l de BrEt no son eficaces para lograr la pérdida de ADN plasmídico y que para las cepas de estudio son necesarios 9 días de incubación a una temperatura de 30 °C a una concentración mínima de 30 mg/L de BrEt para obtener una cepa curada.

Una vez obtenidas las cepas curadas, se procedió a crecer cada una de ellas sobre agar-agua con el compuesto azo, así también a realizar mediciones en medio mineral y medio LB más el compuesto tipo azo, con la finalidad de determinar si el ADN plasmídico les confiere la capacidad de crecer sobre el medio adicionado con colorante, para el medio sólido se realizaron observaciones de crecimiento colonial en placa con réplicas por triplicado (tabla 10); así como los gráficos de crecimiento celular y porcentaje de decoloración del compuesto para el medio LB y medio mineral en las gráficas 11-15 y 16-20 respectivamente, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 10. resultados de crecimiento sobre compuestos azo de las cepas curadas. Los resultados son presentados a través de una clave de ausencia presencia.

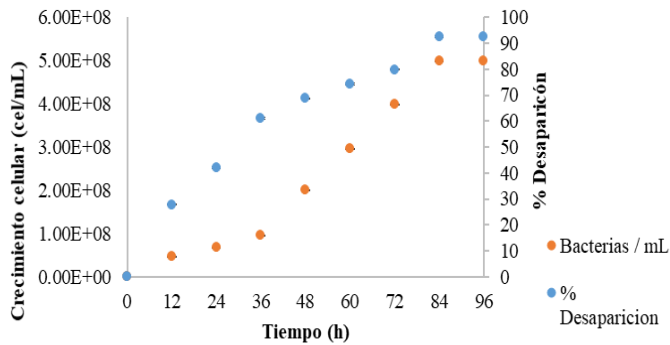
		Crecimiento en h										
Colorante		cepa	0	12	24	36	48	60	72	84	96	
	Rojo Congo	RS1	0	S/A	1	1	1	1	1	1	1	1
		RS2	0	S/A	1	1	1	1	1	1	1	1
		1NR	0	S/A	1	1	1	1	1	1	1	1
	Rojo de Metilo	M20	0	S/A	1	1	1	1	1	1	1	1
201		0	S/A	1	1	1	1	1	1	1	1	

Donde 0 indica ausencia de crecimiento, S/A sin crecimiento aparente o micro colonias, 1 Crecimiento positivo.

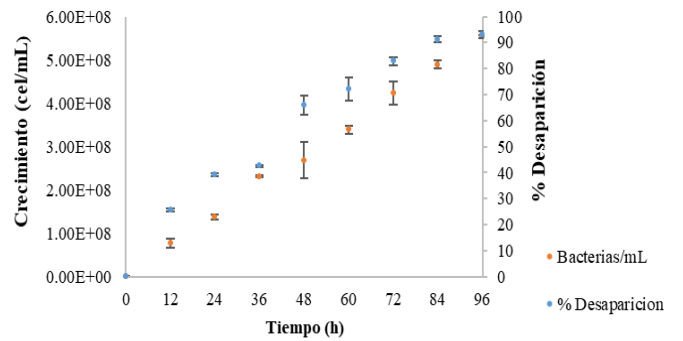
Las cepas bacterianas mostraron una morfología colonial típica durante las primeras 48 h, a partir de las 60 h, la cepa 1NR mostró un exudado de consistencia mucilaginosa no mostrado antes en su crecimiento típico sobre el medio selectivo.

A las 72 h, una de las cajas de la cepa 1NR curadas se encontró contaminada con un hongo, el crecimiento de éste sólo era sobre las colonias bacterianas, sin crecimiento aparente de micelio sobre el medio selectivo adicionado con RC.

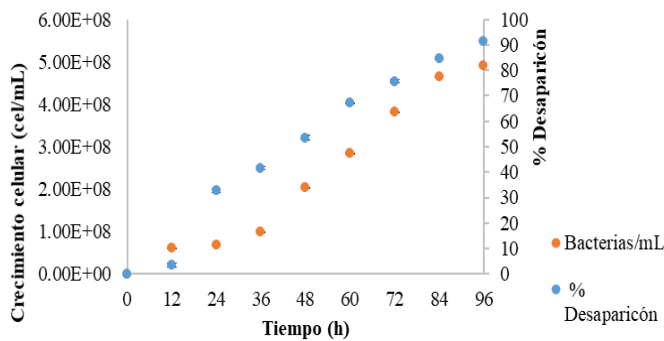
11 Curva de crecimiento de la cepa RS1 curada y desaparicion del colorante RC



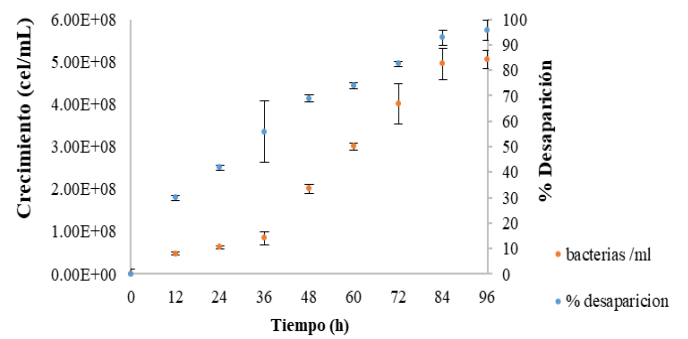
12 Curva de crecimiento de la cepa RS2 curada y desaparición del colorante RM



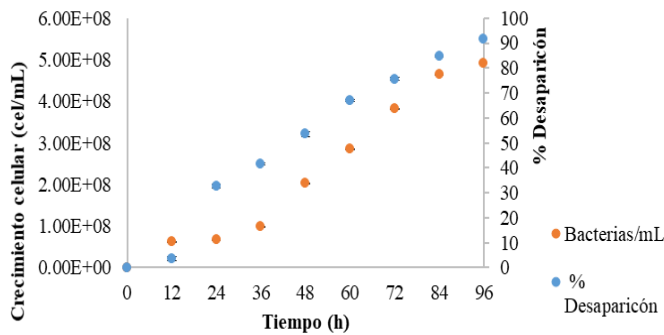
13 Curva de crecimiento de la cepa 1NR curada y desaparición del colorante RC



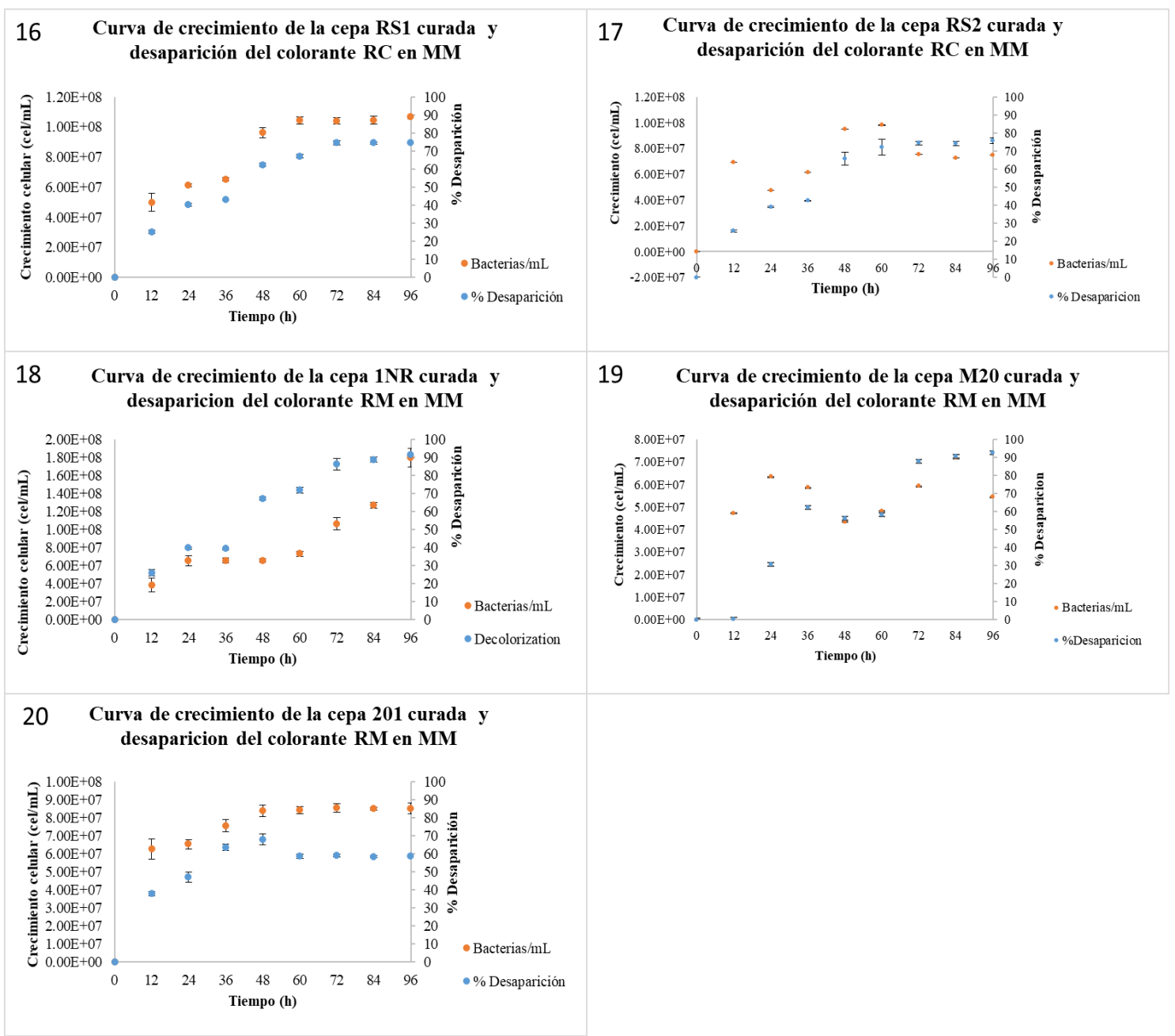
14 Curva de crecimiento de la cepa M20 curada y desaparición del colorante RM



15 Curva de crecimiento de la cepa 201 curada y desaparición del colorante RM



Gráficas de las Curvas de crecimiento y desaparición del colorante RC y RM en medio LB de las cepas RS1, RS2 y 1NR (11, 12, 13) M20 y 201 (14-15).



Gráficas de las Curvas de crecimiento y desaparición del colorante RC y RM en medio LB y colorantes de las cepas RS1, RS2 y 1NR (16, 17, 18) M20 y 201 (19, 20).

Todas las cepas, mostraron crecimiento sobre el medio selectivo respectivo, en el caso del crecimiento en medio LB y medio mineral teniendo valores similares antes y después del curado plasmídico, permitiendo inferir que el ADN plasmídico no les confiere la capacidad de crecer sobre el compuesto tipo azo.

Con el fin de entender cuáles son las posibles características que el ADN plasmídico otorga a las cepas del estudio se realizaron pruebas de resistencia a antibióticos, utilizando niveles basales séricos. Cada cepa fue sembrada por el método de dispersión por estría, en cajas Petri de 60x15 mm en cada uno de los medios por triplicado, se realizaron revisiones cada 12 h durante 96 h, para ver si existía crecimiento sobre los medios de cultivo. Se obtuvieron los siguientes resultados de presencia ausencia (0-1) (Tabla 1).

Tabla 11. Tabla de presencia/ausencia de crecimiento bacteriano sobre medio con antibiótico de las cepas nativas.

CEPA	antibiótico	tiempo h							
		12	24	36	48	60	72	84	96
RS1 PL	Cefadroxil 30 µg /mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	1	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µgr/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
RS2 PL	Cefadroxil 30 µg /mL	0	0	0	1	1	0	0	0
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µg/mL	0	1	1	1	1	1	1	1
1NR PL	Cefadroxil 30 µg /mL	0	0	0	1	1	1	1	1
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µg/mL	0	1	1	1	1	1	1	1
M20 PL	Cefadroxil 30 µg /mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
201 PL	Cefadroxil 30 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µg/mL	0	0	1	1	0	0	0	0

La cepa RS1pl no presentó crecimiento sobre los antibióticos nitrofurantoina y cefadroxil a las 48 h presentó crecimiento de micro colonias sobre amoxicilina, mismas que a las 48 h estaban ausentes. Para la cepa RS2pl, hubo presencia de micro colonias a las 36 y

48 h sobre cefadroxil, sin un crecimiento mayor y una lisis en el medio a las 60 h; así como presencia de colonias amarillas en el medio con nitrofurantoina a las 24 h, persistiendo hasta las 96 h. La cepa 1NRpl tuvo crecimiento sobre cefadroxil y nitrofurantoina a las 36 y 24 h respectivamente. Para M20pl no se observó crecimiento sobre ninguno de los antibióticos. La cepa 201pl presentó formación de micro colonias sobre nitrofurantoina a partir de las 36 h y persistentes hasta las 48 h. A las 60 h ya no estaban presentes.

Tabla 12. Datos de presencia/ausencia de crecimiento bacteriano sobre medio con antibiótico de las cepas curadas.

CEPA	antibiótico	Tiempo h							
		12	24	36	48	60	72	84	96
RS1 CUR	Cefadroxil 30 µg /mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
RS2 CUR	Cefadroxil 30 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µg/mL	0	1	1	1	1	1	1	1
1NR CUR	Cefadroxil 30 µg/mL	0	0	1	1	1	1	1	1
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µg/mL	0	1	1	1	1	1	1	1
M20 CUR	Cefadroxil 30 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
201 CUR	Cefadroxil 30 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Amoxicilina 17 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0
	Nitrofurantoina 20 µg/mL	0	0	0	0	0	0	0	0

La cepa RS1cur no presentó crecimiento sobre los antibióticos probados. La cepa RS2cur presentó colonias amarillas en el medio con nitrofurantoina a las 24 h, persistiendo hasta las 96 h. No creció en los otros dos antibióticos. La cepa 1NRcur creció sobre cefadroxil y nitrofurantoina a las 36 y 24 h respectivamente. La cepa M20pl no presentó crecimiento sobre los antibióticos. La cepa 201pl no formó colonias sobre los antibióticos seleccionados.

Con respecto a los resultados obtenidos en las pruebas de crecimiento de las cepas curadas y las cepas nativas con ADN plasmídico, podemos concluir que el ADN plasmídico no les confiere resistencia sobre los antibióticos seleccionados, debido a que las cepas 1NR, RS2 que fueron capaces de crecer sobre nitrofurantoina y/o cefadroxil fueron tanto las cepas curadas como las cepas con ADN plasmídico.

Como parte de los siguientes objetivos de investigación, mediante la técnica de Eckhart, se obtuvo una resolución de ADN plasmídico para todas las cepas, la cual muestra la presencia de material plasmídico en todas las cepas de estudio (figura 3), en cada caso, el tamaño de los plásmidos es alto, posicionándose sobre la banda mayor del marcador de peso molecular λ PstI utilizado (11,501 pb) en geles de agarosa al 1%. Posterior a este paso se procedió a purificar el material plasmídico para llevar a cabo la digestión enzimática

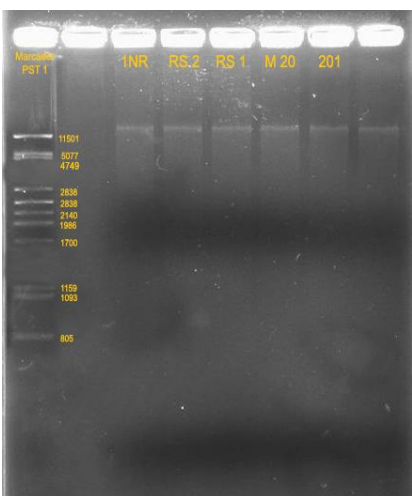


Figura 3. Imagen que muestra la presencia de ADN plasmídico. Se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular λ PstI, en el carril 3-7 se muestran el material plasmídico obtenidos de las cepas RS1, RS2, 1NR, M20 Y 201.

A pesar de que en todas las cepas se observó la presencia de material plasmídico de alto peso molecular, no fue posible linealizarlo en todos los casos con las enzimas y condiciones utilizadas en este estudio. Sólo en el caso del material plasmídico de la cepa RS2

se obtuvo una digestión exitosa con la enzima PuvII, la cual tuvo un solo corte, dejando al plásmido lineal (Figura 4) del que se estimó un tamaño de 18,601 pb.

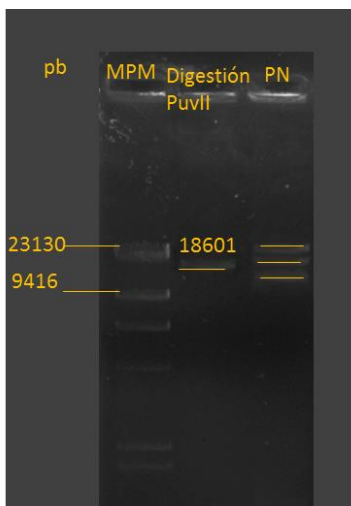


Figura 4. Imagen que muestra un perfil de bandeo en un gel de agarosa al 1% cargado con la digestión enzimática del material plasmídico de la cepa RS2 digerido con PuvII, en el que se puede apreciar una única banda de aproximadamente 18601pb en el carril 2, comparado con el marcador de peso molecular λ HindII carril 1 y el carril 3 el plásmido nativo.

En el plásmido de la cepa RS2 se encontraron múltiples sitios de restricción para la enzima *NcoI* (figura 5). Las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *PstI* no efectuaron corte de restricción en dicho material plasmídico.

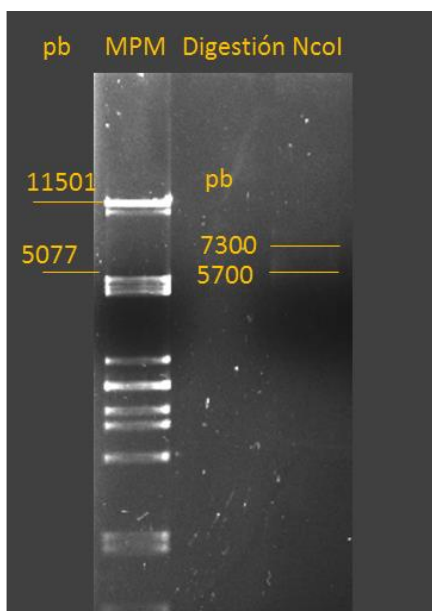


Figura 5. En la fotografía se aprecia la digestión enzimática con *NcoI* del plásmido de la cepa RS2 resuelta en un gel de agarosa al 1%, donde en el carril 1 se posiciona el marcador de peso molecular λ *PstI*, y en el carril 3 la digestión con *NcoI* que se encuentra ubicado un patrón de bandeo entre los 5077 y 11501 pb.

Tanto los fragmentos obtenidos a partir de la digestión como el plásmido lineal, fueron utilizados para su ligación en un plásmido comercial PJet 1.2/ blunt (figura 6), para su posterior clonación y amplificación.

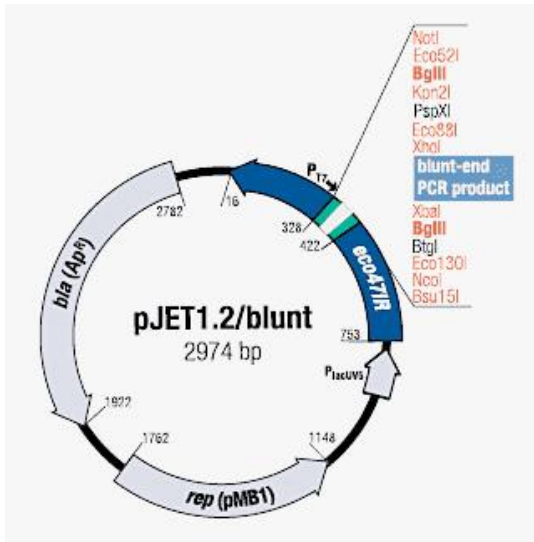


Figura 6. Mapa del Plásmido pJET 1.2/ Blunt

Se transformaron cepas de *E. coli* DH5 α con los constructos obtenidos a partir de los fragmentos del plásmido de la cepa RS2 digeridos con *Nco*I ligados en pJet 1.2. Se obtuvieron un total de 72 colonias de *E. coli* DH5 α transformadas (figura 7).

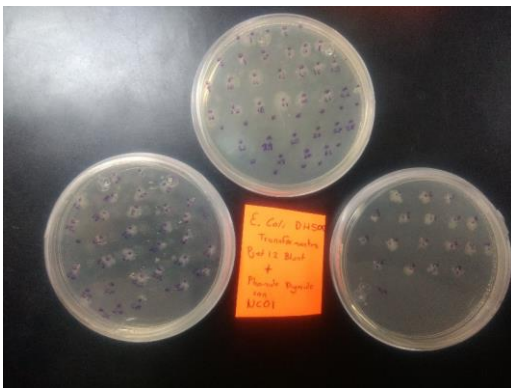


Figura 7. Imagen representando las colonias obtenidas de *E. coli* DH5 α transformadas con pJet1.2 + Fragmentos del ADN plasmídico de la cepa RS2 digerido con *Nco*I, crecidas sobre medio Lb +Amp.

Se obtuvieron secuencias parciales de la ADN plasmídico de la cepa RS2 con una extensión de 580 pb (Anexo 2) luego del ensamblado y edición con el programa DNA baser v.4.36.0.y se realizó una búsqueda de elementos plasmídicos con el programa Vector Friends v1.2.0 . Comparando las secuencias obtenidas con las de plásmidos comerciales presentes en la base de datos mundial. Se realizó un análisis con la herramienta BLAST para comparar las secuencias obtenidas con la base de datos mundial, esperando encontrar similitud a algún elemento génico de ADN plasmídico.

Se encontraron similitudes con un gen de resistencia a ¿? ampicilina, con parte del marco de lectura de las secuencias con el clonaje vector basic 8 y con un plásmido de *Klebsiella pneumoniae* con código de acceso GenBank: KP223701.1 (Figura 8) y GenBank: CP016919.1 (Figura 9) respectivamente.

Klebsiella pneumoniae isolate 11 plasmid plncR_DHQP1300920, complete sequence

GenBank: CP016919.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

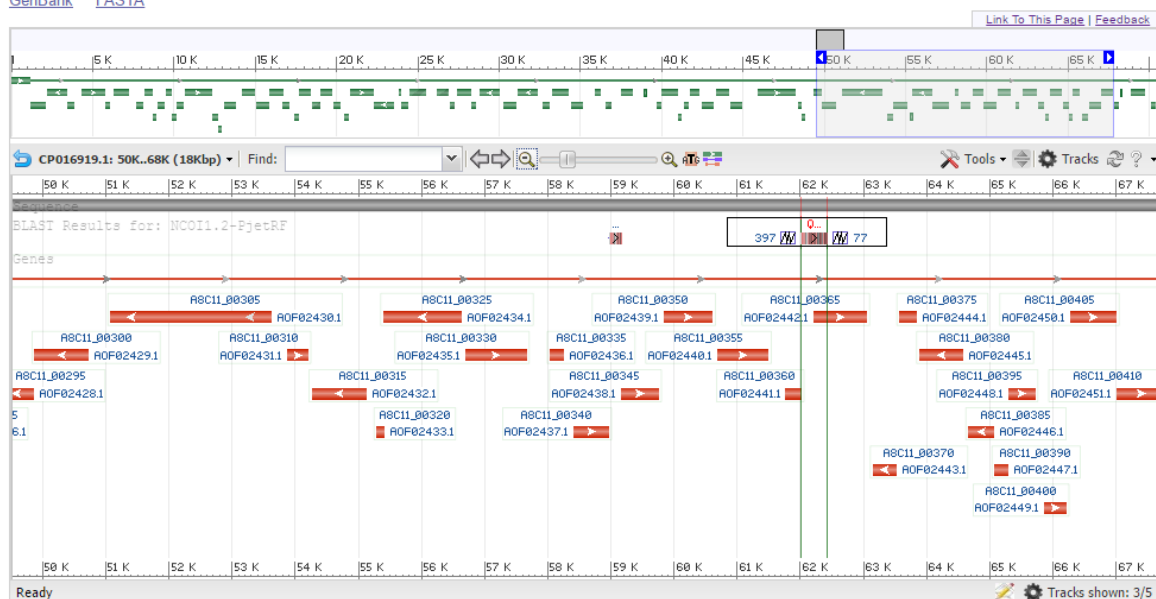


Figura 8. Análisis Blast de la secuencia obtenida del plásmido RS2 congruencia para *Klebsiella pneumoniae*

Cloning vector BASIC_3_Kan, complete sequence

GenBank: KP223697.1

[GenBank](#) [FASTA](#)

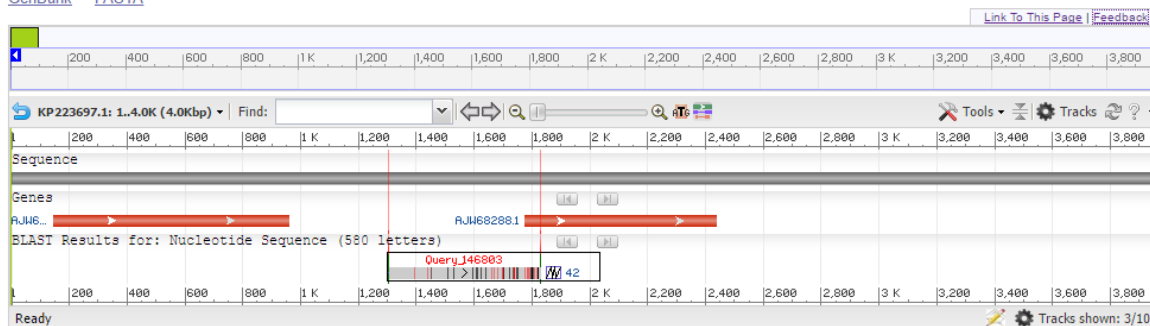


Figura 9. Análisis Blast de la secuencia obtenida del plásmido RS2 similitud a briobrick de resistencia a kanamicina y ampicilina del vector Basic 3

Debido a este resultado se sometió a la cepa *A. anthurii* a un experimento extra para corroborar si las cepas curadas contra las que poseían ADN plasmídico poseían la capacidad de crecer en presencia de ampicilina obteniendo los siguientes resultados, las cepas crecen en ampicilina tanto las que poseen ADN plasmídico como las que han sido curadas. Se observó un cambio en la morfología colonial en las cepas curadas, reduciendo el tamaño de la colonia en comparación a las cepas nativas (Figura 10).

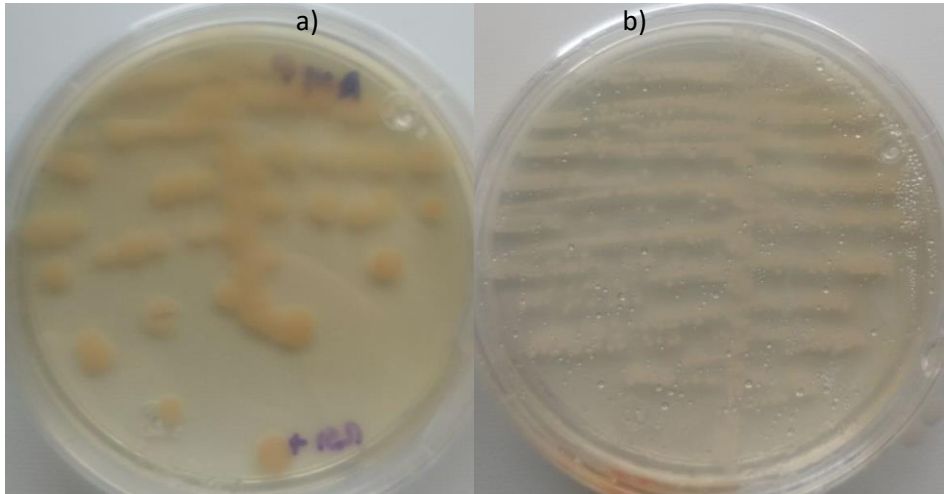


Figura 10. Placas Petri inoculadas con la cepas curadas y nativas de *A. anthurii* crecidas en medio LB y ampicilina. a) cepa nativa de *A. anthurii* crecida sobre medio LB adicionado con ampicilina, b) cepa curada *A. anthurii* crecida sobre medio lb adicionado con ampicilina.

10 Discusiones

El análisis de las secuencias mediante Blast brindó mayor información para la identificación de las cepas con porcentajes de similitud altos, se determinó que las cepa RS2 es un 99% similar a *Acidovorax anthurii*, la cepa RS1, es 99% similar a *Agrobacterium tumefaciens* cepa JSD-RHCu-7^a, la cepa 201 es 99% similar a *Ralstonia pickettii* cepa DTP0602, la cepa M20 es similar un 99% a *Ralstonia pickettii* cepa DTP0602 y la cepa 1NR es 99% similar a *Cupriavidus* sp. y *Ralstonia* sp.

La especie *Acidovorax anthurii*, está caracterizada como una bacteria fitopatógena (Gardan y cols 2000) no presenta reportes o estudios sobre su capacidad de decolorar compuestos tipo cols.; *Ralstonia* y *Cupriavidus* son géneros segregados de *Pseudomonas* por lo que su identidad molecular a veces se ve relacionada o sinonimizada en las bases de datos (Vandamme y Coenye 2004). En el caso del género *Cupriavidus*, es reconocido por su capacidad de resistencia a metales pesados y por su presencia en sitios contaminados (Janssen y cols. 2010).

El género de *Ralstonia* se encuentra ampliamente distribuido en diferentes ecosistemas del mundo, posee múltiples reportes científicos en los que se indica su presencia en sitios contaminados por compuestos como el DDT y el 2,4-diclorofenol, siendo capaces de mineralizar anaerobia y aeróbicamente estos compuestos (Steinle y cols. 1998; Foght y cols. 2010). La especie *Ralstonia pickettii* es una bacteria presente en el suelo, es un organismo oportunista causante de enfermedades nosocomiales, y mostró las capacidad para degradar 2,4,6-triclorofenil y clorobenceno (Zhang y cols. 2011).

En el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, la información con la que se cuenta es del género como tal. Se considera que *Agrobacterium* es una α proteobacteria de la familia Rhizobiaceae, fijadora de nitrógeno, es fitoparásito de dicotiledóneas. Meera y cols. (1993), realizaron un análisis filogenético de un grupo de bacterias capaces de degradar los compuestos azo en una muestra de suelo, siendo ésta una de las enmarcadas en la lista.

El crecimiento de las cepas en medio LB adicionado con colorante azo y utilizando una fuente de carbono adicional fue favorable, alcanzando valores de biomasa máxima de 5.05e+08 (células/mL) y porcentajes de decoloración entre el 91% y el 95% transcurridas las 96 h. Éstos se encuentran asociados de forma directamente proporcional al crecimiento bacteriano

a lo largo del experimento. Resultados similares en cuanto a la capacidad de decolorar compuestos azo a través de sistemas bacterianos, reportan que la cepa *Staphylococcus hominis* RMLRT03 aislada de descargas de aguas residuales, es capaz de decolorar el naranja ácido en un 92.38% en 60 h, indicando que poseen un sistema de enzimas de azo-reducción (Rajat y cols. 2014). *Acinetobacter calcoaceticus* muestra porcentajes de decoloración del 91% durante 48 h de incubación, reportando la presencia de un sistema de enzimas peroxidasas y reductasas las cuales le otorgan la capacidad de decoloración (Gajanan y cols. 2011). *Pseudomona putida* mostró un 90% de decoloración del naranja ácido en 48 h en condiciones estáticas y un 32% en medio líquido (Tripathi y Srivastava 2011).

Con respecto a la prueba de crecimiento en medio mineral donde se confirmó la capacidad de usar como única fuente de carbono al compuesto tipo azo, sólo la cepa 1NR mostró un crecimiento durante las 96 h del cultivo, alcanzando valores de biomasa de $1.8E+08$ (células/mL) y de desaparición del colorante de 90.7%. Liu y Yang 1989 realizaron un estudio con *Pseudomonas S42* en el que muestran que ésta posee la capacidad de decolorar el 90% de componentes tipo azo en condiciones anaeróbicas indicando la presencia de una enzima azoreductasa, siendo la que le otorga esta capacidad de decoloración; en tanto las cepas M20 y RS2 mostraron crecimiento y desaparición del colorante sólo hasta las 72 h con porcentajes de decoloración del 95% y 92% cesando su división celular a las 48 h.

Por lo que se refiere a términos de tolerancia y resistencia, en los datos anteriormente citados, podemos distinguir una diferencia en el crecimiento bacteriano de las cepas en diferentes condiciones de cultivo de cinco cepas evaluadas sólo una cepa mantuvo su crecimiento en ambas condiciones estudiadas sin afectar su crecimiento celular y cuatro de ellas lograron subsistir en presencia del colorante azo siempre y cuando contaran con una fuente de carbono asimilable.

Es importante enfatizar estas diferencias de crecimiento en los distintos medios de cultivo para cada una de las cepas, pues son estos datos los que nos confirman si se trata de una resistencia o una tolerancia, la capacidad de resistencia podemos observarla en las cepas que en el medio mineral mantienen su crecimiento celular, debido a que deben estar desplegando un acervo metabólico que pudiera estar localizado en la membrana y de naturaleza enzimática, para lograr utilizar el colorante como fuente de carbono para su utilización en el crecimiento a través de enzimas peroxidasas o reductasas, sobre los

compuestos o los cambios en la permeabilidad de membrana, como lo efectúan algunas especies bacterianas en presencia de agentes antibióticos o tóxicos. Sin embargo, si las cepas que logran mantener su crecimiento en presencia de una fuente de carbono asimilable, lo ven atenuado o es inexistente al estar en un medio en donde el colorante es su única fuente de carbono, el mecanismo que les permite su subsistencia es de tolerancia (Arbeli 2009), el cual sólo les permite atenuar la presencia del colorante a costa de alterar su crecimiento, para intentar utilizar el compuesto.

Es por ello que los valores de crecimiento en medio mineral fueron inferiores en comparación a los valores obtenidos en la prueba de tolerancia con una fuente de carbono adicional, esto debido a que los compuestos azo deben constituir una fuente de carbono asimilable para estos microorganismos a un alto costo metabólico para su mineralización y detoxificación en su uso como fuente de carbono, esto explicaría el por qué en las cepas 201 y RS1 al transcurso de 36 h habían alcanzado valores de 67 y 75 % de desaparición mientras que su crecimiento llegó a la fase de muerte celular luego de este lapso transcurrido. Estos datos, a diferencia de los reportados por Elbana y cols. (2010) en los que la decoloración de los componentes azo está relacionada a la presencia de ADN plasmídico, indican que las cepas del estudio pudieran poseer la presencia de azoreductasas en el genoma de las cepas, como lo mencionan los estudios de mecanismos de decoloración y degradación de compuestos azo en bacterias y algunos basidiomicetos a través de la acción de enzimas azoreductasas (Anjali, y cols. 2007).

Para las pruebas de curado plasmídico se determinó que las concentraciones de 10 y 20 mg/L no fueron eficaces para lograr la pérdida del ADN plasmídico en las cepas, las concentraciones superiores a 30 mg/L resultaron eficaces a partir del noveno día de incubación; trabajos donde se realizó un curado plasmídico de diferentes cepas, reportan que concentraciones de 10 mg/ mL de BrEt a 48°C por 24 h no son condiciones suficientes para obtener cepas curadas. Así mismo, otros trabajos utilizan a *Pseudomonas* y como agente de curado al naranja de acridina en concentraciones de 10 a 60 mg/L, crecidas a 37° C por 24 h (Zeng X y cols. 2013), mostrando diferencias en la obtención de cepas curadas, esto debido a que el tratamiento de curado actúa en diferentes grados dependiendo del organismo de estudio.

En el caso de las posibles capacidades que el ADN plasmídico pudiera estar otorgándole a las cepas se determinó que la resistencia antibiótica que poseen las cepas INR y RS1 para nitrofurantoina no está otorgada por los plásmidos a diferencia del estudio de Elbanna y cols. (2010), en donde la resistencia a estreptomicina, kanamicina, gentamicina, ampicilina y cloranfenicol esta conferida por el material plasmídico, o el caso particular de *Acidovorax Avenae* en donde posee resistencia a kasugamicina, resistencia que esta mediada por un plásmido pAAA83 (Atsushi y cols. 2015).

Tras el curado plasmídico se optó por trabajar con la cepa RS2, INR, M20, para la obtención de los elementos génicos de dicho material plasmídico, esto porque los trabajos encontrados sobre las especies *Acidovorax anthurii*, *Crupriavidus sp* y *Rashtonia piketti*, no reportan presencia de ADN plasmídico, de igual manera porque estas fueron las cepas que mostraron valores óptimos en las pruebas de tolerancia y resistencia. En el caso particular de las cepa RS2, tras la restricción enzimática con *PuvII*, se logró visualizar un plásmido linealizado de aproximadamente 18,601 pb, esta cepa ha sido identificada como *Acidovorax anthurii*. Esta especie, no presenta reportes de la presencia de ADN plasmídico. Existe un reporte de plásmidos en una cepa *Acidovorax avenae*, el plásmido pAAA83 el cual tiene una extensión de 59,534pb (Atsushi y cols. 2015). Al realizar una simulación de digestión con las enzimas utilizadas en el presente estudio sobre la secuencia de dicho plásmido, se observó que no tiene sitio de corte para *PuvII* a diferencia del plásmido encontrado en la cepa *Acidovorax anthurii* de este estudio, indicando que el plásmido reportado para *Acidovorax avenae* y el aislado en *Acidovorax anthurii*, no son el mismo y muestran diferencia de tamaño y presencia del sitio de corte para la enzima *PuvII*,

Del análisis de las secuencias obtenidas del plásmido de la cepa de *Acidovorax anthurii*, se obtuvo que poseen un 92% de similitud a un gen de resistencia a betalactamasas (ampicilina), a un vector de clonación y a un plásmido de la cepa *Klebsiella pneumoniae*.

Se realizó un experimento posterior a este análisis con la finalidad de confirmar la presencia de un gen de resistencia a ampicilina en la cepa *Acidovorax anthurii* en el que se muestra que la cepa es capaz de crecer en presencia de ampicilina, así como que las cepas curadas mantienen esta resistencia a ampicilina, pero se ve modificada su morfología colonial, este fenómeno sugiere que la resistencia a dicho antibiótico se encuentra modulada por la participación del ADN plasmídico, el cual podría estar participando en la síntesis de

alguna molécula que fomente la maduración, el acoplamiento o la complementación de algún agente antibiótico que se encuentre codificado en el genoma total bacteriano. Para confirmar esto, es necesario realizar una búsqueda de betalactamasas y los genes que las codifican en las células curadas y compararlas con las presentes en las cepas nativas, para tratar de determinar si existen diferencias que expliquen este fenómeno.

11 Conclusiones

- Los datos obtenidos sugieren que la cepa *Cupravidus* sp. es resistente a los compuestos azo.
- Las cepas que corresponden a *Acidovorax anthurii*, *Ralstonia pikettii*, *Agrobacterium* sp., *Ralstonia* sp. poseen tolerancia a los compuestos tipo azo.
- Todas las cepas bacterianas aisladas poseen ADN plasmídico, aparentemente de alto peso molecular.
- La evidencia sugiere que no son los plásmidos los que otorgan la tolerancia a los compuestos tipos azo en las bacterias aisladas.
- La cepa de *Acidovorax anthurii* posee al menos un plásmido con tamaño estimado de 18,601 pb.
- El plásmido de la cepa de *Acidovorax anthurii* posee elementos génicos con cierta similitud a un fragmento de un gen de resistencia a ampicilina.

12 Perspectivas

Para complementar el presente estudio es necesario determinar lo siguiente:

- ❖ Confirmar que, en estas especies bacterianas, son las azo-reductasas las enzimas que confieren la capacidad de degradar colorantes azo.
- ❖ Realizar la evaluación de azo-reductasas en las cepas curadas, lo que confirmaría que, como en otros estudios, los genes de estas enzimas están incluidos en el genoma cromosómico.
- ❖ Obtener una mayor cantidad de fragmentos del plásmido estudiado mediante PCR anidada con la finalidad de obtener más completa la secuencia del mismo y mejorar su caracterización génica.
- ❖ Evaluar el método de Shotgun y secuenciación de alto rendimiento del ADN plasmídico purificado, para la construcción de su mapa de restricción.

Bibliografía

- Achtman, M., and R. Skurray. "A redefinition of the mating phenomenon in bacteria." In *Microbial Interactions, Receptors, and Recognition, Ser. B. V3.*, by J. L. Reissig, 233-279. London: Chapman and Hall, 1977.
- Altimira F., Yáñez C., Bravo G., González M., Rojas L. "Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile." *BMC Microbiology* 12 (2012): 193-205.
- Anjali, Pandey, Singh Poonam, and Iyengar Leela. "Bacterial decolorization and degradation of azo dyes." *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2007: 73-84.
- Anjum R., Grohmann E., Malik A. "Molecular characterization of conjugative plasmids in pesticide tolerant and multi-resistant bacterial isolates from contaminated alluvial soil." *Chemosphere* 84 (2011): 175-18.
- Arbeli, Ziv. "Biodegradation Of Persistent Organic Pollutants (POPs): The Case Of Polychlorinated Biphenyls (PCB)." *Acta Biológica Colombiana*, 2009: Volumen 14, Número 1, p. 56-86.
- Atlas, RM, and R Bartha. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Madrid, España.: Prentice Hall,, 2002.
- Atsushi Yoshii, et al. "Two types of genetic carrier, the IncP genomic island and the novel IncP-1 β plasmid, for the aac(2')-IIa gene that confers kasugamycin resistance in *Acidovorax avenae* ssp. *avenae*." *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 2015: 288-300.
- Bergey D. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition*. 9na. Edited by John G. Holt. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1994.
- Brujin, Frans J. de. *Handbook of molecular microbial ecology II metagenomics UN different habitats*. Willey-Blackwell, 2013.
- Chapalamadugu S., and Chaudhry G. "hydrolysis of Carbaryl by a *Pseudomonas* sp. and Construction of a Microbial Consortium That Completely Metabolizes Carbaryl." *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 1991: 744-750.
- Chattoraj, D.,. "Control of plasmid replication by iterons: no longer paradoxical." *Mol. Microbiol* 37 (2000): 467-476.
- Chen CC, Liao HJ, Cheng CY, Yen CY, Chung YC. "Biodegradation of crystal violet by *Pseudomonasputida*." *Biotechnol. Lett.* 29 (2007): 391-396.
- Chung, K.T., Stevens SE, Cerniglia CR. "The reduction of azo dyes by the intestinal microflora." *Crit.Rev. Microbiol* 18 (1992): 175-190.
- Claus, H., r G. Fabe, and H. Koenig. "Redox- mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. ." *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 2002: Vol. 59: 672-678.
- Coll, Pere, M. Teresa Coque, M. Angeles Domínguez, Julio Vázquez, and Jordi Vila. "Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología ." In *Procedimientos en*

- Microbiología Clínica*, by Emilia Cercenado and Rafael Cantón, 10-25. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica , 2005.
- Cortazar-Martínez, CA González-Ramírez , C Coronel-Olivares, JA Escalante-Lozada, J Castro-Rosas, JR Villagómez-Ibarra. *Biotechnology applied to the degradation of textile industry dyes*. Mexico, DF : Instituto de Biotecnología, UNAM, 2012.
- Datta, S. & R. W. Hedges. "Compatibility groups among fi - R factors." *Nature* 234 (1971): 222-223.
- de Melo, F, Nascimento Cd, Souza DO, and Albuquerque Jr RF. "Identification of oral bacteria on titanium implant surfaces by 16S rDNA sequencing." *Clin. Oral Impl. Res.*, 2016: 1–7.
- del Solar G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarría, M. Espinosa & R. Díaz-Orejas,. "Replication and control of circular bacterial plasmids." *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1998): 434-464.
- Del Solar, G, and R Espinosa. "Plasmid copy number control: an ever-growing story." *Mol. Microbiol.* 37 (2000): 492-500.
- Dos Santos A., F.J. Cervantes y J.B. Van Lier. *Review on colour removal from textile wastewaters: a biotechnological approach*. . The Netherlands.: Wageningen University. , 2004.
- Dziewit, L., Czarnecki J., Wibberg D., Radlinska M., Mrozek P., Schlüter A., Pühler A., and Bartosik D.,. "Architecture and functions of a multipartite genome of the methylotrophic bacterium *Paracoccus aminophilus* JCM 7686, containing primary and secondary chromid." *BMC Genomics*, 2014: 124-140.
- Eckhardt, T. "A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria." *Plasmid* 1, 1978: 584-588. .
- Elbanna K, Hassan G, Khider M, and Mandour R. "Safe Biodegradation of Textile Azo Dyes by Newly Isolated Lactic Acid Bacteria and Detection of Plasmids Associated With Degradation." *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 2010: 1-6.
- Espinosa, M., S. Cohen, M. Couturier, G. del Solar, R. Diaz-Orejas, R. Giraldo, L. Jannièrè, C. Miller, M. Osborn & C. M. Thomas,. "Plasmid replication and copy number control." In *The horizontal gene pool*, by C. M. Thomas, 87-174. Amsterdam: Harwood Academic publishers, 2000.
- Faddeeva-Vakhrusheva, A, et al. "Gene family evolution reflects adaptation to soil environmental stressors in the genome of the collembolan *Orchesella cincta*." *Genome Biol Evol.*, 2016: 134.
- Fernandes, P., Ferreira B. Sommer, and Cabral J.M. Sampaio. "Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance." *International Journal of Antimicrobial Agents* , 22 (2003) : 211/216.
- Freeman, S. y Herron, J.C. *Analisis Evolutivo*. Madrid : Pearson Education S.A., 2002 .
- Gajanan Ghodake, 1 Umesh Jadhav, 2 Dhawal Tamboli,, 2 Anuradha Kagalkar, and Sanjay Govindwar. "Decolorization of Textile Dyes and Degradation of Mono-Azo Dye Amaranth by *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890." *Indian J Microbiol.*, 2011 : 501–508.

- Gardan, L., C. Dauga, P. Prior, M. Gillis, and G. S. Saddler. ""Acidovorax anthurii sp. nov., a new phytopathogenic bacterium which causes bacterial leaf-spot of anthurium.". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000: 50, 235–246. doi:10.1099/00207713-50-1-235.
- Guengerich, F.P. "Cytochrome p450 and chemical toxicology." *Chemical Research in Toxicology*, 2008: 21 (1): 70–83.
- Hancock, R.E., and H.G. Sahl. "Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies ." *Nature Biotechnology*, 2006: 1551-1557.
- Hansel, CM, S Fendorf, PM Jardine, and CA Francis. "Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile." *Appl. Environ. Microbiol.* 74, no. 5 (2008): 1620-1633.
- Harmer, CJ, and RM Hall. "The A to Z of A/C plasmids." *Plasmid*, 2015: 63-82.
- Hayashi H., and Kurusu Y. "DNA Regions Responsible for Maintenance of Shingobium Plasmid pYAN-2." *Microbes Environ* 29 (1) (2014): 96-99.
- Itoh K, Kitade Y, M Nakanishi, and Yatome Ch. "Decolorization of methyl red by a mixed culture of Bacillus sp and Pseudomonas stutzeri." *Journal of Environmental Science and Health*, 2002: 37: 415-421.
- Janssen PJ., Van Houdt R, Moors H, Monsieurs P, Morin N, and Michaux A. "The Complete Genome Sequence of Cupriavidus metallidurans Strain CH34, a Master Survivalist in Harsh and Anthropogenic Environments." *PLoS ONE*, 2010: 5(5): e10433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010433>.
- Jhon Norris. "chapter 11. DNA Sequencing." In *Methods in microbiology*, by J. Grinsted and P.M. Bennett, 233-249. San Diego CA: Academic Press, 1998.
- Jose M. Munita, and Cesar A. Arias. "Mechanisms of Antibiotic Resistance." *Microbiol Spectr*, 2015: doi:10.1128.
- Julia Foght, Trevor April, Kevin Biggar, and Jackie Aislabie. "Bioremediation of DDT-Contaminated Soils: A Review." *Bioremediation Journal*, 2010: 5:3, 225-246.
- Kaplan, W., and L. Kitts. "Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit." *Appl. Environ. Microbiol* 70, no. 3 (2004): 1777-1786.
- Kim D, Kim M, Lim J, Ka J. "Widespread occurrence of the tfd-II genes in soil bacteria revealed by nucleotide sequence analysis of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradative plasmids pDB1 and p712." *Plasmid* 69, no. 3 (2013): 243–248.
- Kim, M, HS Oh, SC Park, and J Chun. "Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes." *Int J Syst Evol Microbiol*, 2014: 64(Pt 5):1825.

- Kramer, M. G., S. A. Khan & M. Espinosa,. "Plasmid rolling circle replication: identification of the RNA polymerase-directed primer RNA and requirement of DNA polymerase I for lagging strand initiation." *EMBO J.* 16 (1997): 5784-5795.
- Labarca, L. Jaime, and B. Rafael Araos. "Antimicrobial agents resistance: Increasing problems and short of solutions." *Rev. Chil. Infectol.*, 2009: 8-9.
- Larson, R, and J Messing. "Apple II software for M13 shotgun DNA sequencing." *Nucleic Acids Res.* 10(1) (Jan 11 1982): 39-49.
- Liu, ZP, and HF Yang. "The decolorization and biodegrading metabolism of azo dyes by *Pseudomonas S-42*." *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 1989 : 418-26.
- Lopez, J., P. Crespo, J. C. Rodriguez, I. Andres & J. M. Ortiz, (1989). "Analysis of IncF plasmids evolution: nucleotide sequence of an IncFIII replication region." *Gene* 78 (1989): 183-187.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and J. Parker. *Brock biology of microorganisms*. . Upper saddle River, New Jersey, USA.: 10th edition. Prentice Hall, Inc. Simon & Schuster/ A Viacom Company. , 2003.
- Marsolek, D. Michael, and E. Bruce Rittman. "Effect of substrate characteristics on microbial community structure, function, resistance, and resilience; application to coupled photocatalytic-biological treatment." *Water research*, 2016: 1-8.
- Matsumoto, T, and M Sugano. "16S rRNA gene sequence analysis for bacterial identification in the clinical laboratory." *Rinsho Byori.* 61, no. 12 (Dec 2013): 1107-15.
- Meera Govindaswami, Thomas M. Schmidt, David C. White, and John C. Loper. "Phylogenetic Analysis of a Bacterial Aerobic Degrader of Azo Dyes." *Journal of bacteriology* , 1993: 6062-6066.
- Miranda, María Consuelo, and GRUPO DE RESISTENCIA BACTERIANA NOSOCOMIAL DE COLOMBIA. "Antimicrobial resistance in Gram negative bacteria isolated from intensive care units of Colombian hospitals, WHONET 2003, 2004 and 2005." *Biomédica*, 2006: 424-433.
- Montemayor, Juan Carlos Galán, Ana Moreno Bofarull, and Fernando Baquero Mochales. "Impact of the Migratory Movements in the Bacterial Resistance to Antibiotics." *Rev. Esp. Salud Publica*, 2014: <http://dx.doi.org/10.4321/S1135-57272014000600014> .
- Neudorf K., Vanderlinde E., Tambalo D., Yost C. "A previously uncharacterized tetratricopeptide-repeat-containing protein is involved in cell envelope function in *Rhizobium leguminosarum*." *Microbiology* 161 (2015): 148-57.
- P Steinle, Stucki G, Stettler R, and Hanselmann KW. "Aerobic mineralization of 2,6-Dicholophenol by *Ralstonia* sp. strain RK1." *Applied and Environmental Microbiology.*, 1998: 64: 2566-2571.
- Peixuan, Guo, Zhao Zhengyi, Wang Shaoying, and Weitao Tao. "Common mechanism of DNA translocation motors in bacteria and viruses using one way revolution mechanism whitout rotation." *Biotechnol. Adv.*, 2014: 853-872.

- Pepper, IL, and CP Gerba. *Environmental microbiology: a laboratory manual*. London, USA.: Elsevier Academic Press, 2005.
- Peter Vandamme, and Tom Coenye. "Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004: 54, 2285–2289 DOI 10.1099/ijms.0.63247-0.
- Preethy C., and Nilanjana D.,. "Role of plasmid in diesel oil degradation by yeast species isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil." *Environmental Technology* 33 (2012): 645-652.
- Rajat Pratap Singh, Pradeep Kumar Singh, and Ram Lakhan Singh. "Bacterial Decolorization of Textile Azo Dye Acid Orange by *Staphylococcus hominis* RMLRT03." *Toxicol International*, 2014 : 21(2): 160–166.
- Ramón M, Hernández José, Pascual Álvaro, Cantón Rafael, and Martínez-Martínez Luisa. "Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000)." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2003: 77-82.
- Ramos, I. , Picão R., de Almeida G. P. ,. " Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Rio de ." *BMC Genomics*, 2014: 54-70.
- Rasooly, A., P.-Z. Wang & R. P. Novick,. " Replication-specific conversion of the *Staphylococcus aureus* T181 initiator protein from an active homodimer to an inactive heterodimer." *EMBO J.* 13 (1994): 5245-5251.
- Rinkie C., Schwientke P., Sczyrba, I. N., Anderson I., Cheng J.-F., Darling A., Malfatti S., Dodsworth J. A, Brian H., Tsiamis G., Sievert S.M.. "Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter." *NATURE* 499 (2013): 431.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigman, P. "Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative." *bioresource technology*. 77 (2001): 247-255.
- Sabaté, D, F Saguir, and M Manca de Nadra. *Plásmidos en Lactobacillus hilgardii. Pérdida por agentes químicos a diferentes temperaturas*. Resumen de congreso, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT. Tucumán (Argentina): Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, 2004.
- Sakai Y, Ogawa N, Shimomura Y, Fujii T. "A 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation plasmid pM7012 discloses distribution of an unclassified megaplasmid group across bacterial species." *Microbiology* 160 (2014): 525-536.
- Sambrook, Joseph, David W. Russell. *Molecular Cloning A LABORATORY MANUAL*. New York.: COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, 2001.

- San Millan A., Heilbron K., and MacLean R. "Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations." *The ISME Journal* 8 (2014): 601–612.
- Shrivastava, Sakshi, and Sharmila S. Mande. "Identification and Functional Characterization of Gene Components of Type VI Secretion System in Bacterial Genomes." *PLoS ONE*, 2008: 3(8): e2955.
- Spengler, G, A Molnár, Z Schelz, L Amaral, D Sharples, and J Molnár. "The mechanism of plasmid curing in bacteria." *Current Drug Targets*, 2016: 823-41.
- Stasiak G., Mazur A., Wielbo J., Marczak M., Żebracki K., Koper P., and Skorupska A. "Functional relationships between plasmids and their significance for metabolism and symbiotic performance of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii." *J Appl Genet* 55 (2014): 515–527.
- Tolmasky, Marcelo E, and Alonso Juan C. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*. USA: The American Society for Microbiology, 2015.
- Tripathi, and S.K. Srivastava. "Ecofriendly treatment of azo dyes: Biodecolorization using bacterial strains." *Int J Biosci Biochem Bioinfo*, 2011: 37-40.
- Uroz, S, et al. "Specific impacts of beech and Norway spruce on the structure and diversity of the rhizosphere and soil microbial communities." *Sci Rep.* , 2016: 27756.
- Van der Zee, F.P. *Anaerobic Azo Dye Reduction. Doctoral thesis*. The Netherlands.: Wageningen University, 2002.
- Van der Zee, F.P., and S Villaverde. "Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes—a short review of bioreactor studies." *Water Research*, 2005: 1425–1440.
- Vogan, Aaron A, and Paul G Higgs. "The advantages and disadvantages of horizontal gene transfer and the emergence of the first species." *Biology Direct* 2, 2011: 1-14.
- Wakene, C. Negassa, K. Guber Andrey, N. Kravchenko Alexandra, L. Marsh Terence, Hildebrand Britton, and I. Rivers Mark. "properties of soil pore space regulate pathways of plant residue decomposition and community structure of associated bacteria ." *PLoS One*, 2015: e0123999.
- Waters, V. L. & D. G. Guiney. "Processes at the nick region link conjugation, TDNA transfer and rolling-circle replication." *Mol. Microbiol.* 9 (1993): 1123-1130.
- Yu J, Wang X, Yue PL. "Optimal decolorization and kinetic modeling of synthetic dyes by *Pseudomonas* strains." *Wat. Res.* 35 (2001): 3579-3586.
- Zeng X, Zhang M, Li W, Li Ch, and Tang W. "Investigation on the decolorizing mechanism of *Pseudomonas* sp. R1 on reactive red X-3B. *Bio-Medical Materials and Engineering.*" *io-Medical Materials and Engineering*, 2013: 23:S971-S977.
- Zhang, Shou Qin Leng, Run Ye Zhu, and Jian Meng Chen. "Degradation of chlorobenzene by strain *Ralstonia pickettii* L2 isolated from a biotrickling filter treating a chlorobenzene-contaminated gas stream." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011: Volume 91, Issue 2, pp 407–415.

Anexos
Anexo 1
Rs1 16s 1242pb

Agrobacterium tumefaciens strain JSD-RHCu-7A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99%
GenBank: KT894723.1

Rhizobium sp. H1-44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% GenBank: KM979037.1

CAGTCGAACGCCCGCAAGGGGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACATAC
CCTTTCCTGCGGAATAGCTCCGGGAACTGGAATTAATACCGCATAACGCCCTACGGGG
GAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAG
GCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACT
GAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG
CAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTT
CACCGATGAAGATAATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
GTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGCGGAACTGCCTTT
GATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAA
TTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCATTACTGAC
GCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
TAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGTATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACGCATT
AAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCCTTACCAG
CTCTTGACATTCGGGGTATGGGCATTGGAGACGATGTCCTTCAGTTAGGCTGGCCCCAG
AACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGC
CGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGC
TGGGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCAGCGAGACAGCGATGTCGAG
CTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTT
GGAATCGCTAGTAATTCGCAG

Rs2 16s 1281pb

Acidovorax anthurii strain XD-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99%
GenBank: KP641171.1

Uncultured bacterium clone BDP204WS49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99%
GenBank: KF841311.1

TTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGACTG
GCTTTATGGGATTGGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTACCAGCCATTGTATG
ACGTGTGTAGCCCCACCTATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC
GGTTTGTACCGGCAGTCTCATTAGAGTGCCCAACTGAATGTAGCAACTAATGACAAG
GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCA
TGCAGCACCTGTGTTACGGCTCTCTTTGAGCACTCCTCTATCTCTAAAGGATTCCGTAC
ATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATCATCCACCGC
TTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGGCCGTACTCCCCAGGCG
GTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGTGAAGACCCAACAACCAGTTGACA
TCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGC
ATGAGCGTCAGTACAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTCCGCATATCT
ACGCATTTCACTGCTACACGCGGAAATTCATCCCCCTCTGCCGTACTCTAGCTATGC
AGTCACAAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCTGTCTTACATAACCG
CCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTCGCACCTACGTATTACCGC
GGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTACGGTACCGTCATGGACCCCAGGT
ATTAACCAGAGTCTTTTCGTTCCGTACAAAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCC
TGCACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAAAATTCCCCCTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCTGGTTCGTCCTCTCAGACCA
GCTACAGATCGTCGGCTTGTAAGCTTTTATCCCACCAACTACCTAATCTGCCATCGGC
CGCTCCGTGAGCGCAAGGCCTTGCGGTCCCCTGCTTTCATCCTGAGATCGTATGCGGTA
TTAGCAAAGCTTTCGCTTCGTTATCCCCACTCTCGGGCACGTTCCGATGTATTACTCAC
CCGTTTCGCCACTCGTCAGCATCCGAAGACCTGTTACCGTTTCG

201 16s 1287 pb

Ralstonia pickettii DTP0602 chromosome 2, complete sequence 99% GenBank: CP006668.1

Cupriavidus sp. 194 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% GenBank: KT461854.1

CCGCGAATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGACT
ACGATGCGTTTTCTGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTACGCACCA
TTGTATGACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACC
TTCCTCCGTTTTGTCACCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCTCTTGCGTAGCAACTAAAGACA
AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGC
CATGCAGCACCTGTGTCCACTTTCCTTTCGGGCACCTAATGCATCTCTGCTTCGTTAGT
GGCATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCAC
CGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGG
CGGTCAACTTCACGCGTTAGCTACGTTACTGAAGAAATGAATCCCCAACAACTAGTTG
ACATCGTTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTTCG
TGCATGAGCGTCAGTGACGTCCCAGGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCACAT
CTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGACATACTCTAGCCTT
GCAGTCACAAGCGCCATTCCCAAGTTAAGCTCGGGGATTTACGCCTGTCTTACAAAAC
CGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGGTACCGTCATCGACCCGGG
GTATTCACCCAGGCCATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTT
CACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTG
CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCAGAC
CAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTAGGCTTTTACCCACCAACTAGCTAATCAGACATCG
GCCGCTCCTGTAGCGCGAGGCCTTGCGGTCCCCCGCTTTCACCCTCAGGTCGTATGCGG
TATTAGCTAATCTTTGACTAGTTATCCCCACTACAGGGCACGTTCCGATGTATTACTC
ACCCGTTCCGCACTCGCCACCAGGCCGAAGCCCGTGCTGCCGTTTCG

M20 16s 1281pb

Cupriavidus sp. 194 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% GenBank: KT461854.1

Ralstonia pickettii DTP0602 chromosome 2, complete sequence 99% GenBank: CP006668.1

TTACTAGCGATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGACTACGATGC
GTTTTCTGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTACGCACCATTGTATG
ACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCC
GGTTTGTACCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCTCTTGCGTAGCAACTAAAGACAAGGGTTG
CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAG
CACCTGTGTCCACTTTCCTTTCGGGCACCTAATGCATCTCTGCTTCGTTAGTGGCATGT
CAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGCTTGT
GCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCA
ACTTCACGCGTTAGCTACGTTACTGAAGAAATGAATCCCCAACAAGTGTGACATCGT
TTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATG
AGCGTCAGTGACGTCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCACATCTCTACG
CATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGACATACTCTAGCCTTGCAGTC
ACAAGCGCCATTCCCAAGTTAAGCTCGGGGATTTACGCCTGTCTTACAAAACCGCCTG
CGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCT
GCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGGTACCGTCATCGACCCGGGGTATTC
ACCCAGGCCATTTCTTTCGGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCACACA
CGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCC
GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCAGACCAGCTA
CTGATCGTCGCCTTGGTAGGCTTTTACCCACCAACTAGCTAATCAGACATCGGCCGCT
CCTGTAGCGCGAGGCCTTGCGGTCCCCGCTTTCACCCTCAGGTCGTATGCGGTATTAG
CTAATCTTTCGACTAGTTATCCCCACTACAGGGCACGTTCCGATGTATTACTGCACCC
GTTCCGCACTCGCCACCAGGCCGAAGCCCGTGCTGCCGTTCCG

1nr 16S 1283pb

Cupriavidus sp. 4HB-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% GenBank: KT321704.1

Ralstonia sp. 80 16S ribosomal RNA gene, partial sequence 99% GenBank: AY238507.1

GCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGACTACG
ATGCATTTTCTGGGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTGGCAACCCTCTGTATGCACCATTG
TATGACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCCTTTCGTAGCAACTAGAGACAAGG
GTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT
GCAGCACCTGTGTCCACTTTCCCTTTCGGGCACCTAATGCATCTCTGCTTCGTTAGTGGC
ATGTCAAGGGTAGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATCCACCGC
TTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCCTTGTAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCG
GTCAACTTCACGCGTTAGCTACGTTACTGAGGAAATGAATCCCCAACAACTAGTTGAC
ATCGTTTtagggcgtggactaccagggatctaatacctgTTTGCTCCCCACGCTTTCGTG
CATGAGCGTCAGTCACGTCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCACATCTC
TACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGACGCACTCTAGCCTTGC
AGTCACAAGCGCAATTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACGCCTGTCTTACAAAACC
GCCTGCGCACGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCG
CGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGGTACCGTCATCGACTCCGGG
TATTAACCAGAGCCATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTC
ACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGC
CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCAGACC
AGCTACTGATCGTCGCCTTGGTGAGCTTTTACCCACCAACTAGCTAATCAGACATCGG
CCGCTCCTATTGCGCGAGGCCTTACGGTCCCCCGCTTTCACCCTCAGGTCGTATGCGGT
ATTAGCTAATCTTTCGACTAGTTATCCCCACAACAGGGCACGTTCCGATGTATTACTC
ACCCGTTCCGCACTCGCCACCAGGATTGCTCCCGTGCTGCCGTTTCG

Anexo 2

Secuencia de ADN plasmídico de la cepa *Acidovorax anthurii*

CTAAGAATTTAAATGAAGAAGACTTCAGAGCTTTTGTAAAAATTATTTGGCAA
AAATAATATAATTCGGCTGCAGGGGCGGCCTCGTGTTACGCCTATTTTTATAGG
TTAATGTCATGATAATAATGGTTTCCTAGACGTCAGGGGCACTTTTCGGGGAAA
TGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCC
GCTCATGAGAACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG
AGTATGAGTATTCAACATTTCCCGTGTCGCCCTTTATTCCCCTTTTTTGCGGCAT
TTTTGCCTTCCTGTTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTTGTGAAAGGAAAAGATGC
TGGAGATCAGTTGGGTCCCCCAGGGAGGTTACATCGAACTGGATCTTCAACAG
CGGAAGAACCTTGAGAAGTTTTCCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATAATGAGA
ATTTCTAAAGTACTGCCTGGAGTGTGGGCGTTATTATTCCTGTAATTGACGCC
GCCGCAGGGGCACATTATCTATCTCTCTCCCTTACCATAGA

Growth on Azo Compounds and Decolorization Capacity of Some Eubacteria not Conferred by Plasmidic DNA [Version 2]

Pérez Rivera Rodrigo¹, Martínez y Pérez José Luis^{1,2}, Estrada-Torres Arturo¹ and Montiel-González Alba Mónica^{1,2*}.

¹Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Mexico

²Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Mexico

*Corresponding author: Alba Mónica Montiel González, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Mexico; Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Mexico, Email: amonicamg@yahoo.com

Copyright: © 2017 Alba Mónica Montiel González, et al. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

Original Submission

Received: March 04, 2017

Accepted: March 15, 2017

Published: April 02, 2017

Open Peer Review Status: Approved

How to cite this article: Pérez Rivera Rodrigo, Martínez y Pérez José Luis, Estrada-Torres Arturo, Montiel-González Alba Mónica. Growth on Azo Compounds and Decolorization Capacity of Some Eubacteria not Conferred by Plasmidic DNA [Version 2]. *Insights Genet Genomics*. (2017) 1: 2.2

Abstract

The bacteria are very abundant and ubiquitous organisms, inhabiting under many conditions, even severely contaminated environments. The azo dyes (recalcitrant synthetic chemicals) are common pollutants, used industrially and discharged into wastewater, where they becoming a risk for human health. Fortunately, the bacteria are capable of mineralizing toxic chemical products through gene products present in plasmidic DNA. This study confirms the capability of bacterial strains, isolated from soil exposed to industrial wastewater, to grow on liquid media supplemented with Congo-red or Methyl-red, or only these azo dyes as the sole carbon source, and shows that this ability is not provided by plasmidic DNA. Three strains isolated were able to grow in the presence of azo dyes and to decolorize them from 90 up to 96%, after 96 h. The strains were identified as *Ralstonia pickettii*, *Acidovorax anthurii* and *Cupriavidus* sp. through 16S rDNA sequence, morphological and biochemical analysis. Only *Cupriavidus* sp. showed considerable growth when azo dyes were used as sole carbon source. Plasmidic DNA was present in the three strains. After the plasmidic DNA was cured in each of the strains, they maintained their ability to grown with the azo dyes, suggesting such capacity is not conferred by its plasmids.

Keywords

Congo-red; Methyl-red; Decolorization; *Ralstonia*; *Acidovorax*; *Cupriavidus*; Plasmids