

### **5. Determinación de los patrones de resistencia a antibióticos y otros metales pesados en medio LB agarizado.**

Los 102 aislados seleccionados capaces de crecer por los menos a 10 µg/ml de HgCl<sub>2</sub> en medio LB agarizado, fueron utilizados para la determinación de la resistencia a diferentes antibióticos.

En este ensayo se cultivó una colonia de cada aislado en medio LB agarizado diluido 1/3, suplementado con los siguientes antibióticos: ampicilina (40 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml), cloranfenicol (30 µg/ml), estreptomina (30 µg/ml) y tetraciclina (30 µg/ml). Las placas se incubaron a 30°C por 48 horas.

Para el estudio de la resistencia a otros metales pesados, se cultivaron las colonias de los aislados Hg<sup>R</sup> en medio LB agarizado diluido 1/3 suplementado con los siguientes metales: Cu<sup>+2</sup>(CuSO<sub>4</sub>), Ni<sup>+2</sup>(NiSO<sub>4</sub>), Zn<sup>+2</sup>(ZnCl<sub>2</sub>) y Pb<sup>+2</sup>(Pb(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub>). En este ensayo se utilizaron concentraciones finales de 2 y 5 mM de cada metal. Las placas fueron incubadas a 30°C por 48 horas.

### **6. Determinación de los patrones de resistencia a antibióticos y otros metales pesados en medio LB líquido.**

Para respaldar los resultados obtenidos en medio LB agarizado, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los 102 aislados Hg<sup>R</sup> a los diferentes antibióticos y metales pesados ensayados anteriormente. Para esta prueba se utilizó la técnica de cultivo en placas de microtitulación.

Los aislados fueron inoculados en medio LB líquido e incubados a 30°C por 24 horas. Al cabo de este tiempo, se agregaron en placas de microtitulación 200 µl de medio LB líquido suplementado con cada antibiótico a las concentraciones finales de 12,5, 25, 50 y 100 µg/ml. Seguidamente, cada pozo fue inoculado con 5 µl del cultivo de cada aislado. Las placas fueron incubadas a 30°C por 48 horas.

Se consideró como CMI la concentración mínima de antibiótico en la cual no se observó crecimiento de las bacterias

La resistencia a metales también se determinó en medio LB líquido utilizando la misma metodología empleada para los antibióticos.

Los aislados Hg<sup>R</sup> fueron cultivados en medio LB líquido e incubadas a 30°C por 24 horas. Posteriormente, en las placas de microtitulación, se agregaron 200 µl de LB suplementado con cada metal a las concentraciones finales de 1, 2, 3, y 4 mM respectivamente. Luego, cada pozo fue inoculado con 5 µl del cultivo de cada aislado. Las placas fueron incubadas a 30°C por 48 horas.

Se consideró como CMI la concentración mínima del metal en la cual no se observó crecimiento de las bacterias.

#### **7. Prueba de Gram por el método KOH.**

Para determinar la naturaleza Gram de los aislados se utilizó la técnica con KOH descrita por Buck (1982).

Para esta prueba los 102 aislados Hg<sup>R</sup> se cultivaron en medio LB agarizado y se incubaron a 30 °C por 24 horas. Al cabo de este tiempo, se tomó una colonia con el asa de metal, y se expandió sobre un portaobjeto que contenía 10 µl de solución de KOH al 3%, mezclándose constantemente en una superficie de aproximadamente 1,5 cm de diámetro.

Si la mezcla colonia-KOH se tornaba notablemente viscosa o gelificada, y permitía la formación de un hilo o bucle al elevar el asa 1 cm sobre la superficie del portaobjeto, dentro de 5 a 60 segundos, la reacción se consideraba positiva, por tanto el aislado era Gram negativo. Si no se observaba viscosidad en la mezcla de reacción, esta se consideraba negativa; en este caso el aislado era Gram positivo.

#### **8. Amplificación del gen *merA*.**

Para detectar la presencia del gen *merA* que codifica para la mercurio reductasa en los aislados Hg<sup>R</sup>, se utilizó la técnica de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores propuestos por Ní Chadhain y col., (2006). Las secuencias de estos cebadores degenerados son las siguientes:

**A1 s-n.F 5'-TCCGCAAGTNGCVACBGTTGG -3'**

**A5 n.R 5'- ACCATCGTCAGRTARGGRAAVA - 3'**

La reacción de amplificación incluyó: Taq polimerasa 2,5 U, oligonucleótidos a una concentración final de 2,5  $\mu$ M cada uno; dNTPs a una concentración final de 1 mM; tampón de Taq polimerasa 10X; MgCl<sub>2</sub> 50 mM; como ADN molde, se utilizó una colonia de cada aislado resuspendida en 500  $\mu$ l de agua estéril y a partir de allí se agregaron 2,0  $\mu$ l y 1,45  $\mu$ l de agua mili Q estéril. El volumen final de la reacción fue de 10  $\mu$ l.

El tamaño esperado del fragmento amplificado era de aproximadamente 285 pb.

El programa del termociclador incluyó 43 ciclos con el perfil térmico siguiente:

**Tabla 1. Programa de PCR utilizado para la amplificación del gen *merA*.**

<b>Etapas de reacción</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Desnaturalización	95	5
Desnaturalización	94	30
Hibridación	55	60
Extensión	72	60
Extensión Final	72	7
Mantenimiento	4	$\infty$

} 43 ciclos

### **Selección de aislados Hg<sup>R</sup> para pruebas posteriores.**

Para la realización de estudios posteriores se seleccionaron 20 aislados en base a su procedencia, morfología de la colonia, resistencia al Hg y MeHg, resistencia a otros metales pesados y resistencia a los antibióticos ensayados.

## 9. Estudio del perfil plasmídico de los aislados Hg<sup>R</sup>.

Como parte de la caracterización genética de los aislados Hg<sup>R</sup>, se realizó un estudio del perfil plasmídico de los 20 aislados seleccionados.

La extracción del ADN plasmídico se realizó mediante el protocolo de lisis alcalina descrito por Kotchoni y col. (2003) con modificaciones.

Para la extracción de ADN plasmídico de los aislados Hg<sup>R</sup>, estos fueron cultivados en 3 ml de LB diluido 1/3 a 30°C durante 24 horas, en agitación constante. Al cabo de este tiempo, 2 ml de cada cultivo fueron centrifugados a 12.000g por 5 min y, se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 200 µl de solución I y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 µl de solución II y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces. Seguidamente, se agregaron 400 µl de solución III, que igualmente se mezcló por inversión de 6 a 10 veces y se incubó en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se mezcló de nuevo por inversión 4 veces y se centrifugó por 15 minutos a 12.000g a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido fue trasvasado a tubos de microcentrifugación limpios y se le agregaron 600 µl de isopropanol frío por cada ml de sobrenadante recuperado. Luego se mezcló por inversión de 4 a 6 veces, y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 12.000g por 15 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Al pellet resultante se le agregaron 400 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó nuevamente a 12.000 g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet transparente obtenido se resuspendió en 25 µl de agua estéril. El ADN plasmídico se conservó a -20°C hasta su utilización.

La observación de los plásmidos se realizó según las especificaciones de Sambrook y col., (1989), mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, en una cámara horizontal sumergida en buffer TBE (0,045 M Tris- borato, 0,001 M EDTA) a 100 voltios durante 1 hora. En cada pocillo se aplicaron 20 µl de cada muestra y 3,5 µl de buffer de carga.

Los plásmidos se visualizaron con bromuro de etidio (BrEt) a una concentración final de 0,70 µg/ml en un transiluminador de luz ultravioleta marca SIGMA.

#### **Sol I**

227 µl Glucosa (20%).

100 µl EDTA (0,5 M pH 8,0).

4550 µl de agua.

(c.p.s 5 ml)

#### **Sol II (Preparar al momento de utilizar)**

2,3 ml de agua

200 µl NaOH (5N)

500 µl SDS (10%)

(c.s.p 3 ml)

#### **Sol III**

Acetato de Amonio (8M)

### **10. Identificación morfológica de aislados Hg<sup>R</sup>.**

Con la finalidad de observar la forma y la agrupación celular de los aislados Hg<sup>R</sup> se utilizó el método de tinción simple propuesto por Madigan y col., (2004).

Para tener muestras frescas de los aislado Hg<sup>R</sup> para esta experiencia, estos fueron cultivados en placas con medio LB diluido 1/3 e incubados a 30 °C durante 24 horas.

Seguidamente, se procedió a la preparación del frotis. Para esto, se tomó una pequeña cantidad de cada aislado y se resuspendió en una gota de agua destilada. La mezcla se extendió sobre el portaobjeto y se realizó la fijación por calor, mediante el flameado del portaobjeto.

Luego se colocaron 5 gotas de azul de metileno y se mantuvo en contacto durante uno a tres minutos. Finalizado este tiempo, se procedió a lavar el portaobjeto con agua destilada y se dejó secar.

Finalmente las muestras fueron observadas en un microscopio óptico de campo, en aceite de inmersión con un objetivo de 100x.

### **11. Pruebas Bioquímicas.**

Para caracterizar, identificar y lograr una ubicación taxonómica preliminar a nivel de género de los aislados Hg<sup>R</sup>, se realizaron una serie de pruebas bioquímicas utilizadas generalmente para la identificación de microorganismos (Koneman y col., (1999); Bergcys y col. (1989)). Dentro de estas pruebas se incluyeron las siguientes:

- Caldo glucosa Rojo - Fenol
- Caldo Lactosa – Rojo Fenol
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)
- Rojo de Metilo y Voges-Proskauer
- Medio de Hugh y Leifson
- Catalasa y Oxidasa
- Urea de Christensen
- Gelatina Nutritiva
- Prueba Citrato de Simmons

Los aislados se inocularon en caldo LB diluido 1/3 y se incubaron a 30 °C durante 24 horas en agitación constante. Luego fueron sembrados con un asa en cada uno de los medios de estudio e incubados a 30 °C, de 24 a 72 horas. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a la lectura y observación de los resultados.

### **12. Extracción de ADN genómico.**

Para la extracción del ADN genómico de los aislados Hg<sup>R</sup>, estos fueron cultivados en 3 ml de LB diluido 1/3 a 30°C durante 24 horas, en agitación constante. Al cabo de este tiempo,

2 ml de cada cultivo fueron centrifugados a 11.000g por 3 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 400 µl de buffer TE (10 Mm Tris-HCl (pH 7,6), 1 Mm EDTA (pH 8.0)), 50 µl de dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y 50 µl de proteínasa K (10 µg/ml en Buffer TE) y se incubó a 30°C por 1 hora.

Transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión se hizo pasar de 3 a 5 veces a través de una inyectadora de insulina. Luego se realizó una extracción agregando 500 µl de fenol: cloroformo en una relación 1:1 y se centrifugó a 11.000g por 5 minutos. La fracción no orgánica se trasvasó a tubos limpios. Este paso se realizó dos veces. Seguidamente se realizó una extracción con 500 µl de cloroformo y se centrifugó a 11.000g por 5 minutos. Luego de esta extracción, los ácidos nucleicos se precipitaron con 25 µl de cloruro de sodio (NaCl 5M) y 1 ml de etanol al 95%; se agitó la mezcla con ayuda del vortex, luego se centrifugó por 10 minutos a 11.000g.

El pellet obtenido se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó por 3 minutos a 11.000g. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 µl de buffer TE y 5 µl de RNasa (5 mg/ml en TE), y se incubó por 30 minutos a 30 °C. Luego de esta incubación, el ADN se precipitó con 40 µl de acetato de amonio ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) 5M y 250 µl de isopropanol y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, la mezcla se centrifugó por 10 minutos a 11.000g, y al pellet obtenido se le realizó un lavado con etanol al 70%. Finalmente, el pellet se resuspendió en 50 µl de agua estéril y se conservó a -20°C, hasta su utilización.

La visualización del ADN extraído se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,9%, en una cámara sumergida en buffer TBE a 100 voltios durante 1 hora.

La calidad del ADN genómico se verificó mediante su visualización en gel de agarosa teñido con BrEt (0,7 µg/ml), en un transiluminador de luz ultravioleta marca SIGMA. En cada pocillo se aplicaron 6 µl de cada muestra y 1 µl de buffer de carga.

### 13. Estudio de la diversidad microbiana de las aguas subterráneas.

#### 13.1. Análisis de espacios intergénicos del ARNr.

Para el estudio de la diversidad genética de las comunidades bacterianas de aguas subterráneas se utilizó la técnica de Análisis de Espacios Intergénicos Ribosomales (RISA), utilizando los “cebadores” propuestos por Borneman y Triplett (1997).

Las secuencias de estos cebadores degenerados son las siguientes:

1406F (TGYACACACCGCCCGT) (Subunidad pequeña universal del ARNr)

23SR (GGGTTBCCCCATTCTG) (Subunidad grande del ARNr bacterial 23S)

La reacción de amplificación incluyó: Taq polimerasa 2,5 U, oligonucleótidos a una concentración final de 2,5  $\mu$ M cada uno; dNTPs a una concentración final de 1 mM; tampón de Taq polimerasa 10X; MgCl<sub>2</sub> 50 Mm; 1  $\mu$ l de ADN genómico molde y 1,45 de agua mili Q estéril. El volumen final de la reacción fue de 10  $\mu$ l.

El tamaño esperado de los fragmentos amplificados era de aproximadamente de 400 pb a 1,400 pb.

El programa del termociclador incluyó 25 ciclos con el perfil térmico señalado en la Tabla 2.

**Tabla 2. Programa de PCR utilizado para la amplificación de genes que codifican para la subunidad pequeña del ARNr.**

Etapas de reacción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización	94	1
Desnaturalización	94	0,25
Hibridación	56	0,25
Extensión	72	0,5
Extensión Final	72	1
Mantenimiento	4	$\infty$

} 25 ciclos

La visualización de los amplificadores se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en una cámara sumergida en buffer TBE a 110 voltios durante 1 hora.

Finalmente, los amplificadores fueron observados con BrEt (a una concentración final de 0,7 µg/ml) en un transiluminador de luz ultravioleta marca SIGMA. En cada pocillo se aplicaron 6 µl de cada muestra y 1 µl de buffer de carga.

Los perfiles de bandas obtenidas para cada aislado fueron analizados mediante el programa de análisis estadístico Palaeontological Statics (Hammer y col., 2005). Con los perfiles obtenidos se realizó un análisis de conglomerados y la construcción de un dendograma. Para la identificación molecular se seleccionaron los aislados que presentaron diferentes perfiles de RISA.

#### **14. Identificación molecular de los aislados Hg<sup>R</sup>.**

La identificación molecular de los aislados Hg<sup>R</sup> se realizó mediante la amplificación por PCR, secuenciamiento y posterior análisis de secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S. Para esta amplificación se utilizaron los “cebadores” universales propuestos por Weisburg y col., (1991).

Las secuencias de estos cebadores degenerados son las siguientes:

fd1 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

rd1 5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3'

La reacción de amplificación incluyó: Taq polimerasa 5 U, oligonucleótidos universales a una concentración final de 2,5 µM cada uno; dNTPs a una concentración final de 1 mM; tampón de Taq polimerasa 10X; MgCl<sub>2</sub> 50 Mm; 1 µl de ADN genómico molde y 1,65 de agua mili Q estéril. El volumen final de la reacción fue de 10 µl. El tamaño esperado de los fragmentos amplificadores era de aproximadamente de 1,500 pb.

El programa del termociclador incluyó 40 ciclos con el perfil térmico señalado en la Tabla 3.

**Tabla 3. Programa de PCR utilizado para la amplificación de genes que codifican para el ADN<sub>r</sub> 16S.**

<b>Etapas de reacción</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Desnaturalización	95	3
Desnaturalización	94	1
Hibridación	55	1
Extensión	72	2
Extensión Final	72	3
Mantenimiento	4	∞

40 ciclos

Los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 0,9%, tal como lo describen Sambrook y col., (1989).

### 15. Ensayos de conjugación *in vitro* entre aislados Hg<sup>R</sup> y cepas potencialmente patógenas para el hombre.

Para la realización de esta experiencia se utilizaron como cepas receptoras *Escherichia coli* (OEG15) y *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13.525), las cuales son resistentes a la rifampicina (Rif<sup>R</sup>). Como cepas donantes se utilizaron algunos aislados indígenas Hg<sup>R</sup> provenientes de las aguas subterráneas.

#### Conjugación en parche

Los ensayos de conjugación se realizaron siguiendo la metodología de conjugación en “parche” (Summers., 2002). Para ello, las bacterias donantes (indígenas Hg<sup>R</sup>) y receptoras fueron cultivadas en 2ml de LB e incubadas a 30°C por 24h; posteriormente se diluyeron 1/10 en LB y se incubaron a 30°C durante 6 horas sin agitación. Luego de esta incubación, se hizo una mezcla de conjugación en una proporción 1:1(v/v) (donante: receptora).

Posteriormente se sembraron 10  $\mu$ l de la mezcla en placas con medio LB agarizado diluido 1/3 y se incubaron a 30°C por 24h. El parche de crecimiento formado se extrajo, se resuspendió en medio LB y se agitó fuertemente para extraer la mayor cantidad de células. Finalmente, la mezcla se sembró en placas con medio selectivo (LB+Hg 20 $\mu$ g/ml +Rif 80 $\mu$ g/ml), y se incubó a 30°C hasta la aparición de colonias.

Los controles se realizaron sembrando las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de cultivos de las bacterias donantes (Hg<sup>R</sup> Rif<sup>S</sup>) y las cepas receptoras (Hg<sup>S</sup> Rif<sup>R</sup>) en placas con Rif (80 $\mu$ g/ml) y en placas con HgCl<sub>2</sub> (20 $\mu$ g/ml).

bdigital.ula.ve

## RESULTADOS

### 1. Caracterización de algunos parámetros fisicoquímicos de muestras de aguas subterráneas de la Mina Colombia, El Callao (Estado Bolívar).

Para la caracterización fisicoquímica de las muestras de aguas recolectadas en los diferentes niveles de la mina Colombia, localizada en la región de El Callao (Estado Bolívar), se tomaron en cuenta diferentes parámetros como el pH, la temperatura, el contenido de Hg y otros metales pesados.

#### 1.1 Determinación de pH y temperatura de muestras de aguas subterráneas.

Los resultados de los análisis de pH y temperatura revelaron que los valores de ambos parámetros eran muy similares en todos los niveles analizados. El pH osciló entre 7,11 y 8,00, lo que indica que el pH de las aguas estudiadas era de neutro a básico. En el caso de la temperatura, los valores fluctuaron entre 26,1 y 27,1 °C (Tabla 4).

**Tabla 4. Valores de pH y temperatura en las muestras de aguas subterráneas.**

Nivel	pH	Temperatura (°C)
VI (388 m)	8,00	27,1
IVa (288 m)	7,43	26,9
IVb (288 m)	7,92	26,3
Ia (138 m)	7,11	26,7
Ib (138 m)	7,92	26,3
Ic (138 m)	7,22	26,1

## 1.2 Determinación de Hg y otros metales pesados.

En cada muestra de agua subterránea recolectada se determinó la concentración de Hg, por medio de la técnica de espectroscopia de absorción atómica y la de otros metales pesados, mediante generación de vapor frío y espectroscopia de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado. La concentración de Hg en las muestras de aguas provenientes de los diferentes niveles, estuvo por debajo del límite de detección (0,43 ppb) (Tabla 5).

Por otra parte, de los 16 elementos metálicos estudiados, solo fueron detectados aluminio, hierro, manganeso y calcio. El calcio (Ca) fue el único elemento que se detectó en la mayor parte de las muestras (2, 4, 5, 6 y 7). En el caso de la muestra 5 los niveles estuvieron por encima de los valores admitidos (200 ppm) (Barrientos y col., 2000).

El aluminio (Al), sólo pudo ser detectado en la muestra 7, a una concentración por encima de los valores aceptados por gaceta oficial para aguas de consumo humano (1 mg/l). Por su parte, el manganeso (Mn), presentó valores cuantificables en las muestras 2 y 6, los cuales estaban por debajo de los valores tolerados (0,10 mg/l) para aguas de consumo humano, según Gaceta Oficial N° 5021.

Finalmente, el hierro (Fe) estuvo presente en las muestras 5 y 7. En el nivel 7 la concentración detectada resultó ser mayor a los niveles admitidos por gaceta oficial para el consumo humano (0,3 mg/l), según Gaceta Oficial N° 5021.

**Tabla 5. Determinación de Hg y otros metales pesados en muestras de aguas subterráneas.**

Nivel	Mercurio ( $\mu\text{g/l}$ )	Aluminio (ppm)	Calcio (ppm)	Hierro (ppm)	Manganeso (ppm)
VI (388 m)	<LOD	<LOD	98,70 $\pm$ 0,96	<LOD	0,59 $\pm$ 0,01
IV (288 m)	<LOD	<LOD	96,67 $\pm$ 0,81	<LOD	<LOD
Ia (288 m)	<LOD	<LOD	259,74 $\pm$ 0,72	0,23 $\pm$ 0,01	<LOD
Ib (138 m)	<LOD	<LOD	95,91 $\pm$ 1,72	<LOD	0,34 $\pm$ 0,01
Ic (138 m)	<LOD	1,00 $\pm$ 00	128,22 $\pm$ 1,43	3,12 $\pm$ 0,01	<LOD

**LOD:** Límite de Detección

**Límites de detección:** Hg: 0,43 ppb; Al: 9,3 ppb; Mn: 0,34 ppb; Fe: 1,3 ppb

## 2.- Análisis microbiológico de las aguas subterráneas de la mina Colombia.

Para el análisis microbiológico de cada nivel, se determinó el número total de heterótrofos cultivables y el porcentaje de aislados resistentes a  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}$  (MeHg) (Tabla 3).

El recuento total de heterótrofos cultivables en cada uno de los sitios analizados varió de  $1 \times 10^2$  a  $9,8 \times 10^3$  UFC/ml (Tabla 6). Los ensayos realizados en los diferentes medios de cultivo (LB y LB diluido 1/3) revelaron que en LB diluido el número de heterótrofos cultivables totales incrementó significativamente.

**Tabla 6. Densidad bacteriana (UFC/ml) de las muestras de aguas subterráneas.**

Nivel	Siembra en LB agarizado (Laboratorio de Minerven)	Siembra en LB agarizado (Laboratorio MMB)	Siembra en LB agarizado dilución 1/3 (Laboratorio MMB)
VI (388 m)	4,3x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	1,9x10 <sup>3</sup>
IV (288 m)	4x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	2,5x10 <sup>3</sup>
Ia (288 m)	1x10 <sup>2</sup>	-	1,6x10 <sup>3</sup>
Ib (138 m)	9,8x10 <sup>3</sup>	-	-
Ic (138 m)	2x10 <sup>2</sup>	1,2x10 <sup>3</sup>	1,4x10 <sup>3</sup>

El análisis microbiológico preliminar evidenció la presencia de aislados resistentes al HgCl<sub>2</sub> (Hg<sup>R</sup>) y al MeHg (MeHg<sup>R</sup>) en todos los niveles de la mina estudiados, con una frecuencia de 25% a 60% y 16,28% a 100% respectivamente, en relación al número total de los aislados heterótrofos cultivables (Tabla 7).

**Tabla 7. Porcentaje de aislados Hg<sup>R</sup> y MeHg<sup>R</sup> en muestras de aguas subterráneas.**

Nivel	Heterótrofos totales	% aislados resistentes (20 µg/ml HgCl <sub>2</sub> )	% aislados resistentes (80 µg/ml HgCl <sub>2</sub> )	% aislados resistentes (5 µg/ml MeHg)
VI (388 m)	4,3 x10 <sup>2</sup>	27,91	2,33	16,28
IV (288 m)	4x10 <sup>2</sup>	25,0	-	100,0
Ia (288 m)	1x10 <sup>2</sup>	60,0	-	-
Ib (138 m)	9,8x10 <sup>3</sup>	-	-	-
Ic (138 m)	2x10 <sup>2</sup>	50,0	-	35,0

### 3. Caracterización de bacterias Hg<sup>R</sup> aisladas a partir de aguas subterráneas tomadas de los diferentes niveles estudiados.

#### 3.1 Estimación de los niveles de resistencia de los aislados Hg<sup>R</sup> y MeHg<sup>R</sup>.

Para estimar el número de aislados Hg<sup>R</sup> y MeHg<sup>R</sup> presentes en los diferentes niveles de la mina analizados y evaluar los niveles de resistencia de los mismos, se sembraron nuevamente las muestras de aguas subterráneas en placas de medio LB agarizado suplementado con diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub> (10-80µg/ml) ó MeHg (3-10µg/ml). Los resultados mostraron que todos los sitios estudiados estaban colonizados por bacterias resistentes a diversas concentraciones de HgCl<sub>2</sub> y MeHg (Figura 10). También se observó que en todos los niveles analizados la mayoría de los aislados fué resistente a 10 µg/ml de HgCl<sub>2</sub>.

La frecuencia más alta de aislados Hg<sup>R</sup> fue encontrada en los niveles 4 y 6, en los cuales el 90% y el 83% de los aislados fueron resistentes a 10µg/ml de HgCl<sub>2</sub>, respectivamente. Los resultados también revelaron que en los diferentes niveles analizados más del 50% de los aislados eran resistentes a 20µg/ml de HgCl<sub>2</sub>. Por otra parte, en los niveles 4 y 6 también se observaron aislados resistentes a todas las concentraciones de MeHg; con excepción del nivel 1, en el cual un 21% de los aislados fue resistente únicamente a 3µg/ml de MeHg.

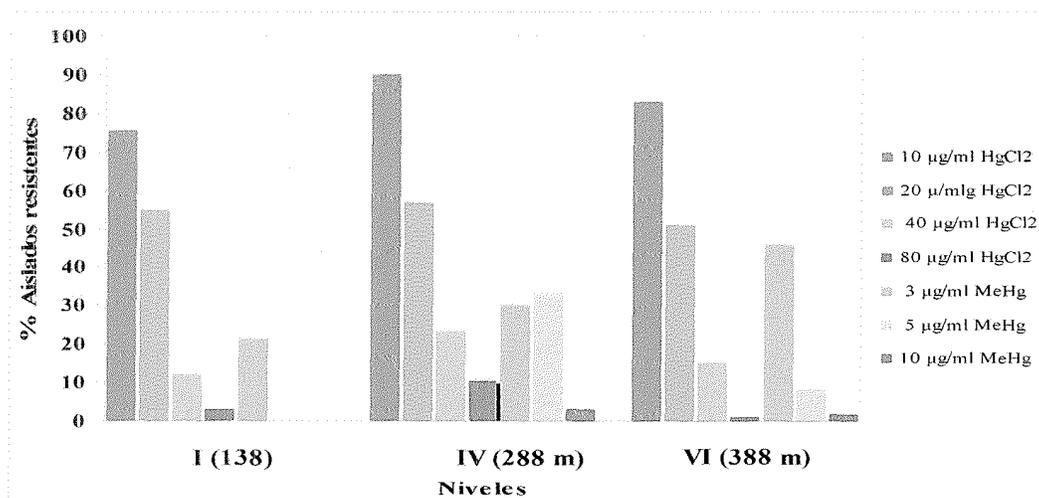


Figura 10. Porcentaje de aislados Hg<sup>R</sup> y MeHg<sup>R</sup> en los diferentes niveles de la Mina Colombia.

#### 4. Resistencia a antibióticos de los aislados Hg<sup>R</sup>.

Para realizar las pruebas de resistencia a diferentes antibióticos y otros metales pesados, se evaluaron 102 aislados Hg<sup>R</sup> seleccionados en base a los niveles de resistencia al Hg y a las diferencias morfológicas de las colonias en LB (Figura 11).

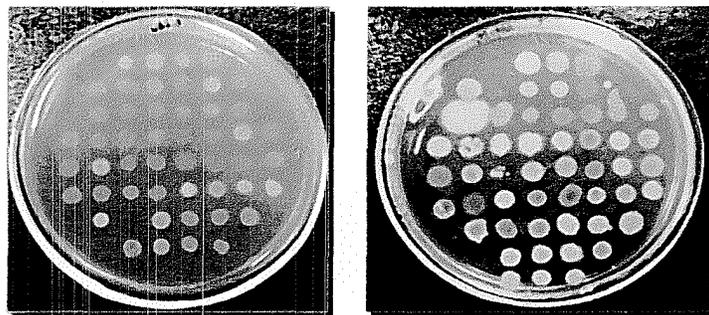


Figura 11. Aislados Hg<sup>R</sup> seleccionados para los estudios de resistencia a antibióticos y a otros metales pesados. El 100% de los aislados seleccionados eran pigmentados.

Para determinar si los aislados Hg<sup>R</sup> provenientes de las aguas subterráneas presentaban resistencia a diferentes antibióticos, los mismos se cultivaron en placas de medio LB (diluido 1/3) agarizado y suplementado con cada uno de los diferentes antibióticos (kanamicina (Kan (30 µg/ml), cloranfenicol (Cam (30 µg/ml)), tetraciclina (Tet (30 µg/ml)), estreptomycin (Str (30 µg/ml) y ampicilina (Amp(40 µg/ml) (Figura 12). Los resultados obtenidos en estas pruebas revelaron que la mayoría de los aislados Hg<sup>R</sup> fueron resistentes a múltiples antibióticos (Figura 13). Las resistencias al cloranfenicol, a la ampicilina y a la tetraciclina fueron las más frecuentes.

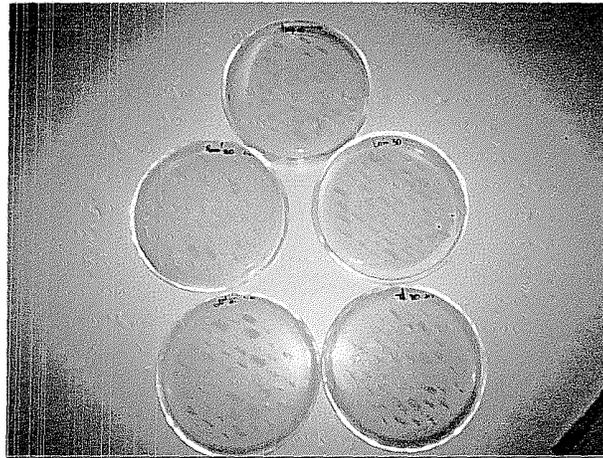


Figura 12. Resistencia a antibióticos de los aislados Hg<sup>R</sup> en medio LB agarizado.

La frecuencia de aislados resistentes al cloranfenicol fue de 83,33%, mientras que la frecuencia de aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a la ampicilina y la tetraciclina fue de 69,75% y 67,56%, respectivamente. Por otra parte, se observó que los porcentajes de aislados resistentes a la estreptomina y a la kanamicina fueron de 50,98% y 49,02%, respectivamente. Es importante resaltar que para todos los antibióticos el porcentaje de aislados resistentes fue muy cercano o mayor al 50%; esto representaría un elevado porcentaje de aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a múltiples antibióticos.

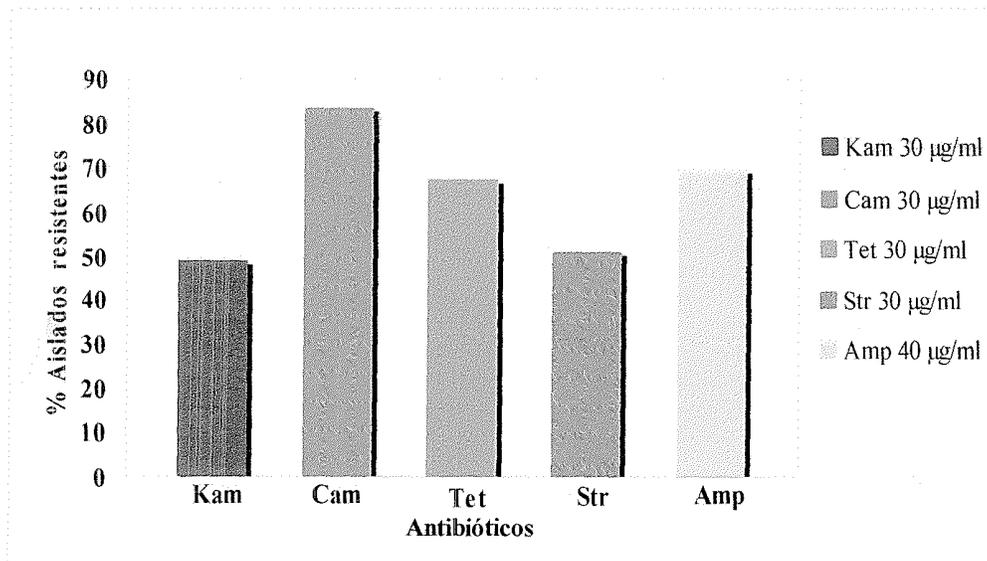


Figura 13. Porcentaje de aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a antibióticos.

Los resultados de resistencia a antibióticos de los aislados  $Hg^R$ , fueron discriminados de acuerdo al nivel de procedencia de los mismos. Este análisis permitió evidenciar que en todos los niveles estaban presentes aislados  $Hg^R$  resistentes a los diversos antibióticos ensayados. En el nivel 4 se observó una mayor frecuencia de aislados resistentes a los diferentes antibióticos (Figura 14). Cabe destacar que el nivel 4 fue en el que se obtuvo un mayor porcentaje de aislados resistentes a todas las concentraciones de  $HgCl_2$  y MeHg ensayadas (Figura 10).

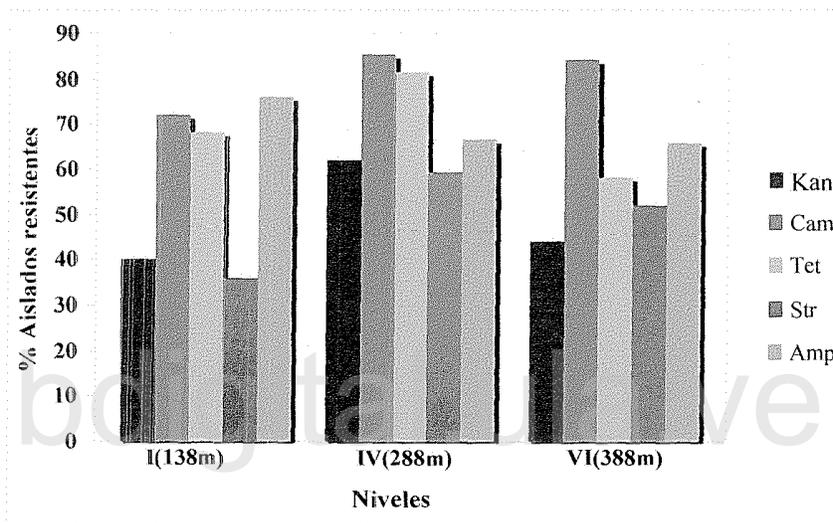


Figura 14. Porcentaje de aislados  $Hg^R$  resistentes a antibióticos provenientes de los diferentes niveles de la Mina Colombia.

Un aspecto muy importante de los resultados de este estudio fue la observación de diferentes patrones de resistencia frente a los antibióticos ensayados. En efecto, el 27,45% de los aislados presentó resistencia a cuatro antibióticos simultáneamente y el 26,47 % a cinco antibióticos; la resistencia a 1 y a 2 antibióticos se presentó con una frecuencia de un 6,86% y un 12,75% respectivamente. Por otro lado, sólo un 9,6 % de estos aislados fue sensible a todos los antibióticos probados (Figura 15).

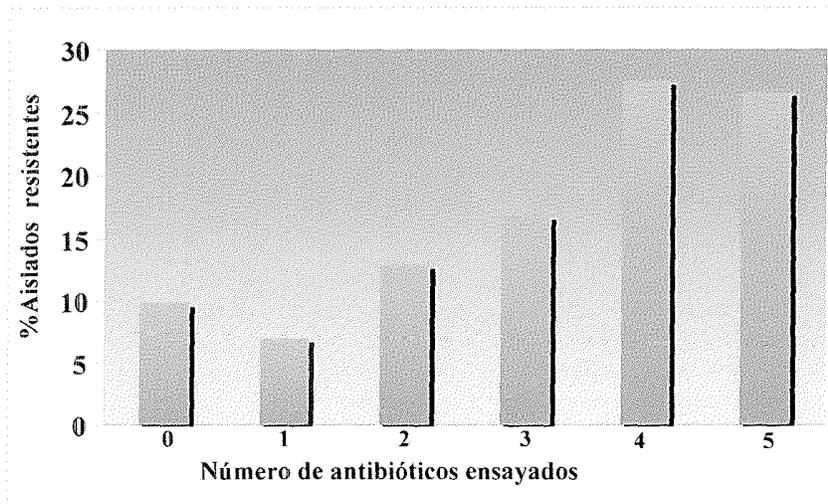


Figura 15. Porcentaje de resistencia de los de aislados Hg<sup>R</sup> a múltiples antibióticos.

El análisis del patrón de resistencia de los aislados Hg<sup>R</sup>, discriminado de acuerdo al nivel de procedencia de la mina, reveló que los aislados Hg<sup>R</sup> presentes en los sitios analizados mostraban diversos patrones de resistencia (Figura 16). La mayor frecuencia de aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a cuatro y cinco antibióticos simultáneamente, fue observada en el nivel 4 con un 33% y 37,04%, respectivamente.

En los niveles I y VI también se observaron diversos patrones de resistencia en los aislados Hg<sup>R</sup>. En el nivel 1, el 20% de los aislados presentó resistencia a 2 y a 3 antibióticos simultáneamente; mientras que un 28% presentó resistencia a 4 antibióticos. Por otro lado, en el nivel 6 la frecuencia de aislados resistentes a tres y cuatro antibióticos simultáneamente fue de 22%; mientras que la frecuencia de aislados resistentes a 5 antibióticos fue de 26%.

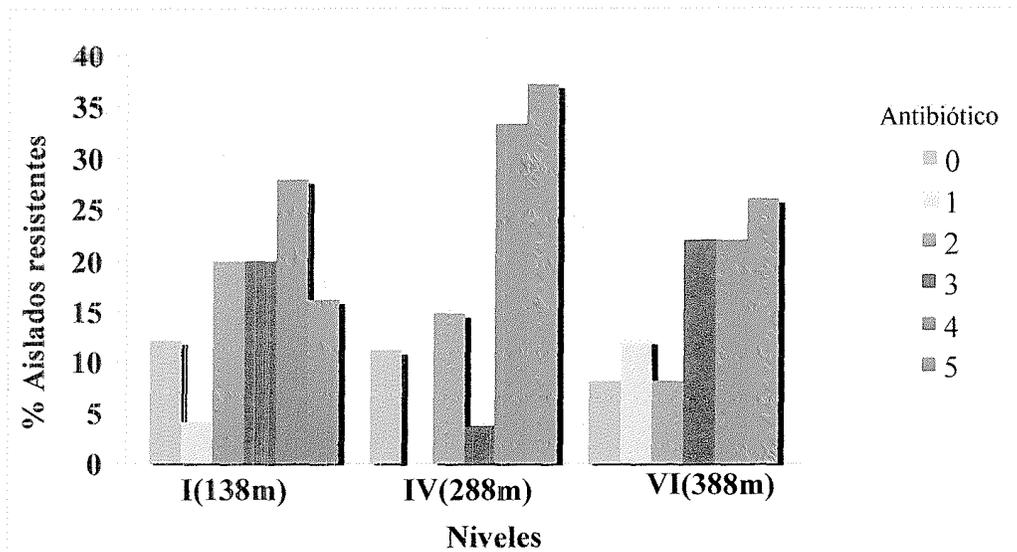


Figura 16. Patrones de resistencia a múltiples antibióticos de los de aislados Hg<sup>R</sup>, provenientes de los diferentes niveles analizados.

La resistencia de los aislados Hg<sup>R</sup> a los diferentes antibióticos también fue evaluada en medio líquido. En este caso, se determinó para cada uno de los 102 aislados Hg<sup>R</sup> la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico (Figura 17).

Los resultados obtenidos mostraron que el cloranfenicol y la ampicilina fueron los antibióticos en los cuales se observó una mayor frecuencia de aislados resistentes; este resultado coincide con los obtenidos en medio sólido. En el caso del cloranfenicol, más del 85% de los aislados fueron resistentes a las cuatro concentraciones ensayadas, mientras que en el caso de la ampicilina, más del 54,9% de los aislados fueron resistentes a las cuatro concentraciones probadas. Por otra parte, en medio líquido también se obtuvo una elevada frecuencia de aislados resistentes a la estreptomicina; en efecto, más del 30,39% de los aislados Hg<sup>R</sup> ensayados fueron capaces de crecer en presencia de 100 µg/ml de dicho antibiótico. Los resultados de esta experiencia indicaron también que el 39,22% de los aislados fue resistente a 12,5 µg/ml de tetraciclina y que sólo un 2,94% de los aislados fue capaz de crecer en presencia de 100 µg/ml de este antibiótico.

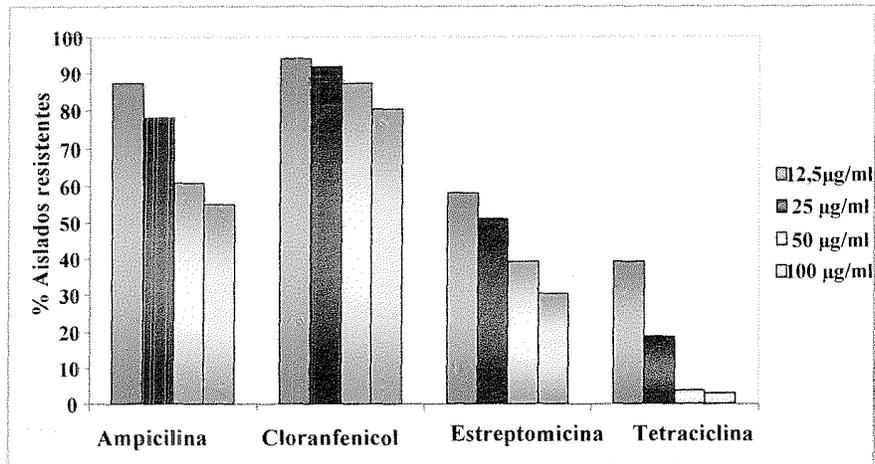


Figura 17. Resistencia a diferentes antibióticos de aislados Hg<sup>R</sup> en medio líquido.

Las pruebas de resistencia a antibióticos de los 102 aislados Hg<sup>R</sup> revelaron que el 95,14% de los aislados pigmentados presentaban resistencia a antibióticos (Figura 18).

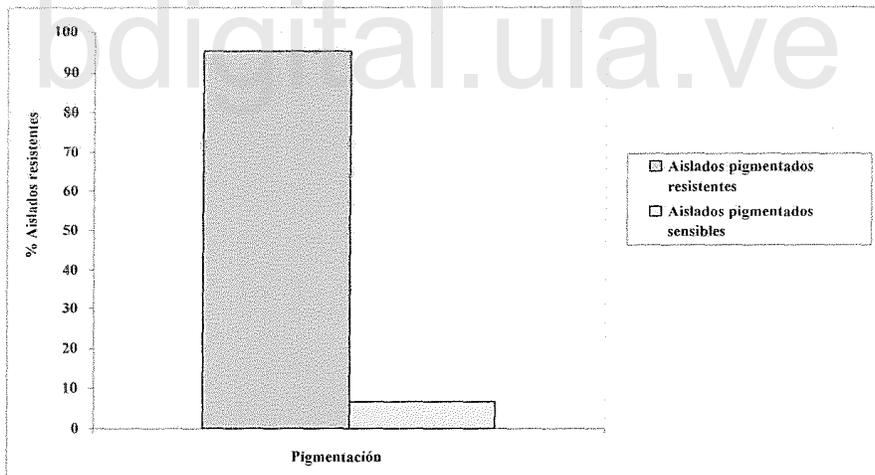


Figura 18. Porcentaje de aislados pigmentados resistentes a diferentes antibióticos.

Los resultados de los ensayos de resistencia a antibióticos también revelaron que la muestra de 102 aislados Hg<sup>R</sup> presentaba 18 patrones de resistencia. Los patrones que presentaron una mayor frecuencia fueron kanamicina-cloranfenicol-estreptomina-ampicilina (KCSTA) (26,47%) y kanamicina-cloranfenicol-tetraciclina-ampicilina (KCTA) (15,69%),

cloranfenicol-estreptomicina-ampicilina (CSA) y cloranfenicol-tetraciclina-ampicilina (CTA) con 5,88% cada uno (Figura 19).

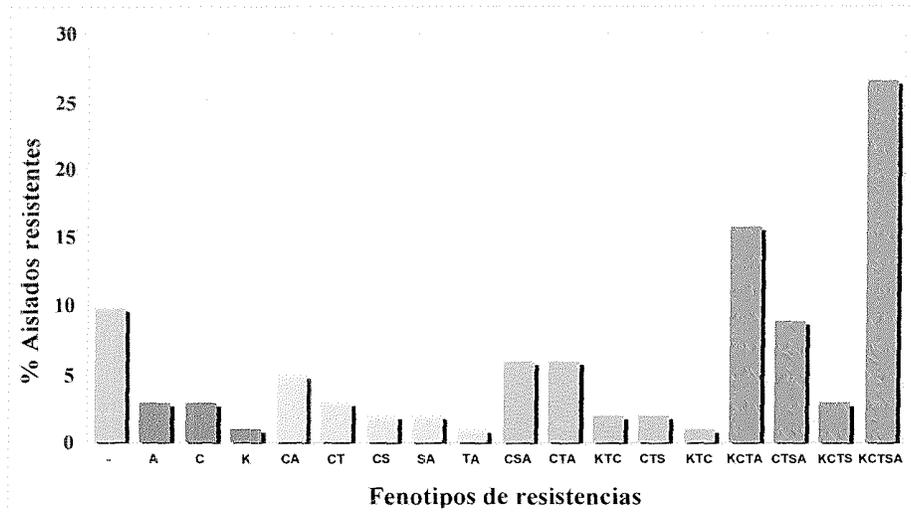


Figura 19. Patrones de resistencia a antibióticos de los aislados Hg<sup>R</sup>.

Con los resultados obtenidos en la prueba de resistencia a antibióticos se realizó un análisis de conglomerados y un dendograma utilizando la distancia Euclídeana (Moraga y col., 2007). Al realizarse un corte en el dendograma a una distancia -1, los aislados Hg<sup>R</sup> fueron agrupados en 18 conglomerados (o agrupaciones) diferentes (Figura 20).

Para saber realmente cuáles eran los grupos que conformaban cada conglomerado, se realizó un corte a la distancia -1. Esto permitió saber cuáles eran los aislados más parecidos en cuanto a la resistencia a antibióticos.

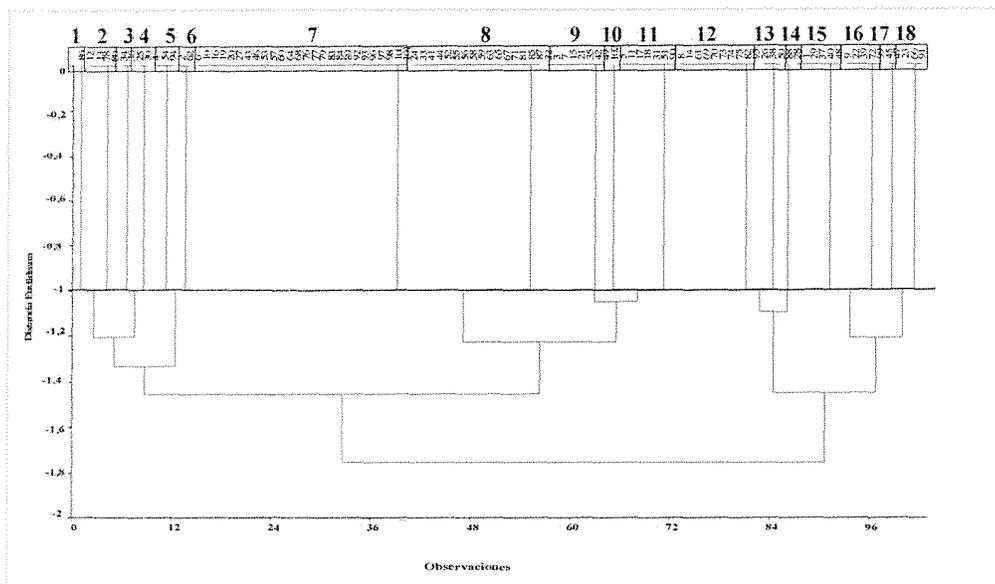


Figura 20. Dendrograma generado a partir de estudios de resistencias a antibióticos de aislados  $Hg^R$  utilizando distancia Euclicdeana (Moraga y col., 2007).

## 5. Resistencia de los aislados $Hg^R$ a otros metales pesados.

La resistencia a otros metales pesados también fue evaluada en los 102 aislados  $Hg^R$  utilizando la misma metodología empleada para la prueba de resistencia a los antibióticos.

Los aislados  $Hg^R$  fueron cultivados en placas de medio LB (diluido 1/3) agarizado suplementado con los diferentes metales, a concentraciones de 2 y 5 mM. Los resultados obtenidos en estas pruebas revelaron que los aislados  $Hg^R$  fueron resistentes a los metales estudiados, presentando diferentes patrones de resistencia (Figura 21). Las resistencias al zinc y al níquel (2 mM) fueron las más frecuentes.

La frecuencia de resistencia al zinc (2 mM) fue de 99,00%, mientras que la frecuencia de aislados  $Hg^R$  resistentes al níquel (2 mM) fue de 91,50%. Por otra parte, en el caso del cobre y el plomo, a esta misma concentración, se observó que los porcentajes de resistencia eran de un 76,60% y 73,40%, respectivamente. Es importante resaltar que la frecuencia de

resistencia para todos los metales a 2 mM fue muy cercana ó mayor al 70%; esto representaría un elevado porcentaje de resistencia a los metales ensayados en los aislados Hg<sup>R</sup>.

A una concentración de 5 mM, las resistencias al zinc y al plomo fueron las que presentaron mayor frecuencia entre los aislados Hg<sup>R</sup> con un 47,90% y 35,10%, respectivamente. Por otra parte, la frecuencia de aislados resistentes al níquel y al cobre fue de 23,40% y 16%, respectivamente.

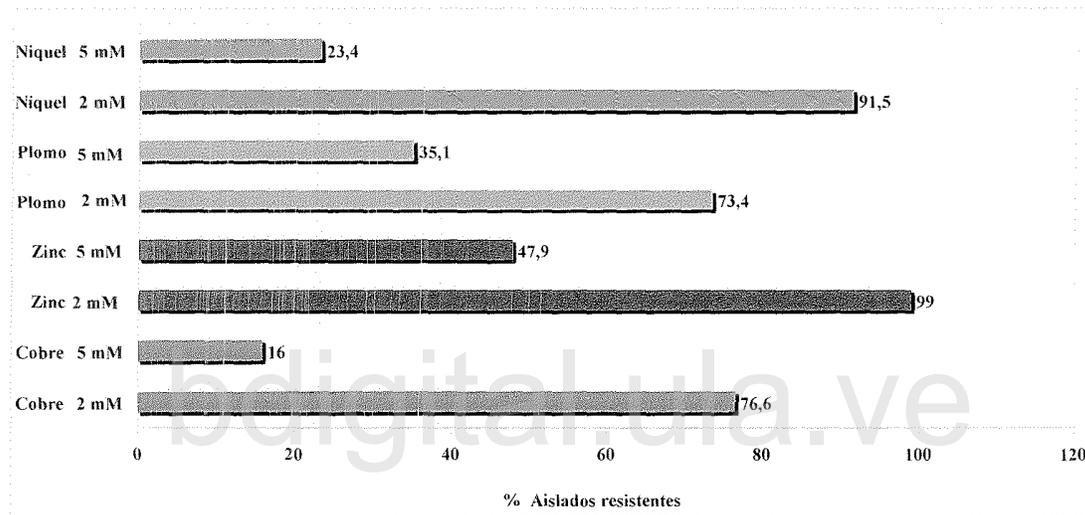


Figura 21. Porcentaje de aislados Hg<sup>R</sup> resistentes a otros metales pesados.

La resistencia de los aislados Hg<sup>R</sup> a los diferentes metales también fue evaluada en medio líquido. En este caso, se determinó para cada uno de los 102 aislados Hg<sup>R</sup> la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada metal (Figura 22).

Los resultados obtenidos mostraron que el zinc y el cobre fueron los metales en los que se observó una mayor frecuencia de aislados resistentes. En el caso del zinc, más del 76,47% de los aislados fueron resistentes a las cuatro concentraciones de este metal ensayadas, mientras que en el caso del cobre, más del 47,1% de los aislados fueron resistentes a las cuatro concentraciones probadas de este metal. Por otra parte, se pudo observar que más del

26,47% de los aislados Hg<sup>R</sup> ensayados fueron capaces de crecer en presencia de 100 µg/ml de níquel.

Los ensayos de resistencia de los aislados Hg<sup>R</sup> a otros metales pesados demostraron que un gran porcentaje de ellos presentó múltiples resistencias a los metales ensayados.

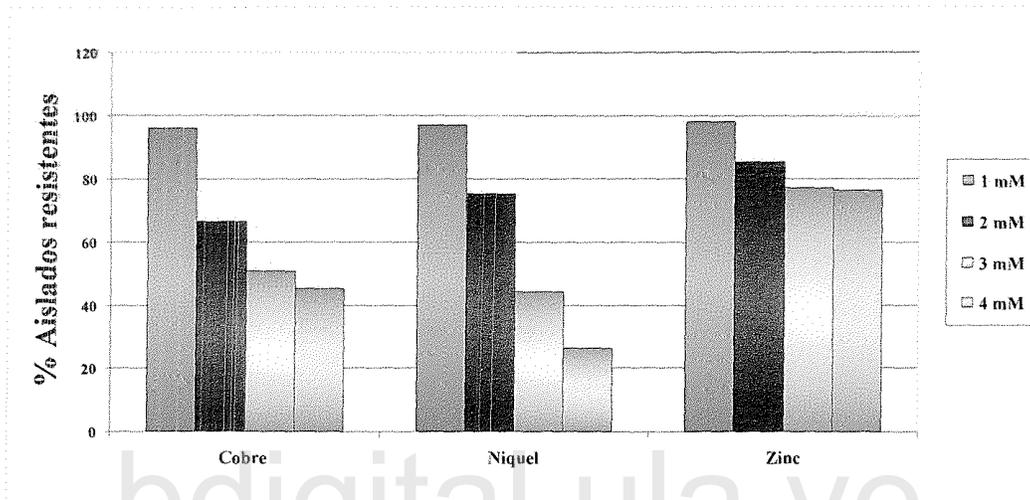


Figura 22. Prueba de resistencia a diferentes metales de aislados Hg<sup>R</sup> en medio líquido.

#### 6. Prueba de Gram de los aislados Hg<sup>R</sup> por el método de KOH.

La determinación de la naturaleza Gram de los aislados Hg<sup>R</sup> por el método de KOH evidenció que el 71,60% de los aislados Hg<sup>R</sup> eran Gram negativos, mientras que sólo un 28,4% de los aislados resultaron ser Gram positivos (Figura 23).

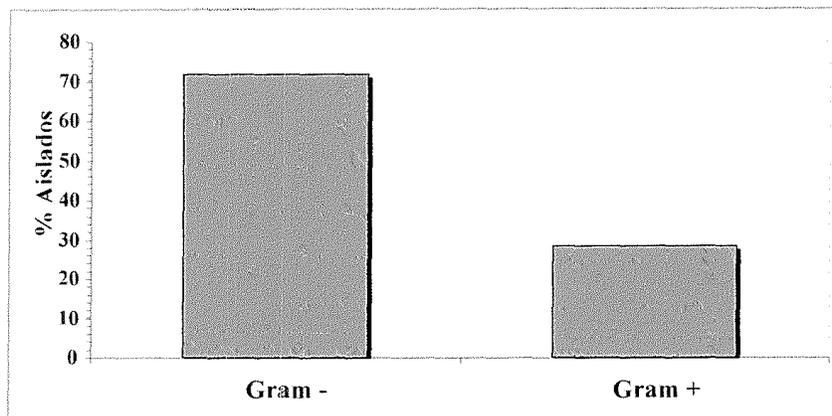


Figura 23. Porcentaje de aislados Hg<sup>R</sup> Gram - y Gram + por el método de KOH.

### 7. Determinación de la presencia del gen *merA* en los aislados Hg<sup>R</sup>.

Con la finalidad de determinar la presencia del gen *merA* (gen que codifica para la enzima mercurio reductasa) en los aislados Hg<sup>R</sup> se procedió a la amplificación del mismo por medio de la técnica de PCR.

Los cebadores utilizados para la amplificación de *merA*, fueron oligonucleótidos degenerados y específicos para bacterias Gram negativas (Proteobacterias) y algunas bacterias Gram positivas (géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Streptomyces*) diseñados por Ní Chadhain y col., 2006 (descritos en materiales y métodos). Al realizar esta amplificación se obtuvo un fragmento del tamaño esperado, de aproximadamente 285 pb (Figura 24).

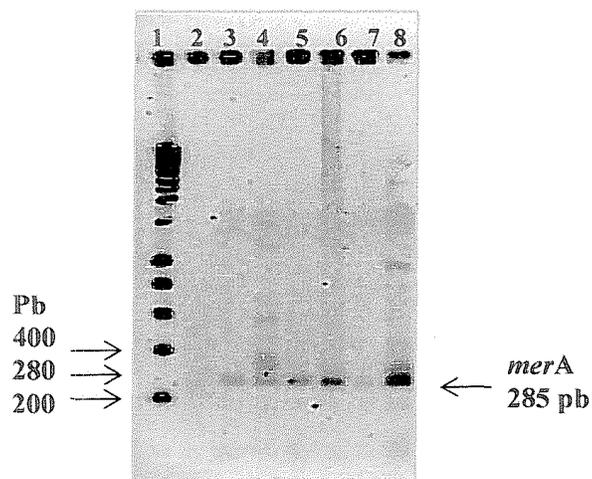


Figura. 24 Amplificación por la técnica de PCR del gen *merA*. 1: Marcador de peso molecular, 2: control negativo; 3: aislado 1; 4: aislado 3; 5: aislado 5; 6: aislado 6; 7: aislado 12; 8: aislado 41.

El gen *merA* pudo ser amplificado en un 78% de los aislados Hg<sup>R</sup> (Figura 25).

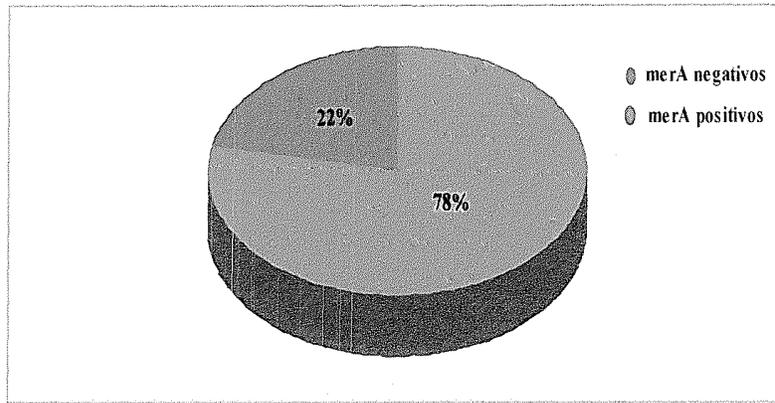


Figura 25. Frecuencia de amplificados *merA* en aislados Hg<sup>R</sup>.

En vista de este resultado, se trató de relacionar la naturaleza Gram de los aislados Hg<sup>R</sup> con la presencia del gen *merA* en los mismos. Se obtuvo que el 83,3% de los aislados en los cuales se amplificó el gen *merA* resultaron ser Gram negativos. El 75% de los aislados en los que no se amplificó *merA* fueron Gram positivos (Figura 26).

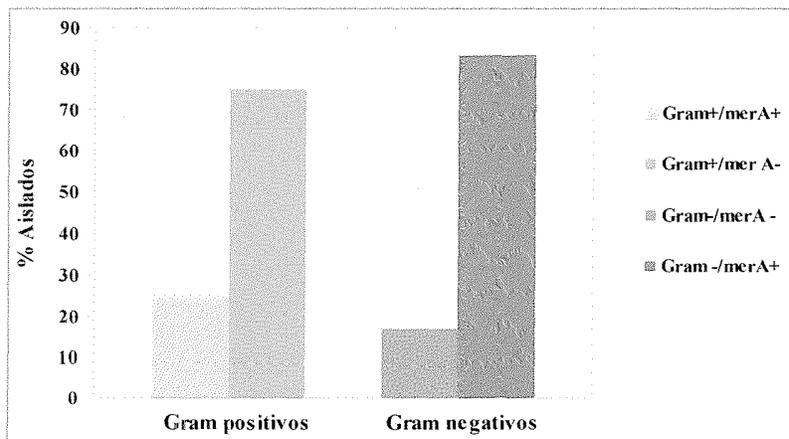


Figura 26. Correlación entre la presencia del gen *merA* y la naturaleza Gram de los aislados Hg<sup>R</sup>.

Para los estudios posteriores de este trabajo (perfil plasmídico, pruebas bioquímicas, RISA, identificación molecular y ensayos de conjugación) se escogieron 20 aislados Hg<sup>R</sup>, en base

a su morfología, resistencia al Hg, resistencia a antibióticos y resistencia a otros metales pesados.

### 8. Estudio del perfil plasmídico de los aislados Hg<sup>R</sup> seleccionados.

Como parte de la caracterización genética de los aislados Hg<sup>R</sup>, se determinó la presencia de plásmidos en los 20 aislados seleccionados. Por medio del protocolo de lisis alcalina se logró evidenciar la presencia de plásmidos en once aislados (55%). Los resultados obtenidos revelaron que los aislados Hg<sup>R</sup> presentaban de 1 a 4 plásmidos y que éstos podían ser de bajo y alto peso molecular (Figura 27). Aunque no se pudo determinar con exactitud el peso molecular de los plásmidos presentes en algunos aislados, se consideró que todos aquellos que migraban por encima del ADN cromosomal tenían un peso molecular mayor a los 30 Kb.

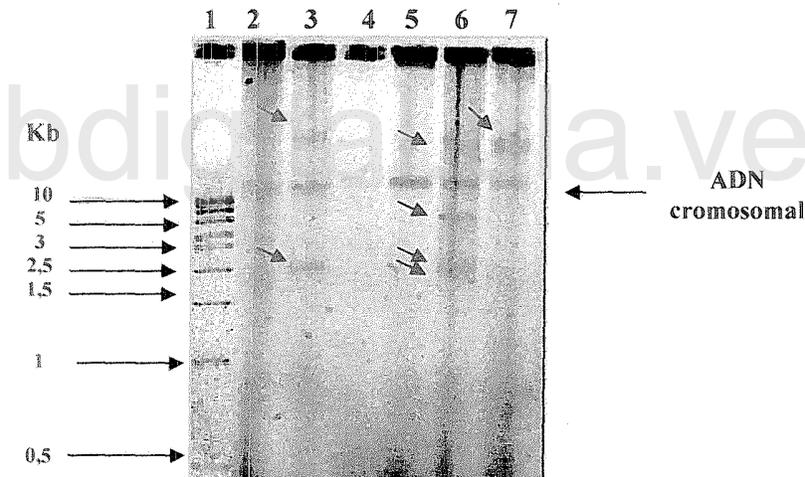


Figura 27. Perfil plasmídico de los aislados Hg<sup>R</sup> de aguas subterráneas. 1: Marcador de peso molecular; 2: aislado 18; 3: aislado 24; 4: aislado 32; 5: aislado 98; 6: aislado 101; 7: aislado 92.

El estudio del perfil plasmídico permitió determinar que el 45% de los aislados Hg<sup>R</sup> contenía dos plásmidos (Figura 28). El 27,27% tenía un solo plásmido y el 18% presentó 3 plásmidos. En esta experiencia también se puso en evidencia que el 9,09% de los aislados contenían cuatro plásmidos.

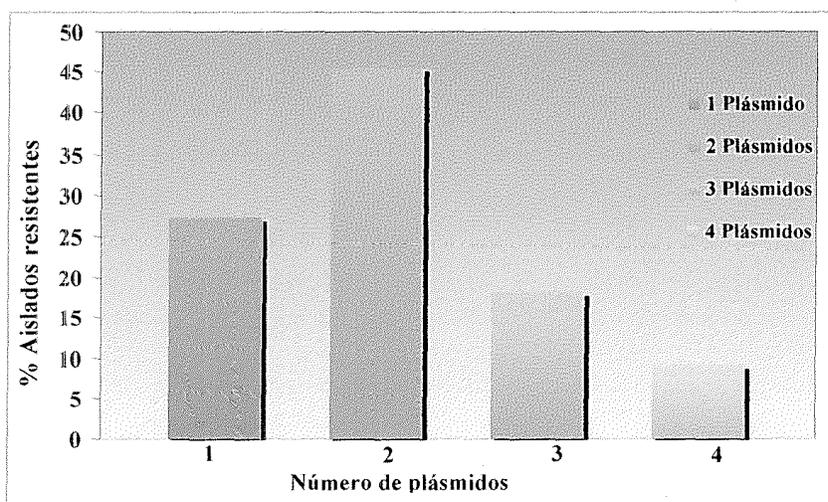


Figura 28. Frecuencia de plásmidos presentes en los aislados Hg<sup>R</sup>.

### 9. Caracterización morfológica de los aislados Hg<sup>R</sup>.

La caracterización morfológica se basó en la observación de las bacterias por medio de la técnica de tinción simple (Tabla 8). Los resultados mostraron que el 70% de los 20 aislados eran bacilos Gram negativos. El 15% de los aislados eran cocos Gram positivos y el 15% eran cocos Gram negativos.

Tabla 8. Caracterización morfológica de los aislados Hg<sup>R</sup>.

Morfología	Tinción Gram	Aislados
Bacilos	Gram -	5,10,15,18,19,21,32,41, 92,97,98,101,44,64
Cocos	Gram -	24,79,84
Cocos	Gram +	33,46,57

### 10. Caracterización bioquímica de los aislados Hg<sup>R</sup> seleccionados.

Para la identificación preliminar de los 20 aislados Hg<sup>R</sup> se realizaron una serie de pruebas bioquímicas (Figura 29). Estas pruebas permitieron ubicar a los aislados Hg<sup>R</sup> a nivel de

género, por medio de la comparación con pruebas de cepas de referencia, descritas por Koneman y col. (1999).

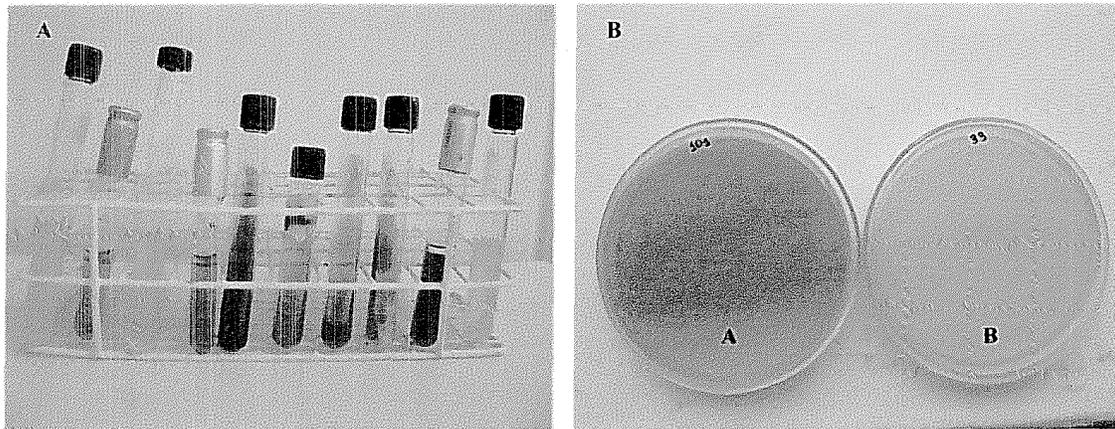


Figura 29. Pruebas bioquímicas realizadas a los aislados Hg<sup>R</sup>. Figura A: Resultados del aislado 41 comparados con el control (izquierda a derecha). A: Caldo glucosa rojo fenol (reacción positiva); B: Caldo lactosa rojo fenol (reacción negativa); C: Citrato de Simmons (reacción positiva); D: Agar TSI (reacción negativa); E: Medio Hugo y Leifson (reacción positiva). Figura B. Prueba ureasa. A: aislado 101 (reacción positiva); B: aislado 33 (reacción negativa).

Tabla 9. Ensayos bioquímicos realizados a los aislados Hg<sup>R</sup>.

Aislado	Glucosa	Lactosa	Catalasa	Oxidasa	Citrato	Gelatina	Urea	VP					TSI			HL	Genero mas cercano	
	Rojo Fenol	Rojo Fenol						Simmons	R	M	V	P	C	T	C			P
33	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i>
41	+	+	+	+	-	-	+	-	-	K	K	K	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
44	-	-	+	+	+	-	+	-	-	K	K	K	-	+	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
79	-	-	-	-	+	-	-	-	-	K	K	K	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
97	-	-	+	-	+	-	-	-	-	K	K	K	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
98	-	-	+	-	+	-	-	-	-	K	K	K	-	+	-	-	-	<i>Acinetobacter</i>
10	-	-	+	+	+	-	+	-	-	K	K	K	-	+	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
46	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i>
18	-	-	+	+	+	-	+	-	-	K	K	K	-	+	+	+	+	<i>Pseudomonas</i>
15	-	-	+	+	+	+	+	-	-	K	K	K	-	+	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>
5	-	-	-	+	-	±	-	-	-	K	K	K	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i>
101	+	+	+	-	+	+	+	-	+	K	A	K	-	+	+	+	+	No identificado

Continuación Tabla 9

21	-	-	-	+	+	+	+	-	-	KKK	+	-	-	<i>Pseudomonas</i>
24	-	-	+	-	+	-	-	-	-	KKK	-	+	-	<i>Acinetobacter</i>
19	+	-	+	+	+	+	+	-	+	KKK	-	+	+	<i>Pseudomonas</i>
92	-	-	+	-	+	-	-	-	-	KKK	-	+	-	<i>Acinetobacter</i>
32	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Alcaligenes</i>
84	-	-	+	+	+	-	-	-	-	KKK	-	+	-	<i>Moraxella</i>
64	-	-	+	-	-	-	-	-	-	KKK	-	+	-	<i>Acinetobacter</i>
57	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i>

**Caldo glucosa rojo fenol reacción positiva:** producción de ácidos en el metabolismo; **Caldo lactosa rojo fenol reacción positiva:** producción de ácidos en el metabolismo; **Catalasa positiva:** presencia de la enzima catalasa; **Oxidasa positiva:** presencia de la enzima citocromo oxidasa; **Citrato de Simmons reacción positiva:** Presencia de la enzima citocromo permeasa y utilización de citrato como única fuente de carbono y energía; **Gelatina reacción positiva:** Presencia de enzimas proteolíticas; **Urea positiva:** presencia de la enzima ureasa; **VP (Voges-Proskauer) reacción positiva:** fermentación butilén-glicólica; **RM (Rojo de Metilo) reacción positiva:** fermentación ácido mixta; **TSI (agar Hierro-Triple Azúcar):** PG: presencia de gas; T (taco): anaeróbico; C (cuña): aeróbico; K: presencia de álcali; A :presencia de ácido; SH (sulfuro de hierro): producción de ácido sulfhídrico; HL (Hugh y Leifson): O (Oxidativo) reacción positiva: oxidativo; F (fermentativo) reacción positiva: fermentativo; **Motilidad reacción positiva:** organismo móvil. (+): reacción positiva; (-): reacción negativa.

Con los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas (presencia de enzimas), se realizó un análisis de conglomerados y un dendograma utilizando distancia Euclídeana (Moraga y col., 2007). En este dendograma los aislados Hg<sup>R</sup> se agruparon en 12 conglomerados diferentes (Figura 30)

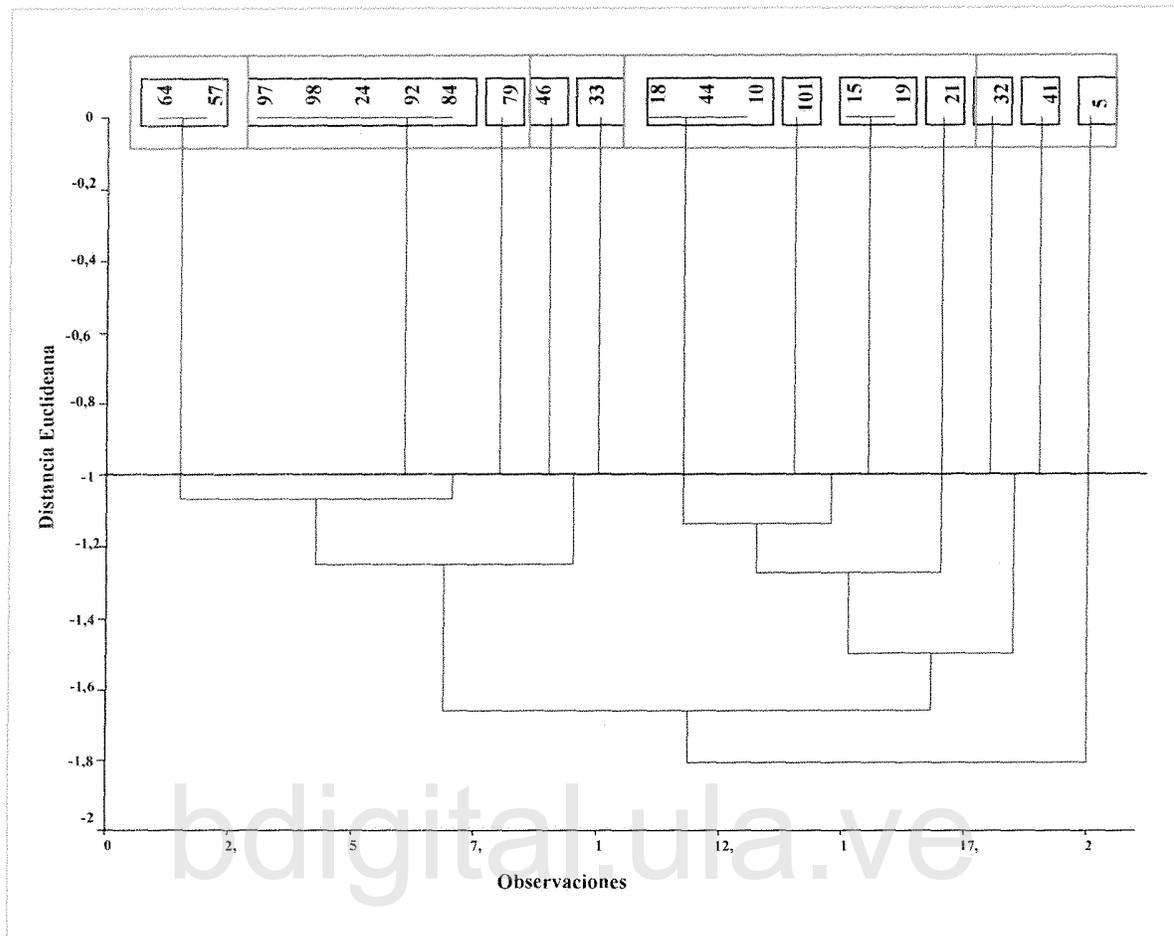


Figura 30. Dendrograma generado a partir de estudios bioquímicos (presencia de enzimas) de aislados  $Hg^R$  utilizando distancia Euclídeana (Moraga y col., 2007).

### 11. Extracción de ADN cromosomal de los aislados $Hg^R$ seleccionados.

El ADN genómico de los 20 aislados  $Hg^R$  se aisló y purificó por el método descrito en materiales y métodos, con la finalidad de utilizarlo en los ensayos moleculares (identificación molecular mediante la amplificación del ADN<sub>r</sub>16S y estudio de la diversidad mediante RISA).

El protocolo utilizado para la extracción del ADN genómico permitió obtener un ADN íntegro, con pocos signos de degradación y contaminación, a partir de los cultivos de los aislados  $Hg^R$  (Figura 31).

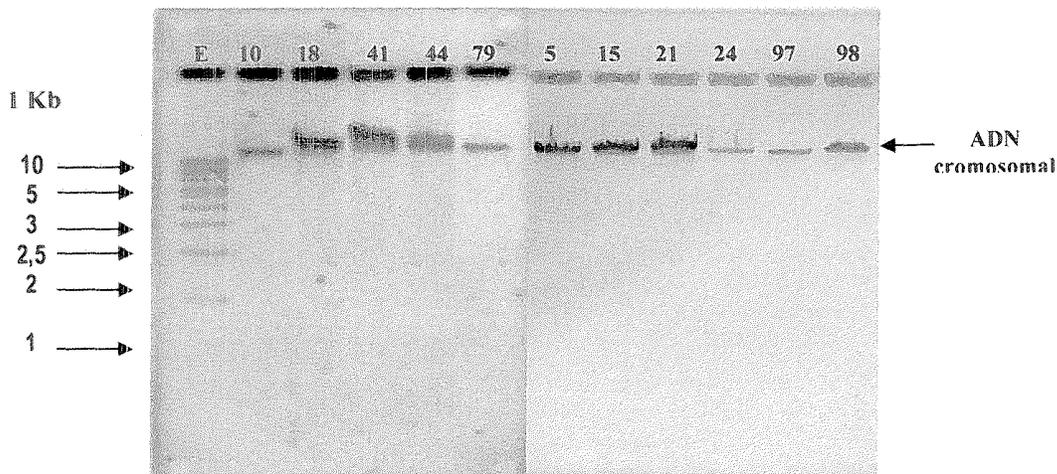


Figura 31. Extracción de ADN cromosomal de los aislados Hg<sup>R</sup>.

## 12. Análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA).

Los productos de amplificación de las secuencias intergénicas ribosomales (RISA) separados por electroforesis mostraron diferentes patrones (Figura 32). Estos patrones estaban conformados por 1 a 6 bandas de diferentes pesos moleculares (200 a >1,517 pb). Los resultados obtenidos revelaron que los diferentes patrones RISA de los 20 aislados presentaban bandas en común.

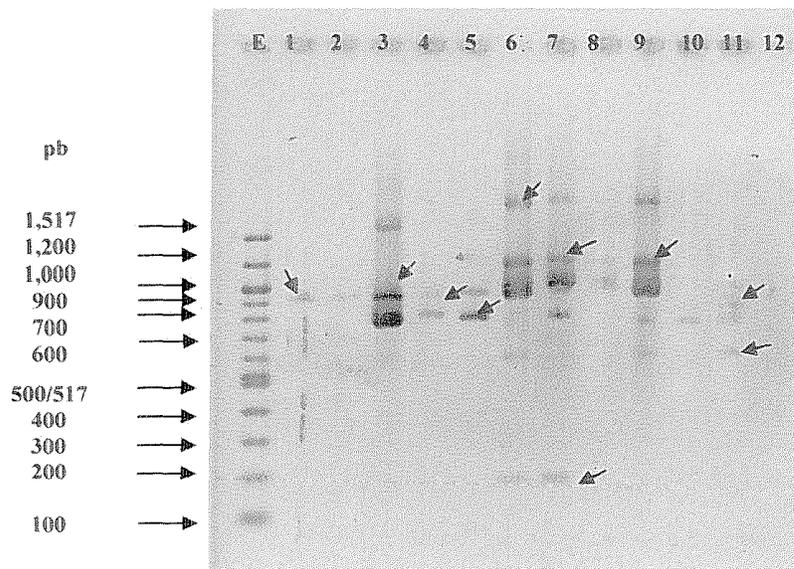


Figura 32. Análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA) de aislados Hg<sup>R</sup>. Línea 1: Marcador de peso molecular; línea 2 y 3: aislado 5; línea 4: aislado 15; línea 5: aislado 32; línea 6: aislado 21; línea 7: aislado 97; línea 8: aislado 98, línea 9: aislado 79; línea 10: aislado 24; línea 11: aislado 18; línea 12: aislado 44; línea 13: control negativo.

Con los resultados obtenidos del ensayo de RISA se realizó un análisis de conglomerados y dendograma utilizando la distancia Euclídeana (Lucas y col., 2002). Los aislados fueron aglomerados en 18 grupos diferentes (Figura 33).

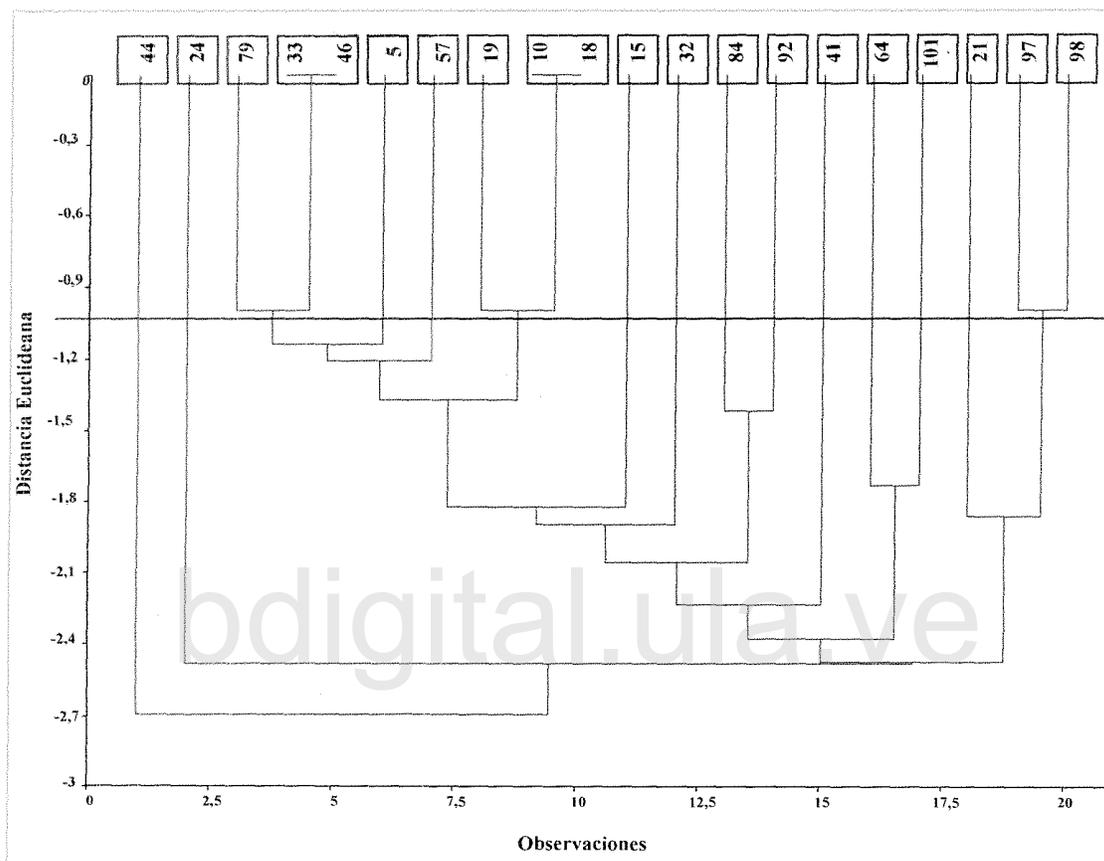


Figura 33. Dendograma generado a partir del análisis de espacios intergénicos ribosomales (RISA) de aislados Hg<sup>R</sup> utilizando distancia Euclidiana (Lucas y col., 2002).

### 13. Identificación molecular de los aislados Hg<sup>R</sup>.

Con el objeto de identificar los aislados Hg<sup>R</sup> y de obtener información filogenética y taxonómica de los mismos, se realizó la amplificación del gen que codifica para el ARNr 16S mediante la técnica de PCR (descrito en materiales y métodos). El tamaño esperado del fragmento era de 1.500 pb (Figura 34).

Los productos amplificados fueron purificados y secuenciados. Las secuencias obtenidas para cada aislado fueron analizadas mediante diversos programas de bioinformática (BLAST de NCBI; base de datos de EMBL y MEGA4) disponibles en Internet. Los resultados del BLAST presentado en la Tabla 10, muestran diferentes porcentajes de identidad con especies de *Pseudomonas sp*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Acinetobacter sp*, *Acinetobacter junii*, *Caulobacter sp*, *Petrobacter succinimandens*, *Brevundimonas diminuta* y *Micrococcus sp*.

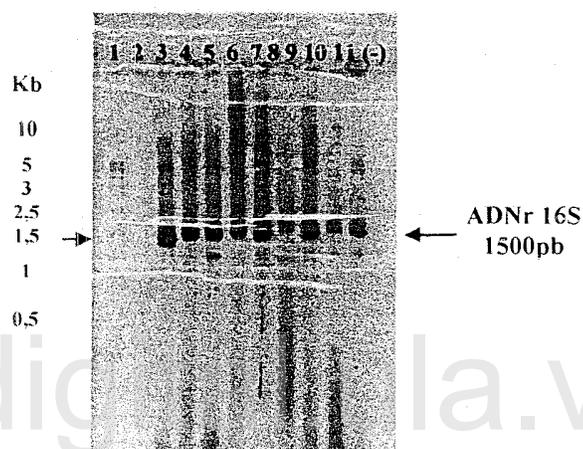


Figura 34. Amplificación por PCR del ADNr 16S. 1: Marcador de peso molecular; 2: control negativo; 3: aislado 5; 4: aislado 15; 5: aislado 18; 6: aislado 21; 7: aislado 24; 8: aislado 79; 9: aislado 44; 10: aislado 97; 11: aislado 98; 12: control negativo.

**Tabla 10. Identificación molecular de aislados Hg<sup>R</sup>.**

Aislado Hg <sup>R</sup>	Organismo más cercano filogenéticamente	% de identidad
5	<i>Brevundimonas diminuta</i>	78
15	<i>Pseudomonas sp.</i>	89
18	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	89
21	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	86
41	<i>Pseudomonas putida</i>	91
44	<i>Micrococcus sp.</i>	83
84	<i>Petrobacter succinimandens</i>	89
92	<i>Acinetobacter sp.</i>	85
97	<i>Acinetobacter junii</i>	95
98	<i>Acinetobacter sp.</i>	89
101	<i>Caulobacter sp.</i>	89

Con los datos obtenidos a partir de la identificación molecular, construimos un árbol filogenético, comparando las secuencias obtenidas con las secuencias de la base de datos EMBL, según el método de agrupamiento Neighbor-Joining con Bootstrap de 1000 repeticiones. Para este análisis se utilizó el programa MEGA4 (Tamura y col., 2007). En el árbol resultante (Figura 35 A) se puede observar que los aislados Hg<sup>R</sup> 15 y 41 están relacionados con especies pertenecientes al género *Pseudomonas* y particularmente con *Pseudomona sp*, mientras que el aislado 41 se relaciona con la especie *Pseudomona putida*; estos aislados presentan un 89% y 91% de identidad con estas especies, respectivamente. El aislado 5 se encuentra muy relacionado con especies del género *Brevudimonas*, presentando 78% de identidad con la especie *Brevudimonas diminuta* (Tabla 10).

En el caso de los aislados 92, 97 y 98, observamos que se relacionan filogenéticamente con especies pertenecientes al género *Acinetobacter*. Los aislados 92 y 98 presentan un 85% y 89% de identidad con la especie *Acinetobacter sp*, y están muy relacionados entre sí. Por su parte el aislado 97 tiene 95% de identidad con *Acinetobacter junii*.

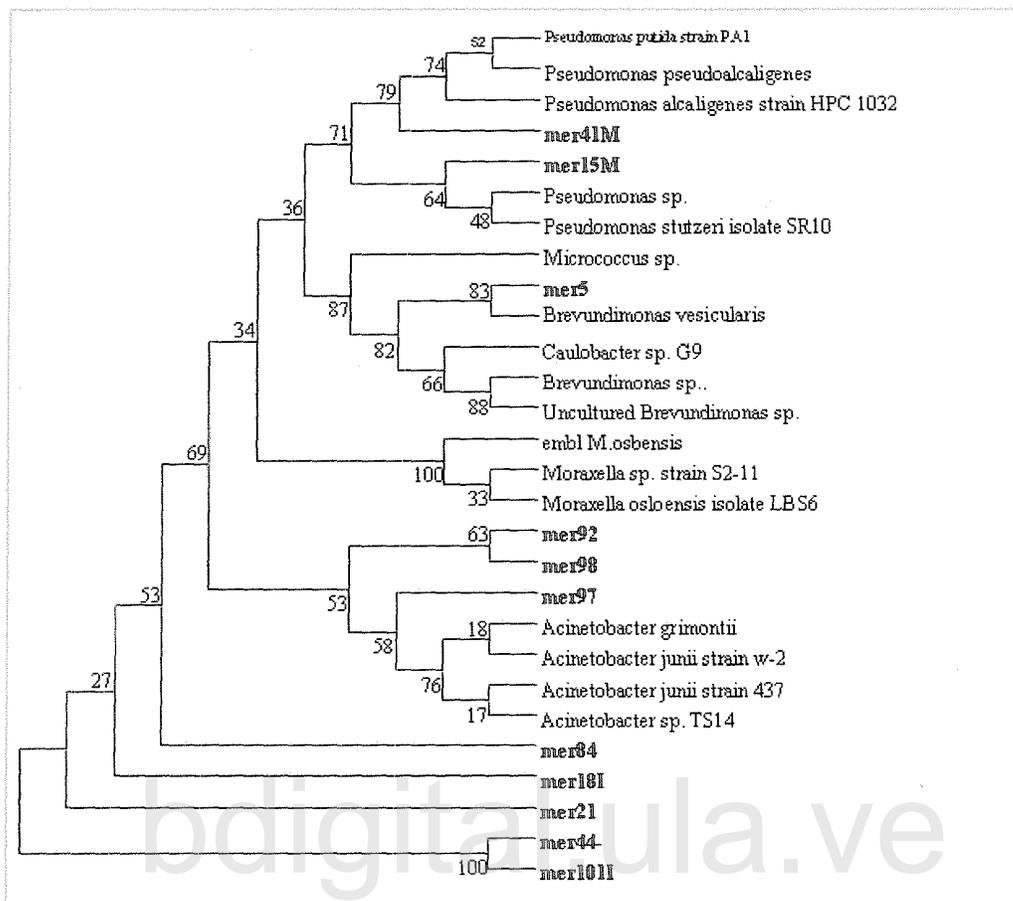


Figura 35 A. Árbol filogenético de los aislados Hg<sup>R</sup>, relacionadas con secuencias de la base de datos EMBL. Método de agrupamiento Neighbor-Joining (Soitou y col., 1987) con Bostrap de 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985).

Debido a la mala calidad de las secuencias obtenidas, los aislados 18, 21, 44, 84 y 101 no fueron relacionados con ningún género (Figura 35 A). Para resolver este inconveniente se tomó en cuenta un fragmento más pequeño de las secuencias problemas pero más conservado, el cual se utilizó para la comparación con la base de datos. Esto permitió relacionar estas cepas con los géneros *Pseudomonas*, *Petrobacter*, *Caulobacter* y *Micrococcus* (Figura 35 B). Los aislados 18 y 21 se relacionaron filogenéticamente con especies del género *Pseudomonas*; el aislado 18 posee un 89% de identidad la especie *Pseudomonas alcaligenes*, mientras que el aislado 21 está más relacionado filogenéticamente con *Pseudomonas stutzeri* (86% de identidad).

En el caso del aislado 44, observamos que se relaciona filogenéticamente con la especie *Micrococcus sp.*, con un 83% de identidad. Por otra parte, el aislado 101 se encuentra muy relacionado filogenéticamente a *Caulobacter sp.*; con un 89% de identidad.

Finalmente el aislado 84 mostró una relación filogenética con microorganismos pertenecientes al género *Petrobacter* y un 89% de identidad con la especie *Petrobacter succinimandens*.

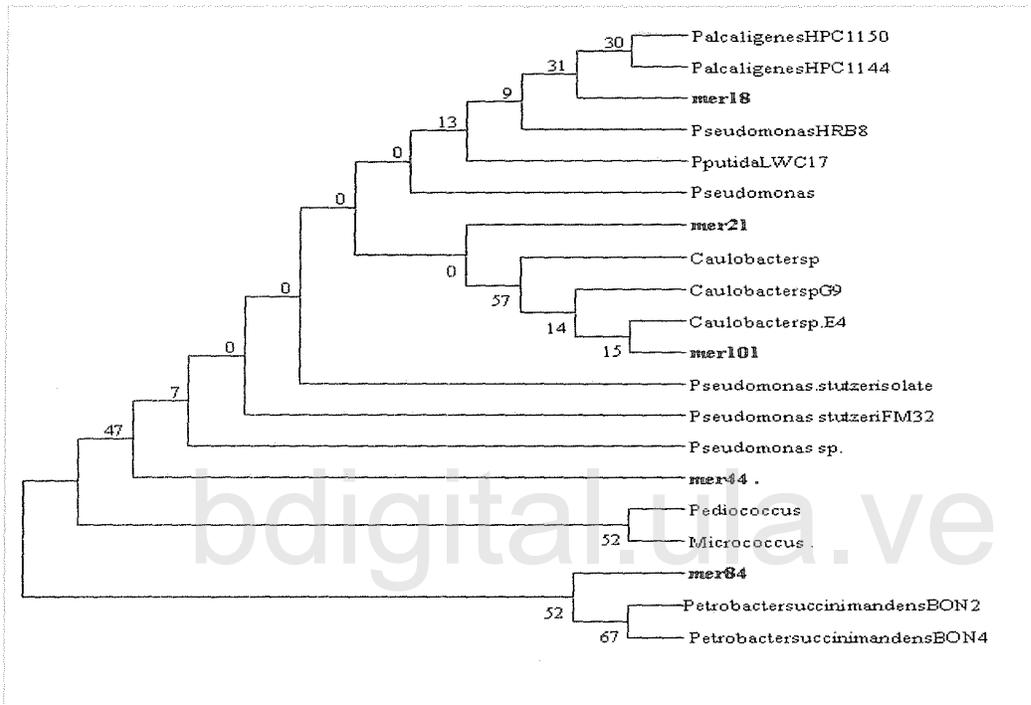


Figura 35 B. Árbol filogenético de los aislados Hg<sup>R</sup>, relacionadas con secuencias de las base de datos EMBL. Método de agrupamiento Neighbor-Joining (Soitou y col., 1987) con Bostrap de 1000 repeticiones (Felsentein, 1985).

#### 14. Ensayos de conjugación *in vitro* entre aislados Hg<sup>R</sup> y cepas potencialmente patógenas para el hombre.

En estos ensayos se intentó determinar mediante conjugación *in vitro* la frecuencia con la cual podía ocurrir la transferencia horizontal de marcadores de resistencia al Hg a otras cepas de bacterias y, especialmente, a cepas potencialmente patógenas para el hombre. Los ensayos se realizaron siguiendo la metodología de conjugación en parche (descrita en materiales y métodos). Para estas experiencias se realizaron varias mezclas de conjugación (*E. coli*  $\chi$  aislados 35, 49, 97 y 98; *P. fluorescens*  $\chi$  aislados 35, 49, 97 y 98) (Figura 36).

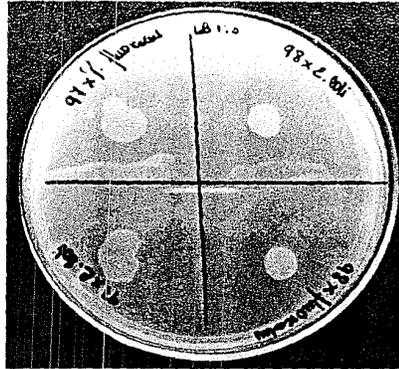


Figura 36. Conjugación en parche en medio LB (dilución 1/3). (*E. coli* x aislados 97 y 98; *P. fluorescens* x aislados 97 y 98).

Las mezclas de conjugación fueron cultivadas en placas con medio selectivo (LB+Hg+Rif), en las cuales sólo podían crecer los transconjugantes que recibían los marcadores de resistencia al Hg y que eran capaces de expresar la resistencia a la rifampicina. Para determinar el título de las receptoras, diferentes diluciones de los cultivos fueron sembradas en placas de LB. Por otra parte, los controles del ensayo se realizaron cultivando los aislados Hg<sup>R</sup> y las cepas receptoras Rif<sup>R</sup> en placas de LB suplementado con Rif (80 µg/ml), en las cuales se esperaba el crecimiento de las cepas receptoras Rif<sup>R</sup>, y en placas conteniendo Hg (20 µg/ml), en las cuales solo podían crecer los aislados Hg<sup>R</sup>. Como se esperaba, sólo se observó crecimiento de los aislados Hg<sup>R</sup> en presencia de Hg y de las cepas receptoras en presencia de Rif (Figura 37).



Figura 37. Control de ensayo de transferencia de marcadores de resistencia al Hg por conjugación. 1: *E. coli*; 2: *P. fluorescens*; 3: aislado 97; 4: aislado 98; 5: aislado 49; 6: aislado 35.

No se observaron exconjugantes en placas, lo que sugiere que este fenómeno ocurre con muy baja frecuencia, en las condiciones ensayadas. De los tres ensayos, sólo en una de las mezclas de conjugación (aislado 97 *Acinetobacter junii*  $\times$  *E. coli*) se obtuvo un clon transconjugante Hg<sup>R</sup> Rif<sup>R</sup>.

En vista de que no se logró cuantificar la frecuencia de conjugación, se realizó un aislamiento plasmídico del transconjugante (Hg<sup>R</sup> Rif<sup>R</sup>) para determinar si la resistencia al Hg adquirida se debía a la transferencia horizontal de plásmidos de la cepa donadora.

La extracción del ADN plasmídico se realizó mediante el protocolo de lisis alcalina descrito por Kotchoni y col. (2003) con modificaciones; la observación de los mismos se realizó según las especificaciones de Sambrook y col. (1989), mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (descrito en materiales y métodos).

Los resultados obtenidos en este estudio revelaron que el transconjugante presentaba el mismo perfil plasmídico que la cepa donante (97 *Acinetobacter junii*) (Figura 38).

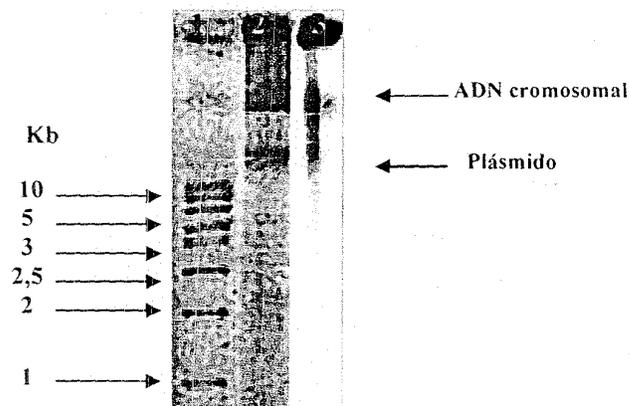


Figura 38. Aislamiento de plásmidos del transconjugante Hg<sup>R</sup>Rif<sup>R</sup>. 1: marcador de peso molecular 100 pb Ladder; 2: aislado donante (97); 3: transconjugante.

## **1. Análisis fisicoquímico de muestras de aguas subterráneas de la Mina Colombia, El Callao (Estado Bolívar).**

Hasta el momento, no se ha publicado ningún trabajo relacionado con el estudio de la contaminación mercurial de aguas subterráneas en El Callao, Edo Bolívar, aún cuando esta región presenta una gran contaminación con Hg de los cuerpos de agua superficiales, como resultado de la explotación minera artesanal del oro; y que además, existe la posibilidad de que aguas superficiales altamente contaminadas puedan alcanzar los ríos a través del flujo superficial y entrar en contacto con aguas subterráneas a través de filtraciones, resultando finalmente en una gran contaminación del medio ambiente acuático de la región.

### **1.1 Determinación de pH y temperatura de muestras de aguas subterráneas.**

Los resultados obtenidos para el pH y la temperatura de las muestras de aguas subterráneas revelaron que los valores de ambos parámetros eran muy similares en todos los sitios analizados. El pH osciló entre 7,11 y 8,00; esto indica que el pH de las aguas estudiadas era de neutro a básico (Tabla 4).

Al comparar nuestros resultados con los valores aceptados por la OMS (pH 7 a 8,5), se podría decir que los valores de pH de las aguas subterráneas de la mina Colombia están dentro de los límites tolerados para el consumo humano.

Los valores de temperatura de los diferentes lugares analizados se encontraron en el rango de 26,1 a 27,1 °C. Estos valores son ligeramente superiores al valor deseable para el agua potable (10 a 25°C) (Doménech 1995).