

**TRABAJO PROFESIONAL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO BIOQUÍMICO**

**QUE PRESENTA:**

**JOSE RUBEN TORRES RUIZ**

**CON EL TEMA:**

**“EXTRACCION DEL DNA METAGENÓMICO Y  
AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S rRNA PARA EL ANÁLISIS  
DEL RESISTOMA DEL SUELOS”**

**MEDIANTE**

**OPCIÓN I**

**TESIS PROFESIONAL**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA**

**TUXTLA GUTIÉRREZ CHIAPAS**

**AGOSTO DE 2015**



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

DIRECCIÓN  
SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas 13 abril del 2015

ORCO NUM. DEP-CT-520-2015

**C. JOSÉ RUBEN TORRES RUIZ**  
PASANTE DE LA CARRERA DE INGENIERIA BIOQUÍMICA  
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ.  
P R E S E N T E.

Habiendo recibido la comunicación de su trabajo profesional por parte de los CC. DR. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA, DR. REINER RINCON ROSALES Y DR. VICTOR MANUEL RUIZ VALDIVIEZO, En el sentido que se encuentra satisfactorio el contenido del mismo como prueba escrita, **AUTORIZO** a Usted a que se proceda a la impresión del mencionado Trabajo denominado:

**"EXTRACCIÓN DEL DNA METAGENOMICO Y AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S rRNA PARA EL ANÁLISIS DEL RESISTOMA DE SUELO"**

Registrado mediante la opción:  
**I (TESIS PROFESIONAL)**

**ATENTAMENTE**  
**"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"**

  
ING. JUAN JOSÉ ARNEOLA ORDAZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE LA DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Vo. Bo.  
  
M. en C. JOSÉ LUIS MÉNDEZ NAVARRO  
DIRECTOR

C.c.p.- Departamento de Servicios Escolares  
C.c.p.- Experiencia  
C.A.M.N.T./DAD/Exam.

  
Secretaría de Educ. Pública  
Instituto Tecnológico  
de Tuxtla Gutiérrez,  
Div. de Est. Profesionales



## AGRADECIMIENTOS

- ❖ Al Dr. Joaquín Adolfo Montes Molina y al Dr. Víctor Manuel Ruiz Valdiviezo:  
Por invitarme a formar parte de este proyecto.
- ❖ Al Dr. Reiner Rincón Rosales: Por sus acertadas correcciones dentro de este proyecto.
- ❖ A la Dr. Yohana Sarria Guzmán: por aceptarme dentro de su equipo, y de que me haya permitido trabajar en cada uno de sus proyectos, de ella aprendí mucho, sobre cómo ser mejor persona y de recuperar mi confianza y hacerme valer por mí mismo.
- ❖ Al Dr. Yosef Chávez por sus consejos y por el buen recibimiento que me dio en la ciudad de México y sobre todos por los consejos que me brindo durante la realización de este trabajo.
- ❖ Al Dr. Luc Dendooven y al CINVESTAV unidad-Zacatenco, por permitirme participar en una estancia y de poder ampliar mis conocimientos y ampliar mis oportunidades.
- ❖ A mis padres y familia: que sin ellos nada de esto hubiera sido posible ya que ellos forman parte de este sueño, ellos más que nada me dieron el impulso a salir adelante cada triunfo en mi vida, es mi forma de darles las gracias de lo que han sacrificado por mí.
- ❖ A mis amigos y compañeros: gracias por este periodo escolar 2009-2014, que fue una de mis mejores etapas en la vida, el compañerismo y la amistad que hubo con cada uno de ellos significo mucho para mi durante mi estadía en la universidad.
- ❖ A dios por darme tantas bendiciones en mi vida y que nunca me ha dejado solo, contando con su presencia donde quiera que yo vaya.

En la vida no hay imposibles todo depende de la mente de cada persona.  
(VCV).

Lograr lo imposible solo lleva más tiempo  
(*David Milarch*).

Si buscas resultados distintos no hagas siempre lo mismo.  
(Albert Einstein).

La vida es así de hermosa y tan bella,  
Y tan insignificativa, pues así es la vida  
Y demos una paseo, por todo este mundo porque  
Solo por ti y solo por ti, la vida es muy bella.  
(lost highway – bon jovi – la vida es bella por ti)

## INDICE

### Contenido

|       |  |        |
|-------|--|--------|
| I.    | INDICE DE FIGURAS.....   | VI     |
| II.   | INDICE DE CUADROS.....   | VI     |
| III.  | RESUMEN.....   | VII    |
| 1.    | INTRODUCCIÓN. ....   | - 9 -  |
| 2.    | DEFINICIÓN DEL SUELO. ....   | - 10 - |
| 2.1   | Bacterias.....   | - 10 - |
| 2.2   | Clasificación de los antibióticos.....   | - 11 - |
| 3.    | RESISTENCIA MICROBIANA A LOS ANTIBIÓTICOS.....   | - 14 - |
| 3.1   | Factores que desencadenaron la resistencia a los antibióticos.....                                   | - 14 - |
| 3.2   | Clasificación de la resistencia microbiana.....  | - 18 - |
| 3.3   | Clasificación de los procesos de intercambio genético.....   | - 19 - |
| 3.4.1 | Transformación.....  | - 19 - |
| 3.4.2 | Conjugación.....   | - 20 - |
| 3.4.3 | Recombinación no homóloga o transposición.....   | - 21 - |
| 3.4.4 | Transducción.....  | - 22 - |
| 3.4.5 | La mutación y el proceso de adquisición de genes de resistencia a antibióticos en las bacterias..... | - 23 - |
| 3.5   | Mecanismos de resistencia a antibióticos.....  | - 25 - |
| 4.    | EXTRACCION DEL DNA.....  | - 27 - |
| 4.1   | Gen 16s.....   | - 29 - |
| 4.2   | Reacción en Cadena de la Polimerasa.....   | - 30 - |
| 4.3   | Tipos de PCR.....  | - 31 - |
| 4.4   | Análisis de las secuencias.....  | - 32 - |
| 5.    | JUSTIFICACION.....   | - 34 - |
| 6.    | HIPOTESIS.....   | - 35 - |
| 7.    | OBJETIVOS.....   | - 35 - |
| 8.    | MATERIALES Y METODOS.....  | - 36 - |
| 8.1   | Procedencia y toma de las muestras de suelo.....   | - 36 - |
| 8.2   | Activación de la microbiota del suelo.....   | - 36 - |

|     |   |        |
|-----|---|--------|
| 8.3 | Cultivo primario del extracto de suelo.....   | - 37 - |
| 8.4 | Cultivo secundario y ensayo de resistencia.....   | - 37 - |
| 8.5 | Cosecha de los cultivos provenientes del ensayo de resistencia y extracción de DNA.....   | - 38 - |
| 8.6 | Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento V1-V3 del gen 16S rRNA. .... | - 39 - |
| 8.7 | Purificación de los productos de PCR.....   | - 40 - |
| 8.8 | Cuantificación de los amplicones purificados.....   | - 41 - |
| 9   | RESULTADOS.....   | - 42 - |
| 10  | DISCUSION. ....   | - 45 - |
| 11  | CONCLUSIONES.....   | - 48 - |
| 12. | BIBLIOGRAFÍAS.....  | - 49 - |

## I. INDICE DE FIGURAS

| <b>N°</b> |  | <b>Pagina</b> |
|-----------|--|---------------|
| 1         | Clasificación de algunos antibióticos de acuerdo al mecanismo de ataque dentro de la célula.   | 12            |
| 2         | Evolución de los microorganismos adaptándose a varios antibióticos con el paso del tiempo.   | 15            |
| 3         | Relación de los factores de contaminación del suelo con la resistencia microbiana que hay en este ecosistema                               | 17            |
| 4         | Principales mecanismos más comunes es la transferencia horizontal de genes que se realiza entre células de diferentes especies             | 19            |
| 5         | Proceso del mecanismo de transformación.   | 20            |
| 6         | Transferencia de genes por vía de la conjugación   | 21            |
| 7         | Mecanismo de transposición.  | 22            |
| 8         | Mecanismo de transducción.   | 23            |
| 9         | Mecanismos de resistencia a) permeabilidad de la membrana; b) modificación del antibiótico; c) inactivación enzimática d) bombas de flujo. | 25            |
| 10        | Ubicación del gen 16s dentro del ribosoma bacteriano   | 29            |
| 11        | Resultado de una pirosecuenciación.  | 33            |
| 12        | Muestreo de los 3 sitios en Tuxtla Gutiérrez   | 36            |
| 13        | Activación de la microbiota y cultivo primario del extracto de suelo.  | 42            |
| 14        | Cultivo secundario y ensayo de resistencia   | 43            |
| 15        | Electroforesis de una placa de agarosa en donde se tiñeron productos de DNA extraídos del suelo.   | 43            |
| 16        | Electroforesis de una placa de agarosa en donde se tiñeron productos de PCR  | 44            |
| 17        | Electroforesis de una placa de agarosa donde se tiñeron productos purificados de ADN.  | 44            |

## II. INDICE DE CUADROS

| <b>N°</b> |   | <b>Pagina</b> |
|-----------|---|---------------|
| 1         | Diferentes tipos de antibióticos y sus principales mecanismos de acción | 13            |
| 2         | Ensayo de los antibióticos por clase y nombre comercial                 | 38            |
| 3         | Cuantificación de DNA de la diferentes muestras de suelo                | 45            |

### **III. RESUMEN**

El presente trabajo comprende la primera etapa de un proyecto mayor, encaminado al estudio de bacterias resistentes a antibióticos provenientes del suelo, que consistió en el establecimiento de cultivos microbianos, en un Medio de cultivo con extracto de levadura (PY). Se ensayó un total 25 antibióticos comerciales en tres extractos diferentes de suelo; 1) Un suelo urbano expuesto permanentemente a aguas contaminadas, 2) Un suelo de uso agrícola y 3) Un suelo perteneciente a un área natural. Después de una incubación de 10 días con el antibiótico, se extrajo el DNA de las bacterias resistentes. El material genético se purificó, se cuantificó y se amplificó la región V1-V3 del gen 16S rRNA obteniendo un tamaño molecular de 500pb. Por último los amplicones se purificaron y se cuantificaron. Finalmente los productos de amplificación obtenidos en el presente trabajo de licenciatura, servirán para un estudio más complejo, que pretende pirosecuenciar las librerías obtenidas, e identificar los grupos bacterianos, así como la riqueza y abundancia de estos grupos con la ayuda de programas bioinformáticos.

## 1. INTRODUCCIÓN.

El resistoma ha sido definido como la colección de genes de resistencia, que de manera directa o indirecta han contribuido al aumento de comunidades bacterianas resistentes a antibióticos, presentes en el suelo. (Perry and Wright, 2013).

Esta capacidad de resistencia consiste en que ciertos microorganismos poseen genes de resistencia, que a su vez activan mecanismos fisicoquímicos que desvían la acción del antibiótico. Lo que hace que pueda resistir altas dosis de fármacos, dejando de ser vulnerables a los mecanismos de acción de los antibióticos. Esta capacidad les ha permitido a las bacterias poder reanudar su reproducción bajo condiciones altas de fármacos en donde otros microorganismos no resistirían (Cloete, 2003).

Esta estrategia de supervivencia es debida en primera instancia a las presiones evolutivas, que han permitido que dichos microorganismos desarrollen genes de resistencia a antibióticos (GRAs), que desactivan la función de los medicamentos (Martínez, 2014). Y en segunda instancia a los altos niveles de contaminación que hay presente en los suelos.

Los niveles de resistencia microbiana a antibióticos (RMA) que experimentan los suelos son ocasionados por diversos factores que se van relacionando entre sí. Por ejemplo la contaminación del suelo, donde el uso constante de aguas residuales en el riego de los cultivos, ha ocasionado que los microorganismos resistentes encontrados en las aguas residuales, intercambien genes de resistencia con los microorganismos presentes en los suelos (Cytryn, 2013).

Otro factor importante es la fertilización de los suelos con abono de animales de granja, tratados previamente con medicamentos (Durso and Cook, 2014). Donde el uso irracional de los fármacos, ha favorecido la aparición de genes de resistencia en todos los tipos de microorganismos, dentro de las heces fecales de los animales, (Walsh, 2013) y que han sido dispersados hacia otras bacterias de manera horizontal como vertical por la transferencia genética (Kelly et al., 2009).

Todos estos factores contribuyen en la propagación y aumento de las comunidades microbianas resistentes a antibióticos, que pueden llegar al ser humano por medio de la cadena trófica causando enfermedades infecciosas (Finley et al., 2013).

Esto justifica la necesidad de extraer el DNA metagenómico de las comunidades bacterianas del suelo, con la finalidad de amplificar el gen 16s RNA para la pirosecuenciación e identificación taxonómica de los amplicones obtenidos de cada secuencia de ácido nucleico.

## **2. DEFINICIÓN DEL SUELO.**

El suelo es un cuerpo natural que está compuesto de minerales y materiales orgánicos, diferenciados en horizontes de profundidad variable, que difiere de material rocoso, con composición fisicoquímica y de características biológicas. Considerado como un componente universal de vida microscópica debido a que en el encontramos varias formas de vida, en donde las bacterias se han vuelto en uno de los seres más abundantes y variables dentro de este ecosistema (Osman 2012).

Las bacterias son uno de los seres más numerosos que ha existido sobre la tierra, llegando exitosamente cada rincón del planeta, Su presencia y actividad son esenciales para la salud así como el funcionamiento adecuado de todos los ecosistemas (Hirsh et al., 2010). Esta capacidad de funciones que tienen los microorganismos se debe a su gran versatilidad bioquímica, que está basada en una enorme cantidad de reacciones como: oxidaciones, reducciones y precipitaciones, sobre elementos y componentes presentes en el suelo y que de manera directa o indirecta gobiernan todos los procesos bioquímicos (Mathews et al., 2002).

### **2.1 Bacterias.**

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares que se distinguen de las eucariotas por no poseer un núcleo o membrana nuclear, su material genético está constituido por una molécula de DNA y por pequeños fragmentos de ácidos nucleicos extracromosómicos (llamados plásmidos) imprescindibles para el intercambio genético (Alberts et al., 2002).

Principalmente están compuestas por una membrana de doble capa lipídica que los protege de la lisis osmótica, su tamaño oscila entre 0.3 – 3 mm, clasificándose en cocos, bacilos y espirilos, además de que pueden dividirse en dos grandes grupos, Gram-positivas y Gram-negativas. (Alberts et al., 2002).

Desde el nacimiento del hombre las bacterias han venido ocasionando un sin número de enfermedades infecciosas, donde a partir de ese momento surgió la idea de detener estas infecciones con la ayuda de sustancias químicas no tóxicas que pudieran combatirlas.

Alexander Fleming, un científico escocés (1881-1955), descubrió la penicilina que produce un hongo del género *Penicilium*, a partir de ahí se marcó un hecho histórico empezando la era de la farmacología, desde aquella época hasta nuestros días los antibióticos se han vuelto en una herramienta imprescindible para el combate de las enfermedades infecciosas que han sido causadas por las bacterias (Torres, 2012).

## 2.2 Clasificación de los antibióticos.

Los antibióticos son compuestos de origen natural sintético o semisintético, con la función de eliminar o de detener el crecimiento de cualquier tipo de bacteria. Los antibióticos se distinguen por tener diferentes mecanismos de acción ante las células microbianas, siendo aplicados en diferentes áreas de la salud; como la medicina, la seguridad alimentaria, veterinaria, ganadería y la agricultura (Torres, 2012).

Debido a la amplia variedad de antibióticos, existen diferentes sistemas de clasificación siendo; el origen del antibiótico, el tipo de acción que ejercen y por el mecanismo de acción que desempeñan dentro de la célula.

### 1. Por el origen de sus componentes

- Naturales: producidos por varios microorganismos que varían entre hongos y bacterias por ejemplo *actinomicetos y streptomycetos* que se encuentran en el suelo y que producen antibióticos como **estreptomycina y penicilina**.
- Semisintéticos: obtenidos a partir de la producción microbiana mezclado con agentes químicos para reforzarlos.
- Sintéticos: elaborados a partir de mezclas químicas (como **quinolonas, betalactámicos y macrolidos**) (Chapman, 2003).

2. En la industria farmacéutica existen 2 tipos de antibióticos basados en la acción que ejercen ante las poblaciones microbianas. Usando el término **static** que hace referencia a los bacterio**státicos**; que se utilizan para inhibir el crecimiento microbiano. Y el sufijo **cida** que es usado para los agentes bacterio**cidas** que poseen la capacidad de destruir a las bacterias (Wright, 2012).
- 3 Los antibióticos también se pueden clasificar de acuerdo al mecanismo de acción que realizan dentro de la célula, ya que actúan en organelos específicos. Como lo podemos observar en la siguiente Figura 1 y cuadro 1.

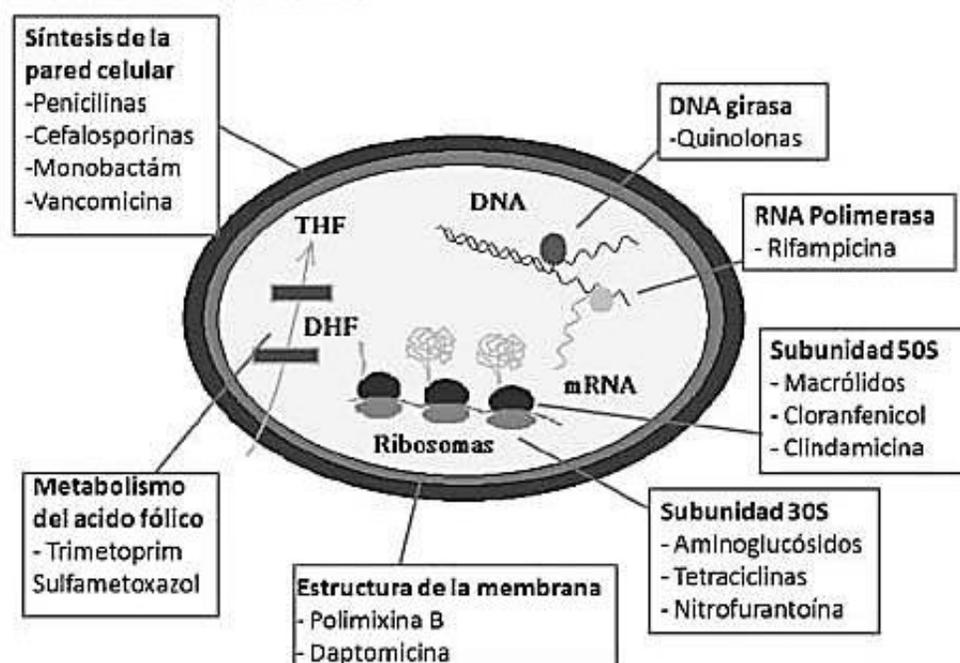


Figura 1: Clasificación de algunos antibióticos de acuerdo al mecanismo de ataque dentro en la célula (Taroco et al., 2006).

Cuadro 1: Diferentes tipos de antibióticos y sus principales mecanismos de acción (Maguiña et al., 2006).

| Grupos de antibiótico  | Mecanismo que desempeñan                   | Como funciona  |
|--|--|--|
| Penicilina, cefalosporinas, carbapenems, monobactams, cicloserina, vancomicina, teicoplanina, bacitracina, antifungicos (clotrimazol, fluconazol, itraconazol) | Inhiben la síntesis de pared celular.      | Forman un enlace covalente entre el antibiótico y las enzimas que llevan a cabo la síntesis del peptidoglicano impidiendo su regeneración. |
| Nistatina, anfotericina, Polimixinas y antifungicos  | Afectan la membrana celular                | Interfieren con la permeabilidad y ocasionan la pérdida de material intracelular   |
| Clorafenicol, macrolidos, azucares complejos, espiramicina, y virgiamicina.  | Inhiben la síntesis proteica               | Atacando la subunidad ribosomal 50s  |
| Aminoglucosidos, estreptomina y tetraciclinas.   | Inhiben subunidad ribosomal 30s            | Forman enlaces covalentes con la región de RNAr 16S.   |
| rifamicinas,   | Afectan el metabolismo de ácidos nucleicos | Inhiben la RNA polimerasa  |
| Quinolonas   | Afectan el metabolismo de ácidos nucleicos | Inhiben la DNA polimerasa  |
| Sulfonamidas y trimetoprima  | Alteran el metabolismo energético          | Inhibiendo la síntesis de ácido fólico.  |

Los antibióticos actúan en diferentes partes de la célula llevando a cabo su mecanismo de acción, en donde primero deben atravesar la pared celular y llegar al sitio de reacción donde llevara a cabo su mecanismo de acción (Martínez, 2014).

Estos pasos son fundamentales para lograr la lisis celular, pero el tiempo que tarda el antibiótico en atravesar la pared y de llevar a cabo su mecanismo de acción es determinante para la bacteria, ya que en ese lapso el antibiótico puede ser desactivado por los genes de resistencia (Finley et al., 2013), así la bacteria seguirá reproduciéndose.

Aunque los antibióticos se han ido renovando para ser más eficaces elaborando hasta antibióticos de nueva generación. Las bacterias debido a las altas tasa de crecimiento, han evolucionado drásticamente, esto aunado a varios factores externos que han ocasionado la propagación de los genes de resistencia, en varios obteniendo como resultado varias comunidades bacterianas resistentes a antibióticos (Dantas et al., 2008).

### **3. RESISTENCIA MICROBIANA A LOS ANTIBIÓTICOS.**

#### **3.1 Factores que desencadenaron la resistencia a los antibióticos.**

- El uso de los medicamentos

El uso constante de los antibióticos por parte de las personas y en las clínicas ha provocado que las comunidades microbianas se adapten, tolerando altas dosis de fármacos, dejando de presentar vulnerabilidad ante a los mecanismos de acción (Perry and Wright, 2013). Según estudios en donde se realizaron antibiogramas (pruebas de resistencia a antibióticos), en diferentes clínicas se demostró que la resistencia microbiana va en aumento ya que cada vez son menos los antibióticos que logran inhibir el crecimiento microbiano, como puede verse en la Figura 2 (D´Costa et al., 2006).

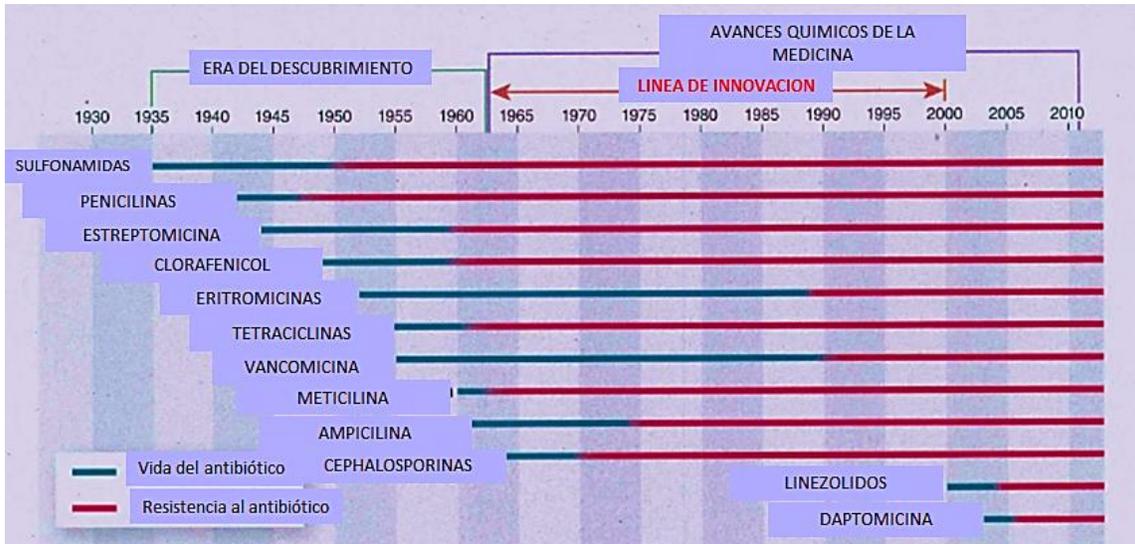


Figura 2: Evolución de los microorganismos adaptándose a varios antibióticos con el paso del tiempo (Dantas and Sommer 2014).

- La contaminación

El abuso sobre los recursos naturales así como el avance tecnológico e industrial, ha tenido un impacto negativo en los ecosistemas, modificando la estructura fisicoquímica de los suelos, afectando a varios microorganismos, ocasionando una mutación inducida en las bacterias, convirtiéndolas en microorganismos resistentes a antibióticos (Rizzo et al., 2013).

- La actividad ganadera

Constantemente los animales de granja son atacados por virus y bacterias ocasionando enfermedades infecciosas y que los ganaderos se vean en la necesidad de aplicar antibióticos, sin embargo estos son aplicados sin supervisión médica, abusando del producto farmacéutico, administrando hasta más o menos de lo que dicta la dosis, la práctica de esta actividad ha provocado que los microorganismos sean parcialmente eliminados quedando un porcentaje de la población con vida y que al reproducirse una de las bacterias pueda desarrollar genes de resistencia a antibióticos, abriendo paso a una nueva generación de bacterias (Cytryn, 2013).

Estudios revelaron haber encontrado altas concentraciones de antibióticos en las heces de los animales siendo depositados en el suelo para aplicarse como abono, entrando en contacto con la microbiota de este ecosistema (Durso and Cook, 2014).

- La agricultura

El suelo posee gran diversidad de microorganismos ya que la población microbiana es muy ilimitada, además en el suelo suceden un sin número de procesos químicos y bioquímicos, que han ocasionado la rápida evolución de los microorganismos adaptándose a cualquier tipo de ecosistema llegando al grado de supervivencia en altas dosis de antibióticos (Monier et al., 2011).

Esto lo podemos observar en la práctica de la agricultura tradicional ya que constantemente los agricultores aplican a sus cultivos plaguicidas con el fin de eliminar bacterias patógenas de las plantas, sin saber que así ocasionan que las bacterias desarrollen resistencia a los antibióticos. Entrando los plaguicidas en contacto con la microbiota del suelo (Monier et al., 2011).

Además el uso de aguas residuales para el riego de cultivos, ha provocado un aumento significativo en los procesos de transferencia genética, ya que las bacterias resistentes a los fármacos encontradas en las aguas residuales llegan a intercambiar genes de resistencia con las bacterias presentes en los suelos, impactando sobre estas comunidades microbianas, extendiendo la resistencia a los antibióticos (Durso and Cook, 2014).

Estos factores (ver figura 3) han hecho que en poco tiempo la resistencia microbiana se encuentre presente en varios ecosistemas (Cytryn 2013). Provocando que los genes de resistencia lleguen a todas las bacterias patógenas y que a través del suelo lleguen a los alimentos, siendo difíciles de manejar sucediendo como un ciclo ocasionando varias enfermedades (Wright, 2012).

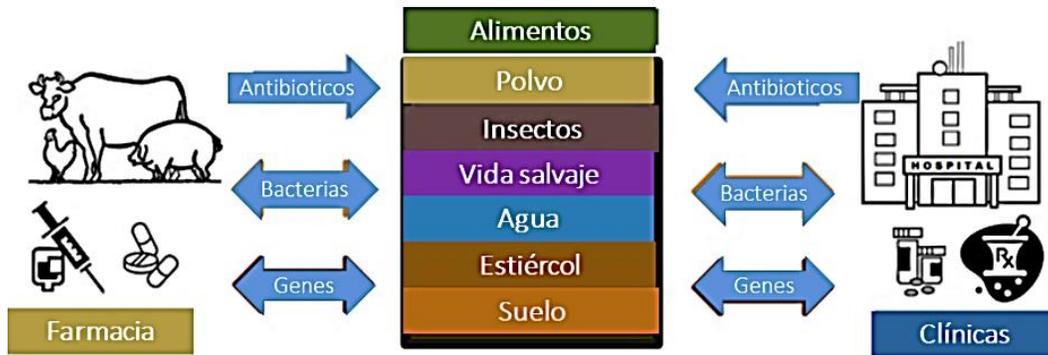


Figura 3: Relación de los factores de contaminación del suelo con la resistencia microbiana que hay en este ecosistema (Durso and Cook, 2014).

Todavía hay mucha incertidumbre sobre el origen de los genes de resistencia a antibióticos, una probable teoría es la propuesta por Dantas et al., (2008) en su artículo plantea que son los microorganismos productores de antibióticos los únicos que pudieron haber contenido este tipo de genes de resistencia, a partir de un estudio que realizó con más de 420 cepas del género **STREPTOMYCES**, que ha sido una bacteria ampliamente estudiada, y que se caracteriza por producir tres tipos de antibióticos de forma natural que son eritromicina, aminoglicosidos así como neomicina (Dantas et al., 2008). Además de que puede codificar una gran variedad de genes de resistencia a antibióticos, desactivando la mayor parte de medicamentos que produce, todo esto a través de enzimas que lleva a cabo reacciones de acetilación y fosforilación que le permitieron convertirse en una bacteria multiresistente a antibióticos (resistiendo a dos o más medicamentos). Estas han propagado los genes de resistencia a través de los mecanismos de transferencia genética, siendo acelerada por los niveles de contaminación presentes en los suelos. (D'Costa et al., 2006).

### **3.2 Clasificación de la resistencia microbiana.**

La resistencia microbiana se clasifica en dos tipos, dependiendo del origen con que se obtuvo el gen de resistencia a antibióticos (Walsh and Duffy, 2013).

Resistencia intrínseca.

Son microorganismos que han adquirido genes de resistencia de forma natural obtenido a partir de la evolución espontánea, es decir que dentro de la población microbiana pueden existir bacterias resistentes, como una consecuencia de una selección natural. En la resistencia intrínseca no hay una exposición al antibiótico (como en la mutación), o procesos de transferencia genética (como la transferencia horizontal de genes) (Martínez, 2014).

Resistencia extrínseca.

Es cuando los microorganismos adquieren los genes de resistencia a antibióticos con los mecanismos de transferencia horizontal y la mutación. La transferencia horizontal de genes (THG) permite el intercambio genético entre dos bacterias a través de plásmidos extracromosómicos, caracterizándose por no distinguir especies ni género de microorganismos, por lo que diferentes bacterias pueden intercambiar genes, contrario de la mutación que solo consiste en cambios genéticos dentro del DNA, causada por la enzima DNA polimerasa (Kelly et al., 2009).

De los dos tipos de resistencia la más común es la resistencia extrínseca que se propaga de manera fácil, llegando a todas las bacterias y microorganismos del suelo (Cytryn, 2013). La transferencia horizontal de genes está compuesta por cuatro mecanismos distintos, estos son los encargados de llevar a cabo el intercambio genético como lo son la transformación, la Conjugación, la Transposición y la transducción (Kelly et al., 2009).

### 3.3 Clasificación de los procesos de intercambio genético.

Los procesos de intercambio genético se dividen en dos tipos, transferencia vertical y transferencia horizontal (que implica el contacto entre dos bacterias). La transferencia horizontal se divide en 4 mecanismos conjugación, transposición, transformación y transducción (Dantas et al., 2014), como se puede ver a continuación en la Figura 6.

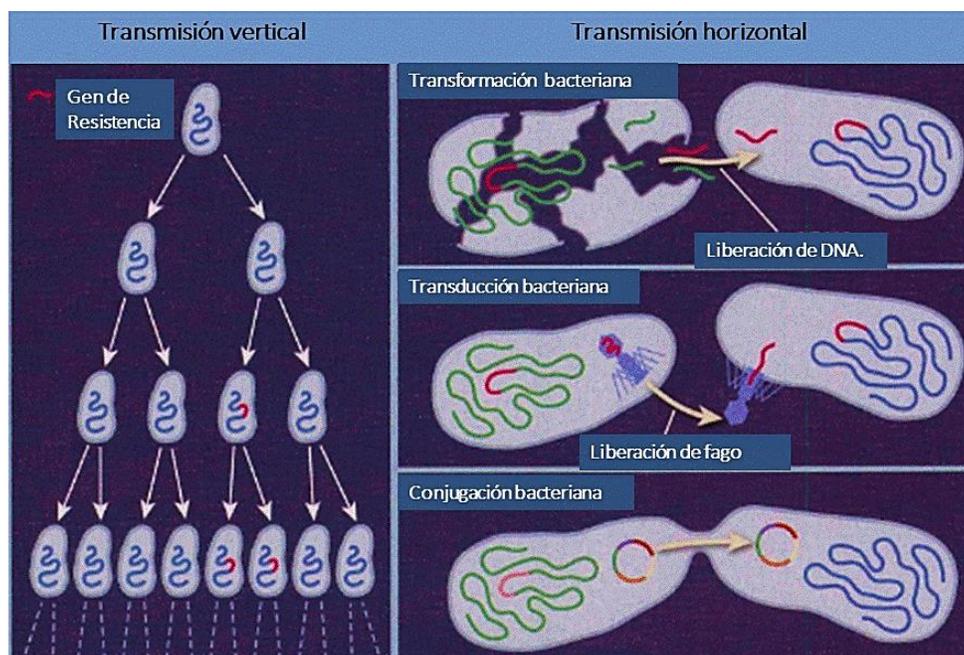


Figura 4: Principales mecanismos más comunes (Dantas and Sommer 2014).

#### 3.4.1 Transformación.

La transformación es la absorción del DNA que penetra por la pared celular, proveniente del medio externo, (Perry and Wright, 2013). Cuando termina el ciclo de vida de una bacteria sus restos pasan a formar parte del medio ambiente, dispersándose en la superficie, siendo adsorbidos por otra bacteria y sufrir una transformación genética gracias a ese fragmento pequeño de DNA que altero su estructura (Kelly et al, 2009).

Las células deben estar en contacto para permitir la creación del mecanismo, el DNA transportado tiene que evitar las nucleasas de restricción del receptor para recombinarse eficientemente, mientras que el destinatario tiene el papel más activo ya que promueve la incorporación del DNA exógeno (Dantas and Sommer, 2014). El método de transformación se lleva a cabo como se ve en la Figura 5.

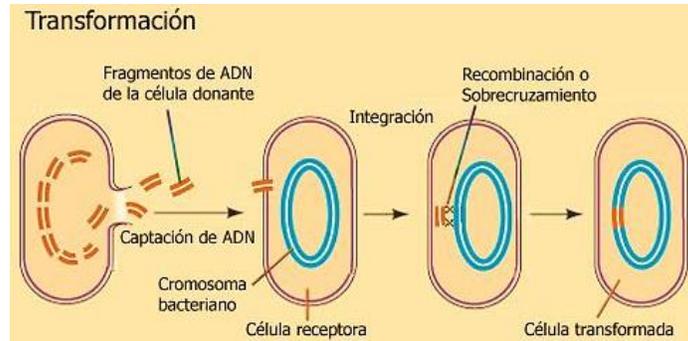


Figura 5: Proceso del mecanismo de transformación (Chen and Dubnau, 2004).

Muchas especies bacterianas son naturalmente transformables, es decir tienen la capacidad natural de captar DNA del medio ambiente (Walsh, 2013).

Lorenz y Wackernage (1994) enumeraron un total de 90 especies descritas como transformables. Estos no incluyen la capacidad de transformación en bacterias no cultivables. La transformación se lleva a cabo en varios tipos de ecosistema, ya que el nivel de transformabilidad y de competencia varía entre cada especie bacteriana (Rensing et al, 2002).

### 3.4.2 Conjugación

La conjugación es el intercambio de plásmidos extracromosómicos entre dos bacterias, para llevar a cabo la conjugación tiene que existir un contacto físico entre la bacteria donadora y la receptora. La capacidad para donar la proporciona un plásmido conjugativo que también se le denomina factor de fertilidad o plásmido sexual (Cytryn, 2013).

La conjugación entre bacterias Gram negativas suele ocurrir a través de Pili sexuales codificados por el plásmido conjugativo, Entre éstos el mejor estudiado es el plásmido F de *Escherichia coli* (M. Fu et al., 2008). Cuando los genes de resistencia a antibióticos están en los plásmidos conjugativos, estos se extienden muy rápidamente a través de diversas especies patógenas (Cox and Wright, 2013).

El mecanismo sucede, cuando el plásmido se rompe en un lugar fijo (llamado origen de transferencia), una de sus cadenas pasa a través del puente citoplasmático creado por el Pili, hasta el citoplasma de la célula receptora (Sommer and Dantas, 2011). Mientras tanto el otro plásmido gira en el citoplasma de la donadora (empleando el mecanismo de replicación por círculo rodante), para sintetizar la cadena complementaria del plásmido dentro de ambas bacterias (Kelly et al., 2013). En la figura 9 se comprende mejor el funcionamiento de este mecanismo.

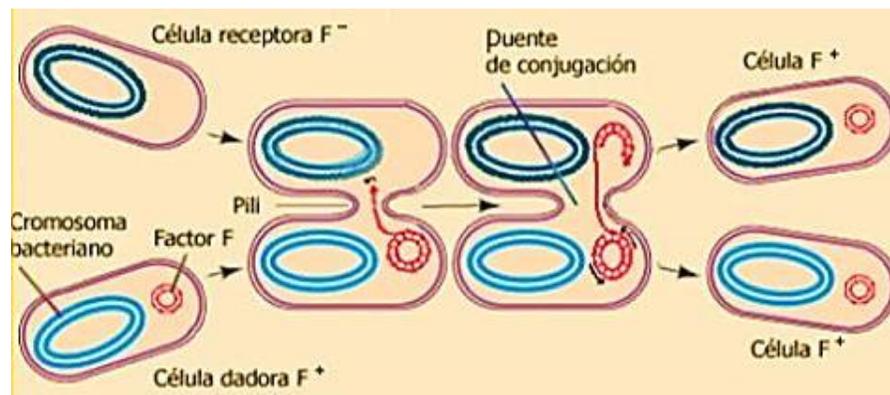


Figura 6: Mecanismo de conjugación a través de los pilis de una célula a otra (Chen et al., 2014).

### 3.4.3 Recombinación no homóloga o transposición.

Los Transposones son fragmentos cortos de DNA capaces de moverse de una secuencia de nucleótidos a otra siempre y cuando posean determinadas secuencias o dianas que permitan su integración, sin necesidad de que exista una similitud de secuencias (B.G Kelly et al., 2013).

Pueden encontrarse integrados en cualquier elemento genético tanto en el código genético, en cromosomas o como en los plásmidos (Rensing et al., 2002). Todos los Transposones poseen la capacidad de provocar su transposición o salto hacia otro elemento genético, ya que también poseen un gen que codifica una transposasa una enzima clave para duplicar la secuencia diana y permitir la integración del transposón (M. Fu et al., 2008).

A veces la transposición es replicativa y una copia del transposón se queda, mientras que la otra se incluye en la diana. Otras veces no se replica sino que se libera de un

replicón y se integra en otro (M. Fu et al., 2008). Algunos Transposones incluyen genes de resistencia a antibióticos que se extienden del cromosoma a los plásmidos o de un plásmido a otro lo que favorece enormemente su diseminación, entre diversas especies de bacterias patógenas (Cox and Wright, 2013). El mecanismo de transposon esta mostrado en la figura 7.

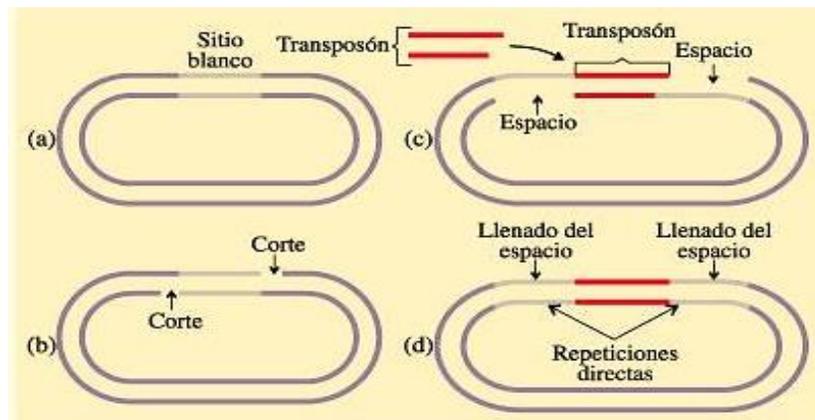


Figura 7: Mecanismos de transposon (Martin et al., 2008).

### 3.4.4 Transducción.

En la transducción son los bacteriófagos los que llevan un fragmento de DNA de la bacteria donadora hasta el citoplasma de la receptora. Este mecanismo es el más importante en el medio ambiente ya que es altamente repetitivo, actuando como un ciclo (Wright, 2010). Cuando los virus infectan a una bacteria, estos depositan su RNA dentro del citoplasma paralizando la replicación de la bacteria cuyo DNA comienza a degradarse y replican el RNA del virus, traduciendo la información precisa para sintetizar nuevas cápsides que se ensamblan rodeando a las copias de RNA fágico liberando nuevos virus dejando la bacteria prácticamente lisada (Perry and Wright, 2013).

A veces, durante estos ciclos líticos se introduce por error DNA de la bacteria infectada, en una cápside del virus, el DNA de la bacteria infectada se acopla al RNA del virus perdiendo la capacidad para infectar bacterias (Dantas and Sommer, 2014). Estos virus llamados ahora bacteriófagos pueden iniciar la infección de otra bacteria a la cual le inyectan de forma automática el DNA que portan de la anterior bacteria a la célula

receptora esta lo acepta y lo integra a su DNA, adquiriendo una nueva información genética (Dantas and Sommer, 2014).

En estos casos el genoma del virus no es completamente inyectado, por lo tanto la bacteria no muere recombinando solamente el fragmento bacteriano adquirido. Cualquier gen de la bacteria donadora tiene igual probabilidad de ser traducido y posteriormente recombinado (Rensing et al., 2002), este mecanismo lo podemos ver en la figura 8.

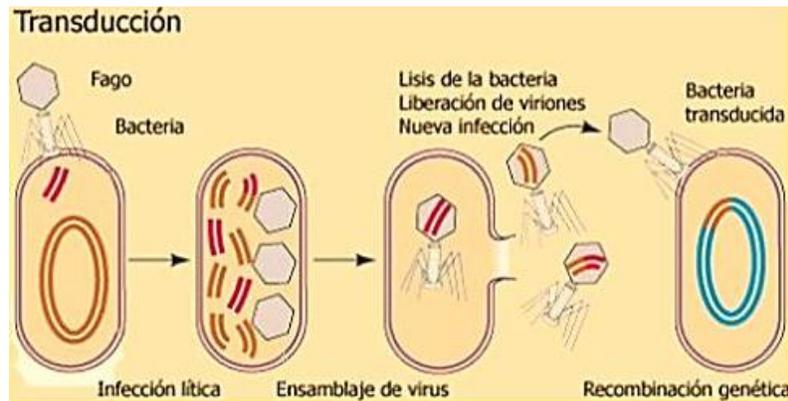


Figura 8: Mecanismos de transducción (Butler, J.M. 2005).

### 3.4.5 La mutación y el proceso de adquisición de genes de resistencia a antibióticos en las bacterias.

La mutación se define como cambios que se dan en la información genética, básicamente las mutaciones se dividen en naturales (espontaneas), errores que cometió la enzima polimerasa durante la replicación del DNA, y/o inducidas provocadas artificialmente por exposición a agentes químicos u otros agentes mutágenos (Sommer and Dantas, 2011).

Cuando una bacteria presenta varias mutaciones espontaneas puede ser ventajoso para el microorganismo, ya que le brinda nuevas capacidades, o bien podría afectarla provocándole lisis celular (Kozhevin et al., 2012).

Las bacterias pueden acumular varios errores durante la replicación del DNA, generando varias mutaciones espontaneas llegando al grado de que en la reproducción microbiana, estos errores sean transmitidos a otras bacterias descendientes, por medio de la transmisión vertical y horizontal, brindándoles la

capacidad incluso de tolerar altas concentraciones de antibióticos (Kozhevin et al., 2012).

Aunque la mutación tiene una probabilidad de 1 en un billón, recordemos que las bacterias poseen la capacidad de multiplicarse exponencialmente ocasionando una evolución acelerada, manifestando varios errores genéticos en el DNA (Dantas and Sommer 2014), cambiando la estructura genética de varios microorganismos adquiriendo la capacidad de resistir a los antibióticos.

Este mecanismo sucede cuando los microorganismos Entran en contacto con los antibióticos, desarrollando genes de resistencia, generados por la mutación inducida (La presión constante de los antibióticos provoco que los microorganismos sufrieran mutaciones, obteniendo como consecuencia genes de resistencia (Perry and Wright, 2013). Adaptándose a varios fármacos incrementando así la prevalencia de la bacteria ante los demás microorganismos de la población (Kozhevin et al., 2012).

Aunque cabe aclarar que para que una bacteria desarrolle genes de resistencia se necesitan múltiples ciclos de mutación y de selección, las bacterias poseen la habilidad de evolucionar muy rápido, debido a las altas tasas de evolución que presentan (Chen et al., 2014). Esto quiere decir que en términos de días las bacterias habrán adquirido varios tipos de genes, obteniendo varias ventajas, como la capacidad de resistir no solo a los antibióticos sino que también a la temperatura, presión osmótica, y ciclos de esterilización (Kozhevin et al., 2012).

Todos los procesos de intercambio genético tienen como finalidad la alteración genética del DNA, con el objetivo de que la célula obtenga nuevas habilidades, reemplazando por completo la generación anterior formando nuevos microorganismos con habilidades que antes no se tenía, llevando a cabo la evolución celular (Walsh, 2013).

Entre estos genes se encuentran aquellos que confieren resistencia a los antibióticos donde a través de mecanismos de resistencia se desactiva la función del antimicrobiano, bloqueando su acción bactericida o bacteriostática (Chapman, 2000)

### 3.5 Mecanismos de resistencia a antibióticos.

Los mecanismos de resistencia a antibióticos, son activados por los genes de resistencia y están encargados de reducir el efecto bactericida o bacteriostático de los antibacterianos, con el fin de proteger a la bacteria. (Dantas and sommer, 2014). Tal y como se observa en la figura 9.

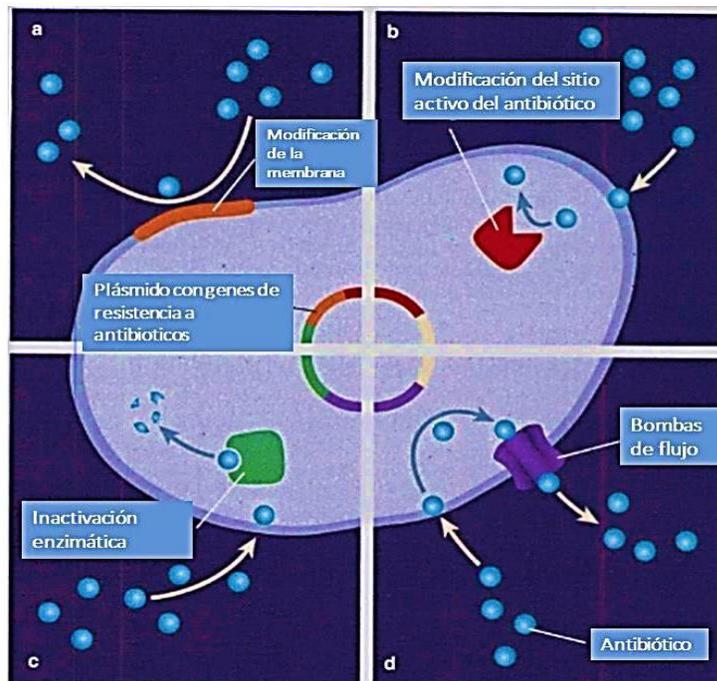


Figura 9: Mecanismos de resistencia a) permeabilidad de la membrana; b) modificación del antibiótico; c) inactivación enzimática d) bombas de flujo (Dantas and Sommer, 2014).

#### 1. Permeabilidad de la membrana

Es un mecanismo de resistencia que se adquiere de forma natural que reconoce a los antibióticos modificando la permeabilidad de la membrana, (cambiando de tamaño los poros) dejando entrar las moléculas más pequeñas como las biomoléculas, interrumpiendo el paso de las moléculas grandes como lo es en el caso de los antibióticos, en algunos casos la membrana celular también bloquea el acceso de las moléculas, seleccionando solamente las que necesita, interviniendo enzimas como porinas que reconocen las moléculas permitiendo el acceso o bloqueo de moléculas (Cox and Wright, 2013).

## 2. Modificación enzimática del antibiótico

Contrariamente al mecanismo anterior este es adquirido por la mutación y el intercambio genético, que consiste en modificar el sitio activo del antibiótico llevando a cabo reacciones químicas que hacen que la estructura química del sitio activo sea modificado llevando a cabo reacciones de hidrólisis enzimática, fosforilación, acetilación y metilación, destruyendo por completo el sitio activo de reacción del antibiótico, sin resultarle perjudicial al crecimiento microbiano (Dantas and Sommer, 2014).

## 3. Desactivación enzimática del antibiótico

El gen de resistencia codifica una enzima que le ayuda a la célula en destruir al antibiótico antes de lograr la lisis celular (Chen et al., 2014). Este gen ha sido ampliamente estudiado debido a su gran rapidez para la producción de enzimas. La  $\beta$ -lactamasa es la enzima responsable de la desactivación de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, la clase más amplia de medicamentos (Kozhevin et al, 2012).

## 4. Bombas de flujo

Ocurre cuando los genes de resistencia a antibióticos codifican de manera directa proteínas, con la función de expulsar a los antibióticos fuera de la célula, manteniendo así una concentración interna suficientemente mínima para prevenir la inhibición del crecimiento microbiano, este mecanismo se caracteriza por reconocer a los medicamentos llevando a cabo su expulsión fuera del citoplasma (Gautam et al., 2008). La célula reconoce el gradiente de alta concentración de antibióticos expulsándolos fuera del citoplasma (Cox and Wright, 2013).

Todos estos mecanismos son activados por los genes de resistencia a antibióticos que se encuentran dentro de gen 16s RNA también denominado (rDNA 16s).

Para aislar este gen es necesario contar con protocolos que permitan su extracción. Los protocolos metagenómicos son los encargados de sustraer los ácidos nucleicos de cualquier tipo de ecosistema incluyendo el suelo, extrayendo el DNA para estudios posteriores como la amplificación y la pirosecuenciación de los ácidos nucleicos (Ronaghi, 2001).

#### **4. EXTRACCION DEL DNA.**

El suelo, las plantas y el agua albergan una cantidad infinita de microorganismos; realizar un aislamiento de todos estos microbios es imposible, ya que las técnicas de aislamiento usado en los laboratorios solo logra obtener el 1% de todos los tipos de microorganismos, que pudieran estar presentes en la muestra (Hirsh et al., 2010).

A partir de este hallazgo se optó por buscar protocolos que permitieran la extracción de DNA de cualquier ecosistema, sea (suelo, agua, plantas o animales) (P. Robe et al., 2003). Abriendo paso a la metagenómica definida como el área encargada de estudiar un conjunto de genomas dentro de un determinado entorno. Desarrollando las técnicas de extracción de DNA (Berta et al., 2014).

Las técnicas de extracción del DNA se dividen en dos grupos, dependiendo de la finalidad de estudio que se quiera realizar.

1. Técnicas directas; estas técnicas consisten en realizar la extracción directamente de la muestra de estudio, extraer el DNA directamente de la muestra nos permite una evaluación total de todos los microorganismos abarcando tanto microorganismos cultivables como no cultivables (P. Robe et al., 2003).
2. Técnicas indirectas; estos protocolos extraen el DNA solamente de microorganismos cultivables, ya sea del medio ambiente o de seres vivos como plantas y animales, estos protocolos se diferencian entre sí porque la segunda opción realiza una incubación en un medio de cultivo nutritivo donde la muestra es depositada para la obtención viable de microorganismos, y a partir de ahí realizar la recolección de microorganismos para la extracción metagenómica del DNA (P. Robe et al., 2003).

Aunque ambas técnicas consisten en pasos similares, la extracción de DNA va enfocada a puntos distintos ya sea si se quieren estudiar todos los microorganismos de un entorno predeterminado, o si solo quiere estudiarse la viabilidad de los microorganismos de determinados ambientes para hacerlos crecer en los medios de cultivo.

Todos los protocolos de extracción coinciden en un paso fundamental; la destrucción o lisis celular. Para esto puede recurrirse a tres tipos de técnicas que son.

1. Métodos físicos
2. Métodos químicos
3. Métodos enzimáticos

Los tratamientos físicos atraviesan la estructura del suelo y tienen un mayor acceso a las comunidades bacterianas del suelo llegando a varias profundidades de la muestra. Estos tratamientos se caracterizan por lisar de forma mecánica a las células, una alternativa que actúa de forma natural, siendo los tratamientos más usados en los laboratorios (Zhao and Xu, 2012).

- a. Choque térmico; este tipo de lisis se fundamenta en los cambios bruscos de temperatura. Cambiar de una temperatura mayor a una temperatura menor en un intervalo corto de tiempo provoca la lisis celular, de todos los microorganismos obteniendo gran cantidad de DNA (P. Robe et al., 2003).
- b. Arena; algunos métodos físicos recurren al uso de la arena como una alternativa natural de llevar a cabo la lisis. Esto consiste en que la arena atraviese la estructura del suelo, y que lleguen a las células perforándolas para así dejar el DNA fuera del citoplasma, todo esto sucede al agitar vigorosamente la muestra con un poco de arena (Zhao and Xu, 2012).
- c. Molienda con nitrógeno líquido; en este método se emplean temperaturas de congelación mayores a la del agua, temperatura que los microorganismos no pueden soportar llevando a cabo la lisis celular, realizando al final una molienda para el desprendimiento del DNA de los microorganismos presentes en la muestra (Zhao and Xu, 2012).

Los métodos químicos y enzimáticos emplean reactivos y enzimas basándose en las propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos, como su solubilidad, precipitación y pH, que logren desactivar la actividad microbiana, obteniendo el paquete genético. Una vez que este es extraído, el siguiente paso será la amplificación del gen 16s un paso que es fundamental para la identificación filogenética de las bacterias (P. Robe et al., 2003).

### 3.1 Gen 16s.

El gen 16s es un polirribonucleótido conformado por más de 1500pb que se encuentra localizado en el ribosoma bacteriano dentro de una subunidad pequeña denominada 30s (ver figura 10), (Harms et al., 2000), este gen ha sido ampliamente estudiado ya que presenta varias ventajas, siendo aplicado en muchas ramas de la genética, por las ventajas que presenta siendo:

1. Se trata de una molécula muy antigua, presente en todas las bacterias actuales. Constituyendo, por tanto, una diana universal para la identificación de microorganismos.
2. Su estructura y función han permanecido constantes durante mucho tiempo permitiendo detectar cambios en la secuencia genética del microorganismo al ser comparado con las bases de datos de los bancos genómicos en los análisis bioinformáticos, de modo que las alteraciones en la secuencia genética pueden reflejar cambios aleatorios probablemente como las mutaciones genéticas.
3. La conservación y estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso.
4. Dado que resulta relativamente fácil secuenciar los rDNA 16S existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento (Rodicio y Mendoza, 2014).

Estas ventajas han logrado que este gen tenga una infinidad de aplicaciones como la amplificación del gen 16s, que consiste en la finalidad de obtener múltiples copias de las cadenas de ácidos nucleicos con un tamaño molecular específico, a partir de una hebra de DNA.

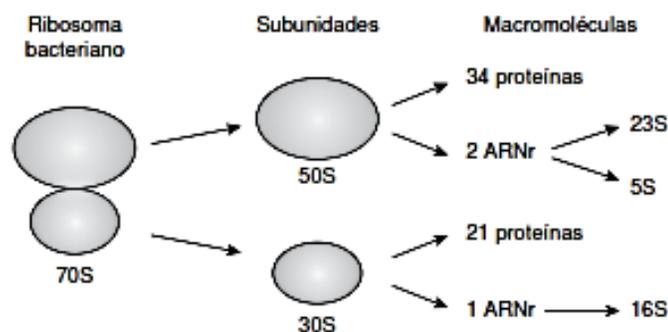


Figura 10: Ubicación de la subunidad 30s (Rodicio y Mendoza 2014).

## 4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PCR son las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction o Reacción en cadena de la polimerasa. La idea básica de esta técnica consiste en la obtención de múltiples copias de una secuencia predeterminada de DNA mediante varios ciclos repetitivos donde la secuencia de DNA será copiada fielmente obteniendo varias secuencias de un mismo tamaño molecular (Tamay de dios and cols, 2013).

La PCR funciona gracias a un equipo llamado termociclador el cual es capaz de alcanzar temperaturas de 4°C a 100°C en intervalos pequeños de tiempo, durante la PCR el equipo maneja tres tipos de temperatura donde suceden diferentes fases de reacción, indispensables para la amplificación del DNA.

1. Desnaturalización (95°C), En esta fase el equipo se encuentra a la temperatura de 95°C donde la cadena de DNA es separada en dos simples hebras, empezando el desenrollamiento las dos hebras de DNA.
2. Alineamiento (50-60) °C, en esta etapa el equipo baja la temperatura con el fin de que los primers se alineen a las dos cadenas de DNA, el primer forward se acopla en la primera hebra de DNA en la dirección 5' a 3', mientras que el primer reverse se acopla en la segunda hebra de DNA con dirección 3' a 5'. En ese mismo momento la enzima taq polimerasa empieza a sintetizar las dos nuevas cadenas de ácidos nucleicos a partir de las dos cadenas de DNA molde.
3. Elongación (72-75) °C. En esta etapa de amplificación la enzima taq polimerasa alcanza su actividad máxima, continuando con la síntesis de los fragmentos de DNA, con los oligonucleótidos que se habían alineado. La replicación transcurre en dirección 5'- 3' a partir del extremo 3-OH de cada cebador, empleando como sustrato los 4 dNTPs hasta terminar la lectura del DNA molde (Tamay de dios and cols, 2013).

### **4.3 Tipos de PCR.**

Debido a la gran aplicación que tiene la PCR, se han diseñado otras técnicas variables de amplificación de DNA en base al estudio que se pretenda realizar, las técnicas variantes de la PCR común son las siguientes.

#### **1. PCR anidada**

La PCR anidada es una técnica que consiste en la amplificación dentro de un amplicon, mientras que la PCR común se aplica 1 solo par de primers, la PCR anidada utiliza dos pares de primers diferentes, por lo que cuando el DNA es amplificado el segundo par de primers se inserta en una zona específica del DNA, donde la enzima polimerasa vuelve a amplificar las dos hebras, obteniendo un amplicon más específico y sensible reduciendo el tamaño molecular de la doble cadena (Griffiths *et al.*, 2002).

#### **2. PCR de extensión solapada (Mutagénesis)**

Consiste en la introducción de cambios en una secuencia corta de DNA, por lo general para este tipo de técnicas se utilizan fragmentos (clonados), empleando 2 primers o cebadores mutagénicos, amplificando un fragmento 5' y 3', que se solapan entre sí portando ambos fragmentos la mutación, los productos obtenidos de esta reacción vuelven a ser amplificados para producir el DNA mutado de longitud completa (Butler, 2005).

#### **3. PCR *in situ***

Es una técnica que consiste en la amplificación de DNA dentro de las células, esta técnica se caracteriza de las demás por no extraer los ácidos nucleicos, ya que se realiza dentro de la misma célula, llevando a cabo las preparaciones sobre portaobjetos, esta amplificación se logra a través de sondas de ADN/ARN, se utiliza para lograr amplicones específicos dentro de una población microbiana donde la cantidad de secuencias es de menor representación (Bartlett and Stirling, 2003).

#### **4. PCR múltiple**

PCR en la cual se busca amplificar de forma simultanea varias secuencias de ácidos nucleicos partiendo de varios cebadores mezclados dentro de un mismo tubo junto con el resto de reactivos para la reacción, obteniendo como resultado varios fragmentos de ADN (Butler et al., 2001), esta técnica es muy empleada para la rápida construcción de bases de datos de un organismo específico, una de sus principales desventajas es que se requiere de una optimización constante del proceso (Bartlett and Stirling, 2003).

#### **5. PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR)**

Es una técnica que permite la cuantificación del ADN o ARN presentes en la muestra, mientras se desarrolla al mismo tiempo la amplificación del gen. Para lograr esto es introducida en las muestras, pequeñas cantidades de flourocromos que al reaccionar emiten una luz fotoquímica que se traduce como la cantidad de ácidos nucleicos amplificados, obtenidos a partir del termino de cada ciclo (Butler, 2005).

Otras de las aplicaciones importantes que tiene el gen 16s, es su aplicación a la descripción filogenética de microorganismos debido a su gran estado de conservación de las secuencias que lo constituyen (Rodicio y Mendoza, 2014).

Dentro del gen 16s se encuentra una secuencia pequeña que va de la región V1-V3, que se encuentra conformada por 500pb, y que ha servido durante los últimos años como una diana universal. Presente entre todos los microorganismos (Ronaghi, 2001).

#### **4.4 Análisis de las secuencias.**

La técnica de pirosecuenciacion consiste en la secuencia del DNA a través de la detección de relación de pirofosfato (PPi), durante una síntesis de reacciones enzimáticas que generan una luz visible por cada vez que se incorpora un nucleótido en el templado del DNA (Ronaghi, 2001). Básicamente una reacción similar a la de PCR, pero donde un equipo controla e inserta de forma separada cada uno de los 4 tipos de nucleótidos (Ahmadian et al., 2000).

La reacción empieza con la separación del templado de DNA al separarse las dobles hebras, el equipo inserta un grupo predeterminado de nucleótidos, por ejemplo un grupo de moléculas de adenina (A), cuando se inserta el nucleótido en el templado de DNA se libera una molécula de pirofosfato donde una enzima sulfurilasa absorbe la molécula de (Pi) produciendo una molécula de ATP, por ultimo una enzima oxiluciferasa absorbe la molécula de ATP oxidándolo produciendo una luz visible donde los destellos de luz se relacionan con la cantidad de nucleótidos insertados, secuenciando la molécula de DNA (Ronaghi, 2001).

Al final el equipo muestra un resultado grafico llamado pyrograma, esta grafica muestra en el eje de las "X" los grupos de nucleótidos insertados y en el eje de las "Y" muestra la cantidad de nucleótidos que se introdujeron en la hebra de ácido nucleico, de este modo la cadena de DNA se secuencia de forma inversa (ver figura 11). Ya que el pyrograma muestra los nucleótidos añadidos, por ejemplo si el nucleótido añadido fue una molécula de adenina (A), inversamente se sabe que la molécula de DNA, contiene una timina (T), de este mismo modo se va avanzando sobre la secuenciación de la cadena, desde el principio hasta finalizar toda la hebra (Roech et al., 2007).

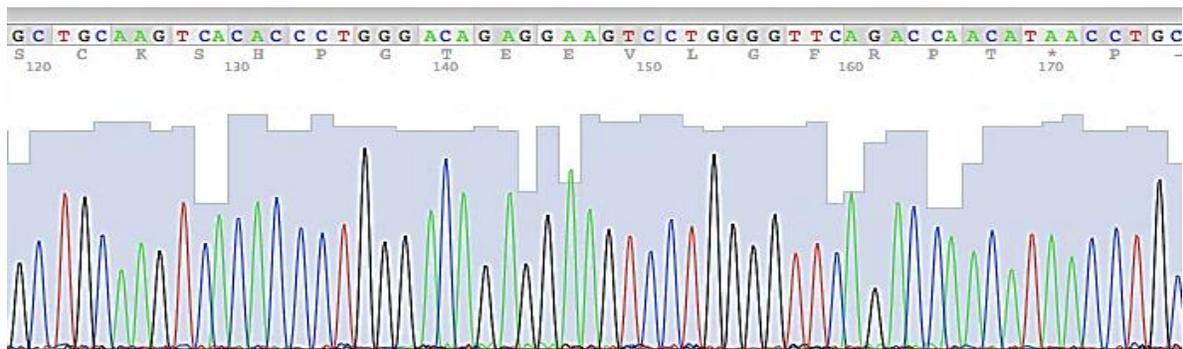


Figura 11: resultado de una secuenciación de DNA a través de PPi (Ronaghi 2001)

## **5. JUSTIFICACION.**

El intercambio genético entre las bacterias del suelo es un fenómeno que se lleva a cabo de una manera natural, como parte del mecanismo evolutivo (Cytryn, 2013). Sin embargo se sabe que entre los genes que intercambian las bacterias, se encuentran los que confieren resistencia a los antibióticos lo cual se traduce en una mayor probabilidad de supervivencia (Kelly et al, 2009).

El mal empleo y uso desmedido de los antibióticos ha dado origen a cepas más resistentes a los medicamentos (Cloete, 2003), por lo que cada vez es más difícil combatirlos, recurriendo a dosis más prolongadas y en algunos casos, antibióticos de nueva generación (Walsh, 2013).

En Chiapas como en la mayor parte de México la falta de recursos económicos y tecnificación para el campo agrícola obliga a los agricultores a buscar maneras más sencillas de incrementar la producción agrícola, por ejemplo la aplicación de abono, a partir de las heces fecales de los animales de crianza, que actúa como un medio fertilizante para el suelo, que han alterado la estructura genética de las bacterias del suelo.

Por otra parte, la falta de conocimiento trae otros problemas, por ejemplo el deterioro ambiental de los ríos que muchas veces son usados como drenaje de aguas residuales (como es el caso del río Sabinál en Tuxtla) contaminando todo aquello que entre en contacto con él.

De este modo los microorganismos con genes de resistencia a antibióticos evolucionados dentro de hospederos animales llegan al suelo, donde pueden interactuar con la microbiota edáfica y conferirles resistencia. Solo entonces dichos microorganismos podrían llegar a los humanos, a través de los alimentos que consumimos.

Por todo lo anterior se justifica la necesidad de realizar estudios encaminados a la extracción de ácidos nucleicos y a la amplificación del gen 16s de la región V1-V3, con fines de averiguar en estudios posteriores la presencia e identidad de microorganismos resistentes a antibióticos en suelos que presentan altos niveles de contaminación como es el caso del “Rio Sabinál” y el campo agrícola en el “terreno la garza” respecto a un suelo no impactado como lo es el de la zona de la “Cascada el Chorreadero” todos ellos dentro del municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

## **6. HIPOTESIS.**

Debido al impacto ambiental que han tenido los suelos por parte de los antibióticos y de los diversos factores de contaminación, esperamos encontrar bacterias resistentes a antibióticos en todas las muestras de suelo.

## **7. OBJETIVOS.**

Objetivo General:

Establecer protocolo para la extracción de DNA metagenómico y amplificación del gen 16S rRNA para su empleo en el análisis del resistóma de suelos.

Objetivos específicos:

1. Extraer el DNA metagenómico de los diferentes tipos de suelos.
2. Establecer las condiciones para la amplificación del gen 16S rRNA.
3. Purificar y cuantificar los amplicones obtenidos.

## 8. MATERIALES Y METODOS.

### 8.1 Procedencia y toma de las muestras de suelo.

El trabajo consideró tres suelos dentro de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, dos impactados por actividades humanas y un suelo control no impactado. El primer suelo impactado proviene de los márgenes del Rio Sabinál (**R1SC**) (**N** 16°45'36.3", **O** 93°09'32.0") que han quedado expuesto cada vez que sube el nivel del agua, el segundo suelo impactado proviene del campo agrícola con monocultivos de maíz en el "terreno de la garza" (**G3SA**) (**N** 16° 23' 28.16", **O** 93° 17' 20.80") y el suelo control originario de la zona perteneciente a la "cascada el chorreadero" (**C2SN**) (**N** 16°45'17.6, **O** 92°58'18.1") (observar figura 12).



Figura 12: Muestreo de los 3 sitios en Tuxtla Gutiérrez: sitio 1: Zona hospitalaria cerca del rio Sabinál, sitio 2: cascada el chorreadero, sitio 3: zona agrícola de la garza.

Las muestras de 500 g se tomaron mediante un muestreo aleatorio simple por triplicado, a una profundidad de 0-15 cm. Los triplicados se juntaron, se homogenizaron y se guardaron a -20 °C hasta su posterior empleo.

### 8.2 Activación de la microbiota del suelo.

Se pesaron 10 gr de suelo por de cada muestra en frascos de vidrio donde a cada frasco se le añadió la cantidad 0.5 g de sulfato de amonio y sacarosa como fuentes de carbono y nitrógeno, después las muestras fueron humedecidas levemente con agua destilada y se mezclaron.

Por último los frascos fueron colocados durante 10 días dentro de un recipiente a temperatura ambiente, con un poco de agua en el fondo para mantener la humedad, con ventilación para evitar la anaerobiosis y en obscuridad.

### **8.3 Cultivo primario del extracto de suelo.**

Al final de la activación, se tomaron 1.9 g de suelo de cada frasco y se resuspendieron con 7.5 mL de Medio de extracto de levadura (PY), en un tubo tipo falcón de 15 mL agitando vigorosamente, inmediatamente después se tomó 1 ml del sobrenadante y se colocó en un matraz Erlenmeyer con 25 ml de Medio de extracto de levadura (PY). Los matraces fueron incubados a 100 rpm, a 25°C durante 7 días (Walsh and Duffy, 2013).

### **8.4 Cultivo secundario y ensayo de resistencia.**

Para el ensayo de resistencia se probaron 25 antibióticos comerciales (**Ver Cuadro 2**) a una concentración de 20 mg/mL en cada uno de los tres tipos de suelo (agrícola, G3SA; contaminado, R1SC y control, C2SN).

En tubos de ensayo con rosca se agregaron 5 mL de Medio de extracto de levadura (PY), más el antibiótico, y 200 µl del cultivo primario del extracto de suelo y se incubaron a 100 rpm, a 25° C por 10 días.

Como control de crecimiento se incubo una alícuota del cultivo primario en Medio de extracto de levadura (PY) sin antibiótico y como control negativo (contra la contaminación) se incubo un tubo con Medio de extracto de levadura (PY) con un antibiótico cualquiera de los 25 disponibles sin inóculo (Walsh and Duffy, 2013).

Cuadro 2: ensayo de los antibióticos por clase y nombre comercial (Walsh and Duffy, 2013).

| <b>ANTIBIÓTICO POR CLASE</b> | <b>ANTIBIÓTICO POR NOMBRE COMERCIAL</b>  |
|------------------------------|--|
| <b>Beta-lactámicos</b>       | <b>1) Penicilina, 2) Dicloxacina, 3) Cefotaxima, 4) Cefalotina, 5) Benzatina bencilpenicilina, 6) Ampicilina, 7) Ceftazidima, 8) Ceftriaxoz, 9) Fosfomicina, 10) Cefuroxima.</b> |
| <b>Glicopeptidos</b>         | <b>11) Vancomicina, 12) Bacitracina.</b>   |
| <b>Aminoglucósidos</b>       | <b>13) Amikacina, 14) Estreptomina, 15) Kanamicina, 16) Gentamicina, 17) Clindamicina, 18) Ácido fenilborónico.</b>  |
| <b>Quinolonas</b>            | <b>19) Levofloxacina, 20) Ciprofloxacina, 21) Ácido nalidixico</b>   |
| <b>Cloranfenicoles</b>       | <b>22) Clorafenicol.</b>   |
| <b>Tetraciclinas</b>         | <b>23) Tetraciclina.</b>   |
| <b>Sulfonamidas</b>          | <b>24) Trimetoprima sulfametoxazol</b>   |
| <b>Macrólidos</b>            | <b>25) Lincomicina</b>   |

### **8.5 Cosecha de los cultivos provenientes del ensayo de resistencia y extracción de DNA.**

De los cultivos con antibiótico se tomaron dos alícuotas, una de 1 mL para la extracción del DNA y otra de 0.5 mL como muestra de respaldo. Para la preservación simplemente se agregó un volumen igual de glicerol estéril en un tubo de 1.5 mL, se homogenizó y se guardó a -70° C (Walsh and Duffy, 2013).

Para la extracción de DNA se centrifugo la alícuota de la cosecha a 13,000 rpm para eliminar el medio de cultivo y se lavó la pastilla con NaCl 0.8%.

Para la lisis celular se agregó 1 mL de buffer para lisozima (receta del buffer para lisozima) y 80 µl de lisozima (10 mg/mL), se resuspendió la pastilla y se incubó por 1 h a 37° C (Walsh and Duffy, 2013).

Al término de la incubación se adiciono 1 mL de SDS al 10% y 0.5 g de arena estéril, se agitó vigorosamente por 15 min y se centrifugó (13,000 rpm por 10 min). El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo donde se le agregaron 200 µl de EDTA 0.5 M; pH 8 y 120 µl de acetato de potasio 5 M; pH 5, se incubó a 4°C por 30 min y se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C por 10 min

Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se le agregaron 400 µl de cloroformo-alcohol isoamilico 24:1, se agitó en vortex por 30 seg y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa (ubicada en la parte superior) en un tubo nuevo teniendo cuidado de no tocar la interface ni la fase orgánica. Este paso se repitió dos veces más (Valenzuela et al., 2008).

Posteriormente se agregó un volumen igual de polietilenglicol (PEG) al 13%, se homogenizó y se incubo a -20° C toda la noche. Luego se centrifugó a 13,000 rpm a 4° C por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla dos veces con etanol frio al 70%. Por último se dejó que se evaporara los residuos de etanol de la pastilla de DNA y después se hidrató con 50 µL de agua destilada estéril.

La presencia de DNA se confirmó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% con TAE 1X teñido con SyBr Green. El DNA se guardó a -20° C hasta su uso.

### **8.6 Amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) del fragmento V1-V3 del gen 16S rRNA.**

Con la finalidad de evidenciar las bacterias resistentes a los 25 antibióticos ensayados, que se encuentran presentes en los tres tipos de suelos elegidos, se llevó a cabo la amplificación por triplicado del fragmento V1-V3 (de aproximadamente 500pb) del gen 16S ribosomal de bacterias.

Para ello se emplearon los iniciadores 8-F (5'-AGA GTT TGA TCI TGG CTC A- 3') (con un identificador acoplado de 10 pb para la plataforma "Roche 454 pyrosequencing" para etiquetar cada librería genómica) y 556-R (5' -TGC CAG IAG CIG CGG TAA- 3') con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo inicial de 94° C por 10 min; 25 ciclos de amplificación (desnaturalización 94° C por 1 min, alineamiento 53°C por 50 seg y elongación 72° C por 50 seg); y por último, un ciclo de 72°C por 10 min (Sarria et al., 2014),. En un termociclador (Mastercycler eppendorf modelo 2231 hamburg)

La mezcla de reacción (25µL) se preparó agregando buffer de reacción 1X, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 10 mM de cada uno de los cuatro dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados), 10 pM de cada uno de los iniciadores, 0.7 U de taq polimerasa (Thermo Scientific) y 20 ng de DNA como cadena molde (Sarria et al., 2014).

La confirmación de los productos de PCR (amplicones) se llevó a cabo mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con SyBr Green, utilizando una solución amortiguadora TAE 1X, las bandas fueron comparadas con un marcador 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen Life Technologies).

Los amplicones positivos de las tres replicas se mezclaron en tres tubo nuevos y se guardaron a -20° C hasta su uso. Las reacciones que no resultaron positivas a la amplificación se repitieron ya sea modificando la cantidad de DNA, purificando o incrementando la concentración de MgCl<sub>2</sub> o adicionando BSA 0.8 µg/µL.

### **8.7 Purificación de los productos de PCR.**

Con el propósito de concentrar y purificar los amplicones y evitar sobreestimación de los mismos eliminando restos DNA molde y residuos de oligonucleótidos (iniciadores) así como los demás componentes de la mezcla de reacción para la PCR; se empleó el kit comercial "DNA clean and concentrator purification kit" (Zymo Research, Irvine, CA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para confirmar la eliminación de los dímeros de iniciadores y en general de la "limpieza" de los amplicones, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con SyBr Green. Los amplicones se guardaron a -20° C hasta su uso.

## **8.8 Cuantificación de los amplicones purificados.**

Los productos de PCR purificados se cuantificaron con el espectrofluorímetro “Nano Drop™” 3300 (Thermo Scientific Inc., Suwanee, GA), el reactivo empleado para “teñir” el DNA fue “Quant-iT™ Pico Green® dsDNA Reagent, Invitrogen” dilución 1:200, el Pico Green es específico para DNA por lo que evita la sobreestimación en la concentración de las muestras en caso de que hubiera contaminación con RNA.

Una vez cuantificadas las librerías (cada producto de PCR representa una librería) se identificó aquella con la concentración más baja (pero no menor a 2 ng/μL). En tres tubos nuevos se mezclaron cantidades iguales de todas y cada una de las librerías de cada tipo de suelo, basándose en la concentración y volumen total de concentración, desde la muestra con baja concentración hasta la más alta. A esta mezcla se le llamo “pool”.

El pool se purificó y se cuantificó como se ha descrito previamente y de este modo se obtuvieron tres muestras únicas compuestas de múltiples librerías correspondientes a cada uno de los ensayos de resistencia de los 25 antibióticos, de los tres diferentes tipos de suelo cumpliendo con los requisitos para ser enviada a pirosecuenciar.

## 9 RESULTADOS.

Para una mejor explicación de los resultados obtenidos en esta investigación el proyecto quedo dividido en 4 resultados.

- I. Obtención viable de las bacterias del suelo
- II. Obtención de las bacterias resistentes a antibióticos.
- III. Obtención de los ácidos nucleicos
- IV. Amplificación y Cuantificación del DNA bacteriano resistente a antibióticos.

### I. Obtención viables bacterias del suelo

Después de los 7 días de incubación del cultivo de suelo observamos que los matraces presentaban turbiedad, indicando el crecimiento positivo de las bacterias del suelo. Concluyendo que el medio de extracto de levadura (PY), proporcionó las condiciones necesarias para el crecimiento de las bacterias del suelo, en un periodo no máximo de 7 días ver figura 13.



*Figura 13: Activación de la microbiota del suelo y Cultivo primario del extracto de suelo.*

### II. Obtención de las bacterias resistentes a antibióticos.

Al llevar a cabo el cultivo secundario junto con el ensayo de resistencia (ver figura 14), observamos que si logramos obtener las cepas resistentes; ya los antibióticos que usamos en los ensayos fueron desactivados permitiendo el crecimiento de todas las bacterias, presentando un crecimiento positivo en todas las muestras de suelo.

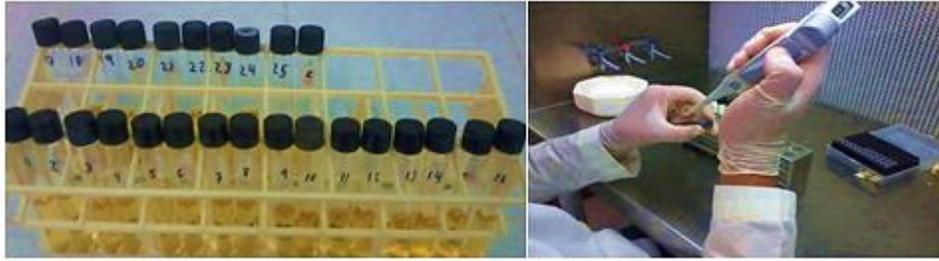


Figura 14: Preparación del medio de cultivo para la segunda incubación administrando los 25 antibióticos para el ensayo de resistencia.

### III. Obtención de los ácidos nucleicos de las bacterias resistentes

Durante la extracciones de DNA, observamos que la técnica reportada por Valenzuela et al., (2008), utilizada para este proyecto, funciono de forma correcta logrando obtener grandes fragmentos de DNA, con pocos residuos de proteínas como se puede apreciar en la siguiente Figura 15.

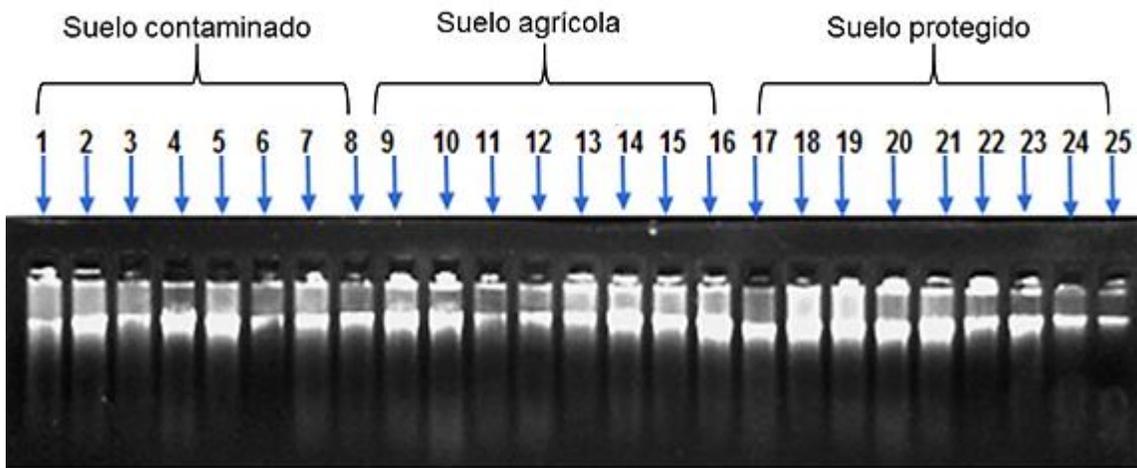


Figura 15: Electroforesis de una placa de agarosa en donde se tiñeron algunos productos de DNA de los tres tipos de suelo.

### IV. Amplificación Cuantificación y del DNA bacteriano resistentes a antibióticos.

La amplificación del DNA, se llevó con éxito obteniendo de forma satisfactoria todos los amplicones, con un tamaño esperado de 500pb correspondientes al gen 16s de la zona V1-V3 de las bacterias resistentes a antibióticos como se ve en la Figura 16.

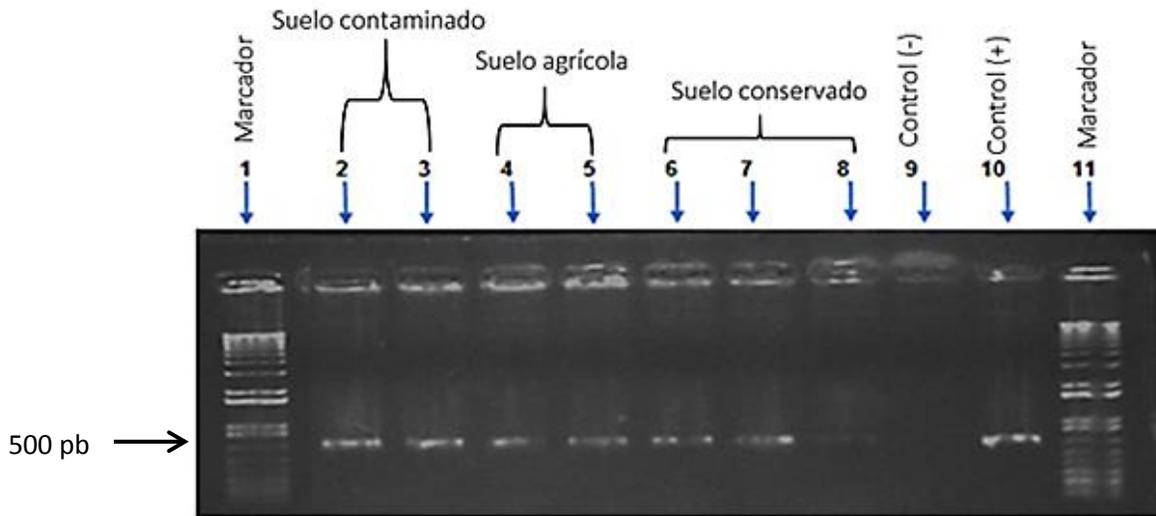


Figura 16: Electroforesis de una placa de agarosa en donde se tiñeron algunos productos de PCR como podemos apreciar en la imagen todos los amplicones corresponden a 500pb.

Para la purificación de los amplicones de DNA se empleo el kit comercial “DNA clean and concentrator purification kit” (Zymo Research, Irvine, CA, USA), obteniendo como resultado una total eliminación de todos los residuos que quedaron al termino de las PCR, así como de la extracción de DNA. Las columnas de purificación funcionaron correctamente quedando en la columna todos los residuos como impurezas y contaminantes que perjudican la estabilidad de la molécula de DNA extendiendo su vida de anaquel. Como medio de comprobación se realizó una electroforesis para comparar el antes y después como podemos observar en la imagen 17.

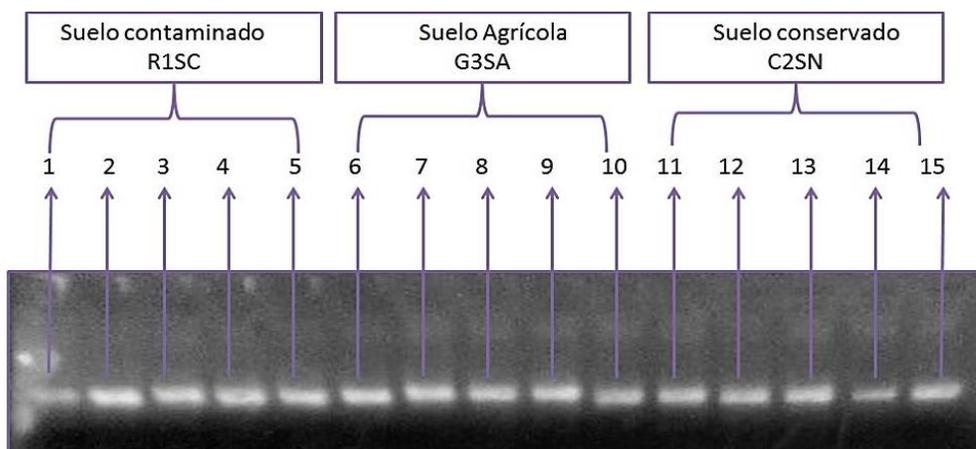


Fig. 17: Electroforesis de una placa de agarosa en donde se tiñeron algunos productos de DNA amplificados y purificados, donde la banda de DNA está libre de impúrezas.

La cuantificación de los amplicones se realizó con éxito. Cada muestra se leyó por triplicado, manteniéndose dentro de un intervalo de error de 0.01-0.1 siguiendo con el promedio de las tres lecturas. Como resultado observamos que los promedios nos indican altas concentraciones de DNA, obteniendo más de 2 ng/mL, (**ver cuadro 3**), empezando la preparación de cada una de las librerías para ser para ser posteriormente enviadas para la pirosecuenciación de los ácidos nucleicos.

Cuadro 3: Cuantificación de DNA del resistoma de suelos de las diferentes muestras de suelo al azar en ng/ml

| ID         | Lectura 1 ng/ml | Lectura2 ng/ml | Lectura 3 ng/ml | Promedio |
|------------|-----------------|----------------|-----------------|----------|
| <b>R1</b>  | 2.45            | 2.5            | 2.39            | 2.44     |
| <b>R2</b>  | 2.81            | 2.37           | 2.32            | 2.5      |
| <b>G1</b>  | 2.06            | 2.02           | 2.33            | 2.13     |
| <b>C3</b>  | 2.2             | 2.39           | 2.24            | 2.27     |
| <b>G5</b>  | 2.32            | 2.24           | 2.74            | 2.43     |
| <b>C20</b> | 3.64            | 3.92           | 3.39            | 3.65     |
| <b>C25</b> | 2.10            | 2.09           | 2.09            | 2.09     |
| <b>G10</b> | 7.72            | 7.47           | 7.6             | 7.58     |

## 10 DISCUSION.

El estudio de las comunidades bacterianas del suelo resistentes a los antibióticos, también llamado Resistóma, es una investigación que se puede abordar con distintas técnicas, que permitan el análisis sobre la variedad de los genes de resistencia y de los microorganismos que los poseen.

Nuestra investigación se basó en el aislamiento de microorganismos del suelo para esto aplicamos la técnica Walsh and Duffy (2013) modificada, obteniendo como primera instancia los microorganismos cultivables del suelo, delimitando la población resistente a antibióticos de la parte no resistente con la aplicación de 25 fármacos distintos, obteniendo así una fracción microbiana resistente. Posteriormente seguimos con la extracción del ADN microbiano de las células resistentes a antibióticos, aplicando un protocolo de extracción indirecto, para la obtención de los ácidos nucleicos de las bacterias resistentes a antibióticos.

Las técnicas de extracción indirectas aunque son muy utilizadas tienen una desventaja. Mientras que las técnicas de extracción directas son capaces de abarcar todas las células como cultivables y no cultivables, las técnicas indirectas solamente pueden extraer microorganismos cultivables bajo condiciones de laboratorio. Hirsh et al., (2010) estimó que solamente el 1% de los microorganismos encontrados en el suelo son cultivables dentro de los laboratorios.

Por otro lado Robe et al., (2003) comparó cuál de los dos tipos de técnicas logra una mejor extracción, concluyendo que las técnicas directas están sujetas a muchas variables para la extracción de ácidos nucleicos, que van desde el tipo de suelo, la cantidad de materia orgánica, así como la concentración de enzimas de restricción (DNAasas) que pueden estar presentes en las muestras y que perjudica gravemente el proceso de extracción metagenómica, además con las técnicas directa el DNA extraído tiene poca vida de anaquel según Robe et al., (2003). Lo que hace que sea inferior comparada con la técnica de extracción indirecta, que extrae una mayor calidad del DNA bacteriano, ya que no incurren tantas variables como en las técnicas directas presentando un DNA de mayor grado de pureza y también una larga vida de anaquel dando la oportunidad de almacenarlos por largos periodos de tiempo.

Desde este punto de vista optamos que la mejor manera de estudiar el resistoma de suelos fuera a través de una técnica indirecta como lo han reportado Walsh and Duffy (2013) y Robe et al., (2003). El grado de pureza que alcanzan los ácidos nucleicos nos permitió una larga vida de anaquel brindándonos el espacio necesario para empezar a establecer el protocolo de amplificación.

La extracción de los ácidos nucleicos se realizó bajo un protocolo de extracción que combinara varios métodos de lisis celular, recurriendo a la reportada por Valenzuela et al., (2008) donde se utilizan tres métodos de lisis, que son lisis enzimática, lisis física y lisis química, todo esto, con el fin de abarcar la mayor cantidad de células cultivables posible. Obteniendo así un mayor alcance de extracción de DNA, ya que los tres tipos de lisis actúan de manera conjunta, mientras que los reactivos tales como el SDS (Sodio Dodecil Sulfato) y la arena estéril, rompen los tejidos celulares mientras la lisozima destruye la capa del peptidoglicano, con esto el EDTA (Ácido Etilen Diamino Tetra Acético) y el acetato de potasio se introducen en las células para

absorber los iones de Ca y Mg así como las enzimas de restricción, evitando la degradación de los ácidos nucleicos.

Mientras que los lípidos que fueron disueltos por el SDS (sodio dodecil sulfato) son absorbidos por el cloroformo-alcohol-isoamílico, obteniendo dos fases, una fase orgánica y una inorgánica, donde el DNA se encuentra dentro de la fase orgánica, el cual será sustraído para evitar mezclarse, realizando varios lavados con cloroformo-alcoholisoamílico, sustrayendo la mayor cantidad de ácidos grasos, de este modo el DNA permanece conservado con una solución salina siendo precipitada con alcohol etílico, donde posteriormente pasa a ser conservado a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para establecer un correcto protocolo de amplificación de DNA, se debe tener en cuenta los siguientes factores como tiempo, temperatura y ambiente de esterilidad que son cruciales para que el DNA no se degrade al igual que sus reactivos (como por ejemplo la enzima taq polimerasa, que es crucial para la amplificación del gen 16s), tomando esto en cuenta la técnica a considerar en el protocolo de amplificación debe de estar sujeta a estas tres variables para así poder aplicarla.

La técnica reportada para la amplificación del gen 16s concluida por Sarria et al (2013), e indicada en su artículo, corresponde a amplicones esperados con un tamaño molecular de 500pb de las regiones V1-V3, por lo que al realizar la amplificación de nuestras muestras obtuvimos los amplicones con el tamaño respectivo de 500pb, los cuales fueron comparados con un marcador de tamaño molecular 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen Life Technologies); estos resultados nos indican que la técnica empleada así como la receta propuesta de esta y sus reactivos como el  $\text{MgCl}_2$  y la enzima taq polimerasa terminaron funcionando a la perfección, acoplado cada uno de los primers en sus sitios de reconocimiento respectivos, llevando a cabo la amplificación exitosa del gen 16s.

## 11 CONCLUSIONES.

1. El establecimiento del protocolo para la extracción de DNA metagenómico y la amplificación del gen 16s rRNA, se realizó de manera satisfactoria, indicándonos que Las condiciones que se usaron para la amplificación así como la receta empleada funciono de manera correcta, acoplado cada uno de los nucleótidos en los respectivos sitios de reconocimiento, cumpliendo con nuestras expectativas. Obteniendo un tamaño molecular de 500pb de la región V1-V3.Las lecturas finales de concentración de DNA que se obtuvieron con la ayuda del nano-drop indicaron que se obtuvieron más de 2 ng/mL, siendo suficientes para la pirosecuenciacion de los amplicones.
2. La comprobación de la hipótesis resulto ser verdadera, hallando bacterias resistentes en todos los suelos analizados. Estas bacterias poseen varios genes de resistencia que le brindan la capacidad de poder resistir a varios antibióticos, indicando que hay una alta presión selectiva, dentro de las comunidades bacterianas del suelo, esto a raíz de los niveles de contaminación y del uso desmedido de los antibióticos, aumentando de esta manera la cantidad de comunidades resistente a antibióticos.

## 12. BIBLIOGRAFÍAS.

- Ahmadian, A., Gharizadeh, B., Gustafsson, A. C., Sterky, F., Nyrén, P., Uhlén, M., & Lundeberg, J. (2000). Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Analytical biochemistry*, 280(1), 103-110.
- Bartlett, J. M., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. In *PCR protocols* (pp. 3-6). Humana Press.
- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Academic Press, 1, 63-84.
- Butler, S. L., Hansen, M. S., & Bushman, F. D. (2001). A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nature medicine*, 7(5), 631-634.
- Chapman, J. S. (2003). Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(2), 133-138.
- Chen, C., Li, J., Chen, P., Ding, R., Zhang, P., & Li, X. (2014). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistances in soils from wastewater irrigation areas in Beijing and Tianjin, China. *Environmental Pollution*, 193, 94-101.
- Chen, I., & Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(3), 241-249.
- Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K., & Lim, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(10), 2259-2261.
- Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 277-282.
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), 287-292.

Cytryn, E. (2013). The soil resistome: the anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry*, 63, 18-23.

D'Costa, V. M., Griffiths, E., & Wright, G. D. (2007). Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Current opinion in microbiology*, 10(5), 481-489.

Dantas, G., & Sommer, M. O. (2014). How to fight back against antibiotic resistance. *American Scientist*, 102(1), 42-51.

Dantas, G., Sommer, M. O., Oluwasegun, R. D., & Church, G. M. (2008). Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, 320(5872), 100-103.

D'Costa, Vanessa M., et al. "Sampling the antibiotic resistome. (2006): 2, 374-377.

Del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.

DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 5069-5072.

Durso, L. M., & Cook, K. L. (2014). Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Current opinion in microbiology*, 19, 37-44.

Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. J., McEwen, S. A., Li, X. Z., Gaze, W. H., ... & Topp, E. (2013). The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*, 1, 704-709.

Fu, M., Deng, R., Wang, J., & Wang, X. (2008). Detection and analysis of horizontal gene transfer in herpesvirus. *Virus research*, 131(1), 65-76.

GRIFFITHS, A. J. Título: GENETICA/ANTHONY JF... [ET AL.]; TR. MONTSERRAT ELIAS ARNAZ... [ET AL.]. P. imprenta: MADRID: McGraw-Hill INTERAMERICANA. XIX, 860 P.: il. COL. Edición 3.

- Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., & Yonath, A. (2001). High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*, *107*(5), 679-688.
- Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., & Clark, I. M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(6), 878-887.
- Kelly, B. G., Vespermann, A., & Bolton, D. J. (2009). Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and chemical toxicology*, *47*(5), 969-977.
- Kozhevin, P. A., Vinogradova, K. A., & Bulgakova, V. G. (2013). The soil antibiotic resistome. *Moscow University Soil Science Bulletin*, *68*(2), 53-59.
- Lewin, B. (2008). *genes IX* (pp. 27-28). Sudbury, Mass: Jones and Bartlett Publishers.
- Lorenz, M. G., & Wackernage, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological reviews*, *58*(3), 563.
- Maguiña-Vargas, C., Ugarte-Gil, C. A., & Montiel, M. (2006). Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Médica Peruana*, *23*(1), 15-20.
- Martin, N. H., Sapir, Y., & Arnold, M. L. (2008). The genetic architecture of reproductive isolation in Louisiana irises: pollination syndromes and pollinator preferences. *Evolution*, *62*(4), 740-752.
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica*. Pearson Education 72-76.
- McDonald, D., Price, M. N., Goodrich, J., Nawrocki, E. P., DeSantis, T. Z., Probst, A., & Hugenholtz, P. (2012). An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *The ISME journal*, *6*(3), 610-618.
- Monier, J. M., Demaneche, S., Delmont, T. O., Mathieu, A., Vogel, T. M., & Simonet, P. (2011). Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. *Current opinion in microbiology*, *14*(3), 229-235.

Osman, K. T. (2012). *Soils: principles, properties and management*. Springer Science & Business Media.

Perry, J. A., & Wright, G. D. (2013). The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. *Frontiers in microbiology*, 4, 1-4

Rensing, C., Newby, D. T., & Pepper, I. L. (2002). The role of selective pressure and selfish DNA in horizontal gene transfer and soil microbial community adaptation. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(3), 285-296.

Riah-Anglet, W., Trinsoutrot-Gattin, I., Martin-Laurent, F., Laroche-Ajzenberg, E., Norini, M. P., Latour, X., & Laval, K. (2015). Soil microbial community structure and function relationships: A heat stress experiment. *Applied Soil Ecology*, 86, 121-130.

Rizzo, L., Manaia, C., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Ploy, M. C., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science of the Total Environment*, 447, 345-360.

Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., Kent, A. D., ... & Triplett, E. W. (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME journal*, 1(4), 283-290.

Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, 11(1), 3-11.

Sarria-Guzmán, Y., López-Ramírez, M. P., Chávez-Romero, Y., Ruiz-Romero, E., Dendooven, L., & Bello-López, J. M. (2014). Identification of antibiotic resistance cassettes in class 1 integrons in *Aeromonas* spp. Strains isolated from fresh fish (*Cyprinus carpio* L.). *Current microbiology*, 68(5), 581-586.

Sommer, M. O., & Dantas, G. (2011). Antibiotics and the resistant microbiome. *Current opinion in microbiology*, 14(5), 556-563.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real 1, 70-74.

Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Chapter*, 36, 663-671.

Torres Manrique C. (2012). La Resistencia Bacteriana a los Antibióticos, Siete Décadas Después de Fleming. Academia de Farmacia Reino Aragón, 1, 15-20.

Töwe, S., Wallisch, S., Bannert, A., Fischer, D., Hai, B., Haesler, F., & Schloter, M. (2011). Improved protocol for the simultaneous extraction and column-based separation of DNA and RNA from different soils. *Journal of microbiological methods*, 84(3), 406-412.

Walsh, F. (2013). Investigating antibiotic resistance in non-clinical environments. *Frontiers in microbiology*, 4, 1-3.

Walsh, F., & Duffy, B. (2013). The culturable soil antibiotic resistome: a community of multi-drug resistant bacteria. *PloS one*, 8(6), 1-9.

Wright, G. D. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current opinion in microbiology*, 13(5), 589-594.

Wright, G. D. (2012). Antibiotics: a new hope. *Chemistry & biology*, 19(1), 3-10.

Valenzuela-Encinas, C., Neria-González, I., Alcántara-Hernández, R. J., Enríquez-Aragón, J. A., Estrada-Alvarado, I., Hernández-Rodríguez, C.,... & Marsch, R. (2008). Phylogenetic analysis of the archaeal community in an alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). *Extremophiles*, 12(2), 247-254.

Zhao, F., & Xu, K. (2012). Efficiency of DNA extraction methods on the evaluation of soil microeukaryotic diversity. *Acta Ecologica Sinica*, 32(4), 209-214.