

300931



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE ECOLOGIA
UNAM

DIVERSIDAD GENETICA DE *Escherichia coli* EN
AMBIENTES SECUNDARIOS (AGUA, AIRE, SUELO)
EN LA REPUBLICA MEXICANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ANTONIO CRUZ PERALTA



DIRECTORA DE TESIS: DRA. VALERIA FRANCISCA EUGENIA LEOPOLDINA
DE MARIA DE GUADALUPE SOUZA SALDIVAR

FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

MEXICO, D. F.

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA II
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: Diversidad genética de Escherichia Coli en ambientes secundarios (agua, aire, suelo) en la República Mexicana.

realizado por Antonio Cruz Peralta

con número de cuenta 8955281-8, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

[Signature] Atentamente
Dra. Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María de Guadalupe Souza
Saldívar
Director de Tesis

Propietario
Dr. Luis Enrique Eguiarte *[Signature]*

Propietario
Dr. Juan Nuñez Farfan *[Signature]*

Propietario
M. en C. Claudia Verónica Silva Romero *[Signature]*

Suplente
M. en C. Martha Graciela Rocha Munive

Suplente *[Signature]*

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



[Signature]
DRA. PATRICIA RAMOS MORDELLA DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Doctora Valeria Souza, en el laboratorio de Evolución molecular y Experimental, en el Instituto de Ecología, UNAM. Este trabajo forma parte del proyecto DGAPA IN218698 y CONACyT 27557-M.

Dedico esta tesis a mis padres Faustino y Lucila por su cariño y paciencia.

A mi hermana Martha, que admiro profundamente.

A mi hermano Faustino que se encuentra en el cielo.

A mis hermanas Julia y Maria que han creído en mí.

A mis hermanos Javier, Higinio y Enrique.

A mi tío Abdón Cruz que con su ayuda pude continuar mis estudios.

Lo importante en el hombre no es vencer, sino lograr, y su razón de existir no sólo es buscar y encontrar, sino ser, siendo inicio y final, morir y renacer, y el tiempo y el lugar a cada paso, llevando la capacidad de dar.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	1a
I) INTRODUCCION.....	2
a) Generalidades de ecología de microorganismos.....	2
b) Taxonomía y posición filogenética de <i>E.coli</i>	4
c) Genoma, plásmidos y biología evolutiva básica de <i>E. coli</i>	6
d) El Ambiente primario y secundario de <i>E. coli</i>	8
e) Genética de poblaciones de <i>E. coli</i>	10
f) Electroforesis de isoenzimas.....	13
II) OBJETIVOS.....	15
III) MATERIAL Y MÉTODO.....	16
a) Localidades de estudio y métodos de muestreo.....	16
b) Total de muestras aisladas.....	23
c) Trabajo de laboratorio.....	24
d) Diversidad genética.....	28
e) Diferenciación genética.....	29
f) Distancias genéticas y Algoritmo UPGMA.....	29
IV) RESULTADOS.....	31
a) La diversidad genética.....	31
b) Diferencias genéticas.....	34
c) Relaciones genéticas entre cepas.....	38
d) Dendrograma de ambientes secundarios.....	40b
V) DISCUSIÓN.....	41
VI) CONCLUSIONES.....	48
VII) REFERENCIAS.....	51
Anexo A. (Lectura de isoenzimas).....	55
Anexo B (Medios y reactivos).....	60

RESUMEN

El presente trabajo describe la variación y la estructura genética de *Escherichia coli* en diversos ambientes secundarios de la Ciudad de México, el Estado de México y el Estado de Yucatán utilizando 11 loci isoenzimáticos. Así mismo se comparó la estructura genética de los ambientes secundarios con la de algunos hospederos (ambientes primarios). *E. coli* ha sido objeto de muchos estudios y éste trabajo se ha enfocado en ampliar el conocimiento de esta bacteria y de su gran versatilidad para poder vivir en diferentes ambientes.

Se describió la diversidad genética en cepas de *E. coli* en los ambientes primarios y secundarios en diferentes lugares. La diversidad genética fue evaluada tanto a nivel de poblaciones ($H = 0.630$), en ambientes primarios ($H = 0.628$) y secundarios ($H = 0.607$), siendo todos éstos valores de diversidad altos.

Los valores de G_{st} fueron cercanos al cero, indican que existe flujo génico y poca diferenciación en términos de frecuencias alélicas. Además de que los hospederos tuvieron ETs que no se encontraron en ninguna otra población. En cuanto a las relaciones genéticas, los hospederos humanos se encuentran ampliamente distribuidos en casi todo el dendrograma con diversos genotipos, en cambio los hospederos murciélagos es todo lo contrario estos solo están en un grupo muy cercano a su cueva. El presente estudio es una contribución a los trabajos realizados con *E. coli* para poder entender más sobre la vida de esta bacteria.

ABSTRACT

The present work describes the genetic structure and variation of *Escherichia coli* in secondary environments of Mexico City and the states of Mexico and Yucatán using 11 isoenzymatic loci. Furthermore, the genetic structure was compared between the secondary and the primary environments. *E.coli* has been the subject of many studies and the aim of this work is to improve the knowledge of this bacteria and its versatility to live in different environments.

The genetic diversity was described in *E.coli* strains from primary and secondary environments. The genetic diversity was evaluated at the population level ($H=0.630$) for both the primary ($H=0.628$) and the secondary ($H=0.607$) environments, and all the values were high.

The G_{st} values were close to zero, demonstrating that there exist genetic flow and little differentiation in terms of allelic frequencies. In addition, the E_{ts} from primary environments (hosts) were not found in any other population.

The genetic relationships demonstrated that the strains from human hosts were distributed all along the dendrogram, and had different genotypes. On the other hand, the strains from bat hosts were located in only one group, very close to the strains from its cave.

The present work represents a contribution to better understand the life of *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Valeria Souza, que es la directora de esta tesis y no solo por eso si no por su apoyo constante, su paciencia (muchísima), comprensión y su cariño.

Al Dr. Luis Eguiarte por el detalle de sus revisiones que fueron muy importantes y determinantes para poder finalizar este trabajo. Muchas gracias.

M. en C. Claudia Silva por la paciencia de adentrarme nuevamente con la tesis y leer con paciencia, dedicación a este trabajo y darle el giro que necesitaba, además darme ánimos de acabarla, mil gracias.

Al Dr. Juan Núñez que tuvo la gentileza de leer y corregir este trabajo, con ello a mejorarla, gracias.

M. en C. Martha Rocha por el tiempo que le dedico a leer conmigo los acetatos como también las correcciones a la tesis Gracias.

Dr. Jordan que con su ayuda hizo que la tesis tuviera un buen comienzo y un final.

Dr. Chava Montes que la aportación que le dedico a la tesis fue de mucho valor.

A las Dra. Mariza Mazarí y Dra. Irma Rosas quien proporciono las cepas de *E. coli* de agua y de aire.

M. en C. Eva Salinas por la ayuda a la tesis.

Biólogo Aldo Valera por ser mi maestro en las electroforesis y muchas cosas más, Gracias.

Biólogo Rene Cerritos por toda la ayuda que me dio.

A Valeria, Luis, Claudia, Martha, Lulú, Aldo, Salvador, Laura, Erika, Sara, Amanda, Ana Gracias por todo.

A los compañeros de laboratorio que siempre me dieron ánimos gracias.

A mis compañeros de la facultad con quienes compartí momentos inolvidables: Teresa (Lola), Rosita, Sonia, Belem, Dulce, Elna, Araceli, Rafa, Roberto (el negro), Armando, Goyo, Ricardo, Nazario (peyote), Jorge, Teresa, Betsabe, Miguel, Luz, Ulises, Paola, Bety, Rosa (yoyin), Adriana C, Angélica Z, Fabiola, Gaby, Asabel, José, Paz, Popoca, Rene, Marcos, Tania, Leonel, Paty y Muchos más.

A mis compañeros del museo: Lupita, Liliana, Ana, Eimarmene, Diana, Juanita, Adriana, Ángela, Lety, Mary, Paty, Rosalinda, Alma, Margarita, Sara, Sandra, Víctor, David (chanclotas), Wendy, Don Ricardo y su esposa doña Amelia, Martha, y muchos más.

A mis alumnos de biología de procariontes (1999) quienes donaron sus bacterias de *E. coli*.

Y sobretodo a una persona quien siempre me motivo para terminar la tesis Gracias Ana Vázquez por ser quien eres.
A un gran maestro Vicente Turrubiarte y Ceciliano.

I) INTRODUCCIÓN

a) Generalidades de la ecología de microorganismos

Debido a que los microorganismos son tan pequeños, sus hábitats también deben ser pequeños, por lo que los ecólogos microbianos utilizan el término microambiente para describir el lugar donde vive un microorganismo. Existen microorganismos en toda la biósfera, en tierra, agua y aire, viviendo sobre o dentro de otros organismos, e inclusive en ambientes extremos (lagunas hipersalinas, volcanes, geizers, glaciales y zonas irradiadas). El término ambiente se refiere a todo aquello que rodea a los organismos vivos, factores químicos, físicos y biológicos, así como a las fuerzas que actúan sobre un organismo vivo. Los microorganismos desempeñan papeles ecológicamente mucho más importantes que lo que podrían sugerir sus dimensiones tan pequeñas, ya que son parte esencial de los ecosistemas. Dentro de un ecosistema cada organismo interactúa con su entorno, principalmente intercambiando sustancias químicas resultado de su metabolismo y estas interacciones puede modificar

marcadamente las características del ecosistema (Brock y Madigan, 1991).

En la naturaleza los factores ambientales que afectan el desarrollo de los microorganismos son la temperatura, el pH, la disponibilidad de agua y de oxígeno, entre otros. Todos estos factores juegan un papel importante en la composición y cantidad de microorganismos en determinados hábitats (Brock y Madigan. 1991). Los ambientes de los microorganismos son sumamente variados, incluyen tanto el entorno físico (agua, aire y suelo), así como el ambiente que representan sus hospederos, de que son tan diversos como la vida misma. Es común que las bacterias no se restrinjan a un solo nicho sino que son capaces de colonizar varios hábitats con mayor o menor eficiencia (Madigan et al., 2000). Para los microorganismos que interactúan con otros seres vivos, se considera que su ambiente primario es el hospedero, donde encuentran un ambiente favorable para su desarrollo, ya que proveen condiciones óptimas de nutrientes, temperatura, pH. Generalmente se considera que todos los demás ambientes donde se encuentren los microorganismos, son secundarios. Sin embargo, estas definiciones pueden no ser precisas. Por ejemplo, se ha observado que las

enterobacterias (por ejemplo *Vibrio* spp. y *Salmonella* spp.) son comunes no sólo dentro de sus hospederos sino que también en el suelo y el agua (Madigan et al., 2000)

En un cuerpo de agua, sus orillas y los lodos constituyen un ecosistema en sí mismo. Las superficies son muy importantes como hábitats microbianos ya que los niveles de nutrientes pueden ser mucho mayores que en toda la solución. Este fenómeno puede afectar marcadamente el metabolismo microbiano. Se ha reportado que sobre las superficies el número de microbios y su actividad pueden ser mucho mayor que en el agua libre, debido a los efectos de absorción (Brock y Mandigan, 1991).

b) Taxonomía y posición filogenética de *E. coli*.

Escherichia coli es la bacteria más conocida debido a que es el organismo mejor estudiado del mundo, ya que se ha utilizado como modelo para estudiar todos los aspectos de genética y fisiología de los organismos vivos. Su genoma entero se conoce desde hace algunos años (Blattner et al., 1997) y su biología general es bien conocida, como demuestran las diferentes ediciones del trabajo de Neidhardt *et al.* (1987; 1996). También ha sido utilizada como organismo modelo en

estudios de evolución experimental para entender la acción de las diferentes fuerzas evolutivas a corto y largo plazo (Lenski y Travisano, 1994).

E. coli es un bacteria Gram negativa típica de la familia Enterobacteriaceae. El análisis de 16S rRNA muestra que pertenece a la subclase de proteobacterias γ , misma que se encuentra muy relacionada a las otras proteobacterias (α , β , δ) (Logan, 1994). La subclase de proteobacterias γ , incluye además a otros organismos patógenos de humanos, como son *Shigella* sp., *Samonella* sp., *Vibrio* sp. y *Haemophilus* sp. Las bacterias de la familia Enterobacteriaceae se caracterizan por crecer facultativamente, por ejemplo, anaeróbicamente en el interior del intestino de sus hospederos y aeróbicamente en el ambiente exterior. Gracias a esta capacidad, muchos de los miembros de esta familia son de vida libre, mientras que otros establecen asociaciones con otros organismos, ya sea como comensales o patógenos. (Logan, 1994)

En particular, como fuente de energía *E. coli* prefiere utilizar azúcares sencillos como la glucosa, además produce ácido y gas en presencia de lactosa y requiere de nitrógeno soluble como sulfato de amonio (Brenner, 1984). En ambientes secundarios como el suelo,

sedimento y agua, el metabolismo de *E. coli* difiere marcadamente de aquel de ambientes primarios; estas diferencias se deben a la oportunidad de encontrar distintos niveles de nutrientes, oxígeno, temperatura, pH y otras variables (Brenner, 1984).

c) Genoma, plásmidos y biología evolutiva básica de *E. coli*.

Como ya se mencionó anteriormente, el genoma completo de *E. coli* se conoce desde hace algunos años (Blattner et al., 1997). La cepa de laboratorio K12 ha sido utilizada intensamente como un organismo modelo en gran cantidad de estudios, y una variante de esta cepa, la MG1655, fue elegida para secuenciar su genoma completo. Se encontró que contiene 4,639,221 pares de bases y un contenido promedio de GC de 50.8%. Esta bacteria puede sobrevivir sin ningún plásmido o tener un alto porcentaje de su genoma total en plásmidos (Hopwood y Chater). La información contenida en estos elementos extra-cromosomales es variable, ya que en ellos se puede encontrar información para asimilar azúcares raros, para producir colicinas (moléculas que matan a posibles competidores de la misma especie), resistencia a antibióticos y a metales pesados, inmunidad contra fagos y colicinas, genes que

codifican para intercambio genético y fimbrias relacionadas con la patogenicidad y toxinas, entre otros (Lewin, 1998).

Como en la mayoría de las bacterias la transferencia de material genético es por medio de los tres procesos bien conocidos: transducción, transformación y conjugación: a) La transducción es la transferencia de material genético por medio de vectores virales conocidos como bacteriófagos, b) La transformación es la transferencia de ADN libre de una célula bacteriana a otra, y c) La conjugación incluye la unión temporal de dos células con tipos de apareamiento opuesto, seguida por transferencia unidireccional de una parte del material genético a través de un puente citoplasmático de la célula donadora a la célula receptora, y la separación posterior de las células (Williams, 1992).

La gran plasticidad genómica de *E. coli* le confiere una plasticidad ecológica notable, ya que gracias a ella puede adaptarse rápidamente a vivir en diferentes ambientes. De esta forma puede pasar de ser comensal o patógeno de animales a ser un organismo de vida libre.

d) El ambiente primario y secundario *E. coli*.

El conducto gastrointestinal humano es el sitio de la digestión de los alimentos y está formado por esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso. El pH del líquido estomacal es ácido, alrededor de 2. El estómago puede entonces visualizarse como una barrera contra la penetración de bacterias extrañas al tubo intestinal. Las bacterias colonizadoras del estómago son por lo general lactobacilos y estreptococos tolerantes a ambientes ácidos, además de bacterias patógenas como *Helicobacter pylori* (Atlas, 1990).

Generalmente se considera que el hábitat "normal" de *E. coli* es el colon de organismos de sangre caliente (aves y mamíferos) y que aunque se pueden encontrar en el medio externo, tradicionalmente se sugería que su presencia representaba contaminación fecal, ya que se sospechaba que no se podía reproducir en medio exterior (Atlas, 1990). Sin embargo, es posible que esto sea falso (Atlas, 1990). Existen *E. coli* que viven en otras partes del tracto digestivo, como las *E. coli* patógenas que pueden habitar en la sangre y en el tracto urogenital (Atlas, 1990). Adicionalmente, es

posible encontrar poblaciones de *E. coli* en vertebrados de sangre fría. Por otro lado, también se han encontrado cepas en ambientes acuáticos, especialmente aquellos ricos en compuestos orgánicos, como en aguas negras (Parveen et al., 1999).

La densidad de *E. coli* en el intestino grueso es de 10^6 células por gramo de colon. Esto hace de *E. coli* un componente menor de la flora predominantemente anaerobia de esta parte del intestino, donde la densidad bacteriana total es de 10^{11} células por gramo (Selander et al., 1987). *E. coli* es una de las primeras especies que coloniza al mamífero recién nacido, adquiriendo las primeras cepas del canal de parto (Bettelheim et al., 1977). Las colonizaciones posteriores se deben por lo general a la ingestión de alimentos contaminados. Ha sido demostrado empíricamente que *E. coli* sintetiza la vitamina K en el colon, ya que cuando este organismo se establece en el conducto intestinal de animales libres de gérmenes, desaparece la deficiencia vitamínica (Brock y Madigan, 1991). Usualmente hay una cepa dominante de *E. coli* por hospedero, sin embargo la aparición de nuevos genotipos, ya sea por mutación o por ingestión hace que esta dominancia sea sólo temporal y que la dinámica esté dictada por procesos tanto aleatorios como

adaptativos, llamados de selección periódica (Caugant et al., 1981). A pesar de que el *E. coli* se puede duplicar en 20 minutos en condiciones de laboratorio (Lewin, 1994), se estima que en el intestino hay una bipartición al día, mientras que en medio de cultivo rico en el laboratorio se tienen 6 biparticiones al día (Selander et al., 1987). Se considera que en condiciones bajas de nutrientes como el agua y el lodo, el tiempo de bipartición de *E. coli* es aún menor que en el intestino (Selander et al., 1987).

e) Genética de poblaciones de *E. coli*.

La genética de poblaciones trata de estimar las frecuencias de los alelos en una población y la influencia que los procesos evolutivos tienen sobre la fijación o eliminación de alelos. La propia definición delimita perfectamente su ámbito de aplicación. Toda población biológica es susceptible de un análisis bajo la perspectiva de la genética de poblaciones (Moya, 1989).

Un objetivo central de la genética de poblaciones es el análisis de la diversidad genética en las poblaciones naturales, y cuantificar el grado de diferenciación genética que existe en las poblaciones y geográfica (Whittam et al. 1983).

La genética de poblaciones en las bacterias es un campo relativamente nuevo en la biología evolutiva. *E. coli* ha jugado un papel importante como modelo de estudio en el crecimiento de este campo de la ciencia, así como el de la genética molecular y la fisiología celular. Esto se debe probablemente a su ubicuidad, la facilidad con que se reproduce en el laboratorio, a su importancia como patógeno en humanos y animales domésticos y a su versatilidad ecológica. Los estudios de genética en poblaciones naturales de *E. coli* empezaron en 1973 (Milkman, 1973). Después de más de dos décadas los estudios han seguido dos caminos. El primero son las preguntas básicas como los procesos de mutación, flujo génico, selección natural y la estructura poblacional. El segundo se refiere a la historia de la divergencia de poblaciones particulares en el tiempo y el espacio, y el origen de la patogenicidad (Hartl, 1984).

El estudio de la variación genética en *E. coli* pone especial énfasis en el análisis clonal de las poblaciones y la magnitud de parámetros como la recombinación y la migración. Las investigaciones han usado los polimorfismos en proteínas totales, enzimas metabólicas y del ADN (Boyd, 1996).

Los estudios de genética de poblaciones en *E. coli* de cepas asociadas principalmente a humanos nos muestran que como especie tiene una gran diversidad genética, desde $H = 0.47$ (Selander y Levin, 1980) y $H = 0.52$, (Whittam, 1983) hasta $H = 0.682$ (Souza et. al, 1999). H es una medida de variación genética que va de 0, si no hay variación, a 1, donde cada individuo de la población presenta una forma alélica diferente. Estos estudios indican que su estructura genética es fuertemente clonal; en otras palabras, existen pocos genotipos y que la recombinación es un fenómeno relativamente raro en la especie (Selander y Levin, 1980, Caugant y Selander., 1981, Selander et al., 1987, Dykhuzien y Green, 1991, Souza et al., 1992). La diversidad genética observada con isoenzimas se podía explicar por selección periódica y adaptación a nichos particulares (Levin, 1997, Gutman, 1997).

Se sabe mucho de *E. coli* asociada a humanos, en especial de las cepas patógenas. Estudios sobre la estructura poblacional *E. coli* asociada a animales silvestres son escasos (Souza et. al, 1999). Sin embargo, se sabe muy poco de las poblaciones *E. coli* fuera de animales hospederos. En los pocos trabajos que existen al respecto,

se ha descrito que la diversidad genética *E. coli* de aguas negras respecto a la encontradas en hospederos, así mismo las cepas no siempre fueron las mismas que las asociadas al colon de los posibles hospederos (Pupo y Richardson, 1995; Parveen et al., 1999).

f) Electroforesis de isoenzimas.

Debido a la escasez de información sobre la diversidad genética de poblaciones de *E. coli* asociada a ambientes secundarios (vida libre) y a la sugerencia de que podría poseer niveles de variación genética superiores que las *E. coli* asociada a hospederos el presente trabajo se plantea las siguientes preguntas.

- (1) ¿Es mayor la diversidad genética de *E. coli* en ambientes secundarios que asociados a hospederos?
- (2) ¿Existe especificidad de las cepas asociadas a ambientes secundarios particulares?

Para reponder estas preguntas hicimos uso de marcadores moleculares mediante la técnica de electroforesis de enzimas multilocus (MLEE). La técnica permite el estudio de la variación alélica en varios genes cromosomales (por ejemplo, genes de rutas metabólicas centrales), y ha sido utilizada ampliamente para determinar la estructura genética en poblaciones naturales. Los

estudios de electroforesis han permitido estudiar la estructura poblacional en muchas especies de todos los dominios del mundo vivo, incluyendo a bacterias como *E. coli* (Selander y Levin, 1980; Selander et al., 1987), *Legionella pneumophila* (Selander et al., 1989), *Listeria monocytogenes* (Piffaretii et al., 1989), *Haemophilus influenzae* (Musser et al., 1988), *Serratia marcesens* (Gargallo-Viola, 1989) y *Bordetella bronchiseptica* (Musser et al., 1987).

Tomando en cuenta la eficacia y rapidez que ofrece la técnica de electroforesis de isoenzimas, decidimos utilizar esta técnica para analizar la variación genética de poblaciones de *E. coli* en ambientes secundarios de diversas localidades de México y compararla con la correspondiente de bacterias asociadas a hospederos que son comunes en los ambientes secundarios analizados.

II) OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la variación y estructura genética de *Escherichia coli* en diversos ambientes secundarios de México.

Objetivos particulares:

1) Conocer la diversidad genética de *E. coli* en poblaciones de ambientes secundarios (suelo, agua y aire) de la Ciudad de México y compararlos con las de humanos de la Ciudad de México.

2) Conocer la diversidad genética de *E. coli* en las poblaciones de ambientes secundarios de cuevas en Yucatán y compararla con la de murciélagos residentes de estas cuevas y con las cepas obtenidas de la Ciudad de México.

3) Determinar si existen cepas particulares a cada ambiente o si existe una poza génica común.

4) Estimar la diferenciación genética de *E. coli* de los diversos ambientes.

III) MATERIAL Y MÉTODOS

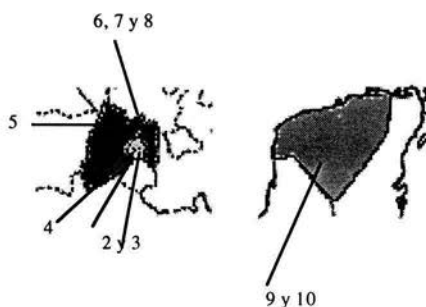
a) Localidades de estudio y métodos de muestreo

Las cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio, originarias de ambientes secundarios y primarios de la República Mexicana fueron colectadas en tres localidades: (A) Ciudad de México (D. F.) ; (B) Estado de México y (C) Estado de Yucatán, como se muestran en la Figura 1.

Figura No. 1 Mapa de la República Mexicana con las tres localidades de estudio.



Figura No. 2 Mapa de los sitios muestreados en cada localidad.



La colecta de *E. coli* de los ambientes secundarios y primarios de las tres localidades se llevó a cabo por medio de diferentes métodos y equipos que se describen en continuación.

En la primera localidad de estudio, el D. F., se muestreó aire y agua en la delegación Iztapalapa, y suelo en la delegación de Tlalpan. Respecto a los ambientes primarios se recurrió a un grupo de estudiantes de la Facultad de Ciencias, UNAM. (Figura No. 2 y Cuadro No.1)

Las bacterias del **aire de Iztapalapa** se colectaron con un muestreador volumétrico Andersen (Andersen Sample inc. 1984). Las partículas acarreadas en el flujo de aire fueron depositadas directamente sobre la superficie del medio de cultivo sólido (agar de soya y tripticaseína TSA, **Anexo B**), contenido en cajas de petri

(Salinas, 1998). Las cepas fueron colectadas dentro de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Cerro de la Estrella. La colecta de cepas del aire se desarrolló en la sección de tratamiento secundario de dicha planta, siendo que el aire en esta sección contenía aerosoles del agua tratada y con ayuda del muestreador Adersen se colectaron las muestras de *E. coli* (Secretaria General de Obras. Sin fecha).

Las cepas de **agua de Iztapalapa** también fueron colectadas dentro de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Cerro de la Estrella en la sección de tratamiento secundario de dicha planta . Se tomó una muestra de agua la cual se procesó para el aislamiento de cada cepa de *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* del **suelo de Tlalpan** fueron colectadas mediante un aspiradora modificada dentro de bolsas estériles. Se tomaron muestras sobre una superficie de 2 metros cuadrados de suelo de la sala de una casa habitación (principalmente de alfombras y tapetes) y del exterior de la casa (sobre superficies pavimentadas). El suelo colectado fue pasado a través de un tamiz del No. 100, con una abertura de malla de 0.149 μc . Para la cuantificación de bacterias en el polvo se utilizó el método de

dilución de placa. Se preparó una solución con 100 mg de suelo en 10 ml de agua de dilución (0.01 % de Tween 80, 1 % de peptona bacteriológica, 2 % de inositol) a partir del cual se prepararon 4 diluciones seriadas 1:10, cada suspensión se agitó vigorosamente con un vórtex (Thermolyne corporation) y se dispersaron 200 μ l de cada dilución sobre TSA por duplicado. Las cajas se cuantificaron y los resultados se expresaron como UFC/gr de suelo (unidades formadoras de colonias por gramo de suelo). Las colonias representativas de bacterias coliformes, se aislaron e identificaron con métodos bioquímicos (Salinas, 1998).

Las cepas de **humanos del D.F.** fueron colectadas de estudiantes de la carrera de biología de la Facultad de Ciencias de la UNAM, quienes representaron una muestra arbitraria de distintas regiones de la Ciudad de México. Estos alumnos proporcionaron una muestra propia, más otra de un familiar. La colecta se realizó por medio de un cotonete nuevo para tomar la muestra de heces fecales, las cuales eran inoculadas en cajas de petri con medio de cultivo MacConkey (**Anexo B**). Con todas las cepas, se procedió a la biotipificación e identificación de *E. coli*.

Las cepas de *E. coli* del suelo de Tlalpan, aire y agua de Iztapalapa fueron proporcionadas por el Laboratorio de Aerobiología del Centro de Ciencias de la Atmósfera por la Dra. Irma Rosas, en colaboración y coordinación de la M. C. Eva Salinas.

La segunda localidad de estudio, el Estado de México, se incluyen en el sistema de drenaje de la zona metropolitana, y comprenden tres canales: Gran Canal, Río de los Remedios y Canal Nacional. Se colectaron muestras del Gran Canal y del Río de los Remedios (**Figura No. 2 y Cuadro No.1**).

El Gran Canal tiene 60 cm. de profundidad y 20 cm. de sedimento (lodos), y recibe aguas residuales domésticas e industriales, así como agua de lluvia (Mazari y Mackay, 1993). El Río de los Remedios también tiene aguas residuales domésticas, industriales y varios contaminantes orgánicos (Mazari y Mackay, 1993).

Las cepas de *E. coli* del estado de México, **Gran Canal y Río de los Remedios**, fueron colectadas por el laboratorio de Ecología Química de la Dra. Marisa Mazari, con recipientes llamados "nucleadores" (Mazari y Mackay, 1993). La muestras de agua fueron procesadas primero haciendo 5 diluciones seriadas. Esta muestra

final fue utilizada para ser cultivada en la caja de petri con medio de cultivo agar de Mac Conkey (**Anexo B**) y esparcida con una varilla de vidrio estéril a una temperatura de 37 grados durante 24 horas.

En la tercera localidad de estudio, el Estado de Yucatán, fueron muestreadas las cuevas de Actun Huac, en el municipio de Akil (Figura No. 2 y Cuadro No.1).

Los **murciélagos** Actun Huac fueron capturados por medio de una red, los murciélagos son frugívoros de la especie *Artibeus jamaicensis*. Para obtener las muestras de *E. coli* se realizó un frotis anal, utilizando para ello un cotonete. Las muestras fueron almacenadas en tubos de ensaye con TSA (**Anexo B**) y transportados al laboratorio donde se procedió a la biotipificación e identificación de las cepas de *E. coli* (Cerritos, 1999) .

Las muestras de **aire de las cuevas** de Actun Huac del estado de Yucatán se colectaron con el muestreador Andersen (Andersen Sample inc. 1984). Las partículas de aire son acarreadas en el flujo de aire y son depositadas en las cajas de petri (TSA, **Anexo B**) con el mismo procedimiento ya descrito.

Cuadro No. 1 Descripción de las localidades A, B y C, sitios y ambientes de muestreo.

Localidad	Agua	Aire	Suelo	Hospedero
(A) D. F.	(3) Iztapalapa	(2)Iztapalapa	(1) Tlalpan	(4) Humanos
(B) Estado de México	(5) Río de los Remedios			
	(6) Gran Canal desagüe			
	(7) Gran Canal superficial			
	(8) Gran Canal lodos			
(C) Estado de Yucatán		(9) Cueva		(10) Murciélagos

b) Total de muestras aisladas

El total de la muestra aisladas fue de 229 cepas de *E. coli* de origen distinto: Ciudad de México (88 cepas), Estado de México (100 cepas) y el Estado de Yucatán (41 cepas) (**Cuadro No. 2**).

En cada localidad se muestrearon varias subpoblaciones, las cuales llamaremos sitios. En algunas localidades de cada sitio existen muestras tanto de ambientes primarios como secundarios.

Cuadro 2 Número de cepas y año de colecta de *E. coli* en ambientes primarios y secundarios de México.

Localidad	año	No. Cepas	Ambiente					
			Secundario				Primario	
Población y Sitio			aire	suelo	agua	lodo	super	hospedero
(1) Tlalpan	1996	14		14				
(2,3) Iztapalapa	1998	34	19		15			
(4) Humanos	1999	40						40
(A) D.F.		88						
(5) Río de los Remedios	1997	23			23			
(6, 7 y 8) Gran Canal	1997	77			44	19	14	
(B) Estado de México		100						
(9) Cuevas	1996	21	21					
(10) Murciélagos	1996	20						20
(C) Estado de Yucatán		41						
Total		229	40	14	82	19	14	60

c) Trabajo de laboratorio

El aislamiento de las cepas de humanos del D. F., se realizó en cajas de petri con medio de cultivo agar de Mac Conkey, se tomó la muestra de heces fecales de humanos con un cotonete y se dejaron crecer con medio de cultivo en cajas de petri durante un día a 37 °C. De las colonias que crecieron por medio de estría, se aislaron aquellas que tuvieran las características de *E. coli* en ese medio de cultivo y se incubaron. Este procedimiento se repitió con otros medios de cultivo selectivos para *E. coli* (EMB, Mac Conkey, SS Agar, TSI, Urea y Medio SIM, **Anexo B**). Las cepas identificadas como *E. coli* se volvieron a crecer en medio de cultivo Mac Conkey, y fueron guardadas a - 70 °C en un tubo 1.5 ml con medio de UL (**Anexo B**). Las cepas se incorporaron a la colección de *E. coli* de la Dra. Valeria Souza del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM. Esta colección se llama IECOL.

Para el análisis genético, las cepas bacterianas se sembraron en medio de cultivo agar Mac Conkey, durante 24 horas en una incubadora a 37°C. Se escogieron colonias aisladas del medio de cultivo y se volvieron a sembrar en 40 ml de medio de cultivo

líquido (LB, **Anexo B**) en un matraz elermeyer de 25 ml, el cual se procedió a incubar con agitación constante a 100 rpm a 37 °C (speed Lab-line incubator - shaker orbit), durante 15 a 20 horas. Posteriormente los cultivos se sacaron de la incubadora y fueron centrifugados durante 10 minutos a 5,000 r.p.m. (en una centrifuga Hettich Zentrifugen universal 30 F). Se tiró el sobrenadante y se resuspendio el botón celular en 250 µl de Buffer (0.09 M tris HCl pH 8, **Anexo B**), y 100 µl de lisozima (**Anexo B**). A continuación las bacterias se someten a congelación a - 70 °C por 15 minutos y a descongelación a temperatura ambiente durante 5 minutos. Este procedimiento de congelar y descongelar se repitió en dos ocasiones. Las bacterias se lisarán con el efecto bioquímico de la lisozima y el efecto físico de la congelación y descongelación. Las cepas lisadas son centrifugadas nuevamente durante un minuto a 14,000. Finalmente, los lisados se recuperan en un tubo de 1.5 ml y son guardado a - 70 °C.

La técnica de electroforesis de isoenzimas que utilizamos es la de acetato de celulosa (Hebert y Beaton, 1993. **Anexo B**). Se utilizaron 10 enzimas para este estudio: isocitrato deshidrogenasa (IDH), peptidasa (PEP), fosfoglucomutasa (PGM), argininaquinasa

(ARK), enzima málica (ME), manosa-6-fosfato isomerasa (MPI), xantina deshidrogenasa (XDH), alcohol deshidrogenasa (ADH), malato deshidrogenasa (MDH), y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. (G6PDH).

Antes de iniciar el análisis de las muestras de *E. coli* de este estudio, con humanos, murciélagos y de ambientes secundarios, fue necesario recurrir a cepas de referencia para usarlos como marcadores (**Anexo A**) para poder precisar bandas de tamaños conocidos que nos permitirá comparar nuestros resultados con otros obtenidos en el laboratorio con este mismo organismo.

La eletroforesis se realizó con el siguiente procedimiento. Se utilizó un sistema buffer de Tris - Glicina (PH = 8.5) (**Anexo B**) que se vierte en la cámara. Los lisados son sacados del congelador y sometidos a una temperatura baja para mantenerlos en buen estado (con hielo), se toma la muestra del lisado, aproximadamente 10 μ l la cual es colocada en los pozos del contenedor. Se colocan 8 lisados de diferentes cepas, los tres carriles restantes tienen las cepas de referencia (**Anexo A**). Para mantener el flujo eléctrico se utilizan tiras de papel filtro de 22 cm de largo por 3 de ancho (wicks), humedecidos en buffer. Los acetatos de celulosa también son humedecidos por lo menos 30 minutos antes de la electroforesis en

el mismo buffer de corrida. Los acetatos de celulosa humedecidos son sellados con las muestras y expuestos durante 15 minutos a una corriente eléctrica de 200 volts. Al término de este tiempo, los acetatos son depositados en vidrios donde se llevará a cabo la tinción para cada enzima específica. La tinción tendrá como finalidad que se observen las bandas donde hay actividad de cada enzima. Cada enzima es específica a su sustrato, con lo cual cada reacción requiere de los donadores de electrones (NADP, NAD) y el cofactor ($MgCl_2$) y el sustrato que se quiere analizar (**Anexo B**). Al cabo de unos minutos en un lugar oscuro y a temperatura ambiente se obtiene el revelado de las bandas.

Para obtener la lectura de cada acetato se toma como punto de referencia el patrón conocido de las cepas de referencia. Los alelos se identifican con números crecientes conforme a su movilidad. Las enzimas que se utilizaron para este estudio presentaron la característica de estar cargados negativamente, por lo que su movimiento en un campo eléctrico es anódico (del ánodo (-) al cátodo (+)). De esta forma cada cepa se caracterizó por una serie de números que refleja su patrón multiloci de bandas, el cual se le denomina electrotipo (ET). Cada cepa se corrió con este sistema

varias veces en conjunto con las cepas de referencia, así con otras cepas con el mismo alelo para poder confirmar el alelo asignado a esta cepa.

d) Diversidad genética

Los datos obtenidos en cada una de las lecturas de electroforesis se capturaron una base de datos y se corrió un programa que calcula la diversidad genética (Whittam, ETDIV, 1990). A partir de las frecuencias alélicas de los ETs se pueden estimar la diversidad genética de un locus:

$$h = (1 - \sum x_i^2) / [n / (n - 1)]$$

donde x_i es la frecuencia del i ésimo alelo y n es el número de electrotipos. Esta es la heterocigosis virtual esperada en condiciones de equilibrio de Hardy - Weinberg. Las bacterias son haploides, por lo que la h se interpreta como diversidad. La h se puede interpretar como la probabilidad de que dos cepas difieran en el mismo locus. La diversidad genética promedio (H), es el promedio aritmético de los valores de h para los 10 loci analizados en este trabajo. A partir de los valores de la h , se calcularon las H de los ambientes primarios y secundarios (Whittam T. 1990).

La diversidad "ecológica" se puede calcular también a partir de las proporciones de ETs con respecto al número de cepas.

$$D = \text{Número de ETs} / \text{Número de cepas}$$

e) Diferenciación genética

A partir de la heterocigosis virtual estimada por medio del programa ETDIV, se calcularon los índices de diferenciación genética entre subpoblaciones (Souza, et al., 1990).

$$G_{st} = H_t - H_s / H_t$$

Donde:

H_t = Diversidad genética total

H_s = Promedio de las diversidades genéticas de la subpoblaciones

G_{st} = Diferenciación entre subpoblaciones.

Si el valor que se obtiene es cercano a 1, las poblaciones no comparten nada y si es igual a 0, las poblaciones son idénticas.

f) Distancias genéticas y el método de distancia UPGMA

La distancia genética entre pares de aislados puede ser expresada por varios tipos de coeficientes. En este trabajo la

distancia genética se calculó como el número de “mismatches” (diferencias) entre cada par de aislados. La distancia es la proporción de mismatches en cada loci (Selander y Whittam, 1986).

$$\text{Distancia} = \frac{2(\text{número de loci con alelos diferentes})}{\text{No. de alelos } i + \text{No. de alelos } j}$$

donde los alelos i-ésimo y j-ésimo, presentan diferentes modalidades electroforéticas.

El UPGMA es un algoritmo que se usa la distancia genética para la construcción de un dendrograma que muestra las relaciones de similitud entre distintos ETs (Hedrick, 2000).

IV) RESULTADOS

a) Diversidad genética:

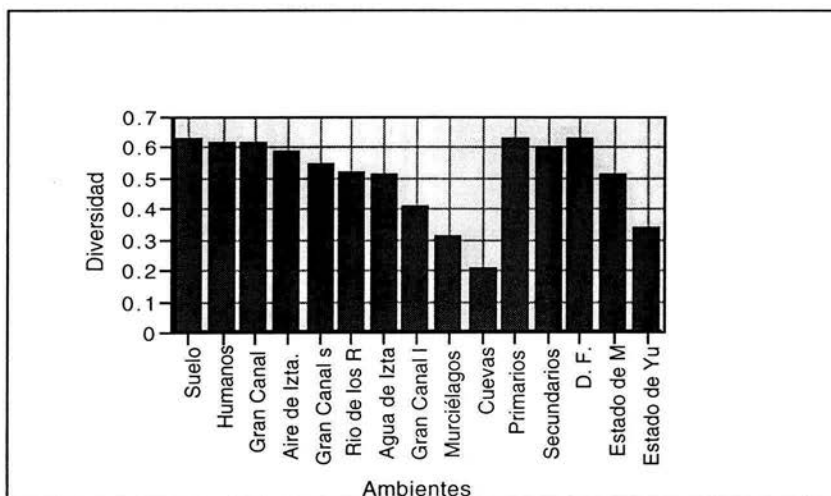
Se analizaron un total de 229 cepas provenientes de las tres localidades. La diversidad promedio total de la población es igual a $H = 0.63$ (**Cuadro 3**). En cuanto a la diversidad de cada sitio, se encontraron altas diversidades en el suelo de Tlalpan ($H = 0.63$), hospederos humanos ($H = 0.62$), agua a la del Gran Canal ($H = 0.62$) y las más bajas fueron en las cuevas de Yucatán, aire ($H = 0.21$) y en los murciélagos ($H = 0.31$). También pudimos calcular la diversidad ecológica (No.de ETs/No. de cepas), siendo la más alta corresponde a los hospederos humanos y el Gran Canal Superficial con $D = 1$ (**Cuadro 3**). La diversidad ecológica con un valor más pequeño fue la de las cuevas de Yucatán con una $D = 0.41$. Los demás valores obtenidos fueron cercanos a 1.

En la gráfica No. 1 se muestran las diversidades para los diferentes ambientes y así poder comparar los valores más altos y más bajos.

Cuadro 3 Parámetros de diversidad genética en poblaciones naturales de *E. coli* en ambientes primarios y secundarios.

Localidad y Población	Sitio	No. Cepas	No. ETs	No. ETs/ No. Cepas	No. Loci polimorficos	promedio de alelos	H	ES(H)
(1) Suelo	Tlalpan	14	13	0.92	1	4	0.63	0.05
(2) Aire	Iztapalapa	19	18	0.94	1	4	0.59	0.05
(3) Agua	Iztapalapa	15	14	0.93	0.9	4	0.51	0.08
(4) Hospedero	Humano	40	40	1	1	5.1	0.62	0.06
(A) D. F.		88	84	0.95	1	5	0.63	0.03
(5) Agua	Remedios	23	21	0.91	1	3	0.52	0.05
(6) Agua	Gran Canal	44	42	0.95	1	5	0.62	0.05
(7) Agua	G.C.Sup**	14	14	1	1	3	0.55	0.07
(8) Lodos	Gran Canal	19	16	0.84	0.9	3	0.41	0.06
(B) E. Méx.		100	90	0.9	0.9	5	0.51	0.07
(9) Aire	Cueva Yuc.	21	8	0.38	0.4	2	0.21	0.09
(10) Hospedero	Murc. Yuc.	20	9	0.45	0.82	2	0.31	0.07
(C) E. Yuca.		41	17	0.41	0.91	2.3	0.34	0.06
A. Secundarios	México	169	140	0.82	1	6.3	0.60	0.04
Hospederos	México	60	49	0.81	1	5.1	0.63	0.09
Total	México	229	195	1	1	6	0.63	0.04

Gráfica No. 1 Gráfica de diversidad genética de los sitios estudiados.



Las 10 enzimas analizadas por la técnica de electroforesis revelaron la existencia de 11 loci y 6.5 alelos en promedio (ME tiene dos loci) (**Cuadro 4**). Todas las enzimas analizadas resultaron variables, con un número mínimo de alelos por loci de 5, y un máximo de 7. Las enzimas IDH, ARK, MPI y XDH presentaron 7 alelos. El locus más variable fue IDH ($h = 0.732$) y el menos variable fue MDH ($h = 0.344$) La heterocigosis virtual para la población total se encuentra entre las más altas reportadas para bacterias ($H = 0.630$).

Cuadro 4 Número de alelos y diversidad genética de cada uno de los loci de *E. coli* analizados en este estudio.

Locus	No. de alelos	h
IDH	7	0.732
ADH	6	0.730
XDH	7	0.721
PEP	6	0.692
MPI	7	0.683
ME2	6	0.674
FGM	6	0.625
G6P	6	0.613
ARK	5	0.579
ME1	8	0.534
MDH	5	0.344
Promedio	6.5	0.630

b) Diferenciación genética

Se calcularon los porcentajes de ETs compartidos entre poblaciones. En general, la mayor similitud de ETs está entre el suelo de Tlalpan y el aire de Yucatán (5%, **Cuadro 5**). El que le sigue es el aire de Yucatán y los lodos del Gran Canal con un 4.3 % y los ETs del aire de Iztapalapa con el suelo de Tlalpan en un 3.3 % (**Cuadro 5**).

Los ambientes secundarios son similares entre sí, con valores de G_{st} cercanos a 0. Sólo los sitios de Yucatán muestran niveles de diferenciación distintos de 0, siendo el mayor el encontrado entre los murciélagos y sus cuevas ($G_{st} = 0.4$, **Cuadro 5**).

La diferenciación genética global entre ambos ambientes fue distinta de 0, aunque el valor no es muy alto ($G_{st} = 0.16$, **Cuadro 6**). La diferenciación entre la zona metropolitana (incluye el D. F. y el Estado de México) y Yucatán es muy baja ($G_{st} = 0.06$, **Cuadro 6**) a pesar de la gran distancia geográfica entre sitios. La diferenciación más alta se observó entre las cepas el aire del D. F. y el aire de Yucatán ($G_{st} = 0.22$, **Cuadro 6**), seguida de la diferencia entre hospederos (murciélagos y humanos, $G_{st} = 0.20$).

Cuadro 5. Porcentaje de ETs compartidos entre las diversas poblaciones (diagonal superior) y valores de G_{st} (diagonal inferior).

Localidad	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Ambiente	Suel	laire	lagua	Huma	Reme	Gran C	G. Sup	Lodos	Yaire	Murci
(1) Suel		3.3	0	0	0	1.9	0	3.4	5	0
(2) laire	0		0	0	0	0	0	3	0	0
(3) lagua	0	0		0	0	0	0	0	0	0
(4) Huma	0	0	0		0	0	0	0	0	0
(5) Reme	0	0	0	0.1		0	0	0	0	0
(6) Gran C	0	0	0	0	0.3		0	1.8	2	0
(7) G. Sup	0	0	0	0.1	0	0		0	0	0
(8) Lodos	0	0.1	0.1	0.1	0	0	0.1		4.3	0
(9) Yaire	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.1		0
(10) Murci	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.4	

Suel= suelo, Gran C = Gran canal, G. Sup = Gran canal superficial, Reme = Río de los Remedios, lagua= agua de Iztapalapa, laire= Aire de Iztapalapa, Yaire = aire de Yucatán, Huma = humanos, Murci = Murciélagos.

Cuadro 6. Diferenciación genética de *E. coli* de diversos orígenes.

Comparaciones de ambientes y localidad	No. cepas	Gst
Humanos (4) / Ambientes secundarios (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9)	209	0.03
Humanos (4) / Murciélagos (10)	60	0.20
Agua Estado de México (5, 6, 7, 8)/ Agua de Iztapalapa (3)	115	0.03
Aire Yucatán (9) / Aire Iztapalapa (2)	40	0.22
Ambientes secundarios de la Zona Metropolitana (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8)	148	0.02
Zona: Metropolitana (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) / Yucatán (9, 10)	229	0.06
Total	229	0.16



c) Relaciones genéticas entre cepas

En el dendrograma generado por el método de UPGMA se identificaron 9 grupos principales (numerados de I a IX), con una distancia máxima de 0.8 (**Figura 3**).

El grupo I está constituido por 3 cepas del Gran Canal con una distancia máxima de 0.77.

El grupo II contiene 59 cepas que dividimos en tres subgrupos muy diversos, donde predominan las cepas humanas, del Río de los Remedios, agua y aire de Iztapalapa, Gran Canal desagüe, Gran canal superficial y suelo. Existen ETs múltiples, los cuales se encuentran en los subgrupos b y c, aunque pertenecen a las mismas localidades. La distancia máxima es de 0.6.

El grupo III contiene a 11 cepas predominantemente de humanos y del aire y agua de Iztapalapa. La distancia máxima de este grupo es 0.64.

El grupo IV contiene a 5 cepas del Gran Canal con una distancia máxima de 0.44.

El grupo V contiene a 12 cepas que provienen del suelo, del Gran Canal, del Río de los Remedios y del agua de Iztapalapa. Hay que mencionar que también en este grupo existe un ET múltiple aunque

de la misma población, que es del agua de Iztapalapa. Estas cepas presentan una distancia máxima de 0.56.

El grupo VI contiene a 8 cepas, las cuales provienen principalmente del suelo y del agua de Iztapalapa y del Gran Canal, y presentó una sola cepa humana. La distancia máxima de este grupo es 0.59.

El grupo VII es el más grande (con subgrupos a, b, c, d y e), en el se encuentran cepas de varios sitios y varias fuentes. Las cepas de murciélagos están en un solo subgrupo (a) junto con las del Gran Canal, mientras que las cepas del aire de Yucatán (d y e) se encuentran separadas por otro lado. El subgrupo c presenta solo cepas de lodos del Gran Canal. También podemos notar que en las cepas del subgrupo (a) hay varios ETs múltiple, en la población asociada a los murciélagos. En el subgrupo (e) también se observan varios ETs múltiples, en este caso encontramos al único ET que incluyó cepas de muy variados sitios, suelo de Tlalpan, Gran Canal y aire de Yucatán. La distancia máxima de este grupo es de 0.50.

El grupo VIII es un grupo pequeño con 4 cepas de humanos, 1 de murciélago y 1 de suelo. La distancia máxima de este grupo es de 0.742.

El grupo IX es el más distante (0.785) y base del dendrograma, incluye 15 cepas en su mayoría de hospederos humanos junto con las de los ambientes del D. F. y Estado de México. Aquí también hay 1 ET múltiple con cepas del aire de Iztapalapa y del Gran Canal (lodos).

d) Dendrograma de ambientes secundarios.

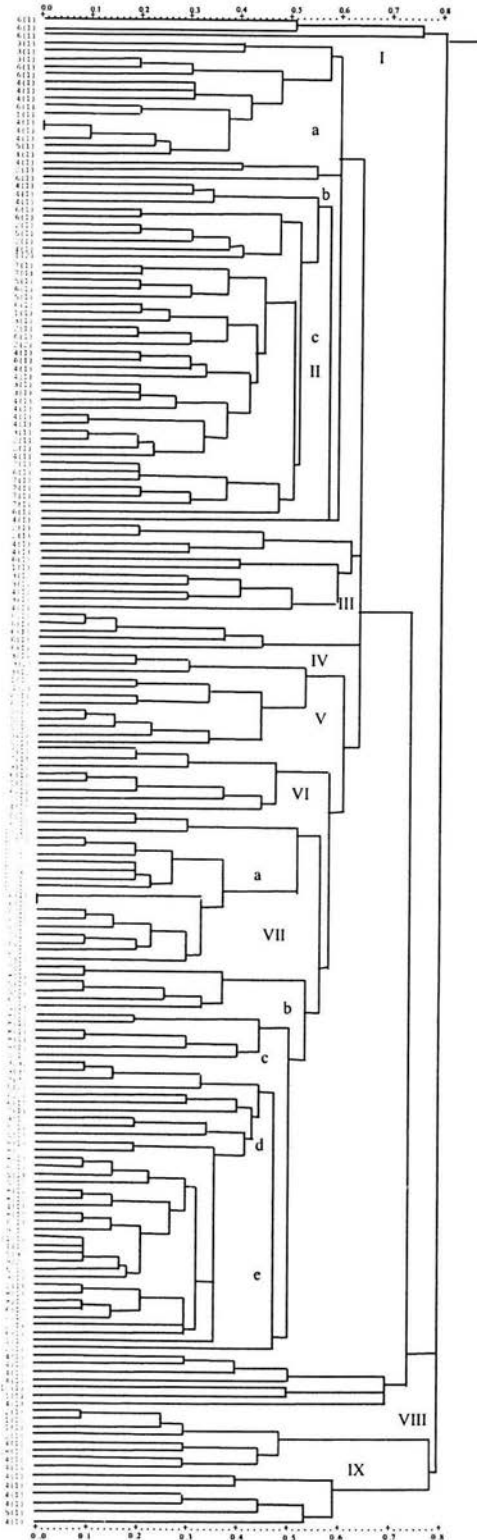


Figura No. 3 Dendrograma construido por UPGMA que muestra las distancias genéticas con distancias de 0.0 hasta 0.8. La población esta indicada por el número sin paréntesis y el número en paréntesis nos dice cuantas cepas hay en cada población de *E. coli*. Con un total de 229 cepas en IX grupos y subgrupos con letras minúsculas de bacterias de ambientes primarios y secundarios.

V) DISCUSION

Los resultados del presente estudio indican niveles de variación altos para *E. coli* en ambientes secundarios y primarios.

La diversidad genética total de *E. coli* en nuestro estudio es de $H = 0.63$, esta diversidad es alta aun para bacterias. Sin embargo, este valor es inferior al reportado para hospederos mamíferos de la República Mexicana ($n = 175$, $H = 0.73$, Rocha, 1996). En nuestro estudio, el ambiente primario (hospederos) también presentan una diversidad más baja ($H = 0.63$) que la reportada por Rocha (1996) para México. Sin embargo, esto se explica por el menor número de hospederos estudiados (humanos y murciélagos), mientras que el estudio de Rocha (1996) tiene representado 7 ordenes de mamíferos diferentes. Por otro lado, la diversidad que existe en los ambiente secundarios de la República Mexicana ($H = 0.60$) es también alta, aunque es menor que la encontrada en los hospederos de este estudio

y la reportada por Rocha (1996). Sin embargo, los ambientes secundarios, al representar varios nichos ecológicos diferentes (agua, aire y suelo) mostraron un mayor número de alelos promedio que los hospederos de este estudio (6.3 vs. 5.1), lo cual sugiere que en los ambientes hay formas genéticas diferentes que en los hospederos.

En los **ambientes secundarios** encontramos que las diversidades tienen un rango muy amplio, desde $H = 0.21$ en el aire de las cuevas en Yucatán y una $H = 0.63$ en el suelo de Tlalpan. Los sitios con **mayor diversidad** fueron el suelo de Tlalpan con $H = 0.62$, los humanos con $H = 0.62$ y el Gran Canal con $H = 0.62$. En cuanto a los **menos diversos** son los ambientes de aire de Yucatán con $H = 0.21$ y los murciélagos con $H = 0.31$, esto se puede deber a que el aire es sumamente pobre en nutrientes y por el hábito de alimentación que tienen los hospederos murciélagos.

En el **aire** por lo regular las bacterias se asocian primordialmente con aeropartículas del tamaño suficiente como para adherirse y protegerse de la desecación y los rayos ultravioleta (Rosas, et. al., 1994). Las bacterias poseen elaborados mecanismos fisiológicos para contener el estrés osmótico, como cuando se

encuentran en la atmósfera o en el polvo (Rosas et, al., 1994). En este estudio tenemos dos poblaciones aisladas de la planta de tratamiento Cerro de la Estrella, las cuales constan de una muestra de agua tratada y una del aire con los aerosoles que se generan durante el tratamiento del agua. Encontramos que la diversidad de ambas muestras es semejante, lo cual indica que gran número de genotipos distintos pueden vivir tanto en el agua como en el aire, además no se encontraron genotipos repetidos ni compartidos. Si no por otros genotipos de las bacterias del aire se encontraron también en las muestras de lodos del Gran Canal y el suelo de Tlalpan. En el dendrograma que muestra las relaciones genéticas observamos que las cepas del aire de Iztapalapa se encuentran distribuidas en varios grupos, lo cual sugiere que el aire es un lugar donde las diferentes bacterias se congregan, aunque sería necesario evaluar si es un ambiente temporal o permanente.

Como ya se mencionó, la población del aire de la cueva de Yucatán tiene una diversidad muy baja y es la población que tuvo mayor proporción de ETs múltiples, lo cual se refleja en el parámetro D de diversidad ecológica. Esta diversidad ecológica nos ayuda a visualizar y entender cómo es que en las poblaciones el

número de cepas y ETs están distribuidos. En general este parámetro concuerdan con las H obtenidas. Aunque la población del aire de Yucatán tuvo una baja diversidad, su genotipo más abundante se encontró en otras poblaciones como el suelo de Tlalpan y el Gran Canal. El dendrograma muestra que la baja diversidad se debe a que se encontraron genotipos muy relacionados entre sí (grupo VII, subgrupos d y e).

En los **ambientes acuáticos** las diversidades son altas, y sólo una tiene una $H = 0.41$, (lodos del Gran Canal). Esto se podría deber a que este ambiente difiere considerablemente en sus propiedades químicas y físicas. El Gran Canal es un receptáculo de las aguas negras domésticas e industriales, la contaminación fecal que existe suministra materia orgánica y bacterias coliformes fecales. En los sedimentos, el ambiente es más anaeróbico y hay menor movimiento que en la columna de agua.

Encontramos ETs compartidos entre el agua del desagüe y los lodos del Gran Canal, estos últimos también compartieron ETs con el suelo de Tlalpan. Como ya se mencionó, los lodos también tuvieron un genotipo compartido con el aire de Iztapalapa, este ET es el genotipo

múltiple principal que corresponde al más abundante encontrado en el aire de la cueva de Yucatán. En cuanto a las relaciones genéticas de los aislados de agua podemos observar que se encuentran distribuidos a lo largo de todo el dendrograma, indicando que el agua es un ambiente donde confluyen la mayor parte de los tipos genéticos, aunque en este caso la muestra de agua es la mejor representada (aproximadamente el 50% de las cepas). Aunque en este caso también sería necesario evaluar si es un ambiente temporal o permanente.

En **el suelo** es donde encontramos la diversidad más alta y la mayor proporción de ETs compartidos con otros ambientes secundarios: con el desagüe y los lodos del Gran Canal, y el aire de Iztapalapa y de Yucatán (en este caso el mayor porcentaje 5 %). Los genotipos del aire se encontraron distribuidos en la mayoría de los grupos genéticos, lo cual es reflejo de la alta diversidad encontrada, aunque esta población fue la menos representada en la colección. Esto puede sugerir que el suelo es uno de los reservorios más importantes de diversidad de esta bacteria.

Los hospederos humanos tienen una diversidad alta con una $H=0.63$, en cambio los murciélagos tienen una diversidad baja con

una $H=0.31$, esto se puede deber a que los hábitos alimenticios de los dos hospederos son muy diferentes, los murciélagos muestreados son frugívoros mientras que los humanos son omnívoros, puede ser que por esto tienen bacterias comensales con niveles de variación genética diferentes. La distribución de sus cepas fue diferente, los humanos tuvieron gran diversidad de genotipos, siendo que todos fueron diferentes, mientras que los murciélagos mostraron muchos genotipos repetidos. Ambos hospederos tuvieron ETs que no se encontraron en ninguna otra población. En cuanto a las relaciones genéticas, los hospederos humanos están distribuidos ampliamente en casi todo el dendrograma con genotipos muy diversos, en cambio los hospederos murciélagos se encuentran en un solo grupo (VII a) y sólo una cepa en el grupo VIII. Esto refleja una diversidad más baja ya que tiene genotipos muy similares entre sí.

El parámetro G_{st} nos indican cómo está organizada la diversidad entre subpoblaciones. Trabajos anteriores sobre la estructura genética de *E. coli* han mostrado muy poca diferenciación entre subpoblaciones de hospederos de diferentes continentes y con diferentes fuentes de infección (Souza et al., 1999; Selander et. al, 1987). Los resultados que nosotros reportamos muestran niveles de

diferenciación, en algunos casos, mucho más altos que los encontrados entre hospederos. Por ejemplo, la diferenciación de la población que habita dentro de los hospederos murciélagos es muy diferente que el de las bacterias que se encuentran en el aire de la misma cueva ($G_{st} = 0.4$). Otro caso es la alta diferenciación entre el agua del Gran Canal y del Río de los Remedios ($G_{st} = 0.3$), o entre los humanos y los murciélagos ($G_{st} = 0.18$). Estos ejemplos nos muestran que en algunos casos existe diferenciación tanto entre ambientes primarios, como entre ambientes secundarios y entre ellos. Sin embargo, en la mayoría de los casos nuestros análisis no muestran diferenciación entre poblaciones y el número de genotipos compartidos fue muy pequeño (2%).

Por otro lado, evaluamos como se comportan las poblaciones comparando ambientes y localidades, encontramos que son muy similares y por lo tanto podemos decir que nuestras poblaciones tienen un flujo génico alto.

Sin embargo, estudios realizados con agua de drenaje en Australia y Estados Unidos sugieren que la diversidad genética es mayor en el agua de desagüe que en los hospederos mismos y que las cepas encontradas en el desagüe rara vez son las mismas que las que

existen en el colon de los posibles hospederos (Pupo y Richarson; 1995 Parveen, et al., 1999). A diferencia de estos resultados nosotros encontramos que la diversidad no es mayor en el drenaje y que los genotipos de los hospederos humanos se encontraron en los mismos grupos que los del drenaje.

VI) CONCLUSIONES

La diversidad genética de *E. coli* en ambientes secundarios es alta. También, la diversidad encontrada en los hospederos humanos y sus ambientes secundarios tienen una variación alta. El análisis de las cepas de *E. coli* en este estudio indican que la mayor parte de las cepas asociadas al ambiente pueden ser específicas de un ambiente mientras que las cepas de los humanos se encuentran en casi todos los grupos, al igual que las cepas ambientales del Gran Canal.

Los ambientes aire de las cuevas y sus hospederos, los murciélagos, tienen baja la variación genética.

Se encontró que existen cepas particulares a cada ambiente como también una poza génica común.

Durante este trabajo nos hicimos dos preguntas las cuales ahora si podemos contestar, la primera pregunta nos dice: ¿Es mayor la diversidad genética de *E. coli* en ambientes secundarios que asociados a hospederos? Nosotros la podemos contestar diciendo que las diversidades son muy similares, la pregunta dos; ¿Existe especificidad de las cepas asociadas a ambientes secundarios particulares? Nosotros decimos que si hay especificidad para cada cepa en su determinado ambiente.

Otro punto importante es que existen formas genéticas diferentes en los ambientes que en los hospederos.

También podemos concluir que en el agua es un ambiente donde confluyen la mayor parte de los tipos genéticos, ya que en el dendrograma se encuentra en todos los grupos.

A otro punto que llegamos es que el suelo es un reservorio importante de la diversidad genética de esta bacteria.

Por ultimo, podemos decir que entre los hospederos y su ambiente estos tuvieron ETs que no se encontraron en ninguna otra población. En cuanto a las relaciones genéticas, los hospederos humanos se encuentra ampliamente distribuidos en casi todo el

dendrograma con genotipos muy diversos, en cambio los hospederos murciélagos se encuentran en un solo grupo.

VII) REFERENCIAS

- Atlas, R. M. 1990. Microbiología. Fundamentos y aplicaciones. México. 870 pp.
- Bettelheim, K. A., E. M. Cooke, S. O'Farrell, and R. A. Shooter. 1997. The effect of diet on intestinal *Escherichia coli* Journal of Hygiene 79:43-45
- Blattner, F. R. I., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpartrick, M. A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau, y Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K - 12 . Science. 277: 1453 - 1462.
- Brenner, D. J. 1984. Family Enterobacteriaceae . In Bergelys Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Krieg. Williams Qwilkins Baltimore. 1(2):408-420.
- Brock y Mandigan. 1991. Microbiología. Editorial. Prentice Hall Hispanoamericana S. A. México, D. F. 955pp
- Boyd. F. E., W. Fu-Sheng., T. S. Whittam. y K. Selander. 1996. Molecular genetic relationships of the Salmonellae. Applied and Environmental Microbiology. 804-808.
- Cerritos, R. 1999. Análisis jerárquico en la estructura genética de *Escherichia coli* asociada a murciélagos de la República mexicana. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 64 p.
- Caugant, D. A., B. R. Levin y R. K. Selander. 1981. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of human host. Genetics 98: 123-134.
- Dykhuzien, D. E. y L. Green. 1991. Recombination in *Escherichia coli*. Infection and Inmunity. 60:3953-3961.
- Gargallo - Viola, 1989. Enzyme polymorphism, prodigiosin production and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*. Journal of clinical microbiology. 27:860-868.
- Guttman, D. S. 1997. Recombination and clonality in natural populations of *Escherichia coli*. TREE 12: 16 -22.
- Hartl, D. L. y D. E. Dykhuizen, 1984. The population genetics of *Escherichia coli*. Ann. Rev. Genet. 18:31 - 68.

- Hebert P. D. N. y M. J. Beaton, 1993. Methodologies for allozyme Analysis Using Cellulose Acetate Electrophoresis. Helena Laboratories. EUA. 31 pp
- Hedrick P. W. 2000. Genetics of populations. Second edition. Jones and Bartlett publishers. Boston. 553 p.
- Le Clerc J. E., B. G. Li, W. L. Payne y T. A. Cebula., 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens.274 (5290): 1208-1211
- Lenski R. E y M.Travisano. 1994. Dynamics of adaptation and diversification: A 10,000- generation experiment with bacterial populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91, 6808-6814 p.
- Levin A., D. Lin, P. A Grossman 1997. Genes Dev. Proceedings National Academy of Sciences. USA. 88:675
- Lewin, B. 1998. Genes V. Oxford Cell press, Oxford.
- Logan, N. A. 1994. Bacterial systematics. Blackwell scientific publications, Oxford, 263pp.
- Madigan, M. T. J.M. Martinko y J. Parker. 2000. Brock Biology of microorganisms. Novena edición. Prentice Hall, USA. 991pp.
- Mazari, M. y D. M. Mackay. 1993. Potential for groundwater contamination in Mexico city. Environ. Sci. Technol. American Chemical Society. 27:(5) 794-802.
- Milkman, R. 1973 Electrophoretic variation in *Escherichia coli* from natural sources. Science 182: 1024-1026.
- Milkman, R. y A. Stolzhus. 1988. Molecular evolution of *Escherichia coli* chromosome. II. Colnal segments. Genetics 120:359-366
- Moya A. 1989. Sobre la estructura de la teoría de la evolución. Editorial Anthropos. Universidad del país Vasco. 172 p.
- Musser, J. M., D. A. Benis, H Ishikawa y R. K. Selander. 1987 Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*. Journal of bacteriology. 163:1021-1031.
- National Research Council., Academia de la investigación Científica, A. C. y Academia Nacional de Ingeniería, A. C. 1995. El suministro de agua de la Ciudad de México.. 89 p.
- Neidhardt, F. C., J. L. Ingraham., K. B. magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger (eds). 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washshigton, D. C., EUA.
- Neidhardt, F. C., Curtiss, J. L. Ingraham., E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. E

- Umbarger (eds). 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washinton, D. C., EUA.
- Parveen,S., K. M. Portier, K. Robinson, L. Edmiston y M. L. Tamplin. 1999. Discriminant analysis of robotype profiles of *Escherichia coli* for differentiating human and nonhuman sources of fecal pollution. *App. Environ. Microbiol.* 65:3142-3147
- Piffaretti J. C., Kressebuch H., Aeschbacher M., Bille. J., Bannerman E., Musser J. M. Selander R. K. & Rocour J. 1989. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 86:3818-3822
- Pupo, G. M. y B. J. Richarson, 1995. Biochemical genetics of a natural population of *Escherichia coli*: seasonal changes in alleles and haplotypes. *Microbiology.* 141: 1037-1044.
- Rocha, M. M. 1996. Estructura genetica de las poblaciones naturales de *Escherichia coli* en mamiferos silvestres. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 75 p.
- Rosas, I.,A. Yela, E. Salinas y E. Calva. 1994. Bacterias entericas en la atmosfera. . *Ciencia y desarrollo.* XX (118) 54-57 p.
- Salinas, C. E. 1998. Caracterización de aerobacterias entéricas en ambientes intra y extramuros de la Ciudad de México. Tesis de Maestría . Facultad de Ciencias. UNAM.
- Secretaria General de obras. Dirección General de construcción y operación Hidráulica. Ciudad de México. Departamento del Distrito Federal.
- Selander, R. K. y B. R. Levin. 1980. Genetic diversity and structure in *Escherichia coli* populations. *Science* 210:545-547 p.
- Selander, R. K., D. A. Caugan, y T. S. Whittam. 1987. Genatic structure and variation in nature populations of *Escherichia coli*. En: F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter y H. E. Umbarger (eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washinton, D.C., EUA. 1625-1648 p.
- Souza V. 1990. genética y ecología de poblaciones de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* asociado a *Phaseolus vulgaris* y a *P. coccineus* cultivado y silvestre, en Morelos, México. Tesis Doctoral, UACPyP, UNAM. Mexico

- Souza, V., T. T. Nguyen, R. R. Hudson, D. Pinero y R. Lenski. 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: Evidence for sex? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8389-8393.
- Souza V. , M. Rocha., A. Valera y Luis Eguiarte. 1999. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. Applied and Environmental Microbiology. V. 65 No. 8 p 3373 – 3385.
- Staley, J. T. 1999 Bacterial biodiversity: a time for place. ASM News. 65(10) 681 – 687.
- Whittam T. 1990 Programas ETDIV, ETCLUS y ETMEGA. Pennsylvania State University
- Whittam, T. S., H. Ochman, y R. K. Selander. 1983. Geographical components of linkage disequilibrium in natural populations of *Escherichia coli*. Molecular Biology and Evolution 1:67-83 p.
- Williams D. F. y J. C. Berg. 1992 The aggregation of colloidal particles at the air - water interfaces Journal colloid interface Science 152:281-229

Anexo A (Lectura de isoenzimas)

Cepas de referencia utilizadas en el estudio y sus alelos observados para cada locus

No. Cepario	IDH	PEP	FGM	ARK	ME1	ME2	MP1	ADH	MDH	G6PH	XDH
64*	4	3	5	3	3	7	3	3	2	3	4
2106 (ECOR)**	2	3	4	2	3	7	3	2	3	3	3
2100 (ECOR)**	2	2	6	3	2	5	5	6	3	4	5

*cepa de Marmosa *canasces* que es parte del cepario IECOL.

**cepa cepa de colección de referencia ECOR 26 humano.

*** ECOR 20, becerro.

DATOS DE ISOENZIMAS

No. Cepario	Población	IDH	PEP	FGM	ARK	ME1	ME2	MP1	ADH	MDH	G6P	XDH
3642	1	3	3	5	3	3	5	3	3	3	3	4
3658	1	4	3	5	4	3	7	1	4	3	3	4
3668	1	4	3	5	4	3	7	9	4	3	3	4
3669	1	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	9
3671	1	6	3	5	3	3	7	2	3	3	4	4
3674	1	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
3680	1	6	3	5	3	3	7	2	3	3	4	4
3694	1	6	3	5	4	3	9	2	4	3	4	5
3695	1	9	5	4	2	3	9	3	3	3	4	4
3696	1	5	3	5	4	3	9	4	4	9	9	5
3709	1	5	5	3	2	2	9	3	3	1	2	4
3712	1	4	4	3	3	3	7	2	3	3	2	3
6974	1	9	9	9	3	9	9	9	9	3	9	9
6975	1	9	9	9	2	3	9	9	9	2	9	9
3720	6	6	1	4	4	4	9	2	3	4	9	9
3721	6	4	4	5	3	9	9	2	3	4	3	4
3722	6	2	4	4	3	3	9	2	9	3	2	9
3723	6	4	4	5	3	3	9	2	3	3	3	4
3724	6	4	4	5	3	3	9	2	3	3	3	4
3725	6	5	3	5	9	3	9	9	9	3	4	9
3726	6	4	4	5	4	3	9	2	4	9	2	5
3727	6	4	3	5	3	3	9	3	9	3	3	9
3728	6	5	3	3	3	3	7	3	4	3	3	5
3729	6	4	4	3	3	3	6	2	3	3	2	4
3730	6	4	4	3	3	3	9	2	3	3	1	5
3731	6	5	3	3	3	2	7	3	4	3	2	4
3732	6	4	4	4	3	3	9	3	9	3	4	4
3733	6	4	2	4	6	3	9	3	5	3	3	3
3734	6	4	2	4	6	3	9	3	5	3	3	5
3735	6	4	2	5	6	3	9	3	9	3	3	9

3736	6	4	2	5	4	3	9	2	4	3	3	9
3737	6	4	2	6	3	3	9	3	9	3	3	3
3738	6	6	2	6	5	3	9	2	5	3	3	3
3739	6	4	2	6	5	3	9	2	5	3	3	3
3740	6	4	2	6	5	3	9	2	5	3	4	3
3741	6	5	1	6	5	3	9	2	4	3	4	3
3742	6	6	2	6	5	2	9	3	9	3	3	3
3743	6	4	3	6	4	9	4	3	9	3	3	3
3744	6	4	3	6	5	9	4	3	4	3	3	3
3745	6	4	3	6	3	3	9	3	9	3	3	3
3746	6	4	3	6	4	3	9	2	4	3	3	3
3747	6	5	1	4	1	2	3	2	2	3	5	2
3748	6	9	3	4	2	1	9	3	3	3	4	4
3749	6	6	1	5	3	2	5	3	4	3	3	4
3750	6	6	2	5	3	2	7	2	4	3	3	5
3751	6	4	3	5	3	3	4	2	5	3	3	5
3752	6	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
3753	6	4	3	5	3	3	9	3	3	3	3	4
3754	6	4	3	5	3	3	5	3	4	3	4	5
3765	6	5	2	6	2	9	7	3	3	3	4	5
3766	6	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
3768	6	4	3	5	3	3	5	2	3	3	2	4
3769	6	6	2	5	4	5	7	3	4	3	4	5
3770	6	4	3	5	3	4	7	3	3	3	4	4
3771	6	4	3	5	3	9	6	2	3	3	3	4
3772	6	6	2	5	4	3	9	3	4	3	4	5
3773	6	5	2	5	4	3	5	3	4	3	4	5
3774	6	9	1	5	2	2	4	2	2	3	4	4
3755	5	4	3	9	3	3	5	2	3	3	3	4
3756	5	6	3	6	2	3	7	2	2	3	2	9
3758	5	9	2	4	3	3	9	3	3	3	4	4
3759	5	4	3	6	2	3	7	3	4	3	3	5
3760	5	6	2	6	2	3	7	2	4	3	3	9
3761	5	4	3	6	2	3	7	2	4	3	3	4
3762	5	6	3	6	2	9	6	2	3	3	3	5
3763	5	4	3	6	2	3	5	2	3	3	3	4
3764	5	4	4	6	2	3	7	2	4	3	3	4
3872	5	4	2	5	3	5	7	3	3	3	3	5
3873	5	4	2	5	3	9	7	3	4	3	4	5
3874	5	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	5
3875	5	6	2	5	3	3	7	2	9	3	3	4
3876	5	4	2	5	5	3	7	4	3	3	3	5
3877	5	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	5
3878	5	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	5
3880	5	5	3	5	3	3	7	2	4	3	3	5
3881	5	4	2	5	3	9	6	2	9	3	3	9
3882	5	6	2	4	2	3	7	3	9	2	4	9
3883	5	5	2	5	3	3	7	2	9	3	3	4
3884	5	4	2	5	3	3	7	2	3	3	3	4
3885	5	6	2	5	5	3	7	3	4	3	4	5
3886	5	4	3	5	4	9	7	2	3	2	3	4
3839	8	9	3	5	3	9	9	2	3	3	3	4
3840	8	4	3	5	3	3	7	1	3	3	3	4
3841	8	4	3	5	3	9	7	1	3	3	3	4
3842	8	4	3	5	3	9	5	1	3	3	3	4
3843	8	4	3	5	3	9	7	1	3	3	3	4
3844	8	6	3	5	4	3	9	2	3	3	3	4
3845	8	6	3	5	4	3	7	2	3	3	3	5

3846	8	4	3	4	3	3	7	1	3	3	3	4
3847	8	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
3848	8	4	3	5	3	3	5	2	3	3	3	4
3849	8	4	3	5	3	3	9	2	3	3	3	4
3850	8	6	4	5	3	3	5	2	3	3	4	4
3851	8	4	3	5	3	9	7	2	3	3	3	4
3852	8	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
3853	8	9	9	4	3	9	9	9	9	3	3	3
3854	8	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
3855	8	6	2	5	1	3	9	2	9	3	3	9
3856	8	6	4	5	2	3	5	2	1	3	4	4
3857	8	6	3	5	2	3	5	2	1	3	3	4
3858	7	6	2	5	3	3	7	3	2	3	4	5
3859	7	4	2	5	1	3	9	3	9	3	3	4
3860	7	6	2	5	1	3	9	2	9	3	2	5
3861	7	4	2	5	3	3	9	2	2	3	3	5
3862	7	6	2	5	3	3	6	3	2	3	3	5
3863	7	4	4	4	4	3	7	2	3	3	3	4
3864	7	4	4	4	4	3	5	2	3	4	3	4
3865	7	5	2	4	4	3	5	3	4	3	3	5
3866	7	5	3	5	5	3	6	3	4	3	4	5
3867	7	5	2	5	5	3	5	3	4	3	3	5
3868	7	2	4	5	3	4	5	2	3	3	3	4
3869	7	5	3	5	5	3	9	3	4	3	3	5
3870	7	6	4	5	5	3	9	3	4	3	3	5
3871	7	9	4	3	3	3	6	3	3	3	4	3
4176	9	4	3	5	4	9	7	2	3	2	3	4
4177	9	4	3	5	3	4	7	2	3	3	3	4
4178	9	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
4179	9	4	3	5	2	3	7	2	3	3	3	3
4180	9	4	3	5	3	4	7	2	3	2	3	4
4181	9	4	3	5	3	2	7	2	3	2	3	4
4182	9	4	3	5	3	2	7	2	3	2	3	4
4183	9	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	3
4184	9	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	3
4185	9	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
4186	9	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
4187	9	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
4188	9	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
4189	9	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
4190	9	4	3	5	3	2	7	2	3	3	3	4
4191	9	4	3	5	3	2	7	2	3	2	3	4
4192	9	4	3	5	3	3	7	2	3	3	3	4
4193	9	4	3	5	3	4	7	2	3	3	3	4
4194	9	4	3	5	3	4	7	2	3	2	3	4
4195	9	4	3	5	3	4	7	2	3	2	3	4
4196	9	4	3	5	3	4	7	2	3	3	3	4
3656	2	4	3	5	4	3	7	1	4	3	3	4
3661	2	9	3	5	3	3	9	2	3	3	3	4
5033	2	4	3	5	3	3	9	3	4	4	4	5
5034	2	5	2	5	3	3	9	3	4	4	4	5
5035	2	4	3	5	3	3	9	2	3	3	4	4
5036	2	9	9	4	3	9	9	9	9	3	3	3
5037	2	9	4	5	3	3	9	4	4	9	3	3
5038	2	9	4	5	3	3	9	9	9	9	3	3
5039	2	5	3	5	3	3	9	2	4	3	4	5
5040	2	5	9	5	3	9	7	4	5	3	4	6
5041	2	4	2	5	3	3	9	3	4	3	3	5

5042	2	4	3	5	3	1	9	2	3	2	4	4
5043	2	5	3	5	3	3	9	3	4	3	4	5
5044	2	5	2	5	3	3	9	3	5	3	4	5
5045	2	9	3	5	3	3	9	2	5	3	4	4
5046	2	5	3	5	3	3	9	3	4	3	4	5
5047	2	5	3	5	3	9	7	2	9	3	4	4
6976	2	9	9	9	2	9	9	9	9	2	9	9
6977	2	9	9	9	2	9	3	3	9	2	9	9
5048	3	4	2	5	5	3	5	2	3	3	3	5
5049	3	5	2	5	3	3	9	3	3	3	4	5
5050	3	6	3	4	3	3	7	4	4	9	4	5
5051	3	6	9	5	3	3	9	3	9	3	4	5
5052	3	6	4	5	3	3	9	3	9	9	4	4
5053	3	6	3	5	3	3	9	4	4	3	4	5
5054	3	9	3	2	1	3	9	9	9	3	9	9
5055	3	4	4	3	3	3	9	4	4	3	4	9
5056	3	7	4	4	3	3	9	1	9	3	4	9
5057	3	6	4	4	1	3	7	4	4	3	4	4
5058	3	4	4	4	4	3	7	3	3	3	4	4
5059	3	9	3	6	2	3	7	5	4	3	9	4
5060	3	9	3	6	3	3	7	4	4	3	9	4
5061	3	9	3	6	3	3	7	4	4	3	9	4
5062	3	9	3	9	3	3	7	4	4	3	9	1
6879	4	9	3	4	2	9	9	9	9	3	3	4
6880	4	9	3	4	3	3	4	2	2	3	4	4
6881	4	9	3	4	3	3	7	3	9	3	4	4
6882	4	9	3	4	3	9	9	3	9	3	4	4
6883	4	9	3	4	3	9	9	9	9	9	9	9
6884	4	9	3	5	3	2	3	3	9	3	4	4
6885	4	9	9	4	3	2	5	9	9	9	9	9
6886	4	3	2	5	2	9	3	3	9	2	2	9
6887	4	9	2	4	3	9	9	9	2	3	4	9
6888	4	9	2	4	3	9	9	3	9	3	4	9
6889	4	9	2	4	3	9	9	3	9	3	4	4
6890	4	5	4	5	2	9	9	4	9	1	4	5
6891	4	7	4	5	3	9	9	3	3	1	4	9
6892	4	7	2	5	3	3	9	3	9	3	4	4
6893	4	7	3	5	3	3	7	3	3	3	4	9
6894	4	6	3	4	2	2	9	5	9	1	4	4
6895	4	5	3	5	3	4	9	3	9	3	4	9
6896	4	5	9	5	3	4	9	3	9	3	4	5
6897	4	5	9	4	3	3	7	4	4	2	3	9
6898	4	9	9	5	3	9	9	2	3	3	4	9
6899	4	5	4	5	3	3	7	3	9	9	4	9
6900	4	7	5	5	3	3	7	3	4	3	4	4
6901	4	5	3	5	2	6	9	3	4	2	4	4
6902	4	5	3	4	3	7	4	9	9	2	4	9
6903	4	6	3	4	3	7	3	5	4	2	4	5
6904	4	9	4	5	3	7	3	4	9	3	4	9
6905	4	4	4	5	3	7	3	3	4	3	4	5
6906	4	4	4	5	3	3	7	4	4	9	4	5
6907	4	9	4	5	3	3	7	3	9	3	3	9
6908	4	5	4	5	3	2	7	3	3	3	4	4
6909	4	9	1	5	2	3	7	1	9	3	3	4
6910	4	6	3	4	2	1	7	6	3	2	4	9
6911	4	4	3	5	3	3	7	1	3	3	4	9
6912	4	4	3	3	3	3	7	2	9	3	4	6
6913	4	6	4	3	2	1	7	5	3	2	4	9

6914	4	4	4	3	3	9	7	3	2	1	4	4
6915	4	9	3	4	3	9	7	2	5	3	4	4
6916	4	4	4	4	3	9	6	4	3	3	4	5
6917	4	4	4	5	2	3	9	3	3	1	4	9
6918	4	6	4	5	3	3	7	3	9	3	4	9
3797	10	4	3	3	3	3	9	3	3	3	3	9
3798	10	4	3	3	3	3	9	3	9	3	3	9
3799	10	4	3	3	3	3	9	3	3	3	3	9
3800	10	4	3	3	3	9	4	3	3	3	3	9
3801	10	4	3	3	3	3	9	3	3	3	3	9
3802	10	4	3	3	3	3	9	3	9	3	3	9
3803	10	4	3	3	3	3	9	3	2	3	3	9
3804	10	4	3	3	3	3	9	3	9	4	3	9
3805	10	4	3	3	3	3	9	3	3	3	3	9
3806	10	4	2	3	3	3	9	3	3	3	3	5
3807	10	4	2	3	3	3	9	3	3	3	3	5
3808	10	4	2	3	3	3	9	3	3	3	3	4
3809	10	4	2	3	3	3	9	3	3	3	3	4
3810	10	4	2	3	3	3	9	3	3	3	3	4
3811	10	4	2	3	3	3	9	3	3	3	3	4
3812	10	4	2	3	3	3	9	3	3	3	3	4
3813	10	4	2	3	3	3	9	3	3	3	3	4
3814	10	4	2	3	3	3	9	3	3	3	3	4
3817	10	4	1	3	3	3	9	3	3	3	3	4
3828	10	3	2	3	2	2	9	2	3	3	3	3

ANEXO B (Medios y reactivos)

LB (Líquido) para un litro de agua destilada

Triptona .
Cloruro de sodio.
Extrato de Levadura

TSA (agar de soya y tripticaseina)

Peptona de caseína
Peptona de soya
Cloruro de sodio
Agar

Agar de Mac Conkey

Peptona de caseína
Peptona de gelatina
Peptona de carne
Lactosa
Sales biliares
Cloruro de sodio
Agar
Rojo neutro
Cristal violeta.

EMB agar

Peptona
Lactosa
Sucrosa
Fosfato de dipotasio
Agar
Eosin
Azul de metileno

Agar de Verde Brillante

Peptona de carne
Extracto de Levadura
Peptona de caseína
Cloruro de sodio
Lactosa

Sacarosa
Rojo de fenol
Verde brillante
Agar.

TSI (Triple sugar iron agar)

Extracto de carne
Extracto de levadura
Peptona
Peptona proteasa
Lactosa
Sucrosa
Sulfato ferroso
Cloruro de sodio
Tiosulfato de sodio
Agar

Rojo de fenol

SS Agar

Extrato de vaca 5 gr.
Peptona 5gr.
Lactosa 10 gr.
Sales de bilis No. 3 8.5 gr.
Citrato de sodio 8.5 gr
Tiosulfato de sodio 8.5 gr.
Citrato ferrico 1 gr.
Verde brillante 0.83 mgr.
Rojo neutro 0.025 gr.
Agar 13.5 gr.

UL

Peptona
Glicerol

Urea (slant)

Base de urea
Agar

Medio SIM

Peptona de caseina
Peptona de carne
Sulfato de hierro y amonio
Tiosulfato de sodio
Agar

Tris Glycina (TG)

30 g. Trizma base
144 g. Glycina
En un Litro de agua destilada. Dilución 1:9

0.09 M Tris HCl pH = 7

11.1 g. Trizma base
87.5 ml. 1 M de HCl.
1lt. agua destilada

0.09 M Tris HCl pH = 8

11.1 g Trizma base
62 ml. 1 M HCl
1lt. agua destilada.

0.20 M Tris HCl pH = 9

9.86 g. Trizma base
12 ml 1M HCl
400 ml. de agua destilada.

Enzimas ensayadas:

Glucose - 6 - phosphatase deshydrogenasa (G6PDH)

- 0.6 ml Tris-HCl buffer pH= 8
- 1.5 ml NADP
- 12 gotas D-glucosa-6-fosfato
- 6 gotas MgCl₂
- 5 gotas MTT
- 5 gotas PMS **
- 2 ml de agar

** Añadir al final

Phosphoglucomutase (PGM)

- 1 ml Tris-HCl buffer pH = 8
- 5 gotas MgCl₂
- 5 gotas Glucosa-1-fosfato solución *
- 1.5 ml NADP
- 5 gotas MTT
- 5 gotas PMS **
- 2 gotas G6PDH **
- 2 ml agar

solución *

Glucosa-1-fosfato preparar solución
250 mg de glucosa-1-fosfato, grado III
250 mg glucosa-1-fosfato, grado IV
5 ml de agua destilada

Malate deshydrogenase (MDH)

- 1 ml Tris-HCl buffer pH = 8
- 1.5 ml NAD
- 13 gotas de sustrato malico
- 5 gotas MTT

Preparar sustrato malico

180 ml de agua destilada

20 ml Tris-HCl, pH = 9

3.68 g L-ácido malico

Ajustar pH = 8

Manose-6-phosphatase-isomerase (PGI)

- 0.5 ml Tris-HCl buffer pH=8
- 3 ml gkucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- 1.5 ml NADP
- 5 gotas MTT
- 5 gotas PMS**
- 2 ml de agar

Xanthine Dehydrogenase (XDH)

- 1 ml Tris-HCl buffer pH = 8
- 20 gotas de Hyposantina
- 1.5 ml NAD
- 5 gotas MTT
- 5 gotas PMS**
- 2 ml de agar

Malate Dehydrogenase (ME)

- 0.6 ml Tris-HCl buffer pH=8
- 12 gotas de sustrato malico
- 1.5 ml NADP
- 2 gotas MgCl₂
- 5 gotas MTT
- 5 gotas PMS**
- 2 ml de agar

Mannose-6-phosphate isomerase (MPI)

- 1 ml Tris-HCl buffer pH = 8
- 1.5 ml NAD
- 5 gotas D-manosa-6-fosfato
- 5 gotas MTT
- 5 gotas PMS**
- 2 gota G6PDH**
- 1 gota PGI
- 2 ml de agar

Alcohol Dehydrogenase (ADH)

- 0.5 ml Tris-HCl buffer pH= 7
- 1.5 ml NAD
- 5 gotas MTT
- 3 gotas etanol o isopropanol
- 5 gotas PMS**
- 2 ml de agar

Arginine Kinase (ARK)

- 0.5 ml Tris-HCl buffer pH=8
- 1.5 ml NAD
- 5 gotas MgCl₂
- 5 gotas fosfato-L-arginina
- 5 gotas ADP + D-glucosa solución ***
- 5 gotas MTT
- 5 gotas PMS**
- 1 gota Hexoquinasa**
- 1 gota G6PDH**
- 2 ml agar

solución ADP ***

0.10 g ADP

3.15 g D-glucosa

10 ml agua destilada

Peptidase (PEP)

- 2 ml 0.02 M Na₂HPO₄ (ajustar pH = 7.5)
- 4 gotas de peroxidasa
- 8 gotas de o-Dianisidine
- 2 gotas MgCl₂
- 8 gotas LEU-ALA (peptide 2)
- 4 gotas L-amino ácido oxidasa**

** Añadir al final