



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**BÚSQUEDA DE MECANISMOS DE RESISTENCIA
BACTERIANOS CONCOMITANTES A PESTICIDAS Y
ANTIBIÓTICOS.**

TESIS DE MAESTRÍA PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
**Maestra en Ciencias de la Producción y de la
Salud Animal**

PRESENTA:

XANTHIA OLINSKA RIVERA RAMÍREZ

COMITÉ TUTOR:

**RAFAEL CAMACHO CARRANZA (IIB)
JOSÉ ÁNGEL GUTIÉRREZ PABELLO (FMVZ)
JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT (FMVZ)**

Ciudad Universitaria Cd. Mx

Noviembre 2018



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.

*"Si puedes tomar todas tus ganancias, y arriesgarlas a un solo golpe de fortuna...
perderlas y empezar otra vez, empezar de nuevo y permanecer impasible ante la
adversidad... La Tierra, lo que contiene, todo te pertenecerá y lo que es más...*

Serás un HOMBRE... hijo mío."

Rudyard Kipling

Bendigo el día que me enseñaste a escribir, hasta siempre hermano.

*El amor tiene diversas formas, reconocerlo a simple vista
es fácil, con tan sólo ver los ojos de mi madre.*

Una oda a mi familia, en cada uno de mis pasos.

A Samuel, las historias nunca acabarán.

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto PAPIT IN-204117, por el financiamiento del trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por la disposición de sus instalaciones y equipo que hicieron posible el desarrollo experimental.

A las doctoras Regina Dorinda Montero Montoya y Sandra Gómez Arroyo, por su apoyo desde el inicio de éste proyecto.

A mis tutores: Dr. Rafael Camacho Carranza, Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y Dr. José Ivan Sánchez Betancourt, sin su apoyo, paciencia y exigencia no habría desarrollado un mejor criterio y superado las dificultades durante la marcha. Gracias por confiar en mí.

A los integrantes de mi jurado: Dr. Fernando Alba Hurtado, Dr. Roberto Cabrera Contreras, Dr. José Ivan Sánchez Betancourt, Dra. Regina Dorinda Montero Montoya y al Dr. David René Romero Camarena, por su paciencia y meticulosidad al revisar éste trabajo.

A Sandra Luz Hernández Ojeda, por el apoyo técnico y apoyo moral, de corazón, gracias Sandy.

A la Dra. Martha Elinos Báez, por su ternura y los postres inesperados.

A las integrantes del laboratorio C-206:

Rebeca Sánchez Palacios por tu calidez, amistad y apoyo moral.

Mónica María Loaiza Zuluaga por tu amistad, comprensión y esos días inolvidables de largas pláticas, desayunos, risas, lágrimas y crepas, espero volvamos a vivirlo.

Cynthia María Navarro Mobarak, por apoyarme a lanzarme a mi primer congreso internacional, por los aventones y pláticas nocturnas, las risas y los cafés del gordo.

Laurel Hernández Gutiérrez y Ana Lilia Marroquín Pérez por las escapadas y los pulques, la buena vibra y su carisma.

A los Borbotones:

Circe Martha Alicia Mouret Hernández, Luz Daniela Mota Ramírez, Kevin Cruz Bernal y Oscar Samuel Ávila Rosales, por todos los memes, risas y bromas.

A los chicos del Laboratorio de Genética Molecular:

Brenda Xanath de Luna Villasana, Kevin Cruz Bernal, Cristopher Levitt Alejandro Moreno Yllescas, Jann Uriel Macías Guerrero y Matilda Martínez, por llegar al laboratorio y a mi vida, por su entusiasmo por aprender y descubrir, por darme una lección de disciplina al estar a cargo de sus necesidades, como almas nuevas en el mundo de la ciencia. Prometo apoyarlos y guiarlos lo mejor posible, seguiré dando mi mejor esfuerzo.

A mi madre por siempre apoyarme y predicar con un ejemplo de dedicación y convicción.

A mis hermanos, por impulsarme a ser cada día mejor, los amo.

A mamá Luz y Engelbert, por brindarme su amor y apoyo, por siempre acogermme y hacerme sentir como en casa, por hacerme parte de ustedes, los amo.

A la familia Lerma Martínez, por mostrarme el origen de mis raíces y hacerme sentir orgullosa de ellas.

A mis padrinos Bertita y Oliverio, y la familia Ramírez Ruiz (Dr. Fidel, Fabi, Lola) por su amistad y mensajes de apoyo, no olvidaré sus palabras de aliento el día que decidí ingresar al posgrado, los tengo siempre en mi corazón y mente.

A Samuel Ávila, por comportarte de acuerdo al momento, por convertirte en mi compañero de vida, secar mis lágrimas, hacerme reír, mostrarme la vida desde una nueva perspectiva; por sacar la mejor versión de mí, te amo.

RESUMEN

El uso y abuso de los pesticidas en la agricultura, ha dado como resultado cambios en la capacidad metabólica de bacterias de suelo. Así mismo, en la última década, el problema de la resistencia bacteriana ha incrementado, creando la necesidad de buscar o sintetizar nuevos compuestos para la elaboración de antibióticos. Trabajos recientes han relacionado la habilidad de la microbiota de suelo para resistir a pesticidas, antibióticos y metales pesados mediante la transferencia horizontal de material genético.

Sin embargo, se ha demostrado que algunos herbicidas pueden inducir cambios en la susceptibilidad a los antibióticos en bacterias como *E. coli* y *Salmonella enterica* a través de transportadores tipo AcrAB, lo cual podría explicar la importancia de la resistencia cruzada a pesticidas y antibióticos.

Metodología: En este trabajo exploramos cepas resistentes a pesticidas (como asulam, glifosato y paratión metílico) usando como modelo biológico una cepa silvestre de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Exploramos si esas cepas resistentes a pesticidas eran también resistentes a antibióticos como β -lactámicos, cloranfenicol, aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol y nitrofurantoina. Finalmente determinamos si la resistencia a los pesticidas se mantenía en una segunda exposición.

Resultados: Se aislaron 257 cepas resistentes a pesticidas, de las cuales 53 mostraron ser menos susceptibles a ampicilina, algunas cefalosporinas, y/o aminoglucósidos.

Conclusiones: Determinamos que la concentración mínima de antibiótico requerida para afectar esas 53 cepas resistentes a pesticidas era mayor en el caso de aminoglucósidos, en comparación con la cepa silvestre. Sin embargo, no se conserva la resistencia a los pesticidas en la segunda exposición.

ABSTRACT

The use and abuse of pesticides in agriculture has resulted in changes in the metabolic capacity of soil bacteria. Likewise in the last decade, the problem of bacterial resistance has increased, creating the need to find or synthesize new substances that may be used as antibiotics. Studies have linked the ability of soil microbiota to resist pesticides, antibiotics and heavy metals with the horizontal transfer of conjugative plasmids, transduction and transformation.

Moreover it has been shown that some herbicides induce changes in physiological susceptibility to antibiotics in bacteria such as *E. coli* and *Salmonella enterica* through AcrAB transporters, which could explain important cross-resistance to pesticides and antibiotics.

Methods: In this work, we explored mutants resistant to pesticides (such as Asulam, Glyphosate and Methyl parathion) using as a model *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. We explored whether the pesticide resistant mutants were also resistant to antibiotics β -lactamics, cephalosporins, chloramphenicol, aminoglycosides, trimethoprim-sulfamethoxazole and nitrofurantoin. Finally, we determined if the resistance to pesticides was conserved.

Results: 257 pesticide resistant candidates were isolated, from which 53 showed reduced susceptibility to ampicillin, some cephalosporines and aminoglycosides.

Conclusions: We determined the new minimum inhibitory concentration of antibiotic required to affect these 53 selected pesticide-resistant strains, and we had more-stronger differences with aminoglycosides, were found with respect to the wild type strain. However, the resistance to pesticides isn't conserved in a second exposition.

ÍNDICE

Agradecimientos	IV
Resumen	VI
Introducción	
El origen de la resistencia	1
El resistoma	2
Mutagénesis, la base de la evolución	3
Resistencia, tolerancia y persistencia	5
El precio de la supervivencia: pérdida de <i>fitness</i>	5
Estrés y mutagénesis	7
Co-selección	8
Mecanismos de resistencia de bacterias, plantas e insectos	8
Efectos de los pesticidas	12
Hipótesis	16
Objetivos generales	17
Materiales y métodos	
Apartado de reactivos y materiales	18
Diagrama de flujo	19
Protocolo de mutagénesis química	20
a) Estandarización	20
b) Porcentaje de auxotrofia	21
c) Colección de mutantes	21
Exposición de la cepa mutagenizada a los pesticidas	21
a) Comprobación de las Concentraciones mínimas Inhibitorias	21
b) Estandarización del protocolo	21
Establecimiento de las CMI a los antibióticos	23
Ensayo de susceptibilidad a antibióticos	23
Comprobación de la resistencia en las cepas candidato seleccionadas	24

Búsqueda de Inducción de mutagénesis por exposición a pesticidas	25
--	----

Resultados

Mutagénesis química	27
Exposición de la cepa mutagenizada a pesticidas	27
a) Establecimiento de las CMI	27
b) Obtención de las cepas resistentes a pesticidas	28
Establecimiento de la CMI a los antibióticos	28
Ensayo de susceptibilidad a antibióticos	29
Comprobación de la resistencia en cepas candidato seleccionadas	33
Inducción de mutagénesis por pesticidas	40
Conclusiones	41
Discusión	42
Referencias	45

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Apartado de reactivos y soluciones	18
Diagrama de flujo de métodos	19
Tabla 1. Concentraciones utilizadas de pesticidas	23
Tabla 2. Porcentajes de sobrevivencia y auxotrofia	27
Tabla 3. Comparación de CMI de pesticidas	28
Tabla 4. CMI de antibióticos	29
Tabla 5. CMIs de antibióticos en cepas resistentes a paratión metílico	30
Tabla 6. CMIs de antibióticos en cepas resistentes a asulam	31
Tabla 7. CMIs de antibióticos en cepas resistentes a glifosato	32
Tabla 8. CMIs de antibióticos en cepas candidatoresistentes a pesticidas	33
Tabla 9. Resultados del ensayo de corroboración de resistencia a paratión metílico	34
Tabla 10. Resultados del ensayo de corroboración de resistencia a asulam	35
Tabla 11. Resultados del ensayo de corroboración de resistencia a glifosato	35
Cinética de crecimiento de cepas pre-expuestas a paratión metílico	37
Cinética de crecimiento de cepas pre-expuestas a asulam	38
Cinética de crecimiento de cepas pre-expuestas a glifosato	39
Tabla 12. Resultados del ensayo de mutagénesis con paratión metílico	40

INTRODUCCIÓN

El origen de la resistencia

La resistencia es un fenómeno biológico espontáneo que constituye un problema mundial creciente en las últimas décadas y que ha contribuido a la selección de patógenos (Andersson, 2011). Cada año se aíslan cepas bacterianas multi-resistentes, provenientes de brotes y epidemias; y así mismo se han detectado plagas de insectos y plantas resistentes a pesticidas de última generación. El uso desmesurado de los antibióticos en animales de producción y en la agricultura, las malas prácticas médicas y el poco control en el manejo de los pesticidas, está estrechamente relacionado con el aumento en la resistencia (Wise, 2002; Andersson & Hughes, 2010).

Los organismos han desarrollado mecanismos de sobrevivencia a través del tiempo. Moléculas de origen inorgánico como dióxido de carbono, nitrógeno y vapor de agua, se unieron y complementaron para formar otras más complejas que adquirieron funciones autocatalíticas como el RNA, lo que posiblemente dio origen a las primeras proteínas y finalmente organismos unicelulares con un genoma rudimentario (Gilbert, 1986). La diversidad de funciones metabólicas permitió la formación de organismos simples, que más tarde adquirieron la capacidad de replicarse y heredar las mismas características a su progenie. Estos primeros organismos eran heterótrofos extremos, pero con el paso del tiempo desarrollaron un metabolismo intermedio que les permitiera obtener nutrientes y sobrevivir a la primitiva atmósfera anaerobia. (CR Woese, 1987; CR Woese, 1998).

La resistencia involucra procesos fisiológicos vitales para el individuo, como los sistemas de transporte transmembranal, cambios en la permeabilidad de membrana y enzimas degradadoras. Sin embargo, aquellos organismos metabólicamente más eficientes, con mejores sistemas de transporte o con mayor

capacidad mutagénica, son los que tienen mayor posibilidad de sobrevivir a un ambiente adverso y por lo tanto se favorece su proliferación bajo estas condiciones selectivas.

Se ha observado que la resistencia se presenta de forma similar en organismos como bacterias, insectos y plantas (Figueroa-Acosta, 2006; Badii *et al.*, 2007); éstos últimos han evolucionado para hacer más eficientes los sistemas de transporte de sustancias, favoreciendo la expulsión y/o secuestro de pesticidas. Por su parte, las bacterias han evolucionado desarrollando una amplia variedad de mecanismos de resistencia a antibióticos.

El resistoma

Se ha propuesto, que dentro del pangenoma microbiano, se encuentra una colección de genes de resistencia de bacterias patógenas y no patógenas. Tanto en patógenos como en bacterias productoras de antibióticos pueden encontrarse genes potencialmente funcionales en la resistencia, que se mantienen en niveles basales de expresión (genes crípticos de resistencia) y genes que participan activamente en la resistencia a antibióticos. A esta colección de genes, precursores y factores de resistencia se le conoce como *resistoma* (Wright, 2007; Davies, 2010).

El éxito del avance en la resistencia de bacterias patógenas se debe a la habilidad para transferir información genética entre poblaciones, lo cual ha permitido la dispersión de genes en el resistoma entre múltiples géneros bacterianos en ausencia de una presión de selección constante (Hershberg, 2017). La adquisición e integración de material genético al genoma de una bacteria, puede realizarse mediante la transferencia horizontal o conjugación de plásmidos entre dos bacterias; la incorporación de elementos genéticos móviles flanqueados por elementos de inserción (transposones), o por transducción mediada por bacteriófagos (Koonin, 2012), sin embargo, son elementos que pueden perderse con el tiempo.

Por otra parte, un factor poco considerado en el desarrollo de la resistencia es el “nivel de resistencia”. Al evaluar una cepa mutante resistente, resulta ser que el incremento en la resistencia es minúsculo y casi indetectable cuando se trata de sistemas de bombas flujo; en cambio cuando se trata de modificaciones en el sitio blanco o degradación enzimática del propio antibiótico, el nivel de resistencia puede ser mayor (Hughes y Andersson, 2016).

Mutagénesis, la base de la evolución

La evolución de las bacterias para adaptarse a cambios del ambiente, puede ocurrir mediante la adquisición de material genético externo o bien por modificaciones en genes y operones preexistentes debido a mutaciones (Blázquez *et al.*, 2002). En un ambiente natural, es común encontrar elementos genéticos móviles (transposones y plásmidos) e incluso bacteriófagos que funcionan como herramientas muy efectivas de transferencia horizontal de genes (de la Cruz y Davies, 2000). Cuando el ambiente es favorable y coexisten especies genéticamente compatibles, es posible que se dé el intercambio genético; sin embargo, cuando las especies bacterianas no están relacionadas o no son capaces de incorporar y replicar el material genético la alternativa inmediata es el rearrreglo genómico y/o la mutación (Blázquez *et al.*, 2002). Por otra parte, hay que recordar que la resistencia también puede ser resultado de la presencia de características morfo-funcionales inherentes del género; por ejemplo: la ausencia de un sitio de acción específico o las diferencias entre la cantidad de peptidoglicano entre Gram-positivas y Gram-negativas (Blair *et al.*, 2015).

La resistencia es el resultado de la adaptación continua de un individuo ante cambios en su ambiente, los individuos más aptos sobrevivirán y su carga genética trascenderá en su descendencia. Esta capacidad está determinada por la modificación de la estructura de su genoma y la tasa de mutación. Cuanto mayor sea la tasa de mutación, se incrementa el riesgo de sufrir cambios deletéreos,

pero, por otra parte, si estas mutaciones son benéficas les permite adaptarse rápidamente a un ambiente diferente (Galán *et al.*, 2006).

En una población bacteriana, la diversidad genética puede modificarse con mayor facilidad cuando el tamaño de la población es grande que cuando es pequeña, ya que cuando la población es reducida la tasa de mutación no es suficiente para generar la suficiente variabilidad genética para superar posibles cuellos de botella y generar individuos mejor adaptados a situaciones de estrés (Hersh *et al.*, 2004, Galán *et al.*, 2006). En un hospedero infectado, es poco el conocimiento del tamaño de la población bacteriana, pero en algunos casos cuando es lo suficientemente grande, se puede sugerir el surgimiento de mutaciones de resistencia de forma espontánea. Existen métodos para medir la tasa de mutación espontánea en una población bacteriana (Drake, 1991; Foster, 2006), la cual ocurre con una frecuencia aproximada de 10^{-10} por dinucleótido y alrededor de 0.003 mutaciones por genoma (Drake, 1991; Adbulkarim, 1996; Drake 1998, Drake 1999). Por otra parte, las inserciones, deleciones, inversiones y duplicaciones pueden ocurrir con mayor frecuencia, es decir entre 10^{-5} y 10^{-2} por célula por generación (Anderson, 1981; Hughes, 2017; Reams, 2012; Reams 2010).

En un medio natural, las bacterias se encuentran en fase estacionaria y en condiciones de baja actividad replicativa, los sistemas de reparación se rigen por el factor σ^S , una subunidad de RNA polimerasa que contribuye en la regulación de la respuesta general a estrés (Gentry *et al.*, 1993). Cuando la célula se encuentra en condiciones estables, la respuesta se encuentra atenuada; por lo tanto se tiende a la acumulación de errores o mutaciones; en cambio cuando una bacteria está en fase exponencial la reparación se activa (Galán, 2006, Rosenberg 1998, Foster, 1999, Storvik *et al.*, 2010). Si tenemos una población con una tasa de mutación elevada, se genera una variabilidad sobre la cual podría actuar la selección natural. Sin embargo, la mayoría de las subpoblaciones de estas bacterias tienen un fenotipo transitorio y la menor parte responden a mutaciones estables y heredables (Galán *et al.*, 2006). Por otra parte, es importante considerar

que la conservación de la integridad del genoma es importante para la perpetuación de las especies, (Radman, 1999 Jayarman, 2011).

Resistencia, tolerancia y persistencia

Los dos parámetros principales que pueden variar a lo largo de los eventos de adaptación bacteriana son: (1) el tamaño de la población y (2) el número y la ventaja selectiva de las mutaciones favorables necesarias para que se adapten las bacterias. Un ejemplo de ello es la interacción de las poblaciones bacterianas en el hospedero; la competencia por los sustratos y las condiciones del sitio anatómico donde habitan (Presión de oxígeno, pH etc.), generan diferente presión de selección que conduce a una constante necesidad por adaptarse. (Tenailon *et al.*, 1999).

En una situación de estrés, como es el caso de la presencia de antibióticos, la mayoría de la población bacteriana suele perecer, sin embargo, algunas de ellas podrían responder de diferentes formas para resistir a esta condición y sobrevivir. La resistencia bacteriana podría interpretarse como la capacidad máxima de defensa ante los antibióticos, y como lo hemos presentado ésta puede ser adquirida a través de mutaciones o por la incorporación de DNA exógeno (Davies, 2010; Koonin, 2012), sin embargo esta capacidad puede derivar de una condición previa conocida como “tolerancia”.

La tolerancia es una propiedad característica de las células bacterianas metabólicamente inactivas, llamadas “persistentes” o “persisters”, las cuales, podría conducir eventualmente a la resistencia (Lewis, 2017). Esta condición fue descrita por primera vez por Joseph Bigger en 1944, quien estudiaba los efectos de la Penicilina; descubrió que al exponer un cultivo de *Staphylococcus* spp. una pequeña subpoblación de bacterias sobrevivía, quedando éstas en estado de “latencia” o inactivas (Lewis 2007; Lewis, 2010).

El efecto de “refractariedad” a los antibióticos se ha atribuido a esta condición de tolerancia (Dhar and McKinney; 2007), con ello se permite la sobrevivencia cuando las bacterias se encuentran expuestas por un corto tiempo a concentraciones altas de antibióticos (Fridman *et al.*, 2014, Andersson and Hughes, 2011), práctica que comúnmente es efectuada en la terapéutica de enfermedades

infecciosas. Fridman *et al* (2014) presume que el mecanismo consiste en la expresión de mutaciones que elongan la fase de latencia, en la cual las poblaciones detienen su crecimiento por tiempos suficientemente largos, reduciendo el daño causado por Ampicilina.

Por otra parte, en un trabajo de Levin-Reisman (2017) pudo observarse que tras sucesivas exposiciones de estas bacterias a concentraciones bajas de antibióticos, pueden obtenerse cepas resistentes que portan mutaciones en el promotor del gen *ampC*, que codifica para la enzima β -lactamasa implicada en la resistencia a ampicilina. Sin embargo, esta condición es permisible siempre y cuando la célula se conserve en estado de latencia, ya que al reanudarse el crecimiento se reestablece el efecto bactericida del antibiótico (Levin-Reisman *et al.*, 2017; Fridman *et al.*, 2014).

Cabe mencionar que en la terapéutica, al administrar una dosis inicial alta del antibiótico seguida de dosis decrecientes, se producen condiciones favorables para la selección de mutantes persistentes a dosis altas y posteriormente la propagación de células resistentes, al estar en contacto continuo con el antibiótico en dosis bajas (Lewis, 2017; Levin-Reisman *et al.*, 2017).

En conclusión, todo indica que el problema actual al que se enfrenta la salud pública en el combate de las enfermedades infecciosas es la persistencia y con ello la perpetuidad de la resistencia.

El precio de la supervivencia: pérdida de *fitness*

Un parámetro clave para medir la prevalencia de la resistencia en una población es el *fitness* (vigor génico). Cuando obtenemos experimentalmente una cepa bacteriana resistente a cierto factor de estrés con respecto a otra cepa antecesora, podríamos pensar que por expresar determinado mecanismo de resistencia ésta es más apta para sobrevivir en el ambiente, aún en ausencia del antibiótico. Sin embargo, aquellas mutaciones que le confieren resistencia a

antibióticos, tienden a generar un impacto en el *fitness* ya sea de forma positiva o negativa (Hughes, 2017; Wright, 2007, Andersson and Hughes, 2011).

El resultado de una mutación depende en gran medida del contexto genómico, particularmente en las mutaciones que generan resistencia. La epistasis, habla de este fenómeno e implica que un fenotipo asociado a un gen o alelo puede diferir por influencia de otros genes con los que interactúa genéticamente (Hughes and Andersson, 2017). Debido a estas interacciones epistáticas, se puede aumentar el costo metabólico que sufre una bacteria al adquirir resistencia a antibióticos y con ello seleccionar mutaciones de acompañamiento, que ayuden a mejorar el *fitness* bacteriano, lo cual está relacionado con un fenómeno llamado mutagénesis inducida por estrés (Barceló, 2015).

Estrés y mutagénesis

El estrés es un término que puede abarcar múltiples situaciones y condiciones que ponen en desventaja el bienestar y supervivencia del individuo. Existe una variedad muy amplia de factores estresores que repercuten en el metabolismo y crecimiento de la bacteria. La mutagénesis inducida por estrés es producto de la activación de genes de respuesta a estrés. Si bien, esto podría ser una estrategia evolutiva para incrementar la tasa de mutación y adaptarse a nuevos ambientes, cabe la posibilidad de que se trate de la acumulación de lesiones y mutaciones productos del estrés (Biedov, 2014; Friedberg, 2013).

En un hospedero, por ejemplo, las condiciones ambientales propias del nicho ecológico (pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes, etc.), sumadas al estrés químico generado por la toxicidad de sustancias exógenas que provocan desbalance entre las poblaciones bacterianas (edulcorantes, aditivos provenientes de la dieta, biocidas, detergentes, antibióticos y residuos de pesticidas) suelen ser comunes y determinan la agregación de fenotipos (You, 2017; Surendran, 2017).

Co-selección

Los suelos son reservorios importantes de elementos de resistencia con potencial para ser transferidos a bacterias patógenas de interés clínico, y la presencia de antibióticos en el ambiente, ha facilitado la evolución de la resistencia (Costa, 2006). Sin embargo, en los microorganismos que se encuentran en contacto con diversas sustancias tóxicas, éstas podrían influir como una presión de selección adicional. Se ha descrito que las bacterias son capaces de desarrollar resistencia adaptativa a agentes anti-bacterianos como los compuestos cuaternarios de amonio, clorhexidina y triclosán (Braoudaki, 2004). Por otra parte, se ha encontrado que microorganismos habitantes de suelo pueden ser capaces de expresar resistencia a pesticidas y metales pesados por medio de la adquisición de plásmidos conjugativos, que incluso, expresan resistencia para antibióticos (Staub, 2012).

Un ejemplo reciente es el aislamiento de bacterias del género *Bacillus* sp. en suelo, capaces de degradar el insecticida monocrothophos y que después de ser expuestas al compuesto, mostraron resistencia a diversos antibióticos, siendo esto producto de genes codificantes para transportadores MDR contenidos en un plásmido (Rangasamy, 2017). A partir de estas evidencias, podemos sugerir que posiblemente a través de la exposición a agentes tóxicos de diversa índole, se están generando bacterias resistentes a los antibióticos, sin haber sido expuestas a los mismos previamente.

Mecanismos de resistencia de bacterias, plantas e insectos

La resistencia no es un fenómeno exclusivo de bacterias. Hemos encontrado que los procesos de adaptación que conducen a la resistencia se presentan en forma similar en organismos diferentes como es el caso de plantas, hongos e insectos. Entre más complejo sea su metabolismo, más complejos son los

mecanismos de resistencia, pues implica la participación de un mayor número de enzimas y factores reguladores.

a) Desintoxicación metabólica

Está basada en cambios en vías metabólicas y procesos enzimáticos que los organismos han desarrollado para deshacerse de sustancias tóxicas. En los insectos existen múltiples enzimas de desintoxicación como: oxidasas microsomales, glutatión S-transferasas y carboxilesterasas (Badii y Garza-Almanza, 2007; Dawkar *et al.*, 2013). En plantas, el proceso de desintoxicación implica tres fases, en donde entran en juego enzimas de fase I y fase 2 que degradan tóxicos como los herbicidas (Yu, 2014), posteriormente los productos de la degradación se conjugan en metabolitos y finalmente se depositan en compartimentos celulares (Villalba, 2009).

Las bacterias, por su cuenta, expresan enzimas capaces de ejercer cambios en la estructura de los antibióticos, tales que lo lleven a su inactivación o a la pérdida de función. Se ha descrito que, en el caso de algunas bacterias saprófitas, estas enzimas juegan un importante papel en la degradación de sustancias tóxicas del suelo (como los pesticidas), por medio de la desmetilación (Bourquin, 1977), carboxilesterasas solubles (Matsumura y Boush, 1966) o por hidrólisis (Itoh *et al.*, 2014); e incluso pueden utilizar los pesticidas como fuentes de carbono y fósforo (Singh *et al.*, 2012, Deng *et al.*, 2015).

El mecanismo de acción de estas enzimas es de dos tipos (Tafur *et al.*, 2008; Blair *et al.*, 2015):

- 1) **Inactivación por hidrólisis:** Incluye a las enzimas degradadoras de antibióticos como los β -lactámicos, aminoglucósidos, carbapenems, fenicoles y macrólidos.
- 2) **Inactivación por transferencia de un grupo químico:** Se lleva a cabo mediante enzimas que se encargan de la adición de grupos alquilo, fosfato, nucleotidil y ribitol.

b) Modificación del sitio de acción

La pérdida de afinidad de cualquier tóxico por el sitio activo puede deberse a una modificación en la estructura terciaria. Generalmente los sitios blanco son enzimas, proteínas estructurales o neurorreceptores (Villalba, 2009; Dawkar *et al.*, 2013). Un ejemplo es la resistencia de malezas a herbicidas inhibidores de acetil-CoA carboxilesterasa, que se realiza por medio de la sustitución de un residuo del sitio activo de la enzima (Singh, 2015; Matzrafi, 2014).

En bacterias este mecanismo puede explicarse de dos formas: (1) si la bacteria tiene una mutación puntual en su genoma se podría modificar estructuralmente el sitio blanco para el fármaco; y (2) por medio de la unión de grupos funcionales al receptor, evitando el acoplamiento y efecto del antibiótico (Blair *et al.*, 2015). Esta selección se realiza bajo influencia del tiempo de exposición y de la interacción con otras sustancias presentes en el medio, aumentando así la presión selectiva.

c) Reducción en la permeabilidad de membrana

La membrana extracelular no es una estructura hermética, tiene insertadas proteínas formadoras de poros que permiten la comunicación entre el citoplasma y el espacio extracelular. En ocasiones, al entrar un organismo en contacto con una sustancia nociva, reduce el diámetro de los poros membranales. En las bacterias, la eficacia de este mecanismo difiere entre Gram positivas y Gram negativas, ya que éstas últimas son menos permeables porque presentan una doble membrana (Citoplasmática y Externa) (Tafur *et al.*, 2008; Blair *et al.*, 2015).

En el caso de los insectos, presentan una mecánica similar para reducir la penetración de los plaguicidas; éstos modifican su exoesqueleto y aumentan la producción de quitina, lo cual permite que se active a tiempo un sistema de desintoxicación y excreción. Incluso, en las plantas se activa la sobre-producción

de ceras en las células más próximas a la cutícula de las hojas. Este mecanismo retrasa el ingreso del pesticida a la célula, favoreciendo la activación oportuna de otros mecanismos de resistencia como la desintoxicación metabólica (Badii y Garza-Almanza, 2007; FAO, 2012).

d) Activación de Bombas de flujo

Las bombas de flujo o de expulsión, operan transportando sustancias al exterior de la célula, evitando que llegue a su sitio de acción. Pueden ser específicas para un fármaco como la bomba *Tet*, (generalmente codificadas por plásmidos, y por lo tanto son fácilmente transferibles); o inespecíficas, expresadas generalmente en el cromosoma bacteriano (Tafur *et al.*, 2008; Blair *et al.*, 2015).

Éstas últimas son las más comúnmente asociadas a casos de resistencia cruzada a múltiples fármacos, dado que están involucradas proteínas transportadoras de diversas familias tales como: ABC (ATP binding cassette), MF (major facilitator), MATE (multidrug and toxic efflux), RND (resistance nodulation division), SMR (small multidrug resistance) y DMT (drug/metabolite transporter superfamily) (Blair, 2015).

En lepidópteros, se ha reportado que los transportadores de la familia ABC juegan un papel importante en la resistencia a la toxina CryAb2 de *Bacillus thuringiensis*, utilizada como biocida en campos de cultivo (Tay, 2015; Mahon, 2007; Park, 2014; Zhou, 2014). Así mismo en plantas, los transportadores ABC tienen un papel importante en la resistencia a herbicidas como 2,4-D (Schulz, 2016).

Efectos de los pesticidas

En la literatura se ha reportado que los efectos de algunos plaguicidas sobre la microbiota residente de suelos son variables dependiendo de las propiedades químicas, concentración y tiempo de exposición. Particularmente, los organofosforados son los pesticidas de uso más común, por otra parte, los herbicidas Glifosato y Asulam tienen sitios blanco comunes entre plantas y bacterias y además son objeto de duda acerca de sus efectos en la salud humana y animal.

a) Organofosforados

Al igual que los carbamatos, los organofosforados son insecticidas inhibidores de la enzima Acetilcolinesterasa. Esta inhibición causada por fosforilación del sitio activo de la enzima, causa la saturación de receptores de acetilcolina en las neuronas postsinápticas, produciendo sobre-estimulación colinérgica que se traduce en parálisis y la muerte del insecto (Colovic, 2013). Por otra parte, en células vegetales, paratión metílico es capaz de producir citotoxicidad por estrés oxidante, generar genotoxicidad (Ohja y Gupta, 2014) de afectar el ciclo celular al inhibir la polimerización de tubulina para la formación del huso mitótico y con ello aumentar la ocurrencia de aberraciones cromosómicas (Gómez-Arroyo, 1987; Dubey, 2015).

En bacterias, se sabe que los suelos contaminados con concentraciones bajas de paratión metílico inducen el incremento en la población de *Pseudomonas stutzeri* y *P. putida* (Lo, 2010), mientras que a concentraciones altas produce una reducción considerable de la microbiota residente (Bindhya, 2009). Ciertamente se desconoce el mecanismo por el cual causa toxicidad en una bacteria, no obstante, se podrían proponer alternativas pues se sabe que las bacterias también sintetizan una proteína homóloga a la tubulina eucariota: FtsZ. Además, se descubrió que el género *Pseudomonas* sp y algunos otros como *Clostridium* sp., pueden sintetizar enzimas colinesterasas (Sánchez, 2012; Safarik, 1991) para el metabolismo de colina. Sin embargo, para que el paratión metílico inhiba la acetilcolinesterasa en

eucariotas, necesita metabolizarse previamente por las enzimas de la fase 1 (Citocromos P450), dando lugar al metabolito activo (Colovic, 2013; Jan, 2016).

b) Glifosato

El glifosato es de los herbicidas más utilizados en el mundo. Su mecanismo de acción es por medio de la inhibición de la 5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS) (Villalba 2009), enzima importante en la vía del ácido shikímico y cuyo producto final es el corismato (Mir, 2015). En plantas, procariotes y hongos, ésta vía es universal y esencial para la síntesis de compuestos aromáticos, ubiquinona y ácido fólico (Zucko, 2010, Pichandi, 2013). No en todas las bacterias se encuentra completa la vía, pero en algunas se ha descubierto que tiene un papel importante en la síntesis de factores de patogenicidad (Karki, 2014.).

Por otra parte, se ha demostrado que el glifosato puede tener efectos genotóxicos en micronúcleos de *Caiman latirostris* (Poletta, 2009) y efectos teratogénicos en embriones de rana africana; (Paganelli, 2010), además de inhibir la aromataza en citocromos P450 (Shehata, 2013). En hongos, se ha encontrado que tiene un efecto biocida (Wan, 1998) y en *Aspergillus flavus* aumenta la producción de aflatoxinas (Reddy, 2007); mientras que en poblaciones bacterianas de suelo favorece el crecimiento de *Fusarium* sp y disminuye el de *Pseudomonas* sp., al interactuar con cultivos resistentes al pesticida (Kremer, 2009). Además disminuye la población de *Lactobacillus* sp en el intestino, mientras que favorece el crecimiento de patógenos (Samsel, 2015) e incluso se han identificado especies bacterianas como *Salmonella enteritidis*, *S. gallinarum*, *Escherichia coli* y *Clostridium botulinum* que son altamente resistentes al pesticida (Shehata, 2013). En comunidades bacterianas de suelo se ha observado que algunas especies de *Pseudomonas* lo degradan, (Sviridov, 2015; Zhao 2015) mientras que la EPSPS de *Staphylococcus aureus* es resistente al herbicida (Priestman, 2005).

Aún se desconoce el mecanismo específico por el cual las bacterias resisten al pesticida, sin embargo, Staub y colaboradores demostraron que por medio de la sobreexpresión de un tipo de transportadores pertenecientes al grupo de genes

yhhS puede presentarse la resistencia a glifosato (2012). Siguiendo esta misma línea, Kurenbach y colaboradores (2015) publicaron un trabajo en el que probaron que es posible inducir resistencia fenotípica a algunos antibióticos en bacterias expuestas a ciertos herbicidas (Dicamba, 2,4-D y Glifosato). Utilizando cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium, realizaron incubaciones en presencia de los herbicidas (dicamba, 2,4-D y glifosato en dosis sub-letales), y en combinación con diferentes antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, ciprofloxacino, kanamicina y tetraciclina). Determinaron por una parte, que en varias de estas combinaciones, las bacterias disminuían la susceptibilidad a algunos antibióticos; por otra parte, se demostró que uno de los mecanismos involucrados en la tolerancia o resistencia a antibióticos se debía a la actividad de las bombas de flujo como AcrAB.

Paralelamente, se sabe que las bombas de flujo pueden ser reguladas positivamente por *soxRS*, pero también se considera un regulador de expresión de las enzimas β -lactamasas, por lo que en este trabajo demostraron también que pesticidas de la familia de los ácidos Benzoicos (Dicamba) son agentes inductores de *soxRS*.

c) Asulam

Este herbicida es un inhibidor de la 7,8-dihidrohepteroato sintetasa, enzima intermediaria en la síntesis de tetrahidrofolato (Decker, 1995). El tetrahidrofolato es una molécula compuesta por pterina, pABA y glutamato (De Crécy-Lagard, 2007) y es un cofactor indispensable para el transporte de carbono C1 para la formación de aminoácidos (metionina, glicina y serina), síntesis de purinas, pantotenato y N-formilmetionil tRNA (Bermingham, 2002; Hanson, 2011). En bacterias, se ha encontrado que el género *Flavobacterium* sp. es capaz de degradarlo y utilizarlo como fuente de carbono (Kauffman, 2004). Por otra parte, se ha descrito que el producto de su degradación es un derivado de las sulfonamidas (Van Wijngaarden, 2004) y la presencia de este compuesto puede

representar un factor constante de estrés en poblaciones microbianas, ya que se comparte el mecanismo de acción con asulam (Burman, 1986; Huovinem, 2001). .

Dados los antecedentes, consideramos trascendente el realizar una búsqueda de aquellos mecanismos de resistencia presentes en bacterias que puedan ser activados mediante la exposición a compuestos tóxicos como los pesticidas. De ser así, podríamos determinar el vínculo entre las vías que permitan la selección de cepas resistentes a los antibióticos y la supervivencia al estrés químico generado por los pesticidas, evidenciando un parteaguas más en el origen de la resistencia antibiótica.

HIPÓTESIS

Los plaguicidas son agentes generadores de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos sin haber tenido contacto previo con ellos.

OBJETIVOS GENERALES

1. Aislar mutantes *Salmonella enterica* (*wild type*) resistentes a plaguicidas y probar que puede modificarse su susceptibilidad a los antibióticos.
2. Comprobar que la resistencia a pesticidas y antibióticos se conserva al propagar las cepas.

MATERIALES Y MÉTODOS

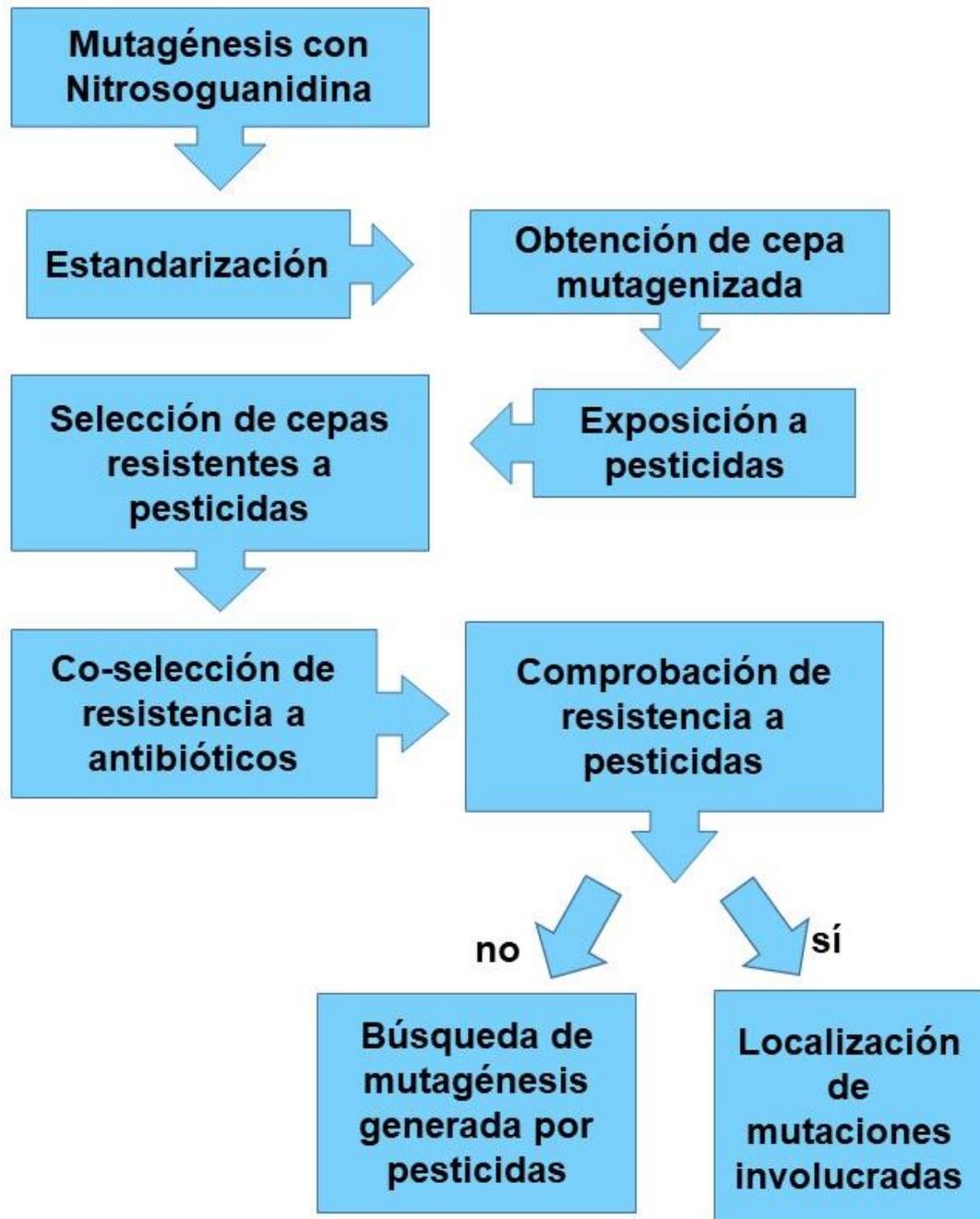
Apartado de reactivos y Soluciones

Reactivo	Descripción	Marca	Abreviatura
Nitrosoguanidina	UPAC: N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine Potente mutágeno, precursor de diazometano. Sal pura, 97%. CAS 70-25-7	Sigma-Aldrich ® Discontinuado	NTG
Agar nutritivo (Nutrient broth)	Medio de cultivo nutritivo para microorganismos poco exigentes.	DIFCO ® Cat. 234000	NB
Buffer de Citratos	Solución amortiguadora utilizada durante la exposición de células a nitrosoguanidina. (Concentración 0.1M, pH 5.5)	---	---
Buffer de Fosfatos	Solución amortiguadora utilizada para el lavado de células expuestas a nitrosoguanidina. (Concentración 0.1M, pH 7.0)	--6	---
Medio mínimo M9	Medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos protótrofos de requerimientos mínimos.	---	M9
Asulam	Herbicida carbamato, estándar analítico en sal. CAS 3337-71-1	Sigma-Aldrich ® Cat. 45329	---
Glifosato	Herbicida glicina, estándar analítico en sal. CAS 1071-83-6	-Pestanal ® Cat. 45521	---
Paratión Metílico	Insecticida organofosforado, solución concentrada al 62.6%. Donación del Instituto de Ciencias de la Atmósfera. CAS 56-38-2	Bayer®	---
Medio Luria-Bertanii	Medio de cultivo nutritivo para microorganismos poco exigentes.	---	LB
Ampicilina	Antibiótico β-lactámico, sal disódica	Sigma-Aldrich ® Cat. A9518	AMP
Amoxicilina	Antibiótico β-lactámico, sal trihidratada, estándar analítico.	Sigma-Aldrich ® Cat. 31586	AM
Ácido Clavulánico	Antibiótico β-lactámico, sal potásica, estándar analítico	Sigma-Aldrich ® Cat. 33454	CL
Cefalotina	Antibiótico de la familia de las cefalosporinas, sal sódica	Sigma-Aldrich ® Cat. C4520	CFL
Cefotaxima	Antibiótico de la familia de las cefalosporinas, sal sódica	Sigma-Aldrich ® Cat. 7039	CFO
Ceftriaxona	Antibiótico de la familia de las cefalosporinas, sal disódica.	Sigma-Aldrich ® Cat. 5793	CFTX
Cloranfenicol	Antibiótico aminoglicósido, sal pura al 98%.	Sigma-Aldrich ® Cat. C0378	CL
Gentamicina	Antibiótico aminoglicósido, sal sulfatada.	Sigma-Aldrich ® Cat. G3632	GE
Kanamicina	Antibiótico aminoglicósido, sal sulfatada.	Sigma-Aldrich ® Cat. 60615	KAN
Neomicina	Antibiótico aminoglicósido, sal trisulfatada e hidratada	Sigma-Aldrich ® Cat. N1876	NEO
Nitrofurantoina	Antibiótico del grupo de los nitrofuranos, estándar analítico.	Vetranal ® Cat. 46502	NIT
Trimetoprim	Antibiótico derivado de la trimetoxibenzilpirimidina	Vetranal ® Cat. 46984	TP
Dimetilsulfóxido	Disolvente orgánico, polar.	EMSURE ® Cat. 102952	DMSO
Sulfametoxazol	Antibiótico sulfonamida, estándar analítico.	Sigma-Aldrich ® Cat. S7407	SF

Características de la Cepa:

- TR1000 (*Salmonella enterica* subsp. Typhimurium tipo silvestre)
- Carente de plásmidos

Diagrama de flujo



Protocolo de mutagénesis química (Adelberg *et al.*, 1965).

a) Estandarización.

El método de mutagénesis química seleccionado fue con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), un agente alquilante cuyo mecanismo de acción es la transición de bases (*G:C a A:T*).

Para la estandarización del protocolo se partió de un cultivo líquido de *Salmonella enterica* subsp. Typhimurium de 18 horas (overnight u o/n) equivalente a 1×10^9 UFC/ml (unidades formadoras de colonia por mililitro). Posteriormente se tomaron 200 μ L del cultivo y se re-inocularon 20 mL de medio líquido Nutrient Broth (NB) DIFCO®. El inóculo se incubó en agitación (150 rpm) a 37°C hasta alcanzar una $DO_{600nm}=0.4$ equivalente a 1×10^8 UFC/mL. El cultivo se centrifugó a 15,000 rpm por 10 minutos y la pastilla bacteriana se resuspendió en sólo 2 mL de Buffer de Citratos.

Las concentraciones utilizadas de NTG fueron 30, 50, 100, 150 y 200 μ g/mL. El ensayo consistió en la exposición del cultivo bacteriano concentrado a una densidad de 1×10^8 UFC/100 μ L, aforando con buffer de citratos a un volumen final de 200 μ l, se probaron dos tiempos de incubación: 15 y 30' a 37°C, 150 rpm. Al final de la incubación, las células fueron centrifugadas a 10,000 rpm y lavadas con buffer de fosfatos sólo una vez. Las células fueron suspendidas de nuevo en 1mL de Buffer de fosfatos y se diluyeron hasta obtener aproximadamente 100 células/100 μ L, lo cual se esparció en una placa de medio NB. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas para contar el número de colonias.

b) Porcentaje de auxotrofia.

Para contar el número de auxótrofos, se hizo una “*replica printing*” en placas de medio mínimo sólido (M9) y en medio NB, de cada caja obtenida del ensayo de mutagénesis. Para hacer la lectura se compararon las cajas de medio mínimo y medio NB e identificamos aquellas colonias que no pudieron crecer en M9.

c) Colección de mutantes

Una vez establecida la concentración del mutágeno (100 µg/mL), y el tiempo de exposición (15'), se mutagenizó aproximadamente 200 mL de cultivo concentrado a 1×10^9 UFC/mL y se crio-preservó en alícuotas de 1 mL a -80, °C en medio Luria Bertani líquido (LB) adicionado con 10% de DMSO.

Exposición de la cepa mutagenizada a los plaguicidas

a) Comprobación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI)

Se inocularon 20 mL de medio líquido LB con 200 µL de un cultivo bacteriano de 24 horas y se incubó en agitación a 37°C. En seguida se diluyó el cultivo en solución salina fisiológica (SSF) con un factor de dilución de 10^{-5} para tener aproximadamente 100 células/100 µL. En tubos de 2 mL se preincubaron 100 µL de esta dilución con cada pesticida (paratión metílico, glifosato y asulam), en un volumen final de 200 µL a 37°C, 150 rpm, 30', y se esparció el contenido sobre placas de agar NB con perlas de vidrio estériles.

b) Estandarización del Protocolo de Exposición

Para el siguiente experimento se utilizó la cepa de *Salmonella enterica* previamente mutagenizada con Nitrosoguanidina. Las alícuotas de la cepa conservada fueron descongeladas y centrifugadas para retirar el medio con DMSO. Una vez retirado el sobrenadante se resuspendió la pastilla bacteriana con 1 mL de medio LB fresco y se incubó a 37°C por una hora en agitación. Posterior a esto se tomaron 10 µL del cultivo (1×10^7 UFC) y se le agregó cada pesticida por separado, el volumen final (100 µL) fue aforado con SSF al 0.85%. Considerando que la tasa de muerte con Nitrosoguanidina es del 94%, estimamos que tendríamos aproximadamente 6×10^5 UFC/mL. El protocolo se estandarizó de la siguiente manera:

1. Descongelación lenta de viales con la cepa mutagenizada en hielo.

2. Los viales fueron centrifugados a 15,000 rpm/10' para eliminar el medio con el que fue preservada la bacteria.
3. Se re-suspendió la pastilla bacteriana en 1 mL de medio LB fresco y se incubó a 37°C por una hora en agitación.
4. Se añadió al cultivo 2 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF) para diluirlo
5. El cultivo diluido se distribuyó en placas de 96 pozos con 30 µL cada uno.
6. Se aplicaron los pesticidas en concentraciones bajas (**Tabla 1**) y se aforó con SSF a un volumen final de 100 µL. Se agregó una columna control de las soluciones sin bacteria y otra sólo con bacteria.
7. Se incubó por 12 horas a 37°C, en agitación.
8. Posterior a este tiempo, se agregó 100 µL de medio LB a cada pozo y se incubó por 6 horas más a 37°C en agitación.
9. Al finalizar se tomó lectura de la densidad óptica para comparar con los controles.
10. Se tomó una muestra de 20 µL de cada pozo y se esparció con perlas de vidrio en placas de agar NB. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas.
11. El resto del contenido de los pozos fueron centrifugados a 15,000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla bacteriana en 30 µL de una solución de medio LB y SSF 1:2.
12. Los productos se expusieron de forma consecutiva a 2 concentraciones más (media y alta) de pesticida: desde 0.85x, 1.3x hasta 2x de la CMI con paratión metílico; 0.35x, 0.7x hasta 1.5x con Glifosato; y 0.25x, 0.5x hasta 0.75x con Asulam como se muestra en la **Tabla 1** siguiendo las mismas condiciones de incubación y recuperación.

Tabla 1. Concentraciones utilizadas de cada pesticida (mg/mL)

Pesticida	C1 (baja)	C2 (media)	C3 (alta)
Paratión Metílico	(0.85x) = 0.347	(1.3x) = 0.531	(2x) = 0.817
Asulam	(0.25x) = 1.168	(0.5x) = 2.337	(0.75x) = 3.506
Glifosato	(0.35x) = 0.509	(0.7x) = 1.018	(1.5x) = 2.182

En esta tabla se muestran las concentraciones usadas a partir de las Concentraciones mínimas inhibitorias de cada pesticida estudiado. C1 (concentración baja), C2 (Concentración media), C3 (concentración alta).

13. Al finalizar la incubación con la concentración más alta, se sembró la totalidad del contenido de los pozos.

Para éste experimento se hicieron 10 réplicas por cada pesticida utilizado.

Establecimiento de la CMI a los antibióticos

Se prepararon placas de agar NB con diversas concentraciones de 11 antibióticos (Ampicilina, Amoxicilina+Ácido Clavulánico, Cefalotina, Cefalexina, Ceftriaxona, Cloranfenicol, Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Nitrofurantoina y Sulfametoxazol+Trimetoprim). Se incubó un cultivo o/n de la cepa “*wild type*” (*S. ty* TR1000) por 18 horas y se descongeló la cepa mutagenizada. Se realizaron diluciones seriadas de ambas cepas en para obtener aproximadamente 200 UFC en 5 μ L. Se aplicó una micro-gota (5 μ L) por cepa en las placas de medio con antibiótico. Las placas se incubaron a 37°C por 36 horas para hacer las lecturas del crecimiento (Andrews, 2001).

Ensayo de susceptibilidad a antibióticos

Se incubó un cultivo o/n de cada una de las cepas resistentes a pesticidas y de la cepa silvestre por 18-24 horas. Se realizaron diluciones seriadas en SSF con un factor de dilución 10^{-5} para obtener aproximadamente 200 células en 5 μ L. Se aplicó una micro-gota (5 μ L) por cepa en las placas de medio con antibiótico. Las

placas se incubaron a 37°C por 36 horas para hacer las lecturas del crecimiento (Andrews, 2001). Este experimento fue replicado 2 veces.

Comprobación de la resistencia en cepas candidato seleccionadas.

Una vez identificadas las cepas resistentes a antibióticos, elegimos aquellos candidatos cuya resistencia fuera más evidente. El criterio de selección consistió en elegir cepas cuya resistencia se mostrara hacia una gama amplia de antibióticos, otras con resistencia a 2 o más antibióticos de un mismo mecanismo de acción y otras tantas con resistencia a un solo antibiótico. Además, incluimos una cepa resistente de cada pesticida que no hubiese mostrado resistencia a ningún antibiótico.

Repetimos también el ensayo de susceptibilidad a antibióticos comparando contra la cepa silvestre (WT) y la cepa silvestre mutagenizada con Nitrosoguanidina (MTG), ya que necesitábamos comprobar que la resistencia seleccionada no provenía de la mutagénesis previa a la exposición a los pesticidas.

Posterior a ello, re-expusimos las cepas seleccionadas a los pesticidas para verificar si en verdad conservaban la resistencia, probando por separado cada una de las concentraciones utilizadas en la primera exposición:

1. Se incubó un cultivo o/n de cada cepa candidato seleccionada y de la cepa silvestre por 18-24 horas (1×10^9 células aproximadamente). Se realizaron diluciones seriadas en SSF para obtener aproximadamente 10^5 células en 10 μ L.
2. Para la cepa mutagenizada con Nitrosoguanidina se descongeló un vial de lo almacenado en el ensayo de mutagénesis y se centrifugó para retirar el medio con DMSO. Una vez retirado el sobrenadante se re-suspendió la pastilla bacteriana con 1mL de medio LB fresco y se incubó a 37°C por una hora en agitación. Suponiendo que tenemos una población viva aproximada

de 6×10^5 células/mL se hizo una dilución para obtener aproximadamente $1 - 1.02 \times 10^5$ células en $10 \mu\text{L}$.

3. La dilución de cada cepa se distribuyó en placas de 96 pozos con $10 \mu\text{L}$ cada uno.
4. Se aplicaron los pesticidas por separado en las diferentes concentraciones utilizadas en el protocolo de exposición a pesticidas y se aforó con SSF a un volumen final de $100 \mu\text{L}$. Se agregó una columna control de las soluciones sin bacteria y otra sólo con bacteria.
5. Se incubó por 12 horas a 37°C , en agitación.
6. Posterior a este tiempo, se agregó $100 \mu\text{L}$ de medio LB a cada pozo y se incubó por 6 horas más a 37°C en agitación.
7. Se tomó la lectura de la densidad óptica cada 30 minutos para hacer una curva de crecimiento y mirar el comportamiento de las cepas en presencia del pesticida.
8. Además de ello, se tomó una muestra de $10 \mu\text{L}$ de cada pozo para observar el crecimiento en placa a los 30 minutos, 12 horas (antes de añadir el medio LB) y a las 18 horas (ésta última muestra fue de $20 \mu\text{L}$).

Adicional a esto, repetimos el ensayo de susceptibilidad a antibióticos comparando contra la cepa silvestre (WT) y la cepa silvestre mutagenizada con Nitrosoguanidina (MTG), ya que necesitábamos comprobar que la resistencia seleccionada no provenía de la mutagénesis previa a la exposición a los pesticidas

Búsqueda de inducción de mutagénesis por exposición a pesticidas.

Para demostrar el posible efecto mutagénico de los pesticidas, en esta ocasión utilizamos sólo la cepa silvestre de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (TR-1000) sin mutagenizar. Realizamos tres exposiciones sucesivas al pesticida paratión metílico con concentraciones crecientes, como lo hemos descrito en el Protocolo de Exposición Estandarizado del punto 6.2, por triplicado.

Al concluir las 18 horas de incubación con cada concentración tomamos muestras de tres pozos completos diferentes, y las sembramos en medio NB sólido con ayuda de perlas de vidrio. Incubamos por 24 horas a 37°C y se contaron las colonias sobrevivientes.

Una vez contadas las colonias hicimos una réplica *printing* en dos cajas con medio mínimo (M9) y una de medio rico (NB) para determinar la presencia de colonias auxótrofas.

Por otra parte, seleccionamos al azar el 10% del total de las colonias contadas y evaluamos motilidad. Para ello, preparamos un medio semisólido hecho a base de NB con 0.4% de agar y lo vertimos en tubos de ensayo. Una vez solidificados los inoculamos por picadura con cada una de las colonias seleccionadas e incubamos por 24 horas a 37°C.

RESULTADOS

Mutagénesis química

Se sabe que la tasa de mutación espontánea de una población bacteriana, aproximadamente es de 10^{-10} , lo cual hace difícil observar con facilidad cambios en el fenotipo. Para fines de nuestro proyecto, decidimos inducir un aumento en la tasa mutagénica utilizando un agente mutágeno. Con ello, al inducir eventos de reparación y recombinación podremos seleccionar aquellos fenotipos que muestren un cambio metabólico secundario a la mutagénesis.

La concentración seleccionada, fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ de Nitrosoguanidina (NTG) con un tiempo de 15 minutos con una supervivencia del 6% y un porcentaje de auxotrofia del 13.95%. Los resultados se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Porcentajes de supervivencia y auxotrofia

NTG $\mu\text{g/ml}$	#Colonias presentes en NB	%Supervivencia	#Colonias ausentes en M9	% Auxótrofas
30 $\mu\text{g/mL}$	198	28%	7	3.5%
60 $\mu\text{g/mL}$	73	10.33%	6	8.21%
100 $\mu\text{g/mL}$	43	6.09%	6	13.95%
Control	706	100%	--	0%

En esta tabla se presenta el número de colonias sobrevivientes de la exposición de un cultivo de *Salmonella enterica* (10^8) a Nitrosoguanidina. A su vez se muestra el porcentaje de éstas colonias que mostraron ser auxótrofas.

Exposición de la cepa mutagenizada a los pesticidas

a) Comprobación de las CMI

Los pesticidas seleccionados, fueron los que se observaron más tóxicos a los 30 minutos de exposición reportados en el trabajo de Rivera-Ramírez (2016), con los pesticidas: Asulam, Glifosato y Paratión metílico. Sin embargo, era necesario reestablecer la Concentración Mínima Inhibitoria de cada pesticida en la cepa

silvestre. En la **Tabla 3** se observan las concentraciones establecidas en el nuevo ensayo.

Tabla 3. Comparación de CMI

Plaguicida	DRA/caja	CMI mg/mL
Asulam	1.747mg	4.675mg/mL
Glifosato	831.88 µg	1.455mg/mL
Paratión M.	408.56 µg	0.4085mg/mL

En la tabla se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que presenta la cepa silvestre de *Salmonella enterica* a los 30 minutos de exposición a los pesticidas. Inicialmente se trabajó con la DRA (dosis recomendada de aspersión por hectárea) y se modificó el protocolo a mg/mL).

b) Obtención de cepas resistentes a pesticidas

Se obtuvieron 85 colonias candidato derivadas de la exposición a Paratión Metílico, 92 de Asulam y 80 de Glifosato.

Establecimiento de la CMI a los antibióticos

Antes de desafiar con antibióticos a las cepas sobrevivientes a pesticidas, fue necesario establecer la Concentración mínima inhibitoria (CMI) a cada antibiótico de la cepa silvestre (*wild type*) y la cepa mutagenizada (NTG), (**Tabla 4**).

Tabla 4. CMI de antibióticos

Antibiótico	CMI wt (µg/mL)	CMI MTG. (µg/mL)
Ampicilina	0.7	0.9
Amoxi-Clav	0.6	0.6
Cefalotina	2	2
Cefotaxima	0.05	0.05
Ceftriaxona	0.05	0.05
Cloramfenicol	5	5
Gentamicina	1.6	1.6
Kanamicina	4	4
Neomicina	4	4
Nitrofurantoina	8	8
Sulfametoxazol-Trimetoprim	120	120

En esta tabla se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que presentaron la cepas silvestre (wt) de *Salmonella enterica* a y ésta misma pero previamente mutagenizada con 100 µg/mL de Nitrosoguanidina (MTG). Puede observarse que no hay diferencias en la susceptibilidad entre ambas cepas, a excepción de Ampicilina, que aumentó ligeramente la resistencia en la cepa mutagenizada.

Ensayo de susceptibilidad a antibióticos

Se obtuvieron 16 cepas resistentes a Paratión, 22 resistentes a Asulam y 15 resistentes a Glifosato que mostraron una disminución en la susceptibilidad a al menos un antibiótico (**Cuadros 5, 6 y 7**).

Tabla 5. CMI's de antibióticos en cepas resistentes a Paratión Metílico (µg/mL)

Cepa	AMP	AM+CI	CFL	CFO	CFTX	CL	GE	KAN	NEO	NIT	SF+TP
WT	0.7	0.6	2	0.05	0.05	6	1.6	4	4	8	120
XM-09	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-14	--	--	--	--	--	--	2	--	8	--	--
XM-18	0.9	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-20	--	0.8	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-30	0.9	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-34	--	--	--	0.1	--	--	--	--	--	--	--
XM-37	0.9	--	--	--	0.1	--	--	--	--	--	--
XM-51	--	--	--	--	--	--	2	8	8	--	--
XM-52	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-53	1.2	--	4	--	0.1	--	4	8	8	--	--
XM-65	--	--	--	--	--	--	--	--	--	10	--
XM-67	0.9	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-68	--	--	--	--	--	--	--	--	--	10	--
XM-84	1.2	0.8	4	--	--	--	>3	8	16	--	--
XM-86	--	0.8	4	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-95	1.2	0.8	4	0.1	--	8	--	--	--	--	--

16 de las cepas resistentes a paratión metílico mostraron resistencia a varios antibióticos. Los colores indican el grupo en el que están clasificados los antibióticos de acuerdo con su mecanismo de acción: Inhibidores de pared celular (*Amarillo*); Inhibidores de la síntesis de proteínas: Subunidad ribosomal 50S (*Azul*), Subunidad ribosomal 30S (*Azul claro*); Inhibidores de la acetil-coenzima A (*Rojo*); Inhibidores de la síntesis de folatos (*Verde*). Cepa silvestre (*wt*).

Tabla 6. CMI de antibióticos en cepas resistentes a Asulam (µg/mL)

Cepa	AMP	AM+CI	CFL	CFO	CFTX	CL	GE	KAN	NEO	NIT	SF+TP
WT	0.7	0.6	2	0.05	0.05	6	1.6	4	4	8	120
XM-100	--	--	4	--	0.1	--	--	--	8	12	--
XM-101	--	--	--	--	0.1	--	--	--	--	--	--
XM104	--	--	--	--	--	--	3	8	8	--	--
XM-105	--	--	4	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-106	1.2	0.8	4	0.5	0.1	--	2	8	8	--	--
XM-116	--	--	--	--	--	--	--	--	--	10	--
XM-124	--	--	--	--	--	--	--	--	--	10	--
XM-125	--	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-126	0.9	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-144	--	0.8	--	--	--	--	>3	>16	>16	--	--
XM-149	--	--	--	--	--	--	2	8	8	--	--
XM-163	--	--	--	--	--	--	>3	8	16	--	>120
XM-164	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-168	--	--	>8	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-171	--	--	--	--	--	--	3	8	8	--	--
XM-173	--	--	--	--	--	--	--	--	--	10	--
XM-175	--	--	--	--	--	--	--	--	--	10	--
XM-176	1.2	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-177	>1.2	0.8	--	--	0.1	10	--	--	--	--	--
XM-179	--	--	--	--	--	--	2	8	8	10	--
XM-185	0.9	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-187	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--

22 de las cepas resistentes a asulam mostraron resistencia a varios antibióticos, incluso sobrevivían a las concentraciones más altas que se probaron en los ensayos de susceptibilidad a antibióticos. Los colores indican el grupo en el que están clasificados los antibióticos de acuerdo a con su mecanismo de acción: Inhibidores de pared celular (*Amarillo*); Inhibidores de la síntesis de proteínas: Subunidad ribosomal 50S (*Azul*), Subunidad ribosomal 30S (*Azul claro*); Inhibidores de la acetil-coenzima A (*Rojo*); Inhibidores de la síntesis de folatos (*Verde*). Cepa silvestre (*wt*).

Tabla 7. CMI's de antibióticos en cepas resistentes a Glifosato (µg/mL)

Cepa	AMP	AM+Cl	CFL	CFO	CFTX	CL	GE	KAN	NEO	NIT	SF+TP
<i>WT</i>	0.7	0.6	2	0.05	0.05	6	1.6	4	4	8	120
XM-202	--	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-226	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-227	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-232	--	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-230	--	--	--	--	--	--	2	--	8	--	--
XM-231	--	--	--	--	--	--	2	--	8	--	--
XM-233	--	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-236	--	0.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--
XM-239	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-242	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-244	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-245	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-246	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
XM-255	--	--	--	--	--	--	>3	8	16	--	--
XM-257	0.9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

15 de las cepas resistentes a glifosato mostraron resistencia a algunos antibióticos, aunque en menor medida que en los grupos resistentes a paratión metílico y asulam. Los colores indican el grupo en el que están clasificados los antibióticos de acuerdo a su mecanismo de acción: Inhibidores de pared celular (*Amarillo*); Inhibidores de la síntesis de proteínas: Subunidad ribosomal 50S (*Azul*), Subunidad ribosomal 30S (*Azul claro*); Inhibidores de la acetil-coenzima A (*Rojo*); Inhibidores de la síntesis de folatos (*Verde*). Cepa silvestre (*wt*).

Comprobación de la resistencia en Cepas Candidato Seleccionadas.

De las cepas seleccionadas, se comprobaron las CMI a los antibióticos, en algunos casos el espectro de concentraciones se amplió para determinar la concentración mínima inhibitoria. Los resultados se muestran en el **Tabla 8**.

Tabla 8. CMIs de antibióticos en cepas candidato resistentes a pesticidas ($\mu\text{g/mL}$)

Cepa	AMP	AM+Cl	CFL	CFO	CFTX	CL	GE	KAN	NEO	NIT	SF+TP
<i>WT</i>	0.7	0.6	2	0.05	0.05	6	1.6	4	4	8	120
<i>MTG</i>	0.9	0.6	2	0.05	0.05	6	1.6	4	4	8	120
PARATIÓN METÍLICO											
<i>XM-15</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>XM-34</i>	--	--	--	0.1	--	--	--	--	--	--	--
<i>XM-51</i>	--	--	--	--	--	--	2	8	8	--	--
<i>XM-53</i>	1.2	--	4	--	0.1	--	4	8	8	--	--
<i>XM-84</i>	1.2	0.8	4	--	--	--	3	8	16	--	--
<i>XM-95</i>	1.2	0.8	4	0.1	--	10	--	--	--	--	--
ASULAM											
<i>XM-131</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>XM-144</i>	--	0.8	--	--	--	--	8	16	20	--	--
<i>XM-163</i>	--	--	--	--	--	--	4	8	16	--	>120
<i>XM-168</i>	--	--	8	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>XM-171</i>	--	--	--	--	--	--	3	8	8	--	--
<i>XM-187</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
GLIFOSATO											
<i>XM-203</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>XM-231</i>	--	--	--	--	--	--	2	--	8	--	--
<i>XM-244</i>	--	--	--	--	--	--	--	--	8	--	--
<i>XM-255</i>	--	--	--	--	--	--	3	8	16	--	--

En esta tabla podemos observar que el perfil de susceptibilidad de la cepa silvestre (WT) con respecto a la cepa mutagenizada (MTG) es muy similar. Las cepas candidato (XM-15, 34, 51, 53, 84, 95, 131, 144, 163, 171, 187, 203, 231, 244 y 255) fueron examinadas nuevamente en la prueba de susceptibilidad a antibióticos y siguieron mostrando la misma tendencia hacia la resistencia.

Por otra parte, las cepas se expusieron nuevamente a los pesticidas para comprobar si eran realmente resistentes o si sólo se trataba de tolerancia y adaptación fisiológica. Los resultados arrojaron que ninguna de las cepas candidato mostraron mantener la resistencia a los pesticidas en comparación con la cepa silvestre (WT) y la cepa silvestre mutagenizada (MTG), (Tablas 9, 10 y 11).

Tabla 9. Resultados del ensayo de corroboración de resistencia a pesticidas

PARATIÓN METÁLICO									
Concentración	Tiempo	WT	MTG	15	34	51	53	84	95
S/Pest	18h	Tapiz							
C1	30'	--	456	--	--	--	1	--	--
	12h	--	--	--	--	--	--	--	--
	18h	--	--	--	--	--	--	113	73
C2	30'	--	--	--	--	--	--	--	--
	12h	--	--	--	--	--	--	--	--
	18h	--	--	--	--	--	--	3	8
C3	30'	--	--	--	--	--	--	--	--
	12h	--	--	--	--	--	--	--	--
	18h	--	--	--	--	--	--	2	5

En esta tabla se observa el número de colonias que sobrevivieron por segunda vez al paratión metílico. En las tres concentraciones consecutivas probadas. Se tomaron muestras de la incubación con los pesticidas a los 30 minutos, 12 y 18 horas para obtener colonias en placas de medio nutritivo. El número de colonias obtenido difiere entre algunas de las cepas previamente expuestas al pesticida (84 y 95) y las cepas silvestre (WT) y mutagenizada (MTG) a las 18 horas de exposición. Concentraciones 1, 2 y 3 (C1) (C2) (C3) Sin embargo no se muestra el crecimiento esperado de una cepa con genotipo de resistencia.

Tabla 10. Resultados del ensayo de corroboración de resistencia a pesticidas

ASULAM									
	Tiempo	WT	MTG	131	144	163	168	171	187
S/Pest	18h	Tapiz							
C1	30'	~10⁴							
	12h	780	~10³	480	520	500	506	1	61
	18h	~10⁵	~10⁵	~10⁴	~10⁴	~10⁴	~10⁴	114	454
C2	30'	~10⁴							
	12h	1	--						
	18h	--	--	--	--	--	29	20	6
C3	30'	~10⁴							
	12h	--							
	18h	--	--	--	--	--	2	1	1

En esta tabla se observa el número de colonias que sobrevivieron por segunda vez al asulam. En las tres concentraciones consecutivas probadas, se tomaron muestras de la incubación con los pesticidas a los 30 minutos, 12 y 18 horas para obtener colonias en placas de medio nutritivo. El número de colonias obtenido difiere entre algunas de las cepas previamente expuestas al pesticida (168, 171 y 187) y las cepas silvestre (WT) y mutagenizada (MTG) a las 18 horas de exposición en las Concentraciones 2 y 3 (C2 y C3). Concentracion 1 (C1).

Tabla 11. Resultados del ensayo de corroboración de resistencia a pesticidas

GLIFOSATO							
	Tiempo	WT	MTG	203	231	244	255
S/Pest	18h	Tapiz	Tapiz	Tapiz	Tapiz	Tapiz	Tapiz
C1	30'	63	--	17	10³	354	52
	12h	--	--	3	--	--	1
	18h	--	--	53	9	--	--
C2	30'	--	--	--	--	--	1
	12h	--	--	1	--	--	--
	18h	--	--	14	4	--	--
C3	30'	--	1	--	--	--	--
	12h	--	--	--	--	1	--
	18h	--	--	2	--	--	--

En esta tabla se observa el número de colonias que sobrevivieron por segunda vez al glifosato. En las tres concentraciones consecutivas probadas, se tomaron muestras de la incubación con los pesticidas a los 30 minutos, 12 y 18 horas para obtener colonias en placas de medio nutritivo. El número de colonias obtenido difiere entre algunas de las cepas previamente expuestas al pesticida (203, 231, 244 y 255) y las cepas silvestre (WT) y mutagenizada (MTG) a las 18 horas de exposición en la Concentración 1, 2 y 3 (C3,C1 y C2)

Por otra parte la cinética de crecimiento no arroja diferencias sustanciales entre la cepa silvestre y las cepas candidato, sólo observamos que en algunos casos la tasa de crecimiento se reduce ligeramente en los controles sin pesticida de algunas de las cepas candidato. En las **Figuras 1 a 3** se muestran las gráficas con la cinética de crecimiento de las cepas que mostraron mayor número de colonias al final de cada tratamiento.

En conclusión, las cepas expuestas a los pesticidas y que presentaron resistencia a antibióticos no conservan la resistencia a los pesticidas, sin embargo, en algunos casos hay una clara sub-selección de células con las diferentes concentraciones en comparación con la cepa silvestre y la cepa mutagenizada. Esto podría hablarnos de un fenómeno de co-selección que implique la tolerancia o persistencia (Andersson y Hughes, 2011) a pesticidas, produciendo mutaciones compensatorias que prolonguen el estado de latencia (Lewis, 2010), amortigüen la pérdida de *fitness* e induzcan resistencia a antibióticos (Lewis, 2017). Sin embargo, cabe la posibilidad de que los pesticidas estén propiciando un estado de hipermutabilidad (Andersson y Hughes, 2009), ya que hasta el momento hemos demostrado que la cepa silvestre al mutagenizarla químicamente con nitrosoguanidina, no cambia el perfil de susceptibilidad a los antibióticos.

Es por ello que decidimos explorar el potencial efecto mutagénico de los pesticidas en la cepa silvestre de *Salmonella enterica* sin haberla expuesto previamente a nitrosoguanidina.

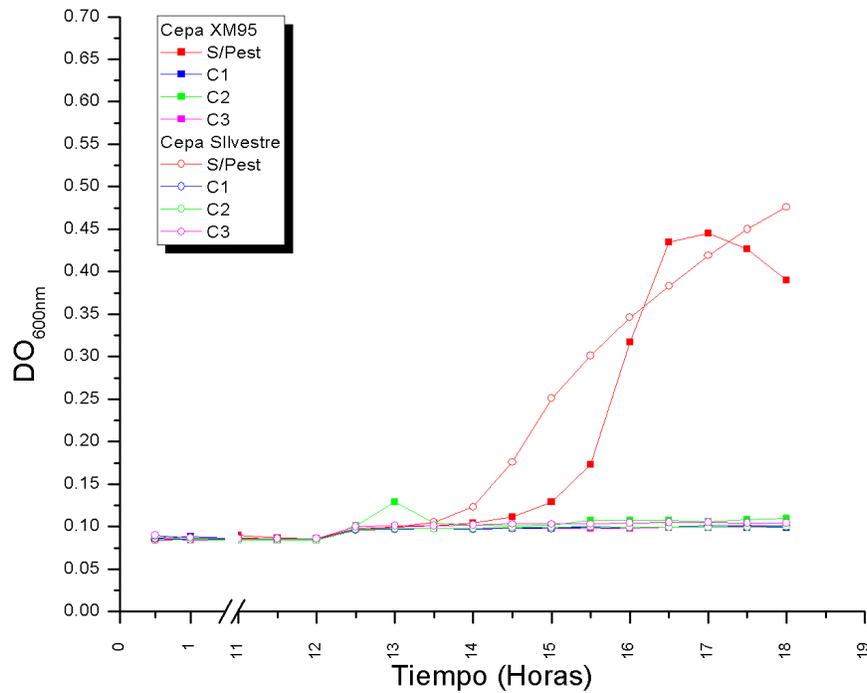
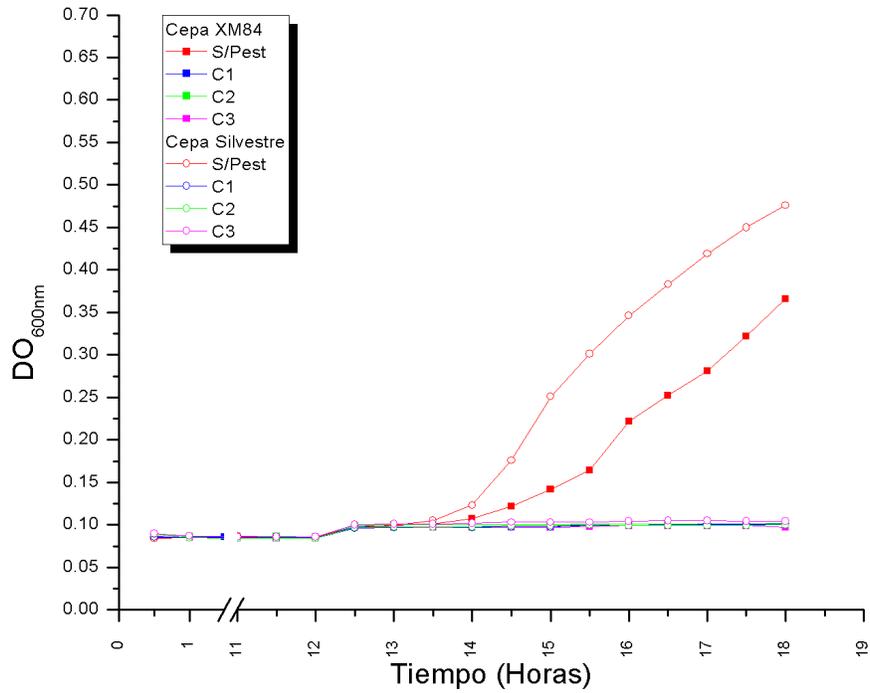


Figura 1. Cinética de crecimiento de cepas pre-expuestas a Paratión Metílico.

Se presentan la cinética de crecimiento de las cepas candidato 84 y 95 sobrevivientes a paratión metílico y que mostraron también resistencia a antibióticos. En esta segunda exposición, puede observarse que en comparación con la cepa silvestre, no se muestran diferencias sustanciales en la tasa de crecimiento. Las concentraciones utilizadas fueron: C1 (0.347 mg/ml), C2 (0.531 mg/ml), C3 (0.817 mg/ml), S/Pest (Sin pesticida).

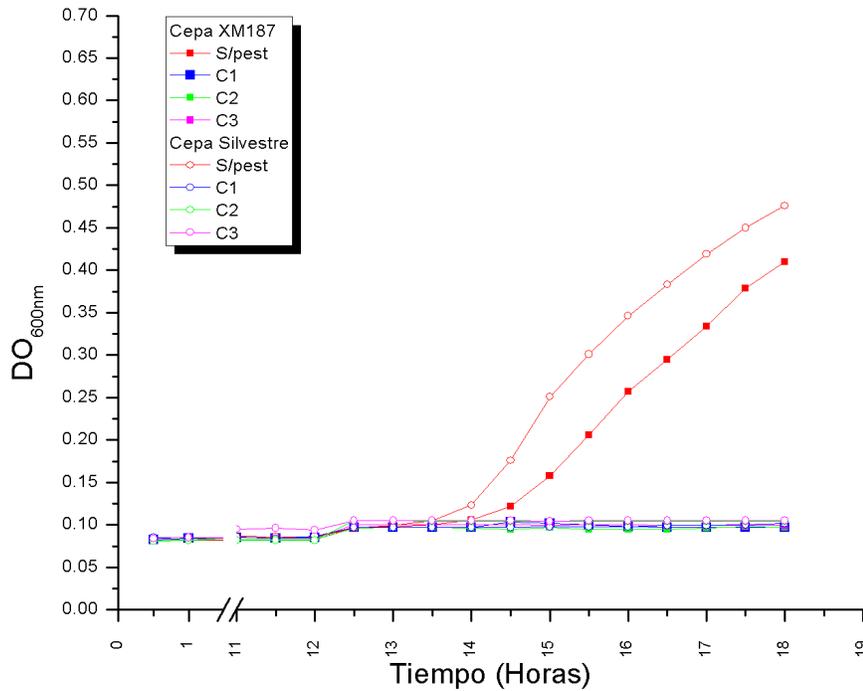
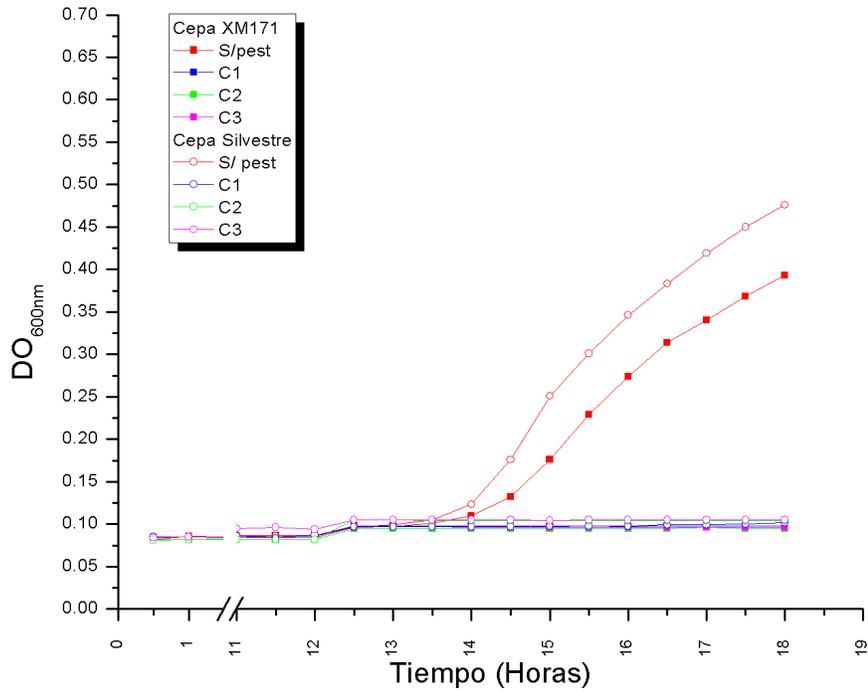


Figura 2. Cinética de crecimiento de cepas pre-expuestas a Asulam.

Se presentan la cinética de crecimiento de las cepas candidato 171 y 187 sobrevivientes a asulam y que mostraron también resistencia a antibióticos. En esta segunda exposición, puede observarse que en comparación con la cepa silvestre, no se muestran diferencias sustanciales en la tasa de crecimiento. Las concentraciones utilizadas fueron silvestre C1 (1.168 mg/ml), C2 (2.337 mg/ml), C3 (3.5 mg/ml), S/Pest (Sin pesticida).

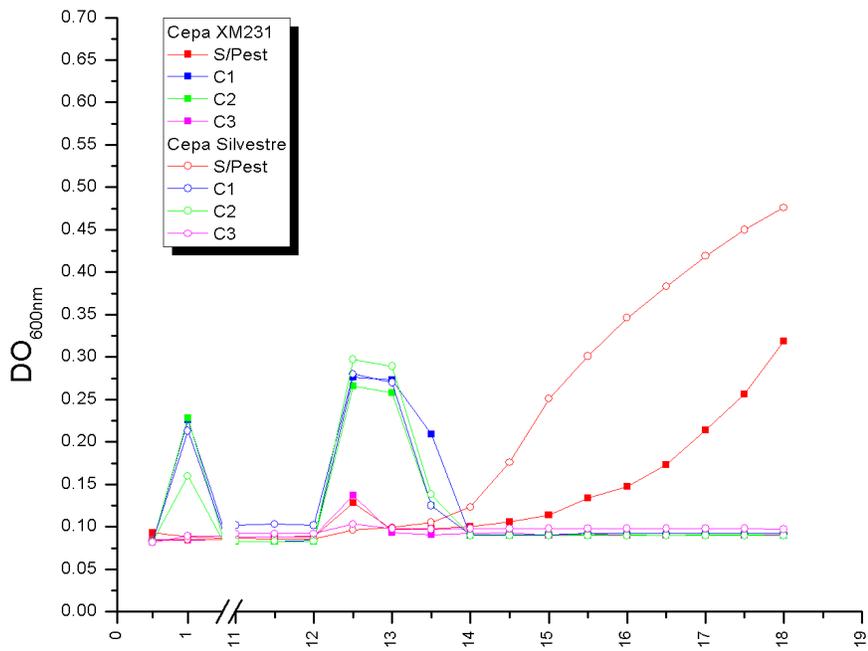
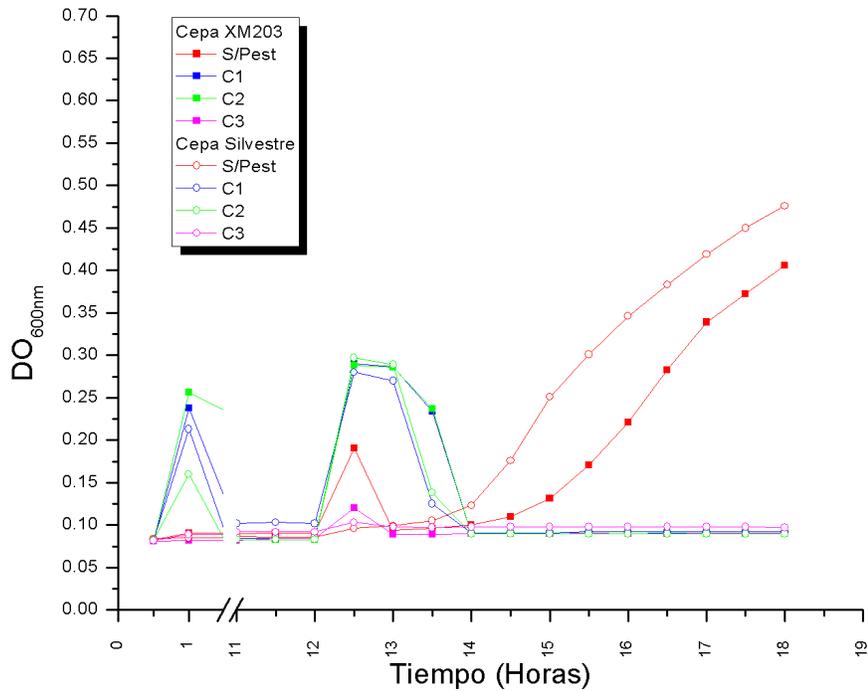


Figura 3. Cinética de crecimiento de cepas pre-expuestas a Glifosato.

Se presentan la cinética de crecimiento de las cepas candidato 203 y 231 sobrevivientes a glifosato y que mostraron también resistencia a antibióticos. En esta segunda exposición, puede observarse que en comparación con la cepa silvestre, no se muestran diferencias sustanciales en la tasa de crecimiento salvo en la primera hora de incubación y entre las 12 y 14 horas, posterior a la adición del medio LB, lo cual pudo deberse a una adaptación temporal al pesticida en la primera hora de exposición y a la recuperación de la cepa después del estrés sufrido por la toxicidad del pesticida. Las concentraciones utilizadas fueron C1 (0.509 mg/ml), C2 (1.018 mg/ml), C3 (2.182 mg/ml), S/Pest (Sin pesticida).

Inducción de mutagénesis por pesticidas.

Con esta búsqueda, evaluamos alrededor de 300 genes y operones involucrados en la producción de aminoácidos esenciales y motilidad; lo cual también incluye genes de metabolismo, proteínas de transporte de electrones y proteínas estructurales del flagelo y de invasividad (Frye *et. Al*, 2006; Low, 2001; Zhao *et al.*, 2014) (**Cuadro 12**). Sin embargo, no encontramos cepas auxótrofas ni inmóviles que nos indicaran que el pesticida se comportara como un agente mutagénico.

Tabla 12. Resultados del ensayo de mutagénesis con Paratión metílico.

Tratamiento	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Total	# Auxótrofas	%No móviles
C1	244	76	93	413	0	0*
C1+C2	532	359	444	1335	0	0
C1+C2+C3	0	0	0	0	NA	NA

En esta tabla se muestra el número de colonias sobrevivientes al tratamiento con pesticidas a diferentes concentraciones. Las muestras fueron tomadas cada vez que finalizaba la incubación con la concentración correspondiente al tratamiento, de tal manera que la muestra final había pasado por una selección con las tres concentraciones de forma sucesiva. C1 corresponde a una concentración baja, C2 a una media y C3 a una alta. NA (no aplica), se debe a que en ausencia de crecimiento se puede evaluar ninguna propiedad. * Sólo 4 colonias redujeron ligeramente la motilidad, pero no corresponde concretamente a un fenotipo de no motilidad, por lo que no se consideró como un cambio.

DISCUSIÓN

Como lo expusimos en la sección 1.4, existen ciertos parámetros que definen la capacidad de adaptación. Cuando una población bacteriana es sometida a estrés, la respuesta puede bifurcarse en dos posibilidades (intercambio genético o mutación). Pero si en dicha población la posibilidad de intercambio genético es baja, la única alternativa es la mutación y/o recombinación de sus propios recursos genéticos (Blazquez *et al.*, 2002; Bjedov *et al.*, 2014). De acuerdo al trabajo de Rosenberg *et al.* (1998) la mayoría de las poblaciones bacterianas con tasas de mutación incrementadas, responden a un fenotipo transitorio, es decir, que las mutaciones producidas en su mayoría no son heredables. (Galán *et al.*, 2006). En este caso, al inducir una mutagénesis previa con Nitrosoguanidina aumentamos la tasa de mutación y por lo tanto la activación de los sistemas de reparación de DNA.

Se ha demostrado que en células eucariotas el paratión metílico y el glifosato producen citotoxicidad por estrés oxidante debido a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) de la molécula del pesticida al ser metabolizado en el retículo endoplásmico (Pham *et al.*, 2004). En bacterias Gram negativas, la mayoría de las reacciones de oxidación se llevan a cabo en el espacio periplásmico, pero existe la posibilidad de que se produzcan en citoplasma y que esto cause estrés y daño en DNA. Sin embargo, aún no tenemos la certeza del tipo de estrés al que se encuentra sometida la bacteria al estar en contacto con el pesticida o si tienen un efecto mutagénico directo, pero en términos generales podríamos presumir que los sistemas de respuesta a estrés entran en acción durante la exposición a los pesticidas.

Se sabe que el sistema SOS es un mecanismo de respuesta a estrés vinculado a daño en DNA. Cuando la célula es sometida a un agente estresor, se activan genes de respuesta a estrés que compensan el daño en la célula, los sistemas de reparación se activan produciendo arresto en el ciclo celular, se activa RecA, se activan represores de LexA y se induce la transcripción de genes de la

respuesta SOS como las polimerasas “*Error-prone*” (Ratray y Strathern, 2003; McLean *et al.*, 2013; Bjedov *et al.*, 2014; Alam *et al.*, 2016). Se ha descrito que en general la respuesta SOS tiene una participación activa en el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, ya que se promueve un estado de hipermutabilidad al acumular mutaciones de compensación (Blazquez *et al.*, 2002; Andersson y Hughes, 2009; McLean *et al.*, 2013; Alam *et al.*, 2016).

La hipermutabilidad puede conducir a la generación de mutaciones tanto beneficiosas como perjudiciales, pero puede contribuir a la adaptación ante condiciones desventajosas; de hecho, es común encontrar este fenómeno en bacterias patógenas (Jayaraman, 2011). La tasa de hipermutabilidad suele ser de menos del 0.1% en bacterias como *Escherichia coli*, pero esta condición puede verse aumentada de 10 hasta 200 veces en aislados clínicos (Jolivet-Gougeon, 2011).

Se sabe que la hipermutabilidad causada por la respuesta SOS suele ser transitoria. Sin embargo la persistencia de una mutación, en especial de aquellas que confieren resistencia a un antibiótico no solo dependen de la constante exposición a la sustancia en cuestión, sino también de la aparición de mutaciones que reestablezcan el “*fitness*” bacteriano, mutaciones de acompañamiento que contribuyan a la resistencia, pero que sean de bajo costo metabólico; o por la co-selección entre mutaciones de resistencia y otros marcadores genéticos seleccionados (Andersson y Hughes, 2009).

En otro trabajo, Pránting y Andersson (2010) proponen la adaptación rápida sin mutagénesis, como un escape de los costos de acondicionamiento asociados a la resistencia. Esta teoría se sustenta en que las cepas mutantes resistentes mejoran su capacidad de adaptación por medio del aumento en el número de copias de genes mutantes funcionales de pequeño efecto, potenciando así el fenotipo de resistencia.

Por otra parte, Andersson y Hughes (2010), así como otros autores (Levin, 2017; Lewis, 2017 y Fridman, 2014) afirman que actualmente nos enfrentamos a

un evento no muy distante de la resistencia: la persistencia. Estas células llamadas “persisters”, como lo hemos abordado en la parte introductoria, tienen como característica la capacidad de entrar en un estado de latencia por períodos anormalmente largos y generalmente se suelen encontrar en individuos con enfermedades infecciosas crónicas (Lewis, 2007; Fauvart *et al.*, 2011; Mulcahany *et al.*, 2017; Lewis and Shan, 2017), los cuales se encuentran sometidos a tratamientos largos con antibióticos.

En nuestro caso, no tenemos aún la certeza de cuál es la vía de selección de la resistencia, podríamos sugerir que el mecanismo de selección esté mediado por la acumulación de mutaciones de compensación a consecuencia del estrés químico, hecho que podría comprobarse rastreando la expresión de genes de respuesta a estrés en presencia del pesticida. Por otra parte, cabe la posibilidad de estar enfrentándonos con genes reguladores del estado de latencia, por lo que se tendría que hacer una selección muy minuciosa de cada uno de ellos para evaluar su expresión, esto explicaría la supervivencia de las bacterias a los pesticidas sin el desarrollo de resistencia a ellos. Por último y no menos importante, es necesario realizar un mapeo genómico de las cepas candidato, para ubicar las posibles regiones genómicas involucradas en la resistencia a antibióticos y secuenciarlas para saber su función.

CONCLUSIONES

- Los pesticidas son sustancias tóxicas para las bacterias, lo cual puede mermar poblaciones de éstas.
- Es posible seleccionar o generar cepas bacterianas resistentes a antibióticos mediante la exposición a pesticidas.
- No encontramos evidencia de concomitancia entre la resistencia a pesticidas y antibióticos, pues las bacterias no desarrollan resistencia a los pesticidas, sin embargo, expresan un mecanismo de adaptación fisiológica transitoria que les permite sobrevivir y de forma colateral expresan resistencia a los antibióticos.

PERSPECTIVAS

El estudio de la persistencia no ha tenido tanto desarrollo como la resistencia, sin embargo podría explicar un origen alternativo de ésta. Por ello es importante continuar con el estudio de los genes involucrados en la regulación de la persistencia en microbiota patógena y microbiota residente; cómo es que los pesticidas pueden alterar este estado de latencia y la forma en la que se originan cepas resistentes a partir de las persistentes dentro del huésped, qué tipo de interacciones tienen las diferentes poblaciones bacterianas en presencia de los pesticidas consumidos en la dieta del huésped.

REFERENCIAS

1. Adelberg EA, Mandel M, Ching-Chen GC. (1969). Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitrosoguanidine in *Escherichia coli*. *Bioch and Bioph R Communic*. 18: 5-6, 788-795.
2. Al Naggar Y, Codling G, Vogt A, Naiem E, Mona M, Seif A and Giesy JP. (2015). Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera L.*) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicol Environ Saf*. 114C, 1-8.
3. Alam MK, Alhazmi A, Decoteau JF, Luo Y, Geyer CR. (2016). *RecA* inhibitors potentiate antibiotic activity and block evolution of antibiotic resistance. *Cell Chem Biol*. 23, 381–391.
4. Albert LA, Rendón VO. (1988). Contaminación por compuestos organoclorados en algunos alimentos procedentes de una región de México. *Rev Saude Publica Sao Paulo*. 2(6), 500-6.
5. Albert LA. (2014). Panorama de los plaguicidas en México. Séptimo Congreso de actualización en toxicología clínica; 2005 septiembre 1-2; Tepic (Nayarit) México. *Rev Tox Online*. 1-17.
6. Andersson DI, Hughes D. (2009). Gene Amplification and Adaptive Evolution. *Bacteria Annu Rev Genet*. 43, 167–195.
7. Andersson, DI and Hughes D. (2010). Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol*. 8, 260–271.
8. Andersson, DI and Hughes D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev*. 35, 901–911.
9. Andrews JM. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chem*. 48 Suppl n1, 5-16.
10. Anjum R, Grohmann E, Malik A. (2012). Exogenous isolation of conjugative plasmids from pesticide contaminated soil. *World J Microb Biotech*. 28, 567-574.

11. Anwar N, Rouf SF, Römling U, Rhen M. (2014). Modulation of biofilm-formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the periplasmic DsbA/DsbB oxidoreductase system requires the GGDEF-EAL domain protein STM3615. *PLoS One*. 9(8), 1-12.
12. Araújo ASF, Monteiro RTR, Abarkelli RB. (2003). Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52, 799-804.
13. Badii MH, Garza-Almanza V. (2007). Resistencia en insectos, plantas y microorganismos. *CULCyT*. 18, 9-25.
14. Bermingham A, Derrick JP. (2002). The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *Bio Assays*. 24, 637-648.
15. Bindhya R, Sunny SA, Thanga VS. (2009). In vitro study on the influence of methyl parathion on soil bacterial activity. *J Environ Biol*. 30:3, 417-9.
16. Bjedov I, Tenailon O. (2014). Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Science*. 1404, 1404–1409.
17. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature*. 13, 42-51.
18. Blazquez J, Oliver A, Gomez-Gomez JM. (2002) Mutation and evolution of antibiotic resistance: antibiotics as promoters of antibiotic resistance? *Curr. Drug Targets*. 3, 345–9.
19. Bourquin AW. (1977). Degradation of malathion by salt marsh microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 33, 356-62.
20. Burman LG. (1986). The antimicrobial activities of trimethoprim and sulfonamides. *Scand J Infect Dis*, 18, 3–13.
21. Dawkar VD, Chikat YR, Lomate PR, Dholakiaa BB, Gupta VS, Giri AP. (2013) Molecular insights into resistance mechanisms of lepidopteran insect pest against toxicants. *J Proteome Res*. 12, 4727-4737.
22. De la Cruz F, Davies J. (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol*. 128–133.

23. Deng S, Chen Y, Wang D, Shi T, Wu X, Ma X. (2015). Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by *Stenotrophomonas* sp. G1. *J Hazard Mater.* 297, 17-24.
24. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D and Crow JF. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics.* 148, 1667–1686.
25. Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(16), 7160–7164.
26. Fauvart M, De Groote V, Michiels J. (2011). Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J Med Microbiol.* 60, 699–709.
27. Foster PL (1999). Are adaptive mutations due to a decline in mismatch repair? The evidence is lacking. *Mutat Res.* 436, 179-84.
28. Foster, P. L. (2006). Methods for Determining Spontaneous Mutation Rates. *M Enzym.* 409, 195–213.
29. Friedberg EC. (2013). The molecular basis of mutagenesis: 40 years of research on genomic integrity. *Mol Gen.* 12(105), 982-83.
30. Frye J, Karlinsey JE, Felise HR, Marzolf B, Dowidar N, McClelland M, Hughes KT. (2006). Identification of new flagellar genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bact.* 6(188), 2233–2243.
31. Galán JC, Baquero MR, Morosini MI, Baquero F (2006). High mutation rate bacteria : Risks of a high-speed life. *Infection.* 10, 22–29.
32. Gentry DR, Hernandez VJ, Nguyen LH, Jensen DB, Cashel M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *Journal of Bacteriology.* 175(24),7982-89.
33. Gilbert W. (1986). The origin of life: The RNA world. *Nature.* 319, 618.
34. Gómez-Arroyo S, Noriega-Aldana N, Juárez-Rodríguez D, Villalobos-Pietrini R. (1987). Sister chromatids exchanges induced by the organophosphorus insecticides Methyl parathion, Dimethoate, Phoxim and Methyl azinphos in cultured human lymphocytes. *Cont Amb.* 3, 63-70.

35. Hersh MN, Ponder RG, Hasting S PJ, Rosenberg SM. (2004). Adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli*: two pathways of genome adaptation under stress. *Res Microbiol.* 155, 352-9.
36. Hubálek Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology.* 46(3), 205-29.
37. Huovinen P. (2001). Resistance to trimethoprim- sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis.* 32, 1608-14.
38. Itoh K, Navarro R, Tekeshita K, Tago K, Hayatsu M, Hori T. (2014). Bacterial population succession and adaptation affected by insecticide application and soil spraying history. *Front Microbiol.* 5(457), 1-12.
39. Jayaraman R. (2011). Hypermutation and stress adaptation in bacteria. *J Genet.* 90, 383–391.
40. Jolivet-Gougeon A, Kovacs B, Le Gall-David, Le Bars H, Bousarghin, Bonnaure-Mallet M, Lobel B, Guille F, Soussy CJ, Tenke P. (2011). Bacterial hypermutation: Clinical implications. *J Med Microbiol.* 60, 563–573 .
41. Kurenbach B, Marjoshi D, Amábile-Cuevas CF, Ferguson GC, Godsoe W, Gibson P, Heinmann JA. (2015) Sublethal exposure to commercial formulations of the herbicides Dicamba, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and Glyphosate cause changes in antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *MBio.* 6:2, 1-9.
42. Levin-Reisman I, Ronin I, Gefen O, Braniss I, Shores N, Balaban NQ. (2017). Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science.* 355:826–830.
43. Lewis K, Shan Y. (2017). Why tolerance invites resistance: Bacteria that encounter antibiotics first become tolerant and then resistant to them. *Science.* 355, página 796.
44. Lewis K. (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev. Microbiol.* 5, 48–56.
45. Lewis K. (2010). Persister Cells. *Annu Rev Microbiol.* 64, 357–72.
46. Low BK. (2001). An overview: Auxotrophy. *Encycl Genet,* 133 doi: 10.1006/rwgn.2001.0096.

47. MacLean RC, Torres-Barceló C, Moxon R. (2013) Evaluating evolutionary models of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Nat Rev Genet.* 14, 221–27.
48. MacLean RC, Torres-Barceló C, Moxon R. (2013). Evaluating evolutionary models of stress-induced mutagenesis in bacteria. *Nat Rev Genet.* 14, 221–27.
49. Maron DM, Ames BN. (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research.* 113:173-215.
50. Matsumura F, Boush GM. (1966). Malathion Degradation by *Trichoderma viridae* and a *Pseudomonas* species. *Science.* 151, 1278-80
51. McCelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, et al. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 413, 852-56.
52. Ohja A y Gupta YK. (2014). Evaluation of genotoxic potential of commonly used organophosphate pesticides in peripheral blood of rats. *Hum Exp Tox.* 34(4), 390-400.
53. Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, Lo S L, Carrasco E. (2010). Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem Res Toxicol.* 23, 1586–1595.
54. Pham C, Min J, Gu M. (2004). Pesticide induced toxicity and stress response in bacterial cells. *Bull Environl Contam Toxicol.* 72, 380–386.
55. Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E, Mudry MD. (2009). Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mut. Res.* 672, 95–102.
56. Pránting M, Andersson DI. (2010). Mechanisms and physiological effects of protamine resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *J Antimicrob Chemother.* 65, 876–887
57. Priestman MA, Funke T, Singh IM, Crupper SS, Schönbrunn E. (2005). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Lett.* 579, 728–732
58. Ratray AJ and Strathern JN. (2003). Error-Prone DNA polymerases: When making a mistake is the only way to get ahead. *Ann Rev Genet.* 37, 31-66.

59. Rivera-Ramírez XO. (2016). Búsqueda de resistencia cruzada entre antibióticos y plaguicidas de uso agrícola en *Salmonella enterica* (tesis de licenciatura). México, D.F., Universidad Nacional Autónoma de México.
60. Rosenberg SM, Thulin C, Harris RS. (1998). Transient and heritable mutators in adaptive evolution in the lab and in the nature. *Genetics*. 148, 1559-66.
61. Roth JR. (2012). The joys and terrors of fast adaptation: New findings elucidate antibiotic resistance and natural selection. *Mol Microbiol*. 79, 279–282.
62. Shehata AA, Schrödl W, Aldin AA, Hafez, HM, Krüger M. (2013). The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr. Microbiol*. 66, 350–358.
63. Singh B, Kaur J, Singh K. (2012). Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion. *Crit Rev Microbiol*. 40(2), 146-54.
64. Staub JM, Brand L, Tran M, Kong Y and Rogers SG. (2012). Bacterial glyphosate resistance conferred by overexpression of an *E. coli* membrane efflux transporter. *J Ind Microb Biotech*. 39, 641-647.
65. Storvik KAM, Foster PL. (2010). RpoS, the Stress Response Sigma Factor, Plays a Dual Role in the Regulation of *Escherichia coli*'s Error-Prone DNA Polymerase IV. *J Bact*. 192(14):3639-3644.
66. Sviridov AV, Shushcova TV, Ermakova IT, Ivanova IV, Epiktetov DO, Leontievsky AA. (2015). Microbial degradation of glyphosate herbicides, *App Biochem Microb*. 51(2), 183–190 (2015).
67. Tafur JD, Torres JA y Villegas MV. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Asoc Col Infect*. 12(3), 217-226
68. Tenailon O, Toupance B, Nagard L, Godelle B. (1999). Mutators, population size, adaptative landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria. *Genetics*. 152, 485-93
69. Villalba A. (2009) Resistencia a herbicidas. Glifosato. *C, Doc y Tec*, (39), 169-186.
70. Zhao H, Tao K, Zhu J, Liu S, Gao H, Zhou X. (2015). Bioremediation potential of glyphosate-degrading *Pseudomonas* spp. strains isolated from contaminated soil. *J Gen Appl Microbiol*. 61, 165–170.

71. Zhao X, Norris SJ, Liu J. Current Topic. (2014). Perspective: Molecular architecture of bacterial flagellar motor in cells molecular architecture of bacterial flagellar motor in cells. *Biochem.* 53:(27), 4323-33.