

*Estudios sobre la transferencia  
horizontal de resistencia a  
tetraciclina en bacterias  
esporuladas aisladas  
de colmenas de abejas melíferas*

Tesis Doctoral

Ing. Agr. Eliana Abrahamovich

Director: Dra. Adriana Mónica Alippi

Codirector: Dra. Ana Claudia López

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
Universidad Nacional de La Plata

A la memoria de mi Mamá, Cristina, que me dejó los recuerdos más lindos y su hermosa sonrisa grabada en el corazón.

## **Agradecimientos**

A mi Mamá y mi Papá, que son mi ejemplo a seguir y siempre me dieron y dan todo su amor.

A mis hermanos Mariela, Pablo y Diego, que siempre me cuidan, me apoyan y me dan todo su cariño.

A mis sobrinos Clara, Joaquín, Juan Ignacio, Agustín, Lucía y Delfina, que son la luz de mi vida y el mejor regalo de mis hermanos.

A mis tíos, Graciela y Carlos, que me brindaron mucho cariño y ánimo necesarios.

A mis amigos Yani, Anto, Barbi, Ana, Fede y Nacho, que siempre estuvieron presentes acompañándome.

A mi directora, Adriana Alippi y a mi codirectora, Ana C. López que me permitieron realizar el doctorado, que me guiaron y me enseñaron durante estos años.

A Laura Bartel, por brindarme siempre su ayuda en lo que podía y por todos sus consejos.

A Ernesto Franco, por su extraordinaria ayuda y por todo su aporte.

A Pedro Balatti y a todos los compañeros de trabajo del CIDEFI, que hicieron su aporte con charlas y consejos.

## Resumen

La miel es un alimento natural elaborado por las abejas melíferas y como tal, presenta una microbiota propia al igual que el resto de los alimentos. Las especies bacterianas formadoras de esporas de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* aparecen en forma frecuente, y, dentro de ellas, se cita *Bacillus cereus sensu stricto* que está asociada a procesos infecciosos humanos como productora de enterotoxinas. En la miel también pueden encontrarse bacterias causantes de enfermedades de las abejas como la loque americana, ocasionada por *Paenibacillus larvae*, y la loque europea, producida por *Melissococcus plutonius*. Durante muchos años, estas enfermedades se trataron con el antibiótico oxitetraciclina, generando la aparición de resistencia de los agentes microbianos que se querían controlar con la consiguiente aplicación de dosis cada vez mayores, y la contaminación de la miel con residuos de estas sustancias.

El aumento de la prevalencia de la resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas, es el resultado de la evolución y la presión selectiva debido a la amplia implementación del uso de antibióticos en medicina humana, medicina veterinaria, alimentación animal y agricultura. Esta adaptación ocurre, no por la mutación de las poblaciones amenazadas, sino mayormente por la adquisición y diseminación de genes simples de resistencia a antibióticos mediante elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y transposones. Estos elementos móviles distribuyen eficientemente los determinantes de resistencia a antibióticos, individualmente o en grupos, entre muchos géneros y especies bacterianas. En el caso de las tetraciclinas, la resistencia se debe a la adquisición de genes *tet* (tetraciclina) y *otr* (oxitetraciclina); frecuentemente estos genes están asociados con plásmidos y/o transposones conjugativos.

Con el objetivo de investigar la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina en cepas de *B. cereus* y *P. larvae* aisladas de miel y materiales del apiario y su correlación con la presencia de plásmidos

salvajes se aplicaron procedimientos de microbiología y biología molecular. Se analizó la presencia de los determinantes de resistencia a tetraciclina: Tet K, Tet L, Tet M, Tet O, Tet Q, Tet S, Tet A (P) y Otr A y se observó una alta correlación entre la presencia de plásmidos y fenotipos resistentes a tetraciclina. Mediante PCR, se detectó la presencia del determinante Tet L empleando como molde ADN plasmídico en un 76% de las cepas de *B. cereus* estudiadas y del determinante Tet M en la cepa *B. cereus* m383 con fenotipo resistente a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina cuando se utilizó como molde ADN genómico total, pero no así cuando se utilizó ADN plasmídico. Con respecto al resto de los determinantes de resistencia analizados (Tet K, Tet O, Tet Q, Tet S, Tet A (P) y Otr A), no se observó producto de amplificación alguno en las cepas estudiadas, ni en ADN genómico total ni en ADN plasmídico.

Se realizaron ensayos de conjugación entre cepas resistentes y sensibles, y de transformación por electroporación con ADN plasmídico obtenido de cepas resistentes, demostrando una transferencia horizontal de genes de resistencia a tetraciclina entre la cepa de *B. cereus* m401, resistente a tetraciclina, y las cepas de *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> y *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup>, sensibles a tetraciclina. Se obtuvieron transconjugantes con fenotipo resistentes a tetraciclina para ambas cepas aceptoras, pero no se obtuvieron transformantes en los ensayos de electroporación.

Mediante el análisis de los resultados de la secuenciación del genoma completo de la cepa de *B. cereus* m401 se confirmó la presencia de 3 plásmidos, a los cuales denominamos pBCm401a, pBCm401b y pBCm401, de 8.307 pb, 9.934 pb y 69.591 pb, respectivamente. Luego del análisis de las anotaciones funcionales de los genes codificantes de proteínas obtenidos en estos 3 plásmidos no se encontraron genes que codifiquen funciones relacionadas con resistencia a tetraciclina.

Al no encontrar en ninguno de los tres plásmidos genes que codifiquen resistencia a tetraciclina, se efectuó la búsqueda de dichos genes en el resto de los

*contigs* obtenidos del genoma (n=46). Luego del análisis de las anotaciones funcionales se detectó un *contig* (*contig09*) de 243.988 pb conteniendo un gen de resistencia a tetraciclina de 1.377 pb (*contig09\_orf00135*) con alta homología a los genes *tetK*, *tetL* y *tet45*, que codifican para proteínas de eflujo. Según el análisis efectuado en la base de datos del servidor GenBank mediante la herramienta BLASTn, este *contig* se correspondería con secuencias similares pertenecientes a megaplásmidos de *B. cereus* y *B. thuringiensis*. Los resultados del análisis del alineamiento de la secuencia correspondiente al gen de resistencia a tetraciclina presente en el *contig09* con secuencias correspondientes a los genes de resistencia *tetK*, *tetL* y *tet45* permitieron concluir que el gen de resistencia a tetraciclina presente en la cepa m401 se correspondería con el gen *tet45*, ya que muestra mayor homología (93%) con la secuencia de dicho gen, con respecto a los genes *tetL* (80%) y *tetK* (64%).

Por todo lo expuesto, se puede concluir que este trabajo es el primer registro de la presencia del gen de resistencia *tet45* en un posible megaplásmido de *B. cereus*.

## Abstract

Honey is a complex natural substance made up by honey bees that, like any other food, show a characteristic microbiota. Spore-forming bacteria of genera *Bacillus* and *Paenibacillus* are commonly present in honey. *Bacillus cereus sensu stricto* is associated with human infectious processes as enterotoxin producer. Other bacteria that cause diseases in honey bees, such as *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*, the causal agents of American foulbrood and European foulbrood, respectively, are also present in honey. The antibiotic oxytetracycline has been used for decades to prevent and control both diseases. However, tetracycline-resistant bacteria were detected that led to apply higher doses with the consequent risks of accumulation of residues in honey.

The increased prevalence of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria is a consequence of evolution and selective pressure due to the wide implementation of antibiotics in human and veterinary medicine, animal feed and agriculture. This adaptation mainly occurs by the acquisition and dissemination of single genes by mean of mobile genetic elements, like plasmids and transposons. These mobile elements can efficiently distribute antibiotic resistance determinants among many bacterial genera and species. Resistance to tetracycline and oxytetracycline is mainly due to the acquisition of *tet* (tetracycline) and *otr* (oxytetracycline) genes frequently associated with mobile elements.

This study aimed to investigate the presence of resistance determinants to tetracycline, oxytetracycline, and minocycline in *B. cereus* and *P. larvae* strains isolated from honey and other apiarian sources and their correlation with the presence of wild plasmids.

The presence of eight tetracycline (Tet K, Tet L, Tet M, Tet O, Tet Q, Tet S, Tet A (P) and oxytetracycline (Otr A) resistance determinants was analyzed by PCR detecting Tet L determinant in 76% *B. cereus* strains when analyzing plasmidic DNA. On the other hand, no PCR products were observed when using the K, Tet O,

Tet Q, Tet S, Tet A (P) and Otr A primers, except for one strain of *B. cereus* (m383) carrying the tet M determinant that was detected when using total genomic DNA.

To ascertain if tetracycline resistance could be transferred horizontally between strains along with a particular plasmid, conjugation experiments were performed. All selected donors previously marked as nalidixic resistant transferred the tetracycline resistant phenotype to all the recipient strains tested. Nevertheless, no transformants were obtained when transformation assays were performed.

Results from the whole genome sequencing of *B. cereus* strain m401 showed the presence of three plasmids named pBCm401a, pBCm401b, and pBCm401, of 8.307 bp, 9.934 bp, and 69.591 bp, respectively. No tetracycline resistance genes were detected in any of these plasmids. After analysis of the functional annotations of the rest of contigs (n=46), a tetracycline resistance gene of 1.377 bp with high homology to *tetK*, *tetL*, and *tet45* genes was detected in contig09 (orf00135). The tetracycline resistance gene present in contig09 (orf00135) showed a high homology to *tet45* (93%), *tetL* (80%), and *tetK* (64%), respectively. On the other hand, the analysis of the whole contig09 (243,988 bp in size) showed homology to megaplasmids of *B. cereus* and *B. thuringiensis*

According to our knowledge, this is the first record of the presence of *tet45* resistance gene in a megaplasmid of *B. cereus*.

## Índice general

Índice de Figuras	1
Índice de Tablas	3
Abreviaturas utilizadas	4
1. Introducción	
1.1. Importancia de la miel	6
1.2. Microorganismos presentes en el apiario	
1.2.1. Microorganismos presentes en la miel	7
1.2.2. Microorganismos asociados con abejas y otras fuentes de apiario	8
1.3. Enfermedades bacterianas de la cría de las abejas	
1.3.1. Loque americana	9
1.3.2. Loque europea	11
1.4. Control de las enfermedades y surgimiento de la resistencia a antibióticos	13
1.5. Mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias	14
1.6. Resistencia a tetraciclinas	19
2. Hipótesis de trabajo	22
3. Objetivos	22
4. Materiales y métodos	
4.1. Cepas bacterianas empleadas y conservación de las mismas	22
4.2. Medios de cultivo	25
4.3. Determinación de sensibilidad/resistencia antimicrobiana por dilución en agar	
4.3.1. Preparación de antibióticos	27
4.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	27

4.4. Análisis del perfil plasmídico por la técnica de lisis <i>in situ</i> en geles de agarosa horizontal	29
4.5. Obtención de ADN genómico total y ADN plasmídico	
4.5.1. Extracción de ADN genómico total	30
4.5.2. Extracción de ADN plasmídico en <i>B. cereus</i>	30
4.5.3. Extracción de ADN plasmídico en <i>P. larvae</i>	32
4.6. Detección por PCR de la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina	33
4.7. Digestión de ADN plasmídico mediante enzimas de restricción	35
4.8. Tratamiento para el curado de plásmidos	
4.8.1. Por calor	36
4.8.2. Mediante tratamiento químico	37
4.9. Conjugaciones bacterianas	38
4.9.1. Obtención de mutantes resistentes a ácido nalidíxico	39
4.9.2. Conjugaciones en medio líquido	40
4.10. Transformaciones por electroporación	
4.10.1. Preparación de electrocompetentes	42
4.10.2. Procedimiento de electroporación	43
4.11. Secuenciación del genoma bacteriano de <i>B. cereus</i> m401	44
5. Resultados y discusión	
Determinación de sensibilidad/resistencia antimicrobiana por dilución en agar	45
Análisis del perfil plasmídico por la técnica de lisis <i>in situ</i> en geles de agarosa horizontal	48
Detección por PCR de la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina	50
Digestión del ADN plasmídico mediante enzimas de restricción	54

Curado de plásmidos	56
Conjugaciones bacterianas	59
Obtención de mutantes resistentes a ácido nalidíxico	59
Conjugaciones en medio líquido	60
Transformación por electroporación	67
Secuenciación del genoma de <i>B. cereus</i> m401	68
6. Consideraciones finales	76
7. Bibliografía citada	79

## Índice de Figuras

Figura 1: Prueba del palillo	10
Figura 2: Panal afectado por loque americana	11
Figura 3: Síntomas de loque europea	12
Figura 4: Mecanismos genéticos de transferencia horizontal de genes	15
Figura 5: Estructura química de tetraciclinas	19
Figura 6: Extracción plasmídica por columnas	32
Figura 7: Tratamiento de curado con bromuro de etidio	37
Figura 8: Esquema del procedimiento para las conjugaciones	40
Figura 9: Determinación de la CIM a MIN por el método de difusión en agar	48
Figura 10: Técnica de lisis <i>in situ</i>	49
Figura 11: Amplificación por PCR del determinante de resistencia a tetraciclina Tet L empleando como molde ADN plasmídico de cepas de <i>B. cereus</i>	51
Figura 12: Amplificación del determinante de resistencia a tetraciclina Tet M en ADN genómico total de cepas de <i>B. cereus</i>	52
Figura 13: Fragmentos de restricción obtenidos con la enzima <i>Bgl</i> II en ADN plasmídico de <i>P. larvae</i>	54
Figura 14: Fragmentos de restricción obtenidos con la enzima <i>Cfo</i> I en ADN plasmídico de <i>B. cereus</i>	55
Figura 15: Tratamiento de curado con 0,001% de SDS	57
Figura 16: Tratamiento de curado con 0,002% de SDS	58
Figura 17: Tratamiento de curado con 30 µg/ml de BrEt	58
Figura 18: Coloración del medio Mossel	61
Figura 19: Determinación de la CIM de TET de los transconjugantes de <i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup>	62

Figura 20: Determinación de la CIM de TET de los transconjugantes de <i>B. pumilus</i> m350 NAL <sup>R</sup>	63
Figura 21: Producto de PCR del determinante de resistencia a tetraciclina Tet L en ADN plasmídico de los transconjugantes	63
Figura 22: Fragmentos de restricción obtenidos con la enzima <i>CfoI</i> y ADN plasmídico de los transconjugantes de <i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup>	64
Figura 23: Tratamiento de curado con 0,002% de SDS en los transconjugantes de <i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup>	66
Figura 24: Esquema de los plásmidos con las anotaciones funcionales	69
Figura 25: Esquema del <i>contig09</i> de 243.988 pb	70
Figura 26: Fragmento de la secuencia del <i>contig09</i> de 243.988 pb con las anotaciones funcionales	70
Figura 27: Alineamiento de las secuencias del gen de resistencia a TET encontrado en la cepa <i>B. cereus</i> m401 y el gen <i>tet45</i> de la cepa <i>Bhargavaea cecembensis</i> DMV42A	71
Figura 28: Esquema de la secuencia del gen de resistencia a TET de la cepa m401	74
Figura 29: Digestión con la enzima <i>CfoI</i> de los plásmidos de pBCm401a y pBCm401b	75

## Índice de Tablas

Tabla 1: Cepas empleadas en esta tesis	23
Tabla 2: Determinantes de resistencia a tetraciclina utilizados	33
Tabla 3: Mezclas de reacción y condiciones de ciclado para cada cebador utilizado	34
Tabla 4: Valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) de TET, OTC y MIN de las cepas estudiadas	46
Tabla 5: Tratamientos de curado de plásmidos	57
Tabla 6: Valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) de TET, OTC y MIN de las cepasceptoras	59
Tabla 7: Valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) de TET para las cepasceptoras y dadoras utilizadas para la conjugación y de los transconjugantes obtenidos	62
Tabla 8: Tratamientos de curado de plásmidos en los transconjugantes obtenidos	65

## Abreviaturas utilizadas

<b>% p/v:</b> porcentaje peso en volumen	<b>mm:</b> milímetro
<b>% v/v:</b> porcentaje volumen en volumen	<b>mM:</b> milimolar
<b>µg:</b> microgramo	<b>MIN:</b> minociclina
<b>µl:</b> microlitro	<b>MYPGP:</b> Mueller Hinton broth, yeast extract, sodium pyruvate, glucose, dipotassium phosphate
<b>µM:</b> micromolar	<b>NAL:</b> ácido nalidíxico
<b>ADN:</b> ácido desoxirribonucleico	<b>NAL<sup>R</sup>:</b> ácido nalidíxico resistente
<b>Aminoacil ARNt:</b> aminoacil ARN de transferencia	<b>NAL<sup>S</sup>:</b> ácido nalidíxico sensible
<b>AN:</b> agar nutritivo	<b>nM:</b> nanomolar
<b>ARN:</b> ácido ribonucleico	<b>nm:</b> nanómetros
<b>ATB:</b> antibiótico	<b>ND:</b> no determinado
<b>ATCC:</b> American Type Culture Collection, Rockville, EE.UU.	<b>NRRL:</b> Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EE.UU.
<b>BLAST:</b> Basic Local Alignment Search Tool	<b>OTC:</b> oxitetraciclina
<b>BrEt:</b> bromuro de etidio	<b>pb:</b> pares de bases
<b>c/u:</b> cada uno	<b>pmol:</b> picomol
<b>cel:</b> células	<b>rpm:</b> revoluciones por minuto
<b>CIM:</b> concentración inhibitoria mínima	<b>SDS:</b> dodecilsulfato de sodio
<b>ET:</b> eficiencia de transformación	<b>SE:</b> solución de electroporación
<b>LB:</b> Luria Bertani	<b>seg:</b> segundos
<b>mg:</b> miligramo	<b>SM:</b> solución madre
<b>MH:</b> Mueller-Hinton	<b>TET:</b> tetraciclina
<b>min:</b> minutos	<b>TET<sup>R</sup>:</b> tetraciclina resistente
<b>ml:</b> mililitro	<b>TET<sup>S</sup>:</b> tetraciclina sensible
	<b>THG:</b> transferencia horizontal de genes

**TY:** triptona extracto de levadura

**UFC:** unidades formadoras de  
colonias

**UV:** ultravioleta

**V:** volt

## 1. Introducción

### 1.1. Importancia de la miel

La miel es un alimento natural producido por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de las secreciones procedentes de partes vivas de las plantas y/o de excreciones de insectos succionadores que quedan sobre las plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, y almacenan y dejan madurar en los panales. Está compuesta por agua (17,2%), fructosa (38,4%), glucosa (30,3%), sacarosa (1,3%), otros carbohidratos (12%), minerales (0,17%), proteínas (169 mg/100 g) y ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, acético, fórmico, glucónico, fólico y otros), y su pH promedio es de 3,9 (da Silva et al., 2016).

La apicultura argentina se ha desarrollado considerablemente durante los últimos veinte años, convirtiendo a nuestro país en uno de los principales productores y exportadores de miel, con un rodeo conformado por aproximadamente tres millones de colmenas, explotadas por alrededor de 20.000 apicultores. Actualmente, el sector apícola aporta a nuestro país un ingreso superior a los 200 millones de dólares anuales por la exportación de miel. Según estadísticas de la FAO, Argentina es el segundo productor y exportador mundial de miel, detrás de China. El 95% de la miel que se produce en Argentina se exporta a más de veinte países diferentes. Los principales destinos de la miel argentina son Estados Unidos, Alemania y Japón (SENASA, 2016a).

La miel producida en nuestro país es muy valorada por su excelente calidad y considerada como una de las mejores del mundo. Existen además otros productos obtenidos de la actividad apícola comercialmente importantes como propóleos, polen, jalea real, cera, apitoxina, material vivo y servicios para la polinización de cultivos.

La mayor actividad apícola se concentra en la Pampa Húmeda, aunque en los últimos quince años la producción se ha extendido a otras regiones del país,

constituyendo un importante factor de desarrollo rural y familiar de las comunidades. La apicultura es una actividad de alto valor social, ya que colabora en el sostenimiento económico de casi 100.000 familias, entre productores y otros actores vinculados a la producción y comercialización de productos apícolas e insumos. Muchas de estas familias dependen exclusivamente de esta actividad productiva que se constituye como una de las principales para la agricultura familiar y economías regionales. La apicultura, además de la producción de miel, contribuye significativamente con la biodiversidad vegetal y la producción de alimentos, ya que las abejas polinizan las flores silvestres y cultivos, sumando beneficios al sector (SENASA, 2016a; 2016b).

## **1.2. Microorganismos presentes en el apiario**

### 1.2.1. Microorganismos presentes en la miel

Como producto de origen natural, las mieles de abejas melíferas (*Apis mellifera* L., *Apis cerana* D. y subespecies) presentan una microbiota propia, al igual que el resto de los productos alimenticios (Salamanca Grosso et al., 2000). Los microorganismos presentes en la miel son aquellos que resisten la alta concentración de azúcar, la acidez y otras características antimicrobianas de la misma. Entre las fuentes primarias de contaminación microbiana se incluyen el polen, el tracto digestivo de las abejas, el aire y las flores (Olaitan et al., 2007).

Normalmente, en la miel pueden encontrarse esporas bacterianas, específicamente de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* (Snowdon y Cliver, 1996) siendo más frecuentes las especies: *B. cereus*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *P. alvei*, *P. larvae* y *P. polymyxa* (Gilliam, 1979; Alippi et al., 2004; Iurlina & Fritz, 2005). También se aislaron de miel otros géneros bacterianos tales como *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Brevibacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactococcus*, *Lysinibacillus*, *Melissococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Virgibacillus* y *Xanthomonas*

(Gilliam, 1979; Snowdon & Cliver, 1996; Alippi et al., 2002; Olaitan et al., 2007). Asimismo, han sido reportados en miel diversas especies fúngicas como *Ascosphaera apis*, *Ascosphaera major*, *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Penicillium* spp. y especies de levaduras pertenecientes a los géneros *Oosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosacharomyces*, *Torulopsis*, entre otros (Snowdon & Cliver, 1996; Salamanca Grosso et al., 2000; Olaitan et al., 2007).

Dentro del género *Bacillus*, una de las especies introducidas en la miel con mayor frecuencia, es *Bacillus cereus sensu stricto* (Alippi et al., 2004; López & Alippi, 2007) que está asociada a procesos infecciosos humanos como productora de enterotoxinas. Otras especies patógenas dentro del “grupo cereus” (*Bacillus cereus sensu lato*) citadas en miel son: *B. thuringiensis*, que sintetiza inclusiones cristalinas proteicas que son tóxicas para un gran número de larvas de insectos y es el pesticida biológico más comúnmente usado en el mundo (Amadio et al., 2009) y *B. mycoides* (Alippi, 1995).

### 1.2.2 Microorganismos asociados con abejas y otras fuentes del apiario

El aparato digestivo de las abejas obreras muestra una limitada diversidad de especies bacterianas. En el buche melario se encuentran relativamente pocas especies tales como *Lactobacillus* spp. y especies de la familia Acetobacteraceae (por ejemplo, *Parasaccharibacter apium*). Tanto en el intestino medio como en el íleo hay una gran comunidad bacteriana dominada por tres especies: *Snodgrassella alvi*, *Gilliamella apicola* y *Frischella perrara*, aunque también han sido reportadas algunas especies de *Lactobacillus*. Por otra parte, en el recto dominan las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Corby-Harris et al., 2014; Moran, 2015; Powell et al., 2016).

En larvas y celdas con alimento han sido aisladas diversas especies de bacterias esporuladas Gram-positivas mesófilas, principalmente de los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus* y especies no esporuladas como *Lactobacillus*

y de la familia Acetobacteraceae, presentes también en el néctar y el polen (Gilliam, 1979; Moran, 2015).

### **1.3. Enfermedades bacterianas de la cría de las abejas**

En la miel, también pueden encontrarse bacterias causantes de enfermedades en las abejas. Las de mayor importancia económica y que afectan a las larvas de las abejas de la miel, *Apis mellifera*, son la loque americana y la loque europea. Ambas están ampliamente distribuidas y son potencialmente letales para las colonias infectadas (Forsgren, 2010).

#### **1.3.1. Loque americana**

La Loque Americana es la enfermedad infecciosa más devastadora de la colonia de abejas, causada por la bacteria esporulada Gram-positiva *Paenibacillus larvae* (OIE, 2011a). Afecta exclusivamente larvas de *Apis mellifera* y otras especies del género *Apis*.

Se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial (OIE, 2011a). Es altamente contagiosa y persistente ya que las esporas bacterianas pueden sobrevivir en el apiario (miel, cera, restos larvales, polen, propóleos) y en el ambiente por 3 a 10 años mientras que las esporas purificadas pueden sobrevivir más de 70 años (OIE, 2011a). Las larvas son más susceptibles a la infección durante sus estadios tempranos, es decir, 12-36 horas después de la eclosión del huevo (Genersch, 2010). La DL<sub>50</sub> (dosis letal media) es de  $8,49 \pm 1,49$  esporas para larvas de 24-48 horas de edad mientras que se necesitan millones de esporas para infectar larvas de más de 2 días (Hansen & Brødsgaard, 1999).

Los apicultores pueden transmitir la enfermedad entre colonias a través del transporte inadvertido de cuadros de cría conteniendo restos de larvas afectadas o alimentando colmenas con miel conteniendo esporas bacterianas o por las mismas abejas mediante pillaje entre colonias debilitadas por la enfermedad (Lindstrom et al., 2008).

Los síntomas clínicos de loque americana son muy diversos y dependen del genotipo bacteriano involucrado en el proceso infeccioso, de la etapa de la enfermedad y de la fortaleza de la colonia de abejas (OIE, 2011a). Los síntomas más característicos son un aspecto general de cría salteada en los cuadros afectados y la formación de una masa viscosa de color amarillento a castaño oscuro que se estira al levantar con un palillo los restos larvales (de Graaf et al., 2006) (Figura 1).



**Figura 1: Prueba del palillo.** Las larvas muertas se estiran y se adhieren a un palillo. Tomado de: Formato et al., 2016a.

Las larvas infectadas pueden morir rápidamente en los primeros estadios, cuando están dispuestas en la base de la celda de cría sin opercular y en este caso las abejas obreras las remueven dejando la celda vacía. Otras larvas mueren en una etapa más tardía de su desarrollo, cuando están en posición vertical ocupando la mayor parte de la celda, aunque a menudo la muerte de la larva o pupa se produce luego del operculado de las celdas de cría (OIE, 2011a). A medida que la infección progresa, los opérculos de las celdas que contienen cría muerta se tornan grasos, y de color castaño oscuro, de forma cóncava y con perforaciones irregulares (Figura 2).



**Figura 2:** Panal afectado por loque americana. Aparece oscurecido y operculado irregularmente. Tomado de: Formato et al., 2016a.

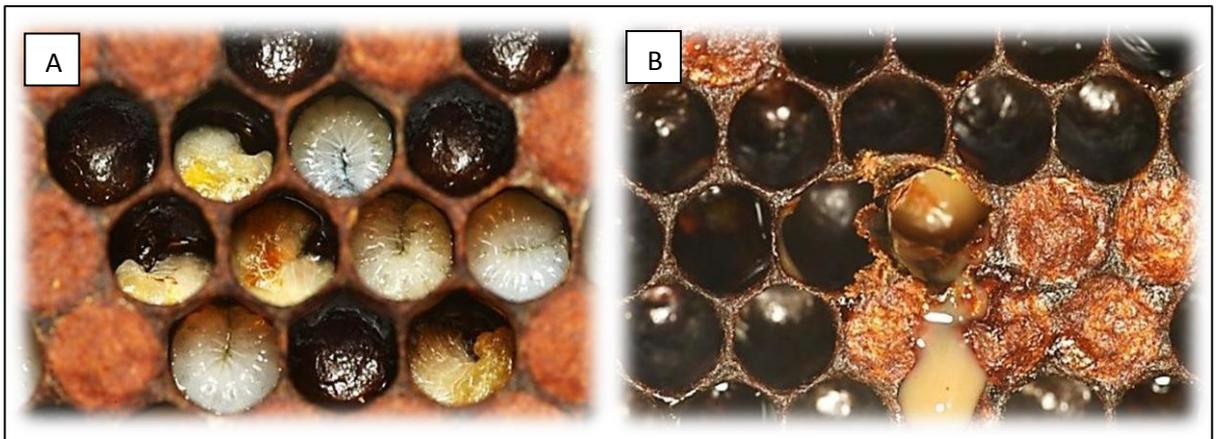
Los restos larvales se secan formando una escama plana fuertemente unida a la pared inferior de la celda de cría. Se estima que cada una de esas escamas puede contener aproximadamente  $2,5 \times 10^9$  esporas bacterianas, constituyendo así la fuente de inóculo para futuras infecciones (OIE, 2011a).

Un síntoma bien característico pero no comúnmente visto, es la descomposición del estadio de pupa en el que la glosa sobresale de la cabeza y se extiende a la parte superior de la celda de cría o en ángulo hacia atrás hacia la parte superior de la celda (OIE, 2011a).

### 1.3.2. Loque europea

La loque europea es otra enfermedad de origen bacteriano que afecta a las larvas de las abejas y está distribuida mundialmente con excepción de Nueva Zelanda (Ellis & Munn, 2005). Su agente causal es la bacteria no esporulada Gram-positiva *Melissococcus plutonius*. Está ampliamente extendida en Gran Bretaña y hay un interés específico sobre la evolución de esta enfermedad en Suiza donde su incidencia ha aumentado constantemente desde finales de los '90, a pesar de que las colonias clínicamente enfermas son erradicadas (Forsgren, 2010).

El primer paso en la infección es la colonización asintomática del intestino de las larvas cuando ingieren el alimento contaminado con células bacterianas. Las larvas son susceptibles en cualquier estadio pero las de más de 48 hs de edad son las menos afectadas por la infección (Forsgren, 2010). Normalmente la muerte de las larvas se produce después del primer o segundo día de ocurrida la infección y generalmente antes de ser operculadas (etapa de cría abierta). La larva se torna amarillenta y luego de color castaño y su sistema de tráqueas se percibe con facilidad (Figura 3). Éstas mueren, en la mayoría de los casos, contorsionadas o encorvadas a lo largo de la celda, lo que la diferencia de loque americana en la cual las larvas mueren estiradas a lo largo de la celda. Algunas larvas infectadas que logran sobrevivir, alcanzan la fase de pupa y se convierten en adultos. Estas larvas que sobreviven son capaces de defecar y sus heces infectadas contribuyen a la propagación constante de la enfermedad (Budge et al., 2010; OIE, 2011b;).



**Figura 3: Síntomas de loque europea. A:** las larvas infectadas inicialmente pierden su color blanco nacarado y se tornan opacas, luego amarillentas y finalmente marrón amarillento. **B:** las larvas afectadas se descomponen en una masa suave de color castaño que no es viscosa ni fibrosa. Tomado de: Formato et al., 2016b.

Dependiendo de la época del año, algunas especies saprobias se asocian con frecuencia con *M. plutonius*. Entre ellas se citan: *Achromobacter eurydice*, la cual es un habitante intestinal en larvas sanas, pero su número aumenta considerablemente en larvas infectadas; *Enterococcus faecalis* que desarrolla abundantemente en larvas infectadas; *Brevibacillus laterosporus* que se considera

indicador de loque europea y *Paenibacillus alvei* que no puede desarrollar en el intestino de larvas normales, pero puede establecerse en colonias crónicamente enfermas multiplicándose en los restos larvales. *P. alvei*, al formar esporas, sobrevive, germina y se multiplica más rápidamente en larvas muertas que otros saprobios, produciendo un característico olor a rancio (Forsgren, 2010; OIE, 2011b).

#### **1.4. Control de enfermedades y surgimiento de la resistencia a antibióticos**

La medida de control más efectiva contra la loque americana, y empleada en la mayoría de los países, como Reino Unido, Nueva Zelanda y muchos países de la U.E. es la quema de todo el material de las colmenas afectadas incluyendo las abejas. Sin embargo, en otros países como Argentina, EE.UU. y Canadá durante muchos años se emplearon antibióticos como la oxitetraciclina, que actuaban contra las formas vegetativas bacterianas suprimiendo de esta manera los síntomas clínicos de la colmena. Sin embargo, con este tipo de control las esporas bacterianas se acumulan y permanecen infectivas durante muchos años (Alippi et al., 2007; Genersch, 2010).

Desde la década del '60, el control de loque europea consistió en el tratamiento con antibióticos, tales como la oxitetraciclina, que inhiben la multiplicación de *M. plutonius* (Wu et al., 2014). En Inglaterra, las colonias infectadas se tratan con oxitetraciclina o con el método de enjambrado artificial (*shook swarm*), que consiste en trasvasar las abejas sobre marcos nuevos de cera fundida destruyendo los viejos. La técnica de enjambrado artificial en combinación con oxitetraciclina redujo la tasa de recurrencia de síntomas clínicos en la colonia (Waite et al., 2003). Sin embargo, se recomienda el método de enjambrado artificial sin tratamiento con oxitetraciclina porque los síntomas clínicos desaparecen por el uso del antibiótico y los apicultores pueden propagar la infección entre colonias inadvertidamente (Forsgren, 2010).

La amplia difusión de estas prácticas sanitarias incorrectas generó dos problemáticas en forma simultánea: la presencia de residuos de antibióticos en miel -situación altamente riesgosa para la salud de los consumidores- y la generación de resistencia de los agentes microbianos que se querían controlar, que a su vez propició la aplicación de dosis cada vez mayores (Grohmann et al., 2003; SENASA, 2016c).

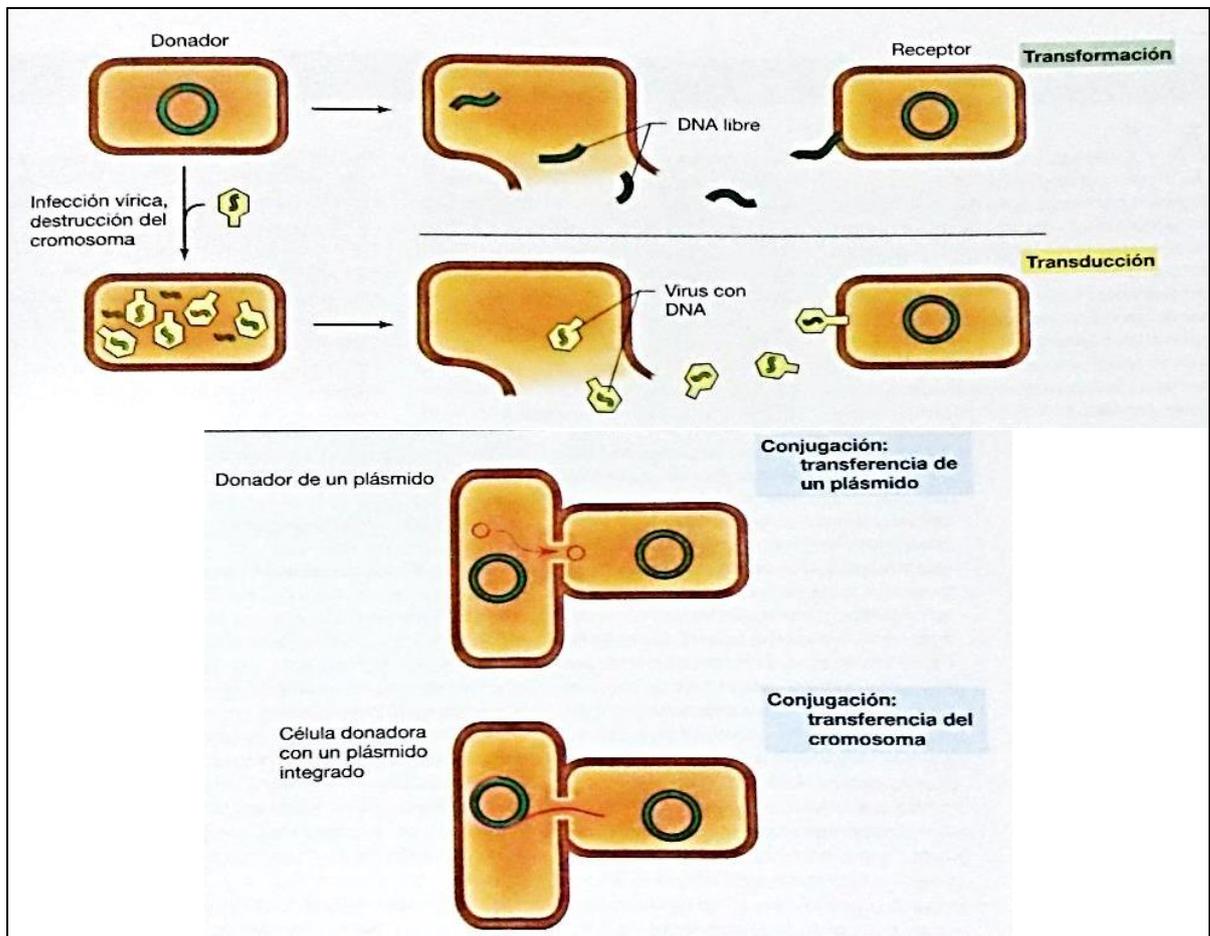
La emergencia de bacterias resistentes es consecuencia de la enorme capacidad de adaptación que presentan, desarrollando diversos mecanismos de resistencia que incluyen la modificación y la inactivación de la droga, la exclusión del antibiótico y la modificación del punto diana, impidiendo de esta manera que el mismo ejerza su mecanismo de acción. Sumado a esto, el suelo es también un reservorio natural de bacterias productoras de antibióticos que contienen mecanismos de resistencia intrínseca y genes de resistencia transferibles (Daza Pérez, 1998).

El aumento de la prevalencia de la resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas es el resultado de la evolución y la presión selectiva debido a la amplia implementación del uso de antibióticos en medicina humana, medicina veterinaria, alimentación animal y agricultura (Grohmann et al., 2003; Popowska et al., 2011). Esta adaptación ocurre no por la mutación de las poblaciones amenazadas, sino por la adquisición y diseminación, en la mayoría de los casos, de genes simples de resistencia a antibióticos mediante elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y transposones. Éstos distribuyen eficientemente los determinantes de resistencia a antibióticos, individualmente o en grupos, entre muchos géneros y especies de bacterias (de la Cruz & Davies, 2000).

### **1.5. Mecanismos de transferencia horizontal de genes en bacterias**

La transferencia horizontal de genes (THG) es el movimiento de información genética entre organismos mediante elementos genéticos móviles que conforman el “mobiloma bacteriano” (Lorenzo Díaz et al., 2012). Ocurre por tres mecanismos

genéticos bien definidos: la conjugación, la transformación y la transducción (Burmeister, 2015) (Figura 4).



**Figura 4:** Mecanismos genéticos de transferencia horizontal de genes. Transformación, transducción y conjugación. Tomado de: Madigan et al., 2004.

La transformación es el proceso por el cual ciertas bacterias, son capaces de incorporar ADN exógeno proveniente de otras bacterias, el cual está libre en el medio circundante. El mecanismo por el cual estas bacterias puede captar el ADN exógeno, conservarlo en forma estable e interactuar con él, se denomina competencia y competentes a las bacterias que lo poseen. Este fenómeno depende de la presencia de un sistema específico de captación de ADN asociado a la membrana. Aunque la mayoría de las bacterias no presentan capacidad natural para captar ADN, es posible inducir en el laboratorio la competencia, generando distorsiones en la membrana celular por distintos medios; por ejemplo con pulsos eléctricos (electroporación) o con cambios osmóticos y térmicos. Estos

procedimientos son muy usados para introducir experimentalmente ADN extraño en una bacteria por ejemplo ADN plasmídico, y así transformarla para que adquiera un fenotipo de interés. Las bacterias también pueden ser transformadas con ADN viral, en cuyo caso el proceso se denomina transfección (Betancor et al., 2006).

La transducción es la transferencia de ADN de una bacteria a otra por intermedio de un bacteriófago. Existen dos formas de transducción, la especializada y la generalizada. La primera ocurre cuando un fago temperado porta genes bacterianos adquiridos durante un ciclo infeccioso anterior y al infectar una nueva bacteria e integrar su genoma al cromosoma bacteriano, incorporará a éste la información genética correspondiente a la bacteria infectada previamente. La transducción generalizada se produce por partículas virales defectuosas que se originan como cápsides vacías durante la replicación viral y que luego incorporan ADN de una bacteria; así, al infectar una nueva bacteria podrá introducir en ella dicho material genético (Betancor et al., 2006).

La conjugación bacteriana es un proceso altamente específico mediante el cual el ADN se transfiere de las bacterias dadoras a las receptoras mediante un complejo multiproteico especializado, denominado aparato de conjugación. Un prerrequisito importante para la transferencia conjugativa es una asociación íntima entre las superficies celulares de las células dadoras y receptoras que interactúan. La translocación del ADN está mediada por dos tipos de elementos genéticos móviles: plásmidos conjugativos e integrantes de elementos conjugativos (ICE) (Goessweiner-Mohr et al., 2014). En las bacterias Gram-negativas, este contacto físico se establece mediante filamentos extracelulares complejos, denominado pili sexual. Para la mayoría de las bacterias Gram-positivas, los medios para lograr este íntimo contacto célula-célula no han sido identificados todavía (Goessweiner-Mohr et al., 2014; Grohmann et al., 2003). La mayoría de los plásmidos conjugativos aplican un sofisticado aparato de secreción multiproteica, conocido como sistema de secreción tipo IV (T4SS) para transferir

ADN a una célula aceptora. En las bacterias Gram-positivas este sistema exhibe una considerable similitud con las bacterias Gram-negativas; los primeros pasos en los que se procesa el ADN plasmídico para ser transferido con la relaxasa que se une covalentemente a su extremo 5' terminal, son prácticamente idénticos. Durante la transferencia conjugativa de ADN, las proteínas codificadas por el plásmido (en la región Mob) denominadas relaxasas interactúan con una pequeña región llamada origen de transferencia (*oriT*), para formar el complejo ADN-proteína conocido como relaxosoma (Wilkins & Lanka, 1993). La transferencia se inicia por la unión de ciertas proteínas pequeñas a la región del *oriT*, seguido de un corte sitio-específico y hebra-específica dado por una proteína con actividad *nickasa* llamada relaxasa.

Sin embargo, el proceso real de translocación de ADN, incluido el paso del contacto celular entre la célula dadora y la aceptora parece diferir considerablemente entre Gram-positivas y Gram-negativas. Esto podría deberse a las diferencias en la estructura de la envoltura celular: membrana citoplásmica seguido de una gruesa multicapa de peptidoglicano en bacterias Gram-positivas versus una configuración de dos membranas con espacio periplásmico y una capa delgada de peptidoglicano entre las dos membranas en bacterias Gram-negativas. Una vez que las bacterias se asocian, se forman los poros necesarios para la transferencia del ADN. Otro tipo de maquinaria de translocación de ADN conjugativo se asemeja a la maquinaria que promueve la segregación de ADN cromosómico durante la división y esporulación de células bacterianas y requiere una única proteína homóloga para transferir ADN de doble cadena a la célula aceptora (Goessweiner-Mohr et al., 2014).

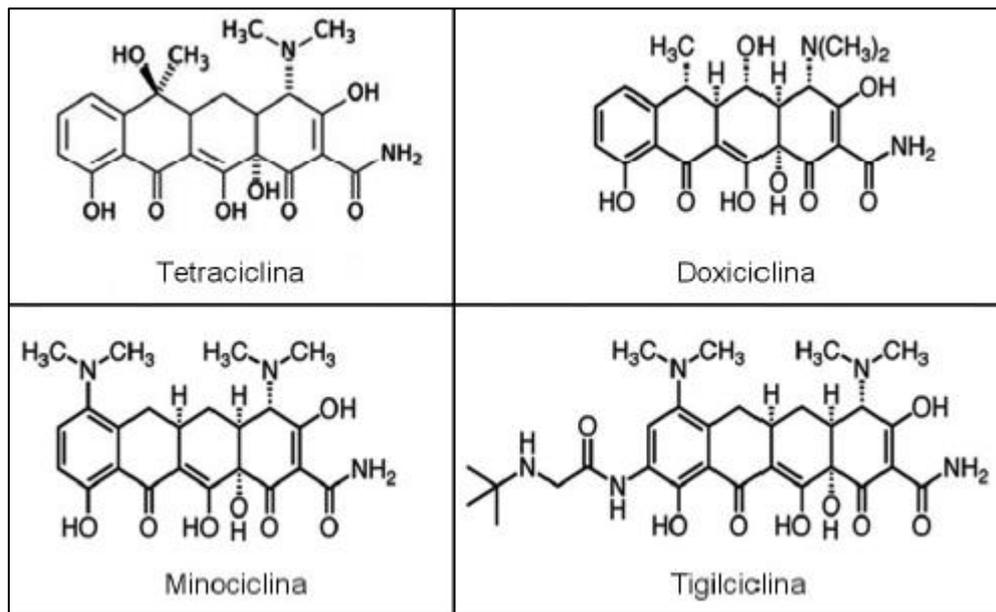
Los transposones conjugativos pueden transferirse ellos mismos desde el cromosoma de una célula dadora hacia una célula aceptora y también movilizar otros elementos genéticos. Tienen un amplio espectro de hospedadores y pueden estar implicados al igual que los plásmidos, en la transferencia de genes entre bacterias de diferentes géneros (Aleksun & Levy, 2007; Goessweiner-Mohr et al.,

2014). Generalmente, los plásmidos conjugativos solamente causan la transferencia de su propio material genético pero en ocasiones el plásmido puede integrarse al cromosoma bacteriano y en el momento de conjugarse se transferirá no solo a sí mismo, sino también a los genes cromosómicos que se encuentran próximos a él. Algunos plásmidos pequeños (plásmidos movilizables) pueden ser movilizados de una célula a otra mediante los plásmidos conjugativos, así como también ADN cromosómico (Alekhshun & Levy, 2007; Betancor et al., 2006).

La habilidad para detectar la transferencia genética es dependiente del destino del ADN transferido una vez que ingresa en la célula receptora. Muchas bacterias poseen sistemas de restricción de ADN que destruyen el ADN foráneo. Sin embargo, los bacteriófagos y los plásmidos de amplio rango de hospedantes han desarrollado mecanismos para contrarrestar estas enzimas de restricción mediante la reducción del número de sitios de corte de restricción que contienen, o mediante la producción de sistemas de protección de restricción. Incluso cuando el ADN transferido escapa a la degradación por parte de las endonucleasas de restricción, éste no necesariamente pasará a las generaciones futuras. Un plásmido debe ser capaz de replicarse y mantenerse en el nuevo hospedante. Si el gen seleccionado es transportado por un transposón, entonces éste debe integrarse con éxito en el cromosoma del hospedante o en otro replicón. Finalmente, cuando el destino del ADN ingresante depende de la recombinación homóloga, como en el caso de la transferencia conjugativa de genes cromosómicos o con la transducción o transformación generalizada, entonces éste debe ser lo suficientemente homólogo para servir como sustrato para el sistema de recombinación del hospedante. La eficacia de integración mediante la recombinación homóloga depende del grado de homología de las regiones del ADN del dador y del aceptor, y esto se controla mediante el sistema de reparación de desajustes (Davison, 1999).

### 1.6. Resistencia a tetraciclinas

Las tetraciclinas (Figura 5) son antibióticos bacteriostáticos que inhiben en forma reversible la síntesis de proteínas impidiendo la asociación del aminoacil ARNt (aminoacil ARN de transferencia) con el ribosoma bacteriano. Por lo tanto, para interactuar con su objetivo esta molécula necesita atravesar uno o más sistemas de membranas dependiendo si la bacteria sensible es Gram-positiva o Gram-negativa (Chopra & Roberts, 2001).



**Figura 5:** Estructura química de tetraciclinas. Tomado de: Jara, 2007.

El incremento de bacterias resistentes a tetraciclinas generó la necesidad de estudiar los mecanismos por los cuales los determinantes genéticos de resistencia son transferidos entre bacterias y las bases moleculares de sus mecanismos de resistencia (Chopra & Roberts, 2001). La resistencia a tetraciclina se debe generalmente a la adquisición, por parte de las bacterias comensales y patógenas, de genes *tet* (tetraciclina) y/o genes *otr* (oxitetraciclina). Usualmente estos genes están asociados con plásmidos y/o transposones y frecuentemente son conjugativos. Hasta el momento se han descrito 45 genes *tet* y *otr* diferentes, que incluyen 28 genes que codifican para proteínas de eflujo dependientes de energía las cuales expulsan las tetraciclinas fuera de la célula bacteriana (*tetA*, *tetA(P)*,

*tetB, tetC, tetD, tetE, tetG, tetH, tetJ, tetK, tetL, tetV, tetY, tetZ, tet30, tet31, tet33, tet35, tet38, tet39, tet40, tet41, tet42, tet43, tet45, tcr3, otrB, otrC*), otros 12 genes que codifican para proteínas de protección ribosómica, las cuales hacen al ribosoma insensible a la inhibición de la tetraciclina mediante la interacción con los sitios de unión de ésta (*tet, tetB(P), tetM, tetO, tetQ, tetS, tetT, tetW, tet32, tet36, tet44, otrA*), y por último, 3 genes que codifican para enzimas inhibidoras, que inactivan las tetraciclinas en presencia de oxígeno (*tetX, tet34, tet37*), y un gen con un mecanismo de resistencia desconocido (*tetU*) (Roberts, 1996; 2011; Jara, 2007; You et al., 2013).

Se han descrito 47 géneros de distintas especies de bacterias Gram-positivas con mecanismos de resistencia a tetraciclinas conocidos. Sin embargo, no se ha demostrado que todas las bacterias Gram-positivas resistentes a tetraciclina sean portadoras de genes *tet* (Roberts, 1996). Los genes *tetK, tetL, tetA, tetA(P)* que codifican para proteínas de eflujo, confieren resistencia a tetraciclina pero no a minociclina (Roberts, 1996; Rather et al., 2012). Los determinantes Tet K y Tet L se encuentran generalmente en pequeños plásmidos transmisibles, como en la especie *Paenibacillus larvae* (Murray & Aronstein, 2006; Alippi et al., 2014), que en ocasiones se integran en el cromosoma de *Bacillus subtilis* (Sakaguchi & Shishido, 1988; Ives & Bott, 1989), o en el cromosoma o plásmidos mayores de especies de *Staphylococcus* (Roberts, 1996). El gen *tetB* hallado en aislamientos de *B. cereus* (Rather et al., 2012), codifica para proteínas de eflujo y confiere resistencia a tetraciclina y minociclina (Roberts, 1996). Los genes de protección ribosómica *tetS* y *tetO* se pueden encontrar en plásmidos conjugativos o en el cromosoma donde no pueden auto-movilizarse, mientras que los genes *tetM* y *tetQ* están generalmente asociados con transposones conjugativos que codifican su propia transferencia. Se ha demostrado que estos transposones conjugativos transfieren plásmidos movilizables a otras cepas y especies e incluso ADN genómico no enlazado (Roberts, 1996; 2011).

Reportes previos de resistencia a tetraciclinas en *P. larvae* indican la existencia de cepas de *P. larvae* resistentes a tetraciclina y/u oxitetraciclina portadoras de un plásmido conteniendo el gen *tetL* (Murray & Aronstein, 2006; Alippi et al., 2007; 2014). Mientras que la resistencia a tetraciclina en especies de *Bacillus* ha sido reportada por diversos autores. Se han hallado cepas de *B. cereus* aisladas de miel y de suelo conteniendo determinantes de resistencia a tetraciclina (López et al., 2008) así como aislamientos pertenecientes a *B. cereus sensu lato* conteniendo los genes *tetL*, *tetM*, *tetA*, *tetB* o *tet45* (Agerso et al., 2002; Glenwright et al., 2017; Rather et al., 2012; Zhu et al., 2016) así como los genes *tetM* y *tetL* en una misma cepa (Agerso et al., 2002). También se han encontrado aislamientos de *Bacillus sp.* resistentes a eritromicina y tetraciclina conteniendo dos plásmidos pequeños, siendo uno de ellos portador del determinante de resistencia a tetraciclina Tet L (Phelan et al., 2011).

La existencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a tetraciclina, específicamente en *P. larvae* y especies de *Bacillus*, ha sido reportada por diversos autores. Battisti et al. (1985) demostraron la transferencia de plásmidos desde *B. thuringiensis* hacia *B. anthracis* y *B. cereus*, mediante conjugación. Por otra parte, Alippi et al. (2007) reportan la existencia de conjugación entre cepas resistentes de *P. larvae* y cepas sensibles de *B. subtilis*. Así mismo, se reportó la capacidad de transformación de cepas sensibles a tetraciclina de *P. larvae* (Alippi et al., 2014) y *B. megaterium* (Murray et al., 2007), mediante la adquisición de plásmidos conteniendo el gen *tetL*; y en cepas de *B. subtilis* mediante un plásmido conteniendo un determinante de resistencia a tetraciclina (Bernhard et al., 1978).

En base a lo expuesto y habida cuenta de los pocos antecedentes a nivel mundial, se propone estudiar la existencia de resistencia a tetraciclinas en cepas de *B. cereus* aisladas de miel, así como los mecanismos moleculares de dicha resistencia.

## 2. Hipótesis de trabajo

Existen diversos tipos de resistencia a tetraciclinas en bacterias esporuladas aerobias presentes en las colmenas de abejas que se pueden transferir en forma horizontal mediante plásmidos entre las poblaciones bacterianas que comparten el mismo nicho ecológico.

## 3. Objetivos

- Investigar la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina en las poblaciones de *Bacillus* y *Paenibacillus* comúnmente presentes en miel y otros materiales del apiario y su posible correlación con la presencia de plásmidos salvajes.
- Efectuar ensayos de conjugación entre cepas bacterianas resistentes y sensibles que comparten el mismo nicho ecológico.
- Efectuar ensayos de transferencia por electroporación de ADN plasmídico hacia cepas sensibles.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Cepas bacterianas empleadas y conservación de las mismas

Todas las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo de tesis pertenecen a la colección de la UB-CIDEFI (Unidad de Bacteriología- Centro de Investigaciones de Fitopatología) y se detallan en la tabla 1.

La colección está conservada en crioviales a -80 °C con el correspondiente medio líquido: Triptona Soja -TS- (Atlas, 1993) para *B. cereus* y otras especies del género *Bacillus*; Mueller Hinton broth-Yeast extract-Sodium pyruvate-Glucose-Dipotassium phosphate -MYPGP- (Dingman & Stahly, 1983) para *P. larvae* y

*Brevibacillus laterosporus*; Luria Bertani -LB- (Bertani, 1951) para *E. coli* y King B (King et al., 1954) para *Pseudomonas aeruginosa*; más glicerol a una concentración final de 20% v/v.

Los stocks de trabajo de las cepas de *B. cereus* y *P. larvae* se conservaron en agua mineralizada estéril a 4 °C y en tubos pico de flauta del correspondiente medio de cultivo Mueller Hinton (MH) (Mueller & Hinton, 1941) para *B. cereus* y MYPGP para las cepas de *P. larvae*.

**Tabla 1: Cepas empleadas en esta tesis.**

Especie	Cepa	Origen	Características relevantes
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778	Colección ATCC	TET <sup>S</sup> - Electrocompetente
	ATCC 11778 NAL <sup>R</sup>	Este trabajo	Mutante: NAL <sup>R</sup> TET <sup>S</sup>
	ATCC 11778 NAL <sup>R</sup> trc1	Este trabajo	Transconjugante: NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>
	ATCC 11778 NAL <sup>R</sup> trc2	Este trabajo	Transconjugante: NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>
	ATCC 11778 NAL <sup>R</sup> trc3	Este trabajo	Transconjugante: NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>
	m6c	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	cm8	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m10a	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m19	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	mv42b	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	mv48	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	mv54	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	mv78	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m85	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m97	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m143b	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m243	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m244	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m272	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m383	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
m387	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>	

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Origen</b>	<b>Características relevantes</b>
<i>Bacillus cereus</i>	m395	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
	m401	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m434	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
	m453a	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m453b	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m453c	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m453e	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m463b	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m500	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	m504	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	La Pampa	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	LP cer1	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
	<i>Bacillus licheniformis</i>	NRRL B-1001	Colección
mv55		UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
<i>Bacillus megaterium</i>	m435	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061	Colección ATCC	TET <sup>S</sup>
	m350	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup> - Electrocompetente
	m350 NAL <sup>R</sup>	Este trabajo	Mutante: NAL <sup>R</sup> TET <sup>S</sup>
	m350 NAL <sup>R</sup> trc1	Este trabajo	Transconjugante: NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>
	m350 NAL <sup>R</sup> trc2	Este trabajo	Transconjugante: NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	m334	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
	m351	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	169	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
	170	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
	171	UB-CIDEFI	TET <sup>S</sup>
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	Bethesda Research Laboratories, Inc.	TET <sup>S</sup> - Electrocompetente
<i>Paenibacillus larvae</i>	NRRL B-14154	Colección NRRL	TET <sup>S</sup> - Electrocompetente
	PL373	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup> - pPL373
	PL374	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup> - pPL374
	PL391	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	PL395	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup> - pPL373

Especie	Cepa	Origen	Características relevantes
<i>Paenibacillus larvae</i>	PL442	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
	PL443	UB-CIDEFI	TET <sup>R</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Colección ATCC	Control de calidad CIM

**Referencias:** **ATCC:** American Type Culture Collection, Rockvile, EE.UU.; **NRRL:** Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, EE.UU.; **NAL<sup>R</sup>:** ácido nalidíxico resistente; **TET<sup>R</sup>:** tetraciclina resistente; **TET<sup>S</sup>:** tetraciclina susceptible.

#### 4.2. Medios de cultivo

La composición y preparación de los medios de cultivo empleados se detallan a continuación:

##### *Agar nutritivo*

Pluripeptona	5 g
Extracto de carne	3 g
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

##### *Caldo super optimizado –Super Optimised Broth- (SOB)*

Tripteína	2 %
Extracto de levadura	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM

##### *Luria Bertani (LB)*

Extracto de levadura	10 g
Tripteína	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml
Ajustar pH a 7,0 con NaOH	

*Mossel (modificado: sin emulsión de yema de huevo)*

Peptona de carne	10 g
Extracto de carne	1 g
Manitol	10 g
NaCl	10 g
Rojo fenol	0,025 g
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml
Ajustar pH a 7,0 con NaOH	

*Mueller-Hinton (MH)*

Infusión de carne	300 g
Peptona ácida de caseína	17,5 g
Almidón	1,5 g
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

*Mueller Hinton broth, yeast extract, sodium pyruvate, glucose, dipotassium phosphate (MYPGP)*

Extracto de levadura	15 g
Caldo Mueller Hinton	10 g
Glucosa	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3 g
Piruvato de sodio	1 g
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

*Tryptona soja (TS)*

Tripteína	15 g
Peptona de soja	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

*Tryptona extracto de levadura (TY) líquido*

Tripteína	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl <sub>2</sub>	1 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave en frascos tapa a rosca a 121 °C durante 15 minutos (min).

### 4.3. Determinación de sensibilidad/resistencia antimicrobiana por dilución en agar

#### 4.3.1. Preparación de los antibióticos

Los antibióticos utilizados fueron clorhidrato de tetraciclina (Sigma®) con una potencia de 977 µg/mg, oxitetraciclina (Laboratorio Weizur) con una potencia de 920 µg/mg y clorhidrato de minociclina (Parafarm®) con una potencia de 982 µg/mg. Las soluciones madre (SM) para cada antibiótico (ATB) se prepararon en 25 ml de etanol 96°, se esterilizaron por filtración y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso. Para determinar la cantidad necesaria de antibiótico a pesar, de acuerdo con su potencia, se empleó la siguiente fórmula (Lorian, 1980):

$$\text{Peso ATB (mg)} = \frac{\text{volumen SM (ml)} \times \text{concentración SM (}\mu\text{g/ml)}}{\text{potencia ATB (}\mu\text{g/mg)}}$$

Para los antibióticos tetraciclina y oxitetraciclina la concentración de la SM fue de 5000 µg/ml, mientras que para el antibiótico minociclina fue de 1000 µg/ml.

#### 4.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Para estudiar la existencia de resistencia a tetraciclinas se utilizaron 25 cepas de *Bacillus cereus* y 3 cepas de *Paenibacillus larvae* (Tabla 1).

Se procedió a determinar la sensibilidad/resistencia a TET, OTC y MIN mediante el método de dilución en agar según los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2006a; 2006b). Para las cepas de *B. cereus*, se emplearon frascos tapa a rosca conteniendo medio de cultivo MH esterilizado, a los cuales una vez templados a 45-50 °C se le agregó, en forma estéril, alícuotas de las SM de los antibióticos TET, OTC y MIN, según la concentración final deseada, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen SM (ml)} = \frac{\text{volumen medio (ml)} \times \text{concentración final (}\mu\text{g/ml)}}{\text{concentración SM (}\mu\text{g/ml)}}$$

Se prepararon los siguientes gradientes de concentración: para TET y OTC fue de 8 - 16 - 32 - 64 - 128 y 256 µg/ml; mientras que para MIN fue de 0,0312 - 0,0625 - 0,1245 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 16 - 32 - 64 y 128 µg/ml. Como control se empleó medio MH sin agregado de ATB.

El medio se vertió en placas de Petri de 90 mm de diámetro hasta un nivel de 4 mm de profundidad y se dejó solidificar. Posteriormente, a partir de cada cultivo bacteriano en agar MH de 20 horas (hs) de crecimiento, se realizó una suspensión en 5 ml de agua destilada estéril ajustada a una concentración equivalente a un valor de 0,5 en la escala de Mc Farland y se sembraron gotas de 5 µl con una micropipeta. En una misma placa se sembraron cuatro cepas distintas más una cepa control con una CIM a TET y MIN conocida (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) (Fass & Barnishan, 1979). De la misma forma y con las mismas suspensiones se inoculó una placa control de agar MH sin antibiótico. Las placas se dejaron a temperatura ambiente dentro del banco de flujo laminar, hasta la absorción completa del líquido que acompañaba el inóculo sembrado. Las placas se incubaron a 37 °C, verificando el desarrollo bacteriano a las 24 y 48 hs. Los valores de CIM se determinaron como la menor concentración de antibiótico que inhibió completamente el desarrollo bacteriano.

Para las cepas de *P. larvae*, se empleó MYPGP como medio base, siguiendo el mismo procedimiento anteriormente detallado, pero ajustando la concentración de la suspensión bacteriana a un valor de 1 en la escala de Mc Farland (de Graaf et al., 2013). Las concentraciones de TET y OTC ensayadas fueron de 4, 8, 16, 32, 64 y 128 µg/ml, respectivamente. Las concentraciones de MIN ensayadas fueron las mismas que para *B. cereus*.

Para los tres ATB, los valores de los puntos de corte para la diferenciación de cepas resistentes y sensibles fueron: Resistente:  $\geq 16$  µg/ml; Intermedio: 8 µg/ml; Sensible:  $\leq 4$  µg/ml.

#### 4.4. Análisis del perfil plasmídico por la técnica de lisis *in situ* en geles de agarosa horizontal

Para la visualización de plásmidos mediante lisis *in situ* en geles de agarosa horizontal se empleó la metodología desarrollada por Eckhardt (1978) con modificaciones en la preparación del gel según Pedraza & Díaz Ricci (2002).

Las cepas de *B. cereus* se sembraron en 4 ml de caldo LB a una concentración final de 16 µg/ml de TET, incubándose a 32 °C durante 16 hs con agitación constante a 100 rpm. Las cepas de *P. larvae* se sembraron en caldo MYPGP líquido con la misma concentración final de TET, incubándose a 37 °C durante 48 hs con agitación constante a 100 rpm.

Luego de la incubación se transfirieron 1,5 ml del cultivo bacteriano a un microtubo y se centrifugaron a 15.500 x g durante 4 min. El pellet se resuspendió en 1 ml de sarcosyl (lauroil sarcosinato de sodio – SIGMA®) 0,3% p/v y se centrifugó a 15.500 x g durante 4 min. Posteriormente, el pellet se resuspendió cuidadosamente en 15 µl de solución de Ficoll®400 (Sigma). La mezcla se conservó en hielo hasta el momento de la siembra. Luego se agregaron 15 µl de solución de lisis conteniendo 0,01 g de lisozima (BioChemika) y RNAsa (Biodynamics) a una concentración final de 0,1 µg/µl. La mezcla se incubó a 37 °C durante 15 min al cabo de los cuales se tomaron 15 µl, se le agregó 1 µl de buffer de siembra 6X (Inbio Highway) y se sembró en un gel de agarosa al 0,7% en buffer TBE 1X y con 1% de dodecilsulfato de sodio (SDS – Carlo Erba®).

La corrida electroforética se inició a 40 V durante 10 min y luego a 100 V durante aproximadamente 2 hs. Finalizada la corrida, el gel se depositó en buffer TBE 0,5X conteniendo bromuro de etidio y se dejó teñir durante toda la noche. Los plásmidos se visualizaron bajo luz UV (UVP®) y las imágenes de los geles se digitalizaron empleando el sistema de captura digital de geles Digi Doc-it UVP.

Soluciones empleadas:

- Solución de lisis:
  - Sacarosa 8%; Ficoll 2%
  - Tris 50 mM
  - EDTA 25 mM, pH 8,5
  
- Buffer TBE 1X:
  - Tris 89 mM
  - Borato 89 mM
  - EDTA 2,5 mM, pH 8

4.5. Obtención de ADN genómico total y ADN plasmídico

*4.5.1. Extracción de ADN genómico total*

Para la obtención de ADN genómico total se empleó el método de extracción directa mediante resina de intercambio iónico (Chelex-100®, BioRad) según el protocolo de Alippi & Aguilar (1998). Se tomaron 1-2 colonias de cada cepa y se colocaron en un microtubo con 300 µl de agua bidestilada estéril. Las suspensiones se agitaron en vortex durante 1 min y se centrifugaron a 18.000 x g durante 4 min. Se descartó el sobrenadante y al pellet se le adicionaron 150 µl de resina, resuspendiendo suavemente. La suspensión se incubó a 56 °C durante 15 min, se agitó en vortex por 30 seg y se incubó nuevamente a 99 °C durante 15 min. Luego, se agitó en vortex durante 1 min y se conservó a -20 °C hasta su uso, para lo cual se precipitaron por centrifugación las células bacterianas y resina y se empleó el sobrenadante como molde para la reacción de PCR.

*4.5.2. Extracción de ADN plasmídico en B. cereus*

La extracción de ADN plasmídico de las cepas de *B. cereus* se realizó mediante la técnica de lisis alcalina detallada por Sambrook & Russell (2001) con modificaciones tomadas de un protocolo del Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (2008).

Las cepas se sembraron en 6 ml de caldo LB adicionado con TET a una concentración final de 16 µg/ml y se incubaron a 32 °C durante 24-30 hs con agitación constante a 120 rpm. Luego, 1,5 ml del cultivo se centrifugaron a 20.000 x g durante 1 min. El pellet obtenido se resuspendió en 200 µl de solución de resuspensión P1 con el agregado de 2 mg/ml de lisozima y 1 µl de RNAsa (4 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 min.

Luego, se adicionaron 200 µl de solución de lisis P2, preparada en el momento, mezclando las soluciones por inversión reiterada del tubo.

Posteriormente, se agregaron 200 µl de solución de neutralización P3 mezclando rápidamente por inversión del tubo varias veces. La mezcla se incubó en hielo durante 5 min y luego se centrifugó a 20.000 x g durante 3 min.

El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo adicionando 300 µl de cloroformo. Se agitó con vórtex y se centrifugó a 20.000 x g durante 5 min.

Posteriormente, la fase superior, cuidando de no tomar de la interfase, se transfirió a tubo con 500 µl de isopropanol. Se mezcló con vórtex y se incubó a -20 °C durante 10 min. Se centrifugó a 20.000 x g durante 15 min y el pellet obtenido se lavó con 500 µl de etanol 70% (sin efectuar resuspensión), repitiendo la centrifugación a 20.000 x g durante 1 min. Se eliminó el etanol y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante 30 min, y luego se resuspendió en 32 µl de agua bidestilada estéril.

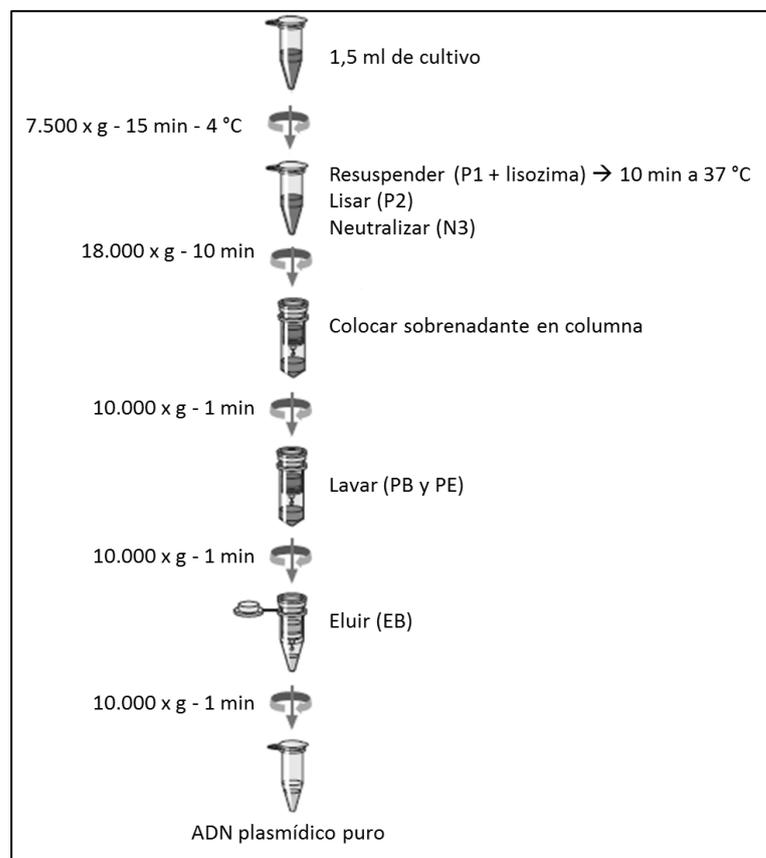
El ADN plasmídico se purificó mediante el agregado de 8 µl de NaCl 4 M y 40 µl de polietilenglicol (PEG 8000) preparado al 13% en agua bidestilada estéril e incubación en hielo durante 60 min. Luego, se centrifugó a 20.000 x g durante 30 min. El pellet se lavó con 400 µl de etanol 70% (sin efectuar resuspensión) y se centrifugó a 20.000 x g durante 1 min. El pellet se secó durante 30 min a temperatura ambiente para luego resuspenderlo en 20 µl de agua bidestilada estéril, conservándolo a -20 °C hasta su uso.

Soluciones empleadas:

- P1:
  - Glucosa 50 mM
  - Tris-Cl 25 mM, pH 8
  - EDTA 10 mM, pH 8
- P2:
  - NaOH 0,2 N (diluído fresco de stock 10 N)
  - SDS 1%
- P3:
  - Acetato de potasio 5 M
  - Ácido acético glacial

4.5.3. Extracción de ADN plasmídico en *P. larvae*

La extracción de ADN plasmídico en las cepas de *P. larvae* se realizó empleando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep kit (QIAGEN®) con las modificaciones detalladas en el esquema de la figura 6. Las cepas se sembraron en 5 ml de caldo MYPGP adicionado con TET a una concentración final de 16 µg/ml y se incubaron durante 24 hs a 37 °C con agitación constante a 120 rpm.



**Figura 6:** Extracción plasmídica por columnas. Esquema del procedimiento.

El ADN plasmídico se resuspendió en *buffer* de elución QIAGEN (Tris-Cl 10 mM, pH 8,5) conservándose a -20 °C hasta su uso.

#### 4.6. Detección por PCR de la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina

Con el objeto de determinar si la resistencia a TET, OTC y MIN es de origen plasmídico o cromosomal, se analizó la presencia de secuencias homólogas a los determinantes genéticos a TET, OTC y MIN.

Se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando como molde ADN genómico obtenido según lo detallado en la sección 4.5.1 o ADN plasmídico obtenido según lo detallado en la sección 4.5.2. y 4.5.3. Para ello, se utilizaron cebadores para la amplificación de secuencias homólogas a los determinantes de resistencia a TET, OTC y MIN citados en bacterias Gram-positivas (Chopra & Roberts, 2001; Roberts, 1996). Los cebadores utilizados y los tamaños de los productos de PCR esperados se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2: Determinantes de resistencia a tetraciclina utilizados.** Secuencia de los cebadores y tamaño del producto de PCR esperado para cada uno.

Cebador	Gen	Secuencia 5' → 3'	Tamaño del producto de PCR
<sup>1</sup> TetK-F TetK-R	<i>TetK</i>	TTAGGTGAAGGGTTAGGTC GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	718 pb
<sup>1</sup> TetL-F TetL-R	<i>TetL</i>	GTTGCGCGCTATATTCCAAA TTAAGCAAACCTCATTCCAGC	788 pb
<sup>2</sup> TetM-F TetM-R	<i>TetM</i>	AGTGGAGCGATTACAGAA CATATGTCCTGGCGTGTCTA	158 pb
<sup>3</sup> TetO-F TetO-R	<i>TetO</i>	AACTTAGGCATTCTGGCTCACTCC CACTGTTCCATATCGTCA	515 pb
<sup>3</sup> TetQ-F TetQ-R	<i>TetQ</i>	TTATACTTCCTCCGGCATCG ATCGGTTTCGAGAATGTCCAC	904 pb
<sup>3</sup> TetS-F TetS-R	<i>TetS</i>	CATAGACAAGCCGTTGACC ATGTTTTTGAACGCCAGAG	667 pb
<sup>3</sup> TetA-F TetA-R	<i>TetA(P)</i>	CTTGGATTGCGGAAGAAGAG ATATGCCCATTTAACCACGC	676 pb
<sup>4</sup> OtrA-F OtrA-R	<i>OtrA</i>	GAACACGTACTIONGACCGAGAAG CAGAAAGTAGTTGTGCGTCCG	778 pb

**Referencias:** <sup>1</sup>You et al., 2012; <sup>2</sup>Strommenger et al., 2003; <sup>3</sup>Ng et al., 2001; <sup>4</sup>Nikolakopoulou et al., 2005

Las mezclas de reacción para cada cebador y las condiciones de ciclado se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3: Mezclas de reacción y condiciones de ciclado para cada cebador utilizado.**

Cebador	Gen	Mezcla de reacción	Condiciones de ciclado
TetK-F TetK-R	<i>TetK</i>	dNTPs 0,2 mM (c/u); MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM; cebador 0,48 μM (c/u); H <sub>2</sub> O 15,8 μl; buffer 1X; Taq polimerasa 1U; molde ADN 2,5 μl; vol final 30 μl	Desnaturalización a 94°C 5 min, 35 ciclos de (94°C 45 seg, 56°C 1 min, 72°C 1 min), 1 ciclo de 72°C 10 min
TetL-F TetL-R	<i>TetL</i>	dNTPs 0,2 mM (c/u); MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM; cebador 0,48 μM (c/u); H <sub>2</sub> O 15,8 μl; buffer 1X; Taq polimerasa 1U; molde ADN 2,5 μl; vol final 30 μl	Desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de (94°C 45 seg, 52°C 1 min, 72°C 1 min), 1 ciclo de 72°C 10 min
TetM-F TetM-R	<i>TetM</i>	dNTPs 0,2 mM (c/u); MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM; cebador 200 nM (c/u); H <sub>2</sub> O 15,8 μl; buffer 1X; Taq polimerasa 1U; molde ADN 3 μl; vol final 25 μl	Desnaturalización a 94°C 3 min, 30 ciclos de (94°C 30 seg, 55°C 30 seg, 72°C 30 seg), 1 ciclo de 72° 4 min
TetO-F TetO-R	<i>TetO</i>	dNTPs 0,37 mM (c/u); MgCl <sub>2</sub> 1,5 mM; cebador 1,25 μM (c/u); H <sub>2</sub> O 25 μl; buffer 1X; Taq polimerasa 1U; molde ADN 3 μl; vol final 50 μl	Desnaturalización a 94°C 5 min, 35 ciclos de (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1,5 min), 1 ciclo de 72°C 5 min
TetQ-F TetQ-R	<i>TetQ</i>	dNTPs 0,37 mM (c/u); MgCl <sub>2</sub> 2 mM; cebador 1,25 μM (c/u); H <sub>2</sub> O 25 μl; buffer 1X; Taq polimerasa 1U; molde ADN 3 μl; vol final 50 μl	Desnaturalización a 94°C 5 min, 35 ciclos de (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1,5 min), 1 ciclo de 72°C 5 min
TetS-F TetS-R	<i>TetS</i>	dNTPs 0,37 mM (c/u); MgCl <sub>2</sub> 2 mM; cebador 0,5 μM (c/u); H <sub>2</sub> O 28,75 μl; buffer 1X; Taq polimerasa 1U; molde ADN 3 μl; vol final 50 μl	Desnaturalización a 94°C 5 min, 35 ciclos de (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1,5 min), 1 ciclo de 72°C 5 min
TetA-F TetA-R	<i>TetA</i> ( P)	dNTPs 0,37 mM (c/u); MgCl <sub>2</sub> 2 mM; cebador 1 μM (c/u); H <sub>2</sub> O 26,25 μl; buffer 1X; Taq polimerasa 1U; molde ADN 3 μl; vol final 50 μl	Desnaturalización a 94°C 5 min, 35 ciclos de (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1,5 min), 1 ciclo de 72°C 5 min
OtrA-F OtrA-R	<i>OtrA</i>	dNTPs 200 μM (c/u); MgCl <sub>2</sub> 2,5 mM; cebador 100 nM (c/u); H <sub>2</sub> O 5,3 μl; buffer 1X; Taq polimerasa 1U; molde ADN 2 μl; vol final 10 μl	Desnaturalización a 94°C 4 min, 35 ciclos de (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min), 72°C 10 min

Los productos de PCR se observaron luego de una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X, adicionado con 0,5 μl de bromuro de etidio. Para esto, 5 μl del producto de amplificación previamente mezclado con 1 μl de buffer de siembra 6X (InbioHighway) se depositaron en cada calle. La corrida se realizó a 40 V durante 15 min y luego a 80 V durante 60 min. Los geles de

electroforesis fueron visualizados mediante un transiluminador UV (UVP®) y las imágenes digitalizadas empleando el sistema de captura digital de geles Digi Doc-it UVP.

#### 4.7. Digestión del ADN plasmídico mediante enzimas de restricción

Con el fin de determinar el tamaño aproximado de los plásmidos obtenidos en la sección 4.5.2 y 4.5.3, se realizaron digestiones con enzimas de restricción.

Para las cepas de *P. larvae*, se empleó la enzima *Bgl*III (Promega) porque presenta un único sitio de restricción observado en los plásmidos de las cepas de *P. larvae* PL373, PL374 y PL395, utilizadas como controles positivos (Alippi et al., 2014).

La mezcla de digestión fue la siguiente:

Agua bidestilada	15,8 µl
<i>Buffer</i> de la enzima 10X	2 µl
Albúmina de suero bovino (BSA) 10 µg/µl	0,2 µl
ADN plasmídico	1 µl
Enzima de restricción ( <i>Bgl</i> III)	1 µl

La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min.

En el caso de las cepas de *B. cereus*: m6c, cm8, m383, m401, m463b y m500, la extracción plasmídica se realizó con el kit comercial QIAprep Spin Miniprep kit como se detalló en la sección 4.5.3, pero a partir de un cultivo líquido de 24-30 hs. Las digestiones se efectuaron con la enzima de restricción *Cfo*I (Promega), dado que presenta dos sitios de restricción, muy próximos entre sí, a lo largo de la secuencia que amplifica el determinante de resistencia a tetraciclina *tetL*. Como controles positivos se utilizaron las cepas de *P. larvae* PL373, PL374 y PL395 (Alippi et al., 2014).

La mezcla de digestión fue la siguiente:

Agua bidestilada	11,8 $\mu$ l
<i>Buffer</i> de la enzima 10X	2 $\mu$ l
BSA 10 $\mu$ g/ $\mu$ l	0,2 $\mu$ l
ADN plasmídico	5 $\mu$ l
Enzima de restricción ( <i>Cfo</i> I)	1 $\mu$ l

La mezcla se incubó a 37 °C durante 10 min.

Para la visualización de las bandas obtenidas, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X, conteniendo 0,5  $\mu$ l de bromuro de etidio. En cada calle se colocaron 20  $\mu$ l de cada digestión previamente mezclados con 1  $\mu$ l de buffer de siembra 6X (Inbio Highway). Como controles, se sembraron, 1  $\mu$ l para *P. larvae* y 5  $\mu$ l para *B. cereus*, de las extracciones plasmídicas sin digerir. La corrida se realizó a 40 V durante 15 min y luego a 80 V durante 60 min. Los geles se visualizaron mediante un transiluminador UV y las imágenes se digitalizaron empleando el sistema de captura digital de geles Digi Doc-it UVP.

#### 4.8. Tratamientos para el curado de plásmidos

Con el objeto de eliminar los plásmidos durante el proceso de replicación bacteriana en las cepas resistentes de *B. cereus*, se probaron tres metodologías de curado diferentes:

##### *4.8.1. Por calor*

Este tratamiento se realizó en las 25 cepas de *B. cereus* resistentes estudiadas. Cada cepa bacteriana se sembró en placas con agar nutritivo (AN) sin el agregado de ATB, incubando a la temperatura máxima de crecimiento para la especie (45 °C). Se efectuaron repiques de las colonias desarrolladas a una nueva placa de AN. Este procedimiento se repitió 10 veces cada 24 hs. Posteriormente la sensibilidad/resistencia de las cepas se testeó mediante el repique de colonias

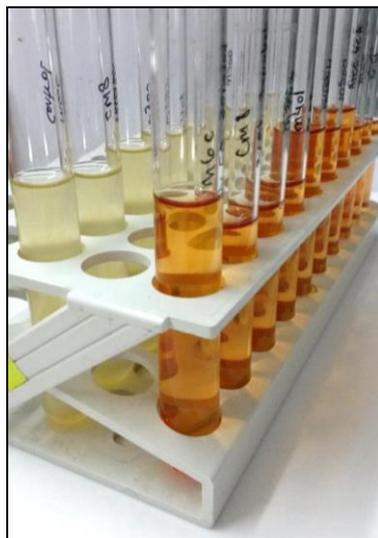
individuales en placas con MH adicionado con TET a concentraciones finales de 4, 8 y 16  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.8.2. Mediante tratamiento químico

La prueba de curado mediante tratamiento químico se realizó con SDS y bromuro de etidio (BrEt), empleando 6 cepas de *B. cereus*: m6c, cm8, m383, m401, m463b y m500.

Con SDS se probaron dos concentraciones: 0,001% y 0,002% (Bernhard et al., 1978). A partir de una SM al 2% p/v en agua destilada estéril, se agregaron 5 ó 10  $\mu\text{l}$  de la misma por tubo conteniendo 10 ml de medio, para lograr las concentraciones finales de 0,001% y 0,0002%, respectivamente.

Con BrEt se probaron tres concentraciones: 0,02  $\mu\text{g/ml}$ , 0,04  $\mu\text{g/ml}$  (Bernhard et al., 1978) y 30  $\mu\text{g/ml}$  (Kobayashi-Saegusa et al., 1987). A partir de una solución de 100  $\mu\text{g/ml}$  obtenida mediante dilución de una SM de 10 mg/ml (Inbio Highway), se agregaron 2 ó 4  $\mu\text{l}$  de la misma por tubo conteniendo 10 ml de medio para lograr las concentraciones finales de 0,02  $\mu\text{g/ml}$  y 0,04  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente. Para lograr una concentración final de 30  $\mu\text{g/ml}$  a partir de la SM de 10 mg/ml, se agregaron 30  $\mu\text{l}$  de la misma por tubo (Figura 7).



**Figura 7: Tratamiento de curado con BrEt.** Tubos con caldo LB sin el agregado de BrEt (tubos color amarillento) y con el agregado de 30  $\mu\text{g/ml}$  de BrEt (tubos color rojizo).

La siembra se realizó agregando 1 ml de suspensión bacteriana ajustada a un valor de concentración de 0,5 en la escala de Mc Farland en 9 ml de caldo LB. Los controles de cada cepa se sembraron en caldo LB sin el agregado del reactivo de curado.

Luego de una incubación a 32 °C durante 20 hs con agitación constante a 120 rpm, tanto las cepas tratadas con el reactivo de curado como los controles, se sembraron en placas con LB adicionado con TET a concentraciones finales de 4, 8 y 16 µg/ml y en placas con LB sin TET. Todas las placas sembradas se incubaron a 32 °C observando desarrollo bacteriano durante 24-48 hs.

Por otro lado, para obtener colonias individuales e identificar las posibles curadas, luego del tratamiento con 30 µg/ml de BrEt, se sembraron alícuotas de 5 y 20 µl de cada dilución en placas con LB sin TET y se dispersó la suspensión con bolitas de vidrio estériles. Luego de 24 hs de incubación a 32 °C, se seleccionaron e identificaron colonias individuales de cada cepa y se transfirieron a placas con LB adicionado con TET a concentraciones finales de 4, 8 y 16 µg/ml de. La incubación se realizó a 32 °C durante 24 y 48 hs evaluando el desarrollo bacteriano para identificar a las posibles colonias curadas.

#### 4.9. Conjugaciones bacterianas

Para realizar los ensayos de conjugación se seleccionaron las cepas de *B. cereus* m401 y m383 como dadoras, a partir de los resultados obtenidos en la determinación de la CIM, la lisis *in situ* y la amplificación de los determinantes de resistencia a TET, OTC y MIN (secciones 4.4, 4.5 y 4.7). Por otro lado, para elegir las futuras cepas aceptoras, se determinó la sensibilidad/resistencia a TET, OTC y MIN, como se explicó en la sección 4.3.2, de 13 cepas de la colección de la UB-CIDEFI: 4 cepas de *B. cereus*: m434, m395, LP cer1, ATCC 11778, 2 cepas de *Brevibacillus laterosporus*: 169, 170 y 171, 2 cepas de *B. licheniformis*: mv55 y NRRL B-1001, 1 cepa de *B. megaterium*: m435, 2 cepas de *B. pumilus*: m350 y ATCC 7061 y 2 cepas de *B. subtilis*: m334 y m351. Finalmente se eligieron como

ceptoras las cepas de *B. cereus* ATCC 11778 y *B. pumilus* m350 por presentar los menores valores de CIM.

#### 4.9.1. Obtención de mutantes resistentes a ácido nalidíxico

Para facilitar la selección de transconjugantes luego de la conjugación, se obtuvieron mutantes de las cepasceptoras *B. cereus* ATCC 11778 y *B. pumilus* m350 (TET<sup>S</sup>) que fueran resistentes a un segundo antibiótico (ácido nalidíxico) y al cual las cepas dadoras (TET<sup>R</sup>) fueran sensibles.

Se preparó una SM de ácido nalidíxico (NAL) a una concentración de 2.500 µg/ml, diluyendo 0,1 g de ATB en 2 ml de NaOH 1 N y llevando a un volumen final de 40 ml en *buffer* fosfato de sodio 0,01 M (pH 7,2).

Para la obtención de mutantes resistentes a NAL se empleó la técnica de gradiente en placa descrita por Szybalski & Brison (1952), con las siguientes modificaciones: en una placa inclinada se colocó medio MH sin ATB. Una vez solidificado, la placa se colocó en superficie plana y se agregó nuevo medio MH adicionado con NAL a una concentración final de 32 µg/ml. Los extremos de la placa se marcaron para identificar la zona de máxima concentración de ATB dejando en reposo a temperatura ambiente durante 24 hs para estabilizar el gradiente de ATB.

A partir de un cultivo de 24 hs de cada cepa aceptora, se preparó una suspensión bacteriana ajustada a una concentración equivalente a un valor de 5 en la escala de Mc Farland. En cada placa se depositaron 100 µl de suspensión distribuyendo el líquido por toda la superficie utilizando un hisopo de algodón estéril. Luego de la incubación a 37 °C durante 48 hs, las colonias desarrolladas en la zona de mayor concentración de NAL se re-estriaron en placas con medio MH con concentraciones finales de NAL de 16, 32 y 64 µg/ml para determinar el nivel de resistencia obtenido.

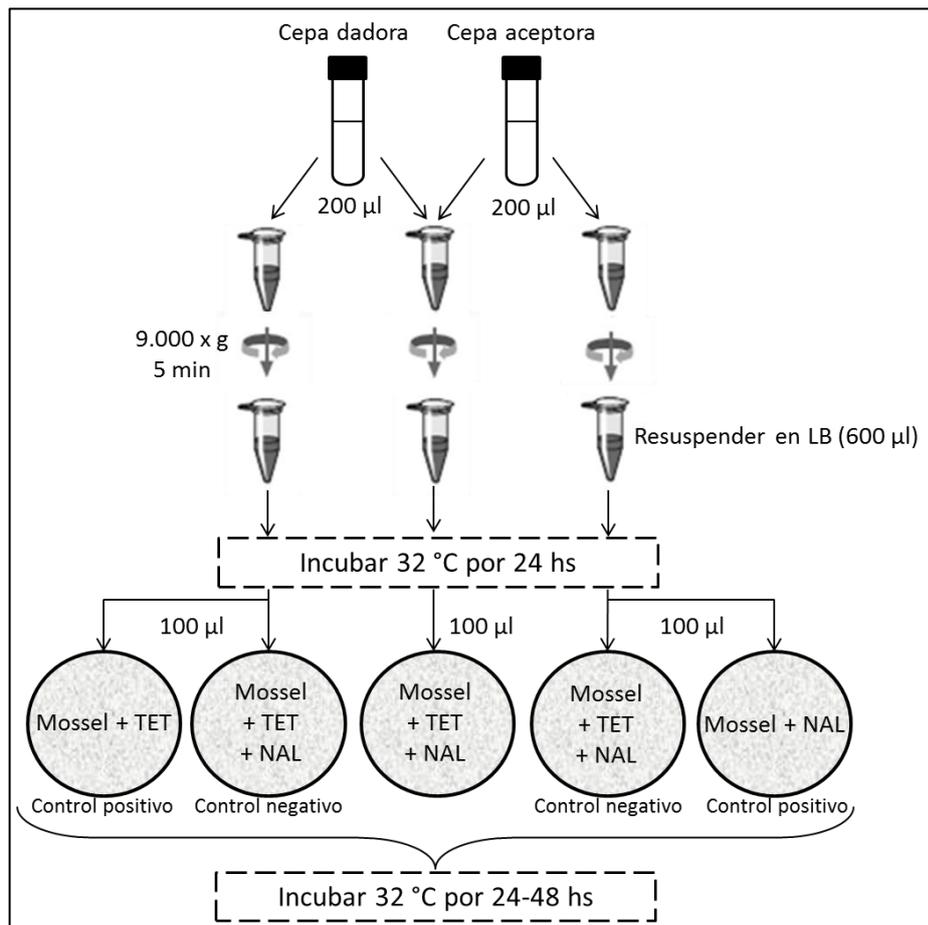
#### 4.9.2. Conjugaciones en medio líquido

Se realizaron las siguientes mezclas de conjugación:

- *B. cereus* m401 + *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup>
- *B. cereus* m401 + *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup>
- *B. cereus* m383 + *B. cereus* ATCC11778 NAL<sup>R</sup>
- *B. cereus* m383 + *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup>

Las cepas dadoras (TET<sup>R</sup> NAL<sup>S</sup>) yceptoras (TET<sup>S</sup> NAL<sup>R</sup>) se sembraron en tubos conteniendo 6 ml de LB y se incubaron a 32 °C durante 16-20 hs con agitación constante a 130 rpm, de manera de alcanzar una concentración bacteriana del orden de 10<sup>8</sup> cel/ml (DO<sub>620nm</sub>= 0,1). En los casos en que la DO superó ese valor, se realizaron diluciones del cultivo.

El procedimiento para realizar las mezclas de conjugación se detallan en la figura 8.



**Figura 8:** Esquema del procedimiento para las conjugaciones.

Las concentraciones finales de ATB en medio Mossel fueron de 8 µg/ml para TET y de 16 µg/ml para NAL.

Se empleó medio Mossel conteniendo TET y NAL para seleccionar a los transconjugantes porque contiene rojo fenol en su composición, lo que permitió diferenciar a las especies desarrolladas en base a la variación del color del medio (Mossel et al., 1967).

Para poder contar las unidades formadoras de colonias de la cepa dadora al momento de la conjugación se efectuaron diluciones del orden de  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-6}$ , a partir de un cultivo de 16 hs, ajustado a una  $DO_{620nm} = 0,1$ , y se sembraron 100 µl de cada una en placas con LB sin ATB incubándose a 32 °C durante 24 hs.

Para calcular la frecuencia de conjugación (FC), se empleó la siguiente fórmula:

$$FC = \frac{\textit{unidades formadoras de colonias (UFC) TET}^R \textit{ transconjugantes}}{\textit{UFC de la cepa dadora al momento de la conjugación}}$$

De cada uno de los transconjugantes seleccionados de cada combinación cepa aceptora/cepa dadora, se determinaron los valores de CIM como se explicó en 4.3.2. Luego, se realizaron extracciones de ADN plasmídico como se detalló en la sección 4.5.1 para posteriormente realizar la amplificación por PCR de los determinantes de resistencia a TET como se detalló en la sección 4.6 y las correspondientes digestiones con enzimas de restricción como se detalló en la sección 4.7. Los transconjugantes también fueron sometidos a tratamientos de curado con calor, SDS y BrEt como se detalló en la sección 4.8.

#### 4.10. Transformaciones por electroporación

##### *4.10.1. Preparación de electrocompetentes*

Se prepararon células electrocompetentes de las cepasceptoras *B. cereus* ATCC 11778, *B. pumilus* m350, *P. larvae* NRRL B-14154 y *E. coli* DH5 $\alpha$ .

En el caso *B. cereus* ATCC 11778 y *B. pumilus* m350, se emplearon cultivos de 24 hs desarrollados en agar LB a partir de los cuales se inocularon tubos con 6 ml de caldo LB incubando a 32 °C durante 18 hs con agitación constante a 130 rpm. Se transfirieron 10  $\mu$ l del cultivo a tubos con medio de cultivo fresco y se incubaron a 32 °C durante 7 hs hasta alcanzar un valor de  $DO_{620nm} = 0,3$ .

En el caso de la cepa *P. larvae* NRRL B-14154, se empleó un cultivo de 24 hs en agar MYPGP a partir del cual se inocularon tubos con 6 ml de caldo MYPGP incubando a 37 °C durante 18 hs con agitación constante a 130 rpm hasta alcanzar un valor de  $DO_{620} = 0,8$ .

Posteriormente, los cultivos se enfriaron en agua con hielo durante 15 min y se centrifugaron a 5.000 x g durante 20 min a 4 °C. Las células obtenidas se lavaron tres veces con solución de electroporación (SE) fría (sacarosa 0,625 M en agua destilada estéril), primero con 6 ml, luego con 3 ml y por último con 1,5 ml, centrifugando entre cada lavado a 5.000 x g durante 15 min a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en SE fría, utilizando 1 ml para las cepas de *B. cereus* y *B. pumilus* y 0,5 ml para *P. larvae*. Las células electrocompetentes se conservaron en alícuotas de 40  $\mu$ l en freezer a -80 °C hasta el momento de usar.

En el caso de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , las células electrocompetentes se prepararon siguiendo el protocolo provisto en el manual de instrucciones del electroporador utilizado -EC100 Electroporator- (E-C Apparatus Corporation), con las siguientes modificaciones. A partir de un cultivo de 24 hs en agar LB, se inoculó un tubo conteniendo 6 ml de caldo súper optimizado -Super Optimised Broth- (SOB) incubando a 37 °C durante 18 hs con agitación constante a 130 rpm. Luego de la incubación, el cultivo se enfrió en agua con hielo durante 15 min y se

centrifugó a 2.500 x g durante 15 min a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 6 ml de agua destilada estéril helada, centrifugando entre cada lavado a 2.500 x g durante 15 min a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con glicerol frío preparado al 10% (v/v), primero empleando 3 ml y luego 1,5 ml y centrifugando entre cada lavado a 2.500 x g durante 15 min a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en 0,5 ml de glicerol frío al 10% (v/v) conservándolas en alícuotas de 40 µl en freezer a -80 °C hasta el momento de usar.

#### 4.10.2. Procedimiento de electroporación

Se utilizó el ADN plasmídico de las cepas resistentes de *B. cereus* m6c, cm8, m383, m401, m463b y m500, previamente obtenido como se detalla en la sección 4.5.2.

Se siguió el protocolo de Murray y Aronstein (2008) con las siguientes modificaciones: las suspensiones de células electrocompetentes de las cepasceptoras se retiraron del freezer y se colocaron a 4 °C hasta su descongelamiento. A cada una de ellas se le adicionaron 2 µl de ADN plasmídico, resuspendido en *buffer* de elución y se incubaron en hielo durante 15 min mezclando con el dedo suavemente cada 5 min. La mezcla se colocó en una cubeta previamente enfriada y se realizó un pulso eléctrico en el electroporador a una intensidad de 2.800 V. Inmediatamente se añadió 1 ml de caldo -LB (en el caso de las cepasceptoras de *B. cereus*, *B. pumilus* y *E. coli*) o caldo MYPGP (en el caso de la cepa aceptora de *P. larvae*)- dispersando las células delicadamente con la micropipeta. La mezcla de transformación se incubó a 32 °C para *B. cereus* y *B. pumilus* y a 37 °C en el caso de *P. larvae* y *E. coli*. Se mantuvieron en agitación constante a 130 rpm, durante 90 min para *B. cereus*, *B. pumilus* y *E. coli* o 16 hs para *P. larvae*. Se realizaron controles negativos de cada aceptor, con el mismo tratamiento que las mezclas experimentales, excepto que no se les agregó suspensión de ADN plasmídico. Luego de la incubación, se sembraron 100 µl de cada una de las mezclas en placas con medio -LB para *B. cereus*, *B. pumilus* y *E. coli* y MYPGP para *P. larvae*-

adicionadas con TET a una concentración final de 4 µg/ml. La incubación se efectuó a la temperatura óptima de cada especie durante 24 y 48 hs, lo mismo que los controles negativos.

Para el recuento de células viables, se realizaron diluciones de las mezclas y posterior siembra de 100 µl en placas con LB o MYPGP sin el agregado de ATB.

Para calcular la eficiencia de transformación (ET), se empleó la siguiente fórmula:

$$ET = \frac{\textit{unidades formadoras de colonias (UFC) transformantes}}{\mu\textit{g de ADN incorporado}}$$

Para calcular la frecuencia de transformación (FT%), se empleó la siguiente fórmula:

$$FT\% = \frac{\textit{UFC transformantes}}{\textit{N}^{\circ} \textit{ de células viables totales}} \times 100$$

#### 4.11. Secuenciación del genoma bacteriano de *B. cereus* m401

Para confirmar la presencia del gen de resistencia a tetraciclina *tetL* en el ADN plasmídico de la cepa *B. cereus* m401, se realizó la secuenciación del ADN genómico total.

El ADN genómico total de la cepa se obtuvo mediante la extracción con el kit comercial Wizard Purification Systems (PROMEGA®) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente la suspensión obtenida se purificó empleando fenol/cloroformo y posterior precipitación con etanol. El pellet final se resuspendió en *buffer* de elución QIAGEN (Tris-Cl 10 mM, pH 8,5) (Pacific Biosciences, 2012). La concentración y la calidad del ADN fue determinada mediante un espectrofotómetro UV-VIS Nanodrop 2000 (Thermo Scientific®) y por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

La muestra fue secuenciada utilizando el servicio de secuenciación de Macrogen Co. (Seul, Corea del Sur). Se solicitó la preparación de una biblioteca genómica con un tamaño de inserto de 300 pb a partir de 1 µg de ADN

fragmentado utilizando el kit TruSeq (Illumina Inc.). El genoma fue ensamblado utilizando una estrategia combinada de ensamblaje *de novo* y ensamblaje guiado por referencia utilizando la herramienta Geneious Mapper implementada en el software Geneious 9.1.2 (Kearse et al., 2012). Como referencia se utilizó el genoma de la cepa tipo de *B. cereus* ATCC 14579 (Biosample SAMN02603340; Bioproject PRJNA57975; Número de acceso NC\_004722; Ivanova et al., 2003). Posteriormente, se realizaron las anotaciones estructurales, utilizando el *plug-in* Glimmer3 (Delcher et al., 2007) de Geneious 9.1.2, y funcionales del genoma, utilizando el software Blast2GO Basic (Conesa et al., 2005). Luego, se analizaron las secuencias obtenidas que correspondieran a ADN plasmídico y la presencia de genes de resistencia a tetraciclina dentro de las mismas.

## 5. Resultados y discusión

### Determinación de sensibilidad/resistencia antimicrobiana por dilución en agar

Para determinar el nivel de resistencia a TET, OTC y MIN se obtuvieron los valores de las CIM de cada ATB para cada una de las cepas estudiadas, los que se detallan en la tabla 4.

**Tabla 4: Valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) de TET, OTC y MIN de las cepas estudiadas.**

Especie	Cepa	CIM TET ( $\mu\text{g/ml}$ )	CIM OTC ( $\mu\text{g/ml}$ )	CIM MIN ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>P. aeruginosa</i>	ATCC 27853	64	16	32
<i>B. cereus</i>	m6c	16	32	4
	cm8	16	128	4
	m10a	128	128	2
	m19	32	32	2
	mv42b	8	16	16
	mv48	16	8	8
	mv54	32	64	8
	mv78	8	8	0,5
	m85	256	8	2
	m97	16	32	0,5
	m143b	64	128	0,5
	m243	64	64	0,5
	m244	256	8	2
	m272	16	64	2
	m383	16	16	32
	m387	16	16	8
	m401	64	8	4
	m453a	8	8	1
	m453b	16	2	16
	m453c	16	16	2
	m453e	8	8	2
	m463b	128	128	2
	m500	64	8	2
m504	128	128	4	
La Pampa	32	128	2	
<i>P. larvae</i>	PL391	8	8	0,03125
	PL442	32	64	0,03125
	PL443	32	8	0,03125

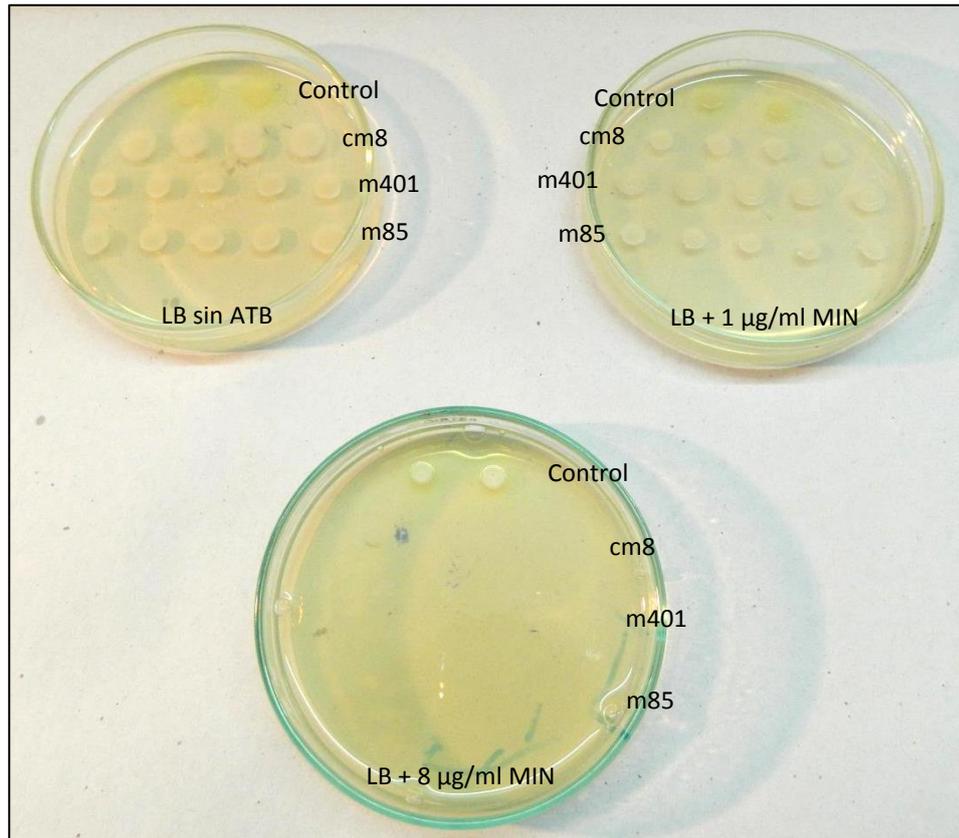
**Referencias:** **sombreado rosado:** valores de CIM que pertenecen a la categoría resistente (CIM  $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ ); **sombreado amarillo:** valores de CIM que pertenecen a la categoría intermedia (CIM =  $8 \mu\text{g/ml}$ ); **sombreado verde:** valores de CIM que pertenecen a la categoría sensible (CIM  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ ).

Los valores de CIM de la cepa control *P. aeruginosa* ATCC 27853 estuvieron dentro de los parámetros esperados, coincidiendo con los intervalos de CIM a TET de 32-64  $\mu\text{g/ml}$  y a MIN de 16-64  $\mu\text{g/ml}$ , obtenidos por Fass & Barnishan (1979).

Del total de cepas estudiadas de *B. cereus* (n=25), 21 (84%) resultaron resistentes a TET, 4 (16%) dieron valores intermedios y ninguna resultó sensible. Para OTC, 18 cepas (68%) resultaron resistentes, 7 (28%) resultaron intermedias y sólo 1 (4%) resultó sensible. Para MIN en cambio, sólo 3 cepas (12%) resultaron resistentes, 3 (12%) resultaron intermedias y 16 fueron sensibles (64%) (Figura 9).

La presencia de cepas de *B. cereus sensu lato* con resistencia a TET, OTC y MIN fue reportada por diversos autores. Agerso et al. (2002), obtuvieron un 79% (n=88) de aislamientos de *B. cereus sensu lato* resistentes a TET provenientes de suelo y estiércol, mientras que López et al. (2008) obtuvieron un 39% (n=77) de aislamientos de *B. cereus* aislados de miel resistentes a TET, OTC y MIN. Rather et al. (2012) reportan la existencia de un 33% (n=118) de cepas de *B. cereus* aisladas de alimentos con resistencia a TET.

Con respecto a las cepas de *P. larvae* estudiadas, la cepa PL391 fue intermedia a TET y OTC, la PL442 fue resistente a TET y OTC y la PL443 fue resistente a TET e intermedia a OTC. Mientras que para MIN, las 3 cepas fueron sensibles. Alippi et al. (2007), encuentran cepas de *P. larvae*, aisladas de miel, con resistencia a TET con una frecuencia del 5%, de las cuales ninguna era de origen argentino, mientras que otros autores (Evans, 2003; Murray & Aronstein, 2006) encuentran un 30% y 58%, respectivamente, de cepas de *P. larvae* aisladas de colmenas de abejas y materiales de apiario provenientes de EE.UU. con resistencia a OTC.

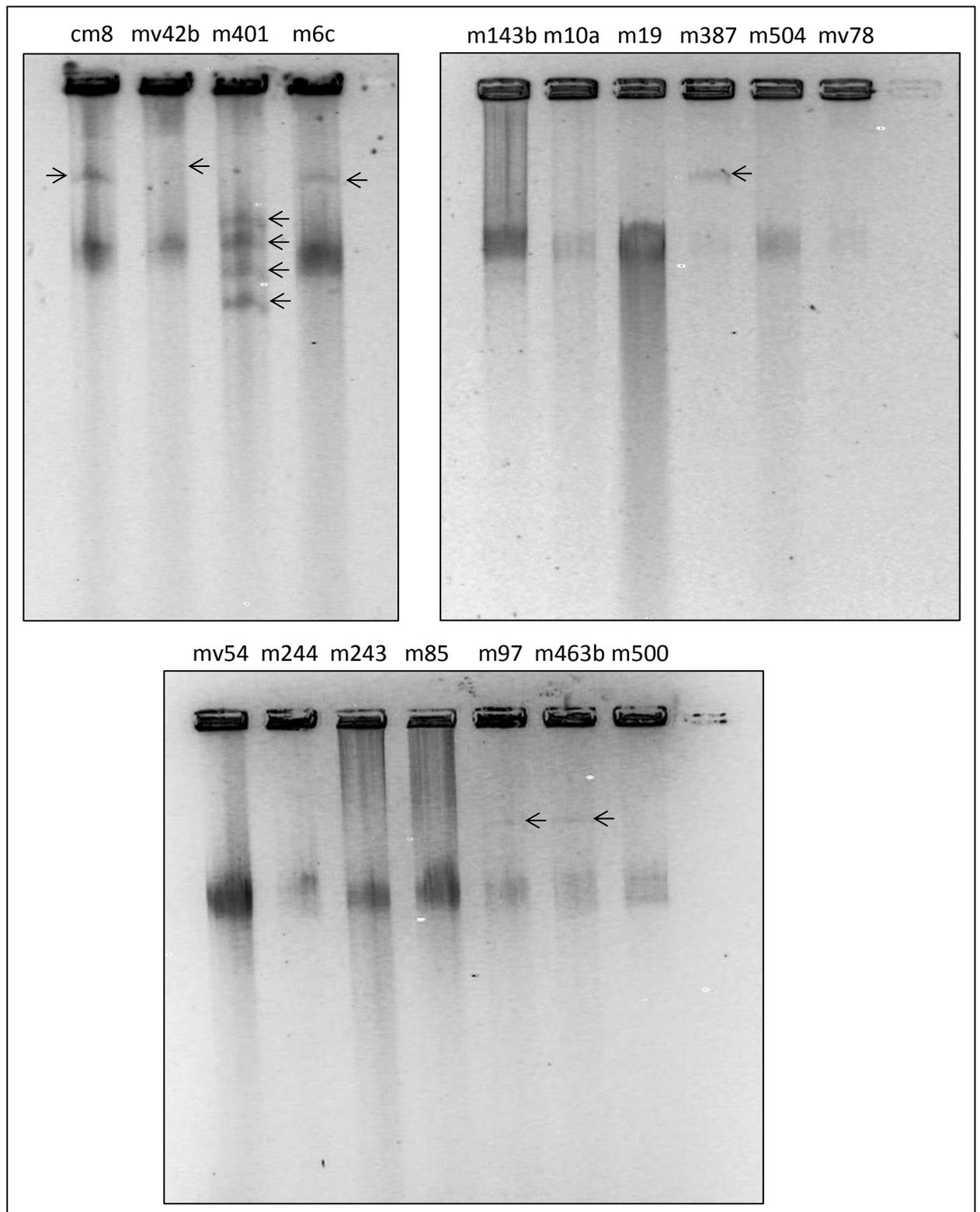


**Figura 9:** Determinación de la CIM de MIN por el método de dilución en agar. Cepas de *B. cereus* cm8, m401 y m85. Control: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

#### Análisis del perfil plasmídico por la técnica de lisis *in situ* en geles de agarosa horizontal

El análisis de los geles empleando la técnica de lisis *in situ* permitió identificar la presencia de al menos 1 banda plasmídica en 7 de las 25 (28%) cepas de *B. cereus*: m6c, cm8, mv42b, m97, m387, m401, m463b. En el caso de la cepa m401 se observó la presencia de 4 bandas plasmídicas que podrían corresponderse con 4 plásmidos diferentes (Figura 10).

Sin embargo, el número de bandas observado debe tomarse con reserva si se desea determinar fehacientemente el número real de replicones plasmídicos.



**Figura 10:** Técnica de lisis *in situ*. La visualización de plásmidos en las distintas cepas de *B. cereus* estudiadas son señalados con una flecha.

Los perfiles plasmídicos visualizados para las cepas m6c, cm8, m97, m387, m401 y m463b se correspondieron con fenotipos resistentes a TET (Tabla 4), y para la cepa mv42b se correspondió con fenotipo intermedio a TET y resistente a OTC y MIN (Tabla 4).

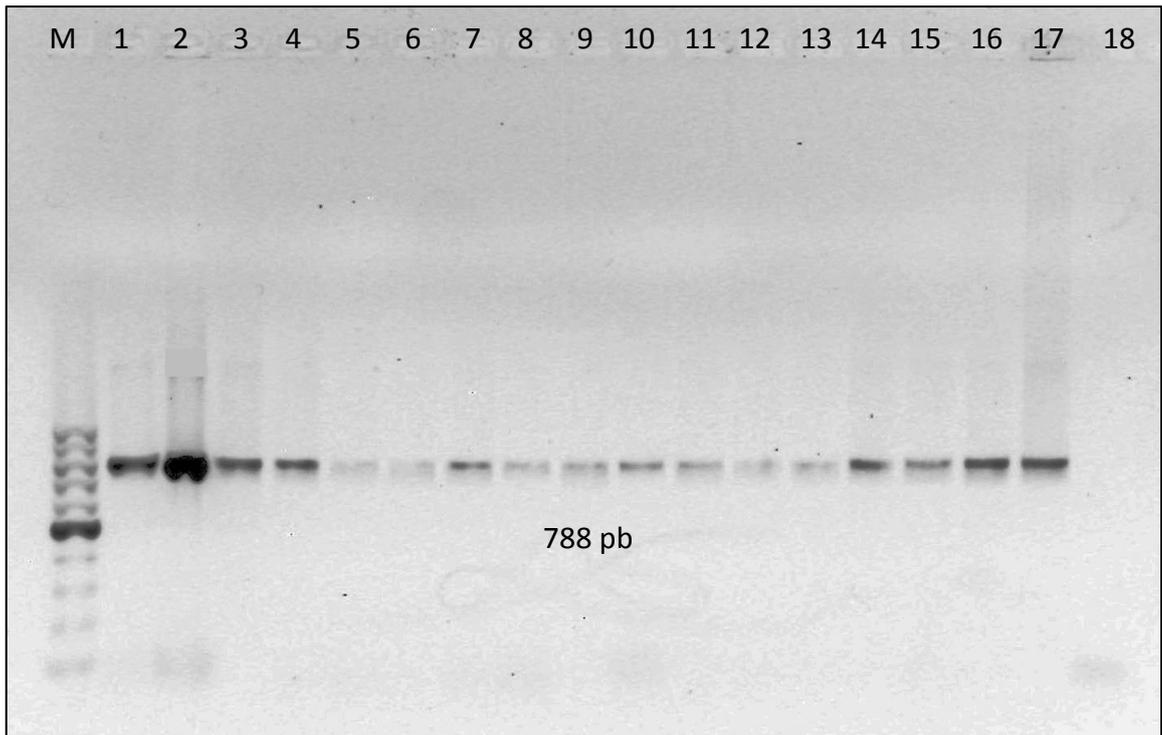
En el resto de las cepas de *B. cereus* (n=18) y *P. larvae* (n=3) analizadas no se pudo verificar la presencia de plásmidos por lo que la técnica no resultaría reproducible. La metodología empleada fue descrita por Eckhardt (1978) para cepas de *B. subtilis*. No se encontraron reportes de la aplicación de esta técnica específicamente en cepas de *B. cereus*.

Existen escasos reportes empleando esta técnica para la visualización de plásmidos en cepas de *P. larvae* (Alippi, 2015; Alippi et al., 2007; Benada et al., 1988). Mientras que Alippi et al. (2007) encuentran una correlación positiva entre la presencia de plásmidos y resistencia a TET, Benada et al. (1988) no encuentran correlaciones entre la presencia de plásmidos y resistencia a ATBs.

#### Detección por PCR de la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina

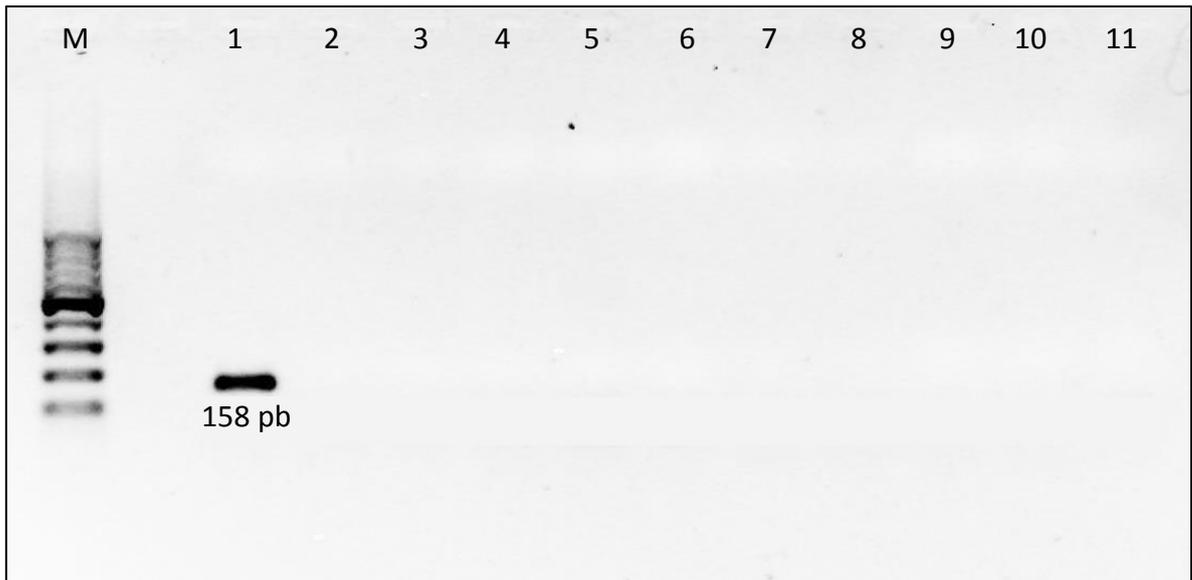
El ADN genómico total y el ADN plasmídico, obtenidos a partir de las cepas de *B. cereus* y *P. larvae* ensayadas resultaron adecuados para su utilización como molde en las amplificaciones de los distintos determinantes de resistencia a tetraciclina.

Se detectó la presencia del determinante Tet L, observándose el amplicón esperado de 788 pb en 19 cepas de *B. cereus* (m6c, cm8, m10a, m19, mv42b, mv54, m85, m97, m143b, m243, m244, m272, m387, m401, m453c, m463b, m500, m504 y La Pampa) y en las 3 cepas de *P. larvae* (PL391, PL442 y PL443) cuando se utilizó como molde ADN plasmídico (Figura 11). Adicionalmente, 4 cepas de *B. cereus* m10a, m85 m243 y m244, y las 3 cepas de *P. larvae* fueron positivas para este determinante, cuando se utilizó como molde ADN genómico total.



**Figura 11:** Amplificación por PCR del determinante de resistencia a tetraciclina Tet L empleando como molde ADN plasmídico de cepas de *B. cereus*. Calle M: marcador de peso molecular 100-1.000 pb, calle 1: mv54, calle 2: cm8, calle 3: mv42b, calle 4: m401, calle 5: m6c, calle 6: m143b, calle 7: La Pampa, calle 8: m10a, calle 9: m244, calle 10: m243, calle 11: m272, calle 12: m85, calle 13: m19, calle 14: m463b, calle 15: m500, calle 16: m504, calle 17: *P. larvae* PL442, calle 18: blanco.

Se detectó la presencia del determinante Tet M observándose el amplicón esperado de 158 pb en la cepa *B. cereus* m383 cuando se utilizó como molde ADN genómico total, pero no así cuando se utilizó como molde ADN plasmídico (Figura 12).



**Figura 12:** Amplificación del determinante de resistencia a tetraciclina Tet M en ADN genómico total de cepas de *B. cereus*. Calle M: marcador de peso molecular 100-1.000 pb (Inbio Highway), calle 1: m383, calle 2: m10a, calle 3: mv42b, calle 4: mv48, calle 5: mv54, calle 6: m85, calle 7: m401, calle 8: m387, calle 9: m453a, calle 10: m453b, calle 11: blanco.

Con respecto al resto de los determinantes de resistencia analizados (Tet K, Tet O, Tet Q, Tet S, Tet A (P) y Otr A), no se observó producto de amplificación alguno en las cepas estudiadas, ni en ADN genómico total ni en ADN plasmídico.

Los genes *tetK*, *tetL* y *tetM* son los más frecuentemente encontrados en especies Gram-positivas de los géneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, entre otros (Chopra & Roberts, 2001).

En nuestro estudio, el determinante de resistencia Tet L fue amplificado en el 76% (n=19) de las cepas de *B. cereus*, que tenían fenotipos resistentes e intermedios a TET, mientras que, el determinante Tet M fue amplificado sólo en la cepa m383, y que fue la única que presentó fenotipo resistente a TET, OTC y MIN. Se cree que el gen *tetM* confiere resistencia a todas las drogas disponibles del grupo, incluyendo la tetraciclina y la minociclina (Trzcinski et al. 2000). Sin embargo, las cepas de *B. cereus*: mv42b resistente a MIN y OTC, y m453b resistente a MIN y TET, si bien amplificaron el determinante Tet L, a pesar de realizar repeticiones de la PCR con el cebador correspondiente al determinante Tet

M, no se obtuvieron productos de amplificación, como se podría haber esperado debido a sus fenotipos resistentes a MIN.

Nuestros resultados muestran una correlación positiva entre la resistencia a TET y la presencia de al menos un determinante de resistencia. En este estudio se observó un alto porcentaje (76%) de cepas de *B. cereus* conteniendo el determinante Tet L, coincidiendo con reportes previos de López et al. (2008) quienes observan un 77% de cepas resistentes de *B. cereus* portando algún determinante de resistencia. Mientras que otros autores (Agero et al., 2002), de un total de 88 aislamientos resistentes de *B. cereus sensu lato*, detectan los genes de resistencia a tetraciclina *tetM* y *tetL* en sólo 7 de ellos.

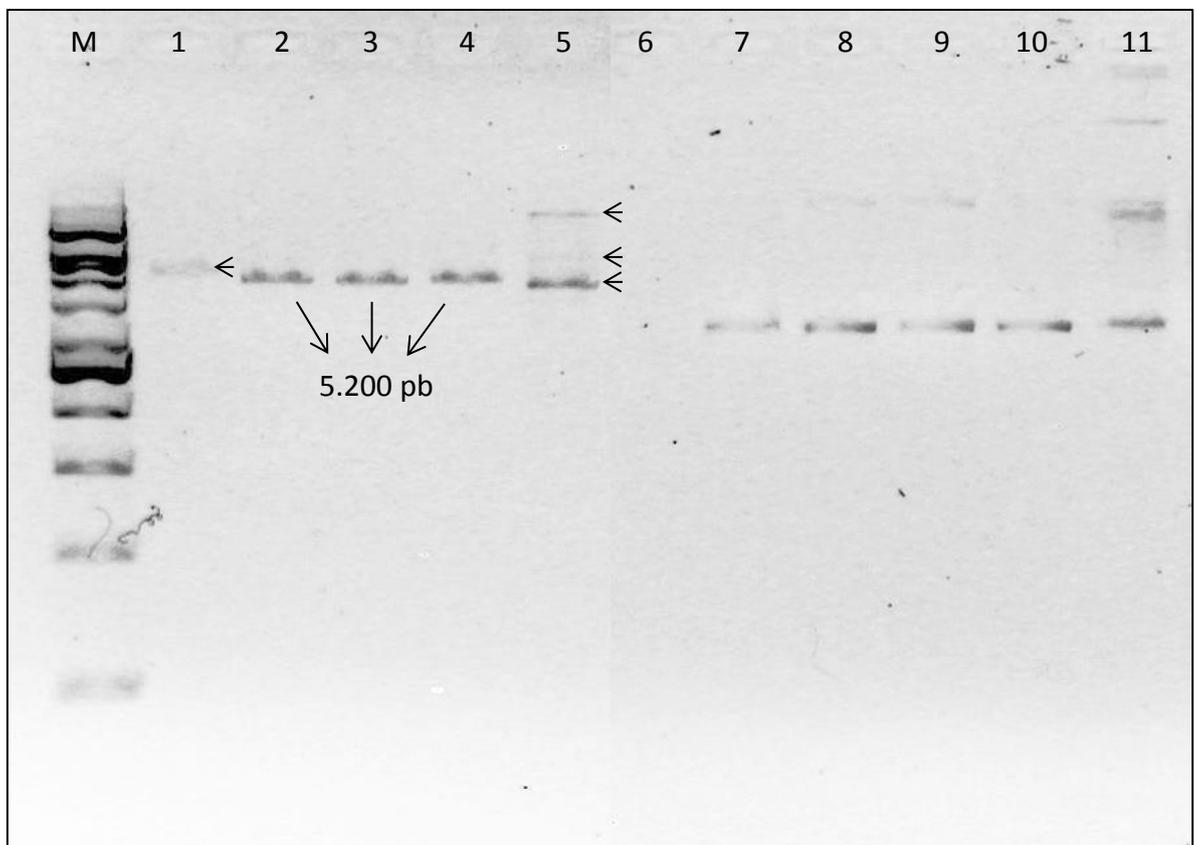
Con respecto a las cepas de *P. larvae* estudiadas, el determinante Tet L fue amplificado en las 3 cepas, que presentaron fenotipo intermedio (PL391) y resistente (PL442 y PL443). Nuestros resultados coinciden con lo reportado por otros autores (Alippi et al., 2014; Murray et al., 2007) de cepas de *P. larvae* resistentes a TET y OTC conteniendo el gen *tetL*.

No se observó producto de amplificación para el determinante Tet A en ninguna de las cepas estudiadas, a diferencia de lo reportado por Rather et al. (2012) quienes encontraron los genes *tetA* y *tetB* en cepas de *B. cereus* aisladas de alimentos resistentes a TET. Lo mismo ocurrió con el determinante Otr A, al no observarse producto de amplificación en las cepas estudiadas pero fue previamente reportado en cepas de *B. cereus* resistentes a TET (López et al. 2008).

Por otra parte, aunque en 5 cepas no se obtuvo producto de amplificación con ningún determinante de resistencia estudiado, las mismas presentaron fenotipos resistentes o intermedios a TET. Esto podría deberse a que dichas cepas puedan ser portadoras de otros genes *tet* no analizados en este estudio o desconocidos hasta el presente (Roberts, 1996).

### Digestión del ADN plasmídico mediante enzimas de restricción

La digestión del ADN plasmídico de las cepas de *P. larvae*: PL391, PL395, PL442 y PL443 con la enzima *Bgl*II generó un único fragmento de restricción de aproximadamente 5.200 pb. Este fragmento se correspondería con el de la cepa control *P. larvae* PL395 correspondiente al plásmido pPL395 (Alippi et al., 2014). En las cepas control *P. larvae* PL373 y PL374 se observaron los 3 fragmentos de restricción esperados: uno de aproximadamente 5.200 pb, correspondiente al plásmido pPL373, uno de entre 6.000 y 7.000 pb y otro mayor a 10.000 pb (Alippi et al., 2014) (Figura 13).

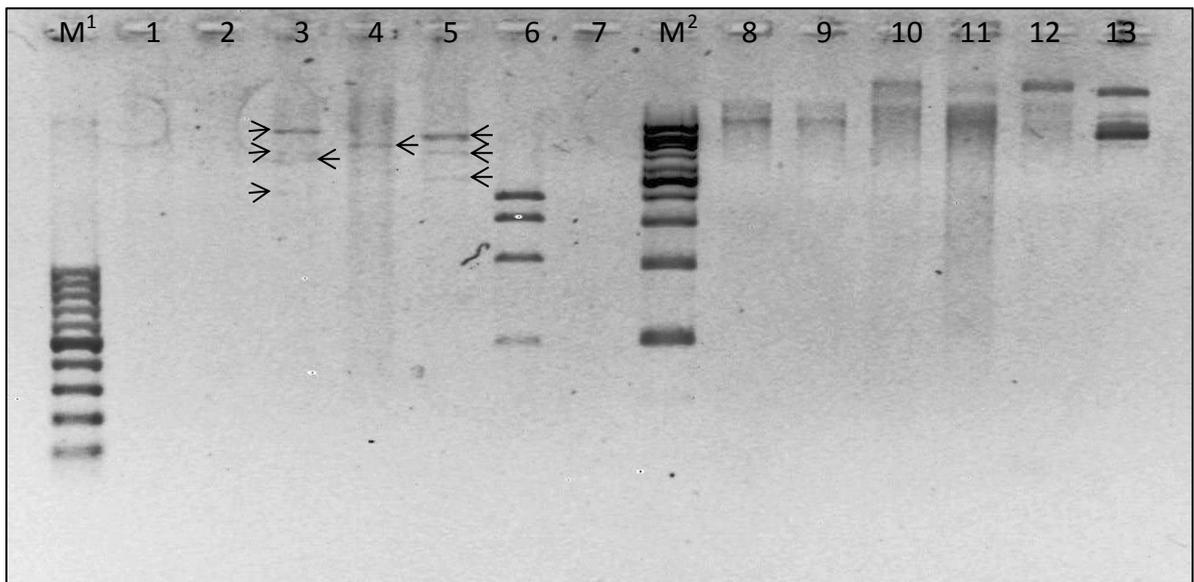


**Figura 13:** Fragmentos de restricción obtenidos empleando la enzima *Bgl*II y ADN plasmídico de *P. larvae*. Calle M: marcador de peso molecular 1 kb (Genbiotech®), calle 1: PL395, calle 2: PL391, calle 3: PL442, calle 4: PL443, calle 5: PL373, calle 6: blanco. Calles 7 a 11: extracciones de ADN plasmídico sin digerir. Calle 7: PL395, calle 8: PL391, calle 9: PL442, calle 10: PL443, calle 11: PL373.

Se estima que el fragmento de 5.200 pb presente en el ADN plasmídico de las cepas PL391, PL442 y PL443, se correspondería con los plásmidos de replicación

por círculo rodante conteniendo el determinante Tet L presente en las cepas de *P. larvae* resistentes a tetraciclina (Alippi et al., 2014; Murray et al., 2007).

Los resultados de la digestión del ADN plasmídico de las cepas de *B. cereus* con la enzima *CfoI* fueron variables. La cepa m401 generó 4 fragmentos de restricción: uno entre 7.000 y 10.000 pb, otro de 4.000 pb, otro entre 3.000 y 4.000 pb y otro un poco mayor a 2.000 pb. La cepa m463b generó un único fragmento de restricción de 6.200 pb aproximadamente y la cepa m500 generó 3 fragmentos de restricción de aproximadamente 7.000 pb, 4.000 pb y 2.500 pb, respectivamente. Las cepas m6c y cm8 no presentaron sitios de restricción (Figura 14). Las cepas control de *P. larvae* PL373, PL374 y PL395 presentaron los 4 fragmentos de restricción esperados de 2.000 pb, 1.500 pb, 1.000 pb y 500 pb, respectivamente, correspondientes a los plásmidos pPL373, pPL374 y pPL395 (Alippi et al., 2014).



**Figura 14:** Fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *CfoI* en ADN plasmídico de *B. cereus*. Calle M<sup>1</sup>: marcador de peso molecular 100-1.000 pb; calle 1: m6c, calle 2: cm8, calle 3: m401, calle 4: m463b, calle 5: m500, calle 6: *P. larvae* PL374, calle 7: blanco, calle M<sup>2</sup>: marcador de peso molecular 1 kb. Calles 8 a 13: extracciones de ADN plasmídico sin digerir. Calle 8: m6c, calle 9: cm8, calle 10: m401, calle 11: m463b, calle 12: m500, calle 13: cepa control de *P. larvae* PL374.

Los resultados observados muestran que los plásmidos presentes en las cepas de *B. cereus* son diferentes a los presentes en las cepas de *P. larvae*. A su vez, la obtención de fragmentos distintos, sugieren la existencia de plásmidos diferentes en cada una de las cepas de *B. cereus*. Zheng et al. (2013) sugieren la existencia de eventos de fusión plasmídica en cepas de *B. cereus sensu lato*.

Se han citado eventos de recombinación interplasmídica durante la propagación del gen *tetL*, observándose diferencias significativas en el tamaño de los plásmidos portadores de este gen en *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, los que adicionalmente pueden portar genes adicionales de resistencia (Kehrenberg et al., 2005).

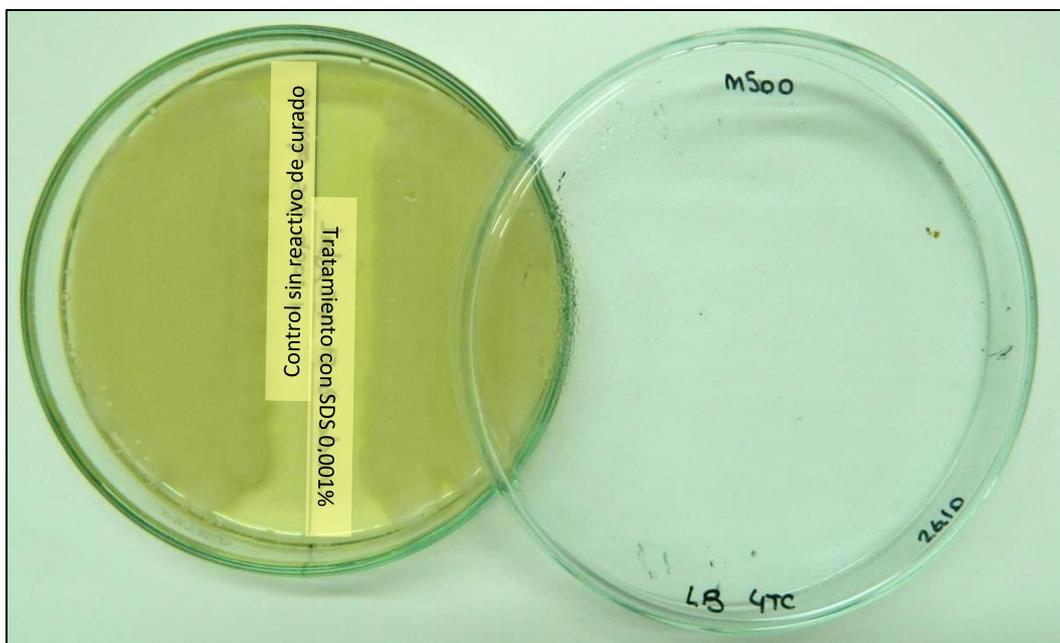
#### Curado de plásmidos

No fue posible curar a ninguna de las cepas resistentes conteniendo plásmidos por ninguna de las metodologías probadas. Nuestros resultados difieren con lo reportado por Bernhard et al. (1978), quienes obtuvieron un curado TET<sup>S</sup> de una cepa de *B. cereus* empleando concentraciones de 0,02 y 0,04 µg/ml de BrEt. Sin embargo, en las cepas tratadas con BrEt a una concentración de 30 µg/ml y con SDS a una concentración de 0,002% se observó una disminución de la replicación, detectándose menor turbidez en el medio de cultivo y menor desarrollo en la placa con LB (Tabla 5 y Figuras 15, 16 y 17). A esa concentración de BrEt, Kobayashi-Saegusa et al. (1987) obtuvieron una frecuencia de derivados curados del 1%, mientras que Bernhard et al. (1978) no reportan la obtención de curados TET<sup>S</sup> con el tratamiento de 0,002 % de SDS.

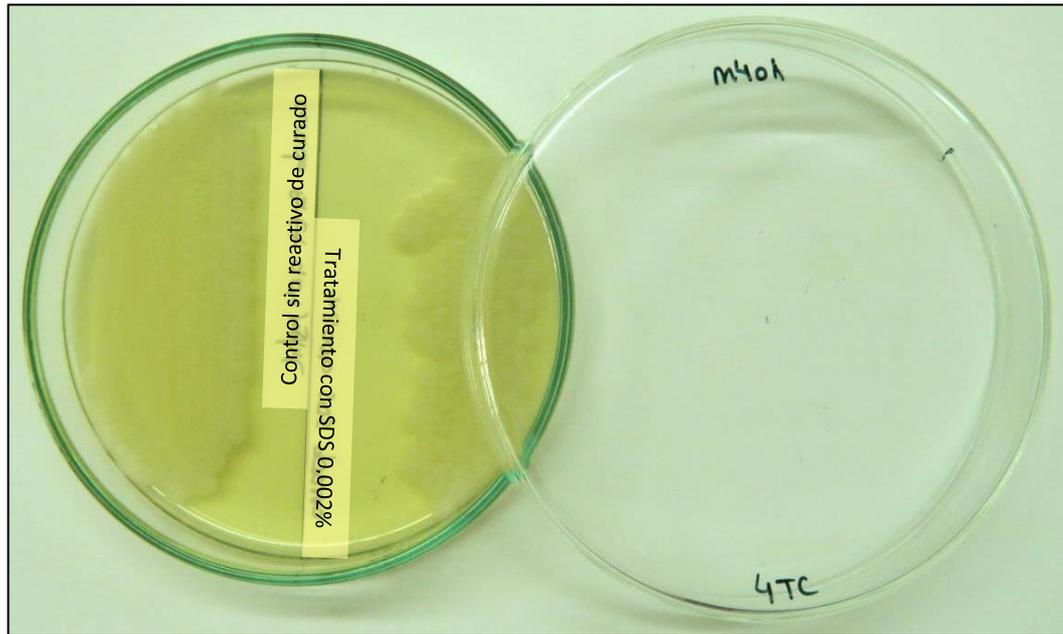
**Tabla 5: Tratamientos de curado de plásmidos.** Comparación del desarrollo de las cepas con y sin tratamiento de curado.

Cepa	Medio LB + TET 4 µg/ml		
	Sin curar	SDS 0,002%	BrEt 30 µg/ml
<i>B. cereus</i> m6c	++++	++	++
<i>B. cereus</i> cm8	++++	++	++
<i>B. cereus</i> m383	++++	++	++
<i>B. cereus</i> m401	++++	+++	+++
<i>B. cereus</i> m463b	++++	++++	+
<i>B. cereus</i> m500	++++	+++	+++

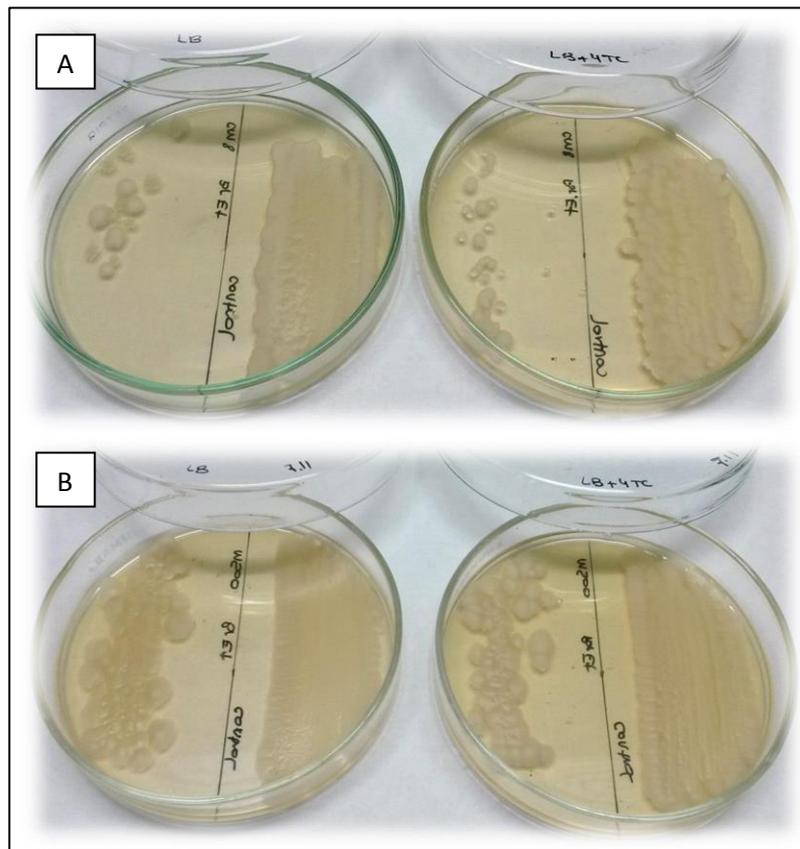
**Referencias:** (++++) desarrollo normal; (+++) disminución leve del desarrollo; (++) disminución media del desarrollo; (+) poco desarrollo.



**Figura 15: Tratamiento de curado con 0,001% de SDS.** Desarrollo de la cepa m500 en placa con LB adicionado con TET. **Mitad izquierda:** sin tratamiento; **mitad derecha:** luego del tratamiento de curado.



**Figura 16:** Tratamiento de curado con 0,002% de SDS. Desarrollo de la cepa m401 en placa con LB adicionado con TET. **Mitad izquierda:** sin tratamiento; **mitad derecha:** luego del tratamiento de curado.



**Figura 17:** Tratamiento de curado con 30 µg/ml de BrEt. Comparación del desarrollo de las cepas en placas con LB sin TET (izquierda) y en placas con LB adicionado con 4 µg/ml de TET (derecha) luego del tratamiento. **A:** cepa cm8. **B:** cepa m500.

### Conjugaciones bacterianas

La cepa dadora *B. cereus* m401 se seleccionó porque presentaba resistencia a TET (CIM= 64 µg/ml), contenía 4 plásmidos según lo observado en la técnica de lisis *in situ* (sección “Análisis del perfil plasmídico por la técnica de lisis *in situ* en geles de agarosa horizontal”) y se encontró el determinante Tet L cuando se utilizó como molde ADN plasmídico; mientras que la cepa dadora *B. cereus* m383 se seleccionó porque presentaba resistencia a TET, OTC y MIN (CIM= 16, 16 y 32 µg/ml, respectivamente) y fue positiva para el determinante Tet M cuando se utilizó como molde ADN genómico total. Ambas cepas presentaron un fenotipo sensible a NAL ya que no desarrollaron en placas con MH adicionado con 16 µg/ml de NAL.

Como cepas aceptoras se seleccionaron: *B. cereus* ATCC 11778 y *B. pumilus* m350 que presentaron sensibilidad a TET, OTC y MIN con bajos valores de CIM (Tabla 6). Todas las cepas probadas que dieron valores de CIM para TET mayores o iguales a 2 µg/ml se descartaron como posibles aceptoras.

**Tabla 6: Valores de CIM (µg/ml) de TET, OTC y MIN de las cepas aceptoras.**

CIM (µg/ml)	Tetraciclina	Oxitetraciclina	Minociclina
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	0,125	0,125	0,0312
<i>B. pumilus</i> m350	1	0,125	0,0312

**Referencias: sombreado verde:** valores de CIM que pertenecen a la categoría sensible (CIM ≤ 4 µg/ml)

#### *Obtención de mutantes resistentes a ácido nalidíxico*

Tanto para *B. cereus* ATCC 11778 como para *B. pumilus* m350 se obtuvieron mutantes bacterianos resistentes a 64 µg/ml de NAL mediante la técnica detallada en la sección 4.9.1.

### *Conjugaciones en medio líquido*

La transferencia *in vitro* de resistencia a tetraciclina fue demostrada en *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> y *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup> cuando se utilizó como cepa dadora *B. cereus* m401.

Las cepas aceptoras mostraron diferencias en cuanto a la capacidad para producir transconjugantes. Con la cepa aceptora *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> se obtuvieron 18 colonias transconjugantes de las cuales se eligieron 3 (*trc1*, *trc2* y *trc3*) para continuar trabajando. La frecuencia de conjugación fue del orden de  $7 \times 10^{-7}$ . Con la cepa aceptora de *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup> se obtuvieron 34 colonias transconjugantes de las cuales se eligieron 2 (*trc1* y *tcr2*) para continuar trabajando. La frecuencia de conjugación fue del orden de  $1 \times 10^{-6}$ .

Por el contrario, los ensayos de conjugación realizados con la cepa dadora m383 no produjeron transconjugantes de *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> ni de *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup>. Nuestros resultados difieren de lo reportado por Agerso et al. (2002) de aislamientos de *Bacillus cereus sensu lato* conteniendo el gen *tetM* en un transposón y el cual es transferido a *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*.

La utilización del medio Mossel permitió diferenciar las especies, ya que las colonias de *B. cereus* presentaron color rosado alcalinizando el medio de cultivo (color fucsia); mientras que las colonias de *B. pumilus* presentaron un menor tamaño y coloración amarilla acidificando el medio (color amarillo) (Figura 18).

Tal como se esperaba, no se observó desarrollo de colonias cuando los controles de las cepas dadoras y aceptoras fueron sembrados por separado en el medio selectivo de conjugación conteniendo ambos ATBs (controles negativos). Es decir, que no se observaron mutantes espontáneos resistentes a NAL en las cepas dadoras *B. cereus* m401 y m383, o resistentes a TET en las cepas aceptoras *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> y *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup>.



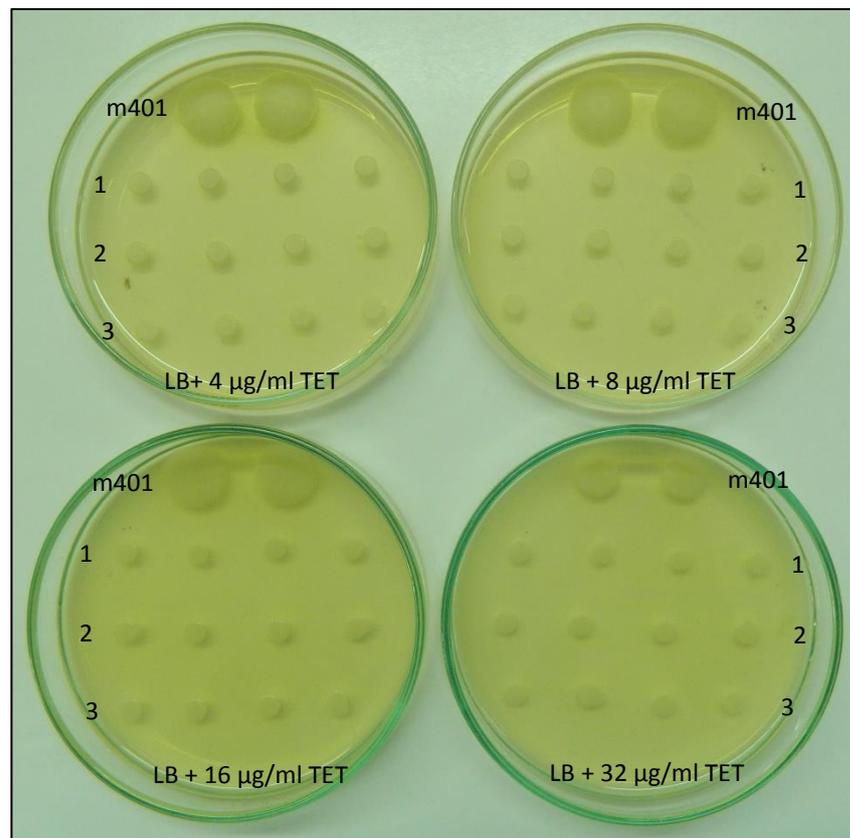
**Figura 18:** Coloración del medio Mossel. El medio se tornó de color fucsia con las cepas de *B. cereus*, mientras que se tornó de color amarillo con las cepas de *B. pumilus*. El color original del medio sin siembra se observa en el centro de la imagen.

La determinación de las CIM de TET de los transconjugantes seleccionados de *B. cereus* y *B. pumilus*, dieron como resultado un incremento del valor de la misma (Tabla 8 y Figuras 19 y 20). Así mismo, todos los transconjugantes mostraron el amplicón esperado de 788 pb correspondiente al determinante Tet L utilizando como molde ADN plasmídico (Tabla 7 y Figura 21).

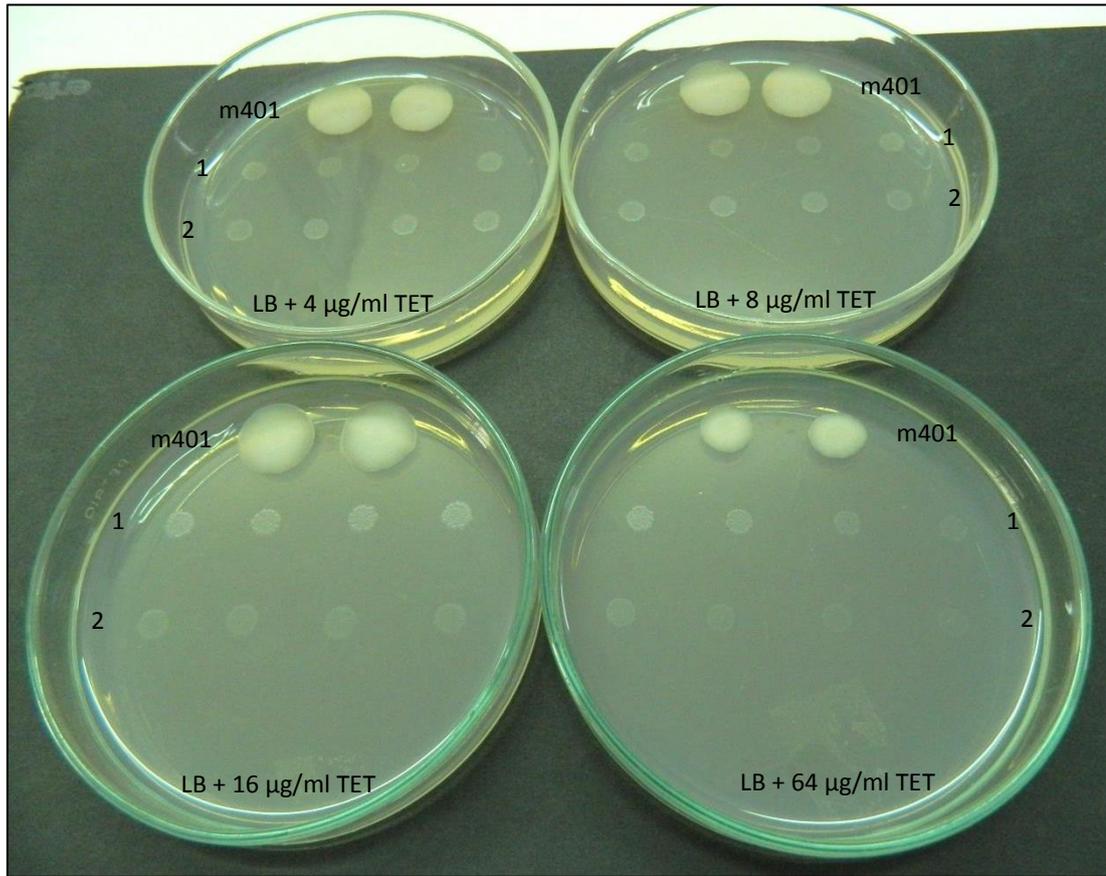
**Tabla 7: Valores de CIM ( $\mu\text{g/ml}$ ) a TET para las cepasceptoras y dadoras utilizadas para la conjugación y de los transconjugantes obtenidos.**

Cepa	Fenotipo	CIM TET ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tet L
<i>B. cereus</i> m401	TET <sup>R</sup> NAL <sup>S</sup>	64	+
<i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup>	NAL <sup>R</sup> TET <sup>S</sup>	0,125	-
<i>B. pumilus</i> m350 NAL <sup>R</sup>	NAL <sup>R</sup> TET <sup>S</sup>	1	-
<i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup> trc1	NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>	64	+
<i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup> trc2	NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>	64	+
<i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup> trc3	NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>	64	+
<i>B. pumilus</i> m350 NAL <sup>R</sup> trc1	NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>	64	+
<i>B. pumilus</i> m350 NAL <sup>R</sup> trc2	NAL <sup>R</sup> TET <sup>R</sup>	64	+

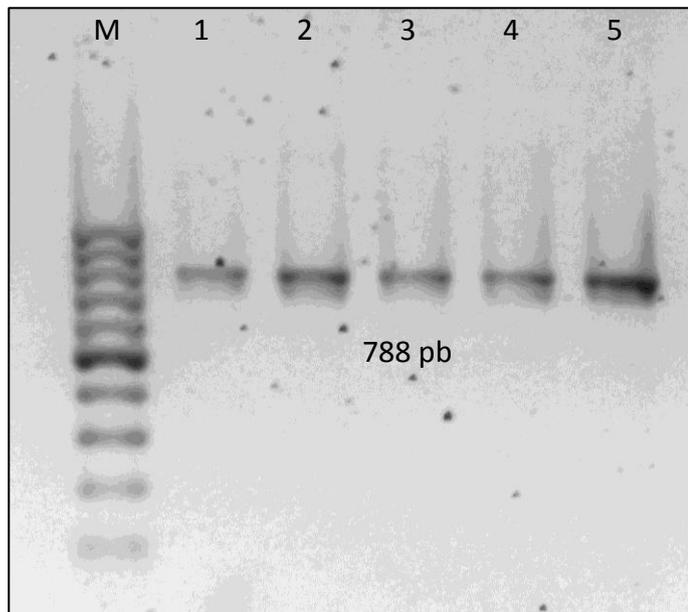
**Referencias:** (+) presencia de amplicón; (-) ausencia de amplicón. **Sombreado rosado:** valores de CIM que pertenecen a la categoría resistente (CIM  $\geq$  16  $\mu\text{g/ml}$ ); **sombreado verde:** valores de CIM que pertenecen a la categoría sensible (CIM  $\leq$  4  $\mu\text{g/ml}$ ).



**Figura 19: Determinación de la CIM de TET de los transconjugantes de *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup>. Como control se usó la cepa *B. cereus* m401. 1: trc1; 2: trc2; 3: trc3.**



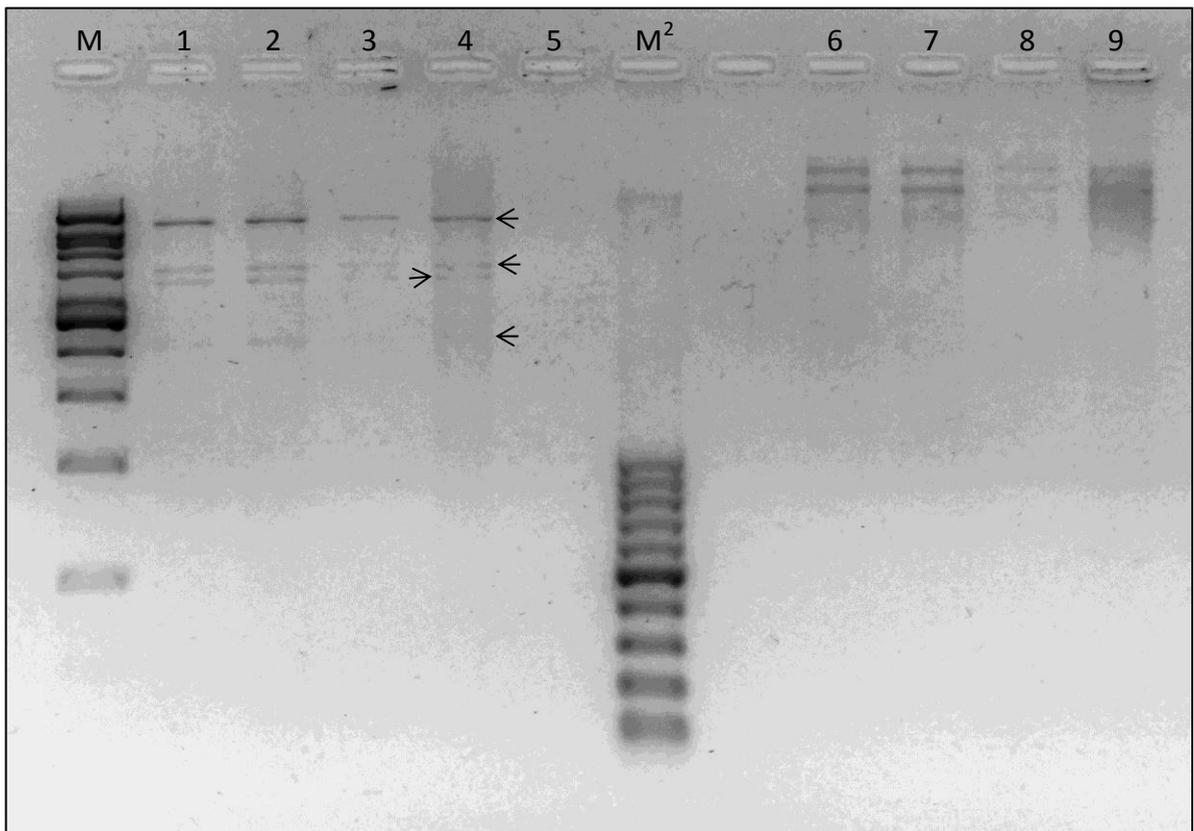
**Figura 20:** Determinación de la CIM de TET de los transconjugantes de *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup>. Como control se usó la cepa *B. cereus* m401. 1: trc1; 2: trc2.



**Figura 21:** 65. Calle M: marcador de peso molecular 100-1.000 pb, calle 1: *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> trc1, calle 2: *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> trc2, calle 3: *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> trc3, calle 4: *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup> trc1, calle 5: *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup> trc2.

La digestión de ADN plasmídico de los transconjugantes de *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> con la enzima *CfoI*, generó 4 fragmentos de restricción idénticos a los generados por la cepa dadora *B. cereus* m401 (uno entre 7.000 y 10.000 pb, otro de 4.000 pb, otro entre 3.000 y 4.000 pb y otro un poco mayor a 2.000 pb) (Figura 22). Estos resultados sugieren una transferencia completa de los plásmidos presentes en la cepa dadora.

La digestión de ADN plasmídico de los transconjugantes obtenidos de *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup> no pudo realizarse ya que luego de dos repiques perdieron la viabilidad, impidiendo su recuperación para pruebas posteriores. Algo similar a esto fue observado por Alippi (2015), en un transconjugante de *P. larvae* resistente a TET que espontáneamente perdió los plásmidos adquiridos y por consiguiente la resistencia a este ATB.



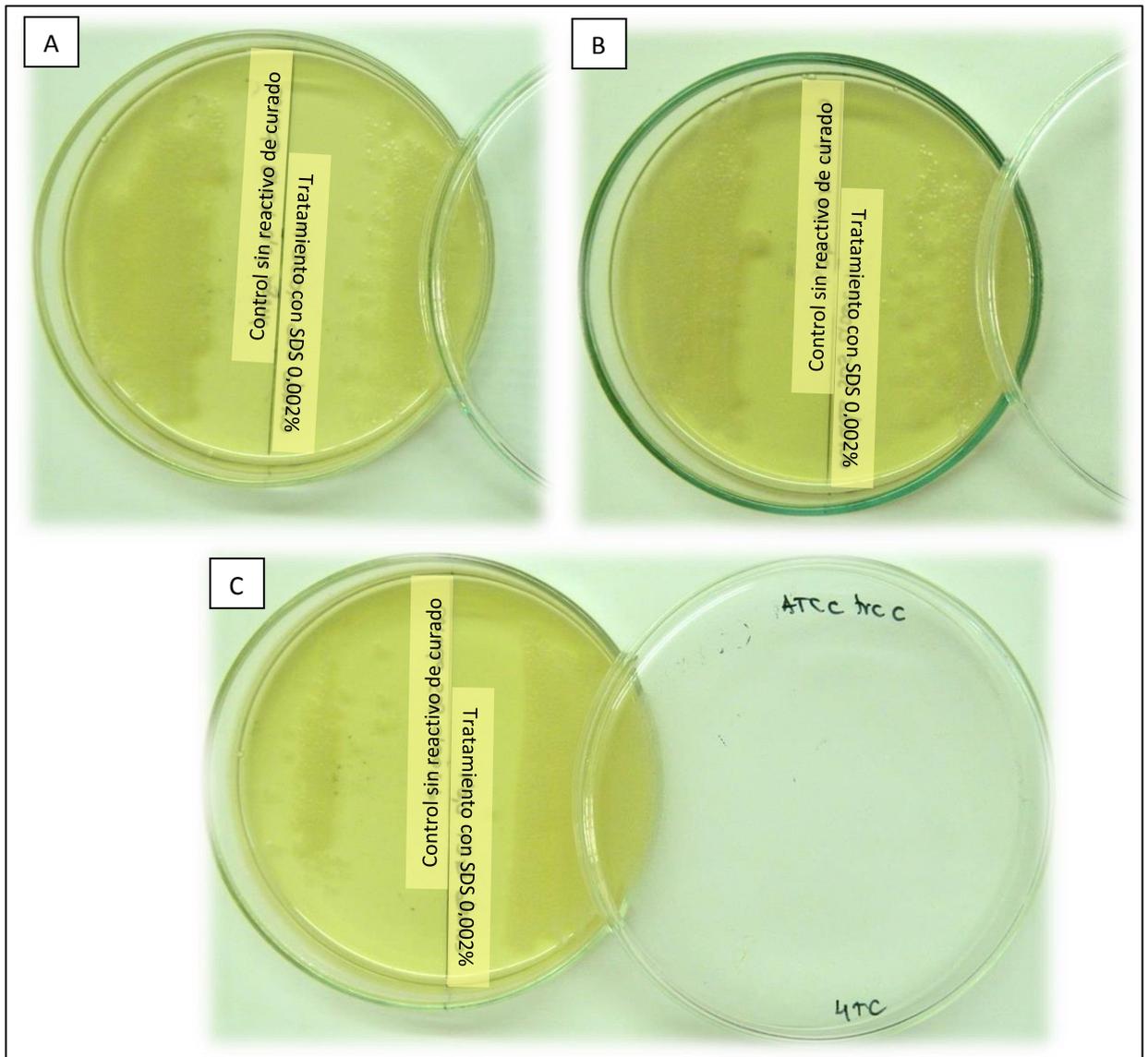
**Figura 22:** Fragmentos de restricción obtenidos con la enzima *CfoI* y ADN plasmídico de los transconjugantes de *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup>. Calle M<sup>1</sup>: marcador de peso molecular 1 kb; calle 1: trc1, calle 2: trc2, calle 3: trc3, calle 4: *B. cereus* m401 (cepa dadora), calle 5: blanco, calle M<sup>2</sup>: marcador de peso molecular 100-1.000 pb. Calles 6 a 9: extracciones de ADN plasmídico sin digerir. Calle 6: trc1, calle 7: trc2, calle 8: trc3, calle 9: *B. cereus* m401.

No fue posible curar a los transconjugantes *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> por ninguna de las metodologías probadas. No obstante hubo variaciones en el desarrollo de las colonias bacterianas en los tratamientos con 0,002% de SDS y 30 µg/ml de BrEt (Tabla 8 y Figura 23) tal como se observó en las cepas resistentes de *B. cereus* m6c, cm8, m383, m401, m463b y m500.

**Tabla 8: Tratamientos de curado de plásmidos en los transconjugantes obtenidos.** Comparación del desarrollo de las cepas con y sin tratamiento de curado.

Cepa	Medio LB + 4 µg/ml de TET		
	Sin curar	SDS 0,002%	BrEt 30 µg/ml
<i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup> trc1	++++	++	+
<i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup> trc2	++++	++	+
<i>B. cereus</i> ATCC 11778 NAL <sup>R</sup> trc3	++++	++	+

**Referencias:** (++++) desarrollo normal; (++) disminución media del desarrollo; (+) poco desarrollo



**Figura 23: Tratamiento de curado con 0,002% de SDS en los transconjugantes de *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup>.** Crecimiento en placa con LB adicionado con TET sin tratamiento y luego del tratamiento. **A:** trc1; **B:** trc2; **C:** trc3.

La obtención de transconjugantes TET<sup>R</sup>, positivos para el determinante Tet L y la presencia de los mismos fragmentos de restricción generados por la enzima *CfoI* en las cepas dadora yceptoras, demostrarían la existencia de eventos de THG de resistencia a TET entre cepas de *B. cereus* así como entre *B. cereus* y *B. pumilus*. Nuestros resultados coinciden con reportes previos de THG de un plásmido con resistencia a TET desde *B. thuringiensis* hacia *B. anthracis* y *B. cereus* (Battisti et al., 1985), así como entre *P. larvae* y *B. subtilis*, mediante la transferencia de un plásmido conteniendo el gen *tetL* (Alippi et al., 2007).

### Transformación por electroporación

Los ensayos de electroporación en *B. cereus* ATCC 11778, *B. pumilus* m350, *P. larvae* NRRL B-14154 y *E. coli* DH5 $\alpha$  no produjeron colonias transformantes. Tal como se esperaba, los controles de cada cepa aceptora sin adición de ADN plasmídico, desarrollaron con normalidad en las placas con LB o MYPGP, según correspondiera, indicando que los pulsos eléctricos no produjeron la muerte celular. Por otro lado, estos controles no desarrollaron en las placas con LB o MYPGP adicionado con TET, indicando que no se produjeron mutantes espontáneos resistentes a TET.

Los resultados negativos pueden deberse a que el protocolo de electroporación no haya sido el adecuado para las especies de *Bacillus* probadas, aunque tampoco puede descartarse la posibilidad de algún tipo de restricción en la adquisición del ADN plasmídico por parte de las cepasceptoras, tal como la incompatibilidad plasmídica (Wang et al., 2011). Se ha reportado que varias cepas de *B. thuringiensis* y *B. cereus* presentan baja eficiencia de transformación o no son competentes para transformar, siendo la conjugación el método más conveniente para la transferencia de ADN (Wang et al. 2016). Sin embargo, otros autores han demostrado la transferencia de un plásmido conteniendo el gen de resistencia a doxiciclina *tet45* mediante electroporación desde *B. cereus* hacia *B. subtilis* y *S. aureus* (Zhu et al., 2016).

Por otro lado, los ensayos con la cepa de *P. larvae* NRRL B-14154 no son coincidentes con lo reportado por Alippi et al. (2014), que transformaron esta misma cepa con plásmidos resistentes a tetraciclina provenientes de cepas de *P. larvae*. Otros autores (Murray & Aronstein, 2008) también reportaron la electrotransformación de cepas de *P. larvae*, con un plásmido con resistencia a tetraciclina y kanamicina.

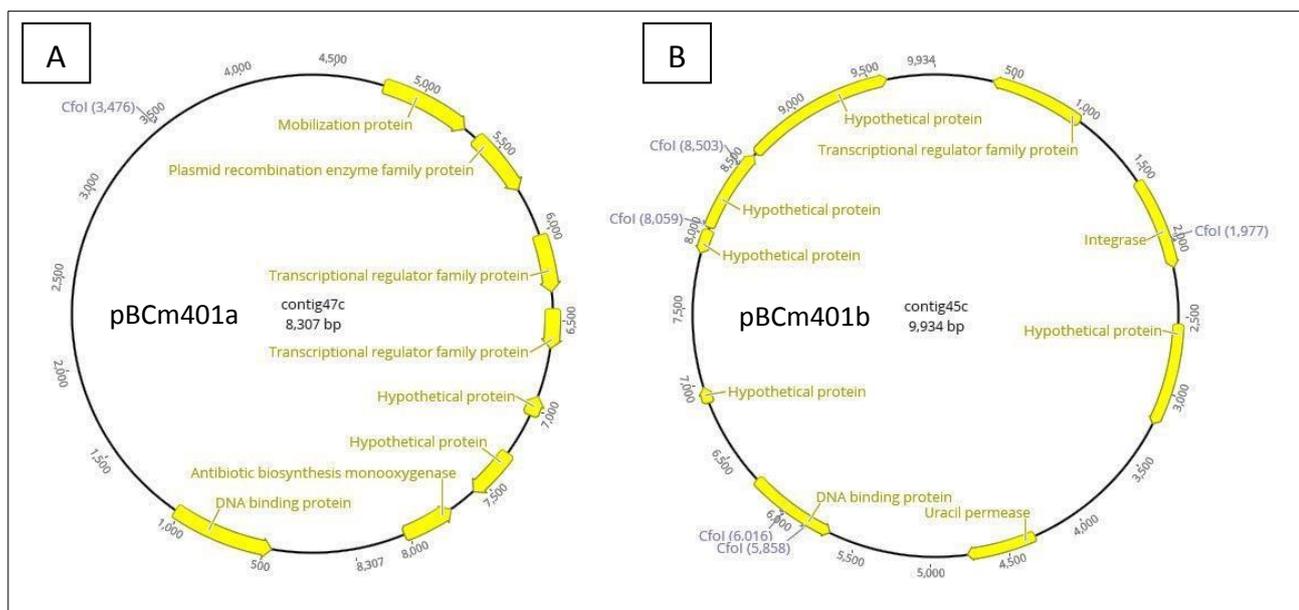
### Secuenciación del genoma de *B. cereus* m401

La secuenciación permitió obtener una versión preliminar del genoma completo de *B. cereus* m401. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas (sección 4.11) se determinó la presencia de 3 plásmidos: uno de 8.307 pb al cual denominamos pBCm401a (*contig47c*); otro de 9.934 pb al cual denominamos pBCm401b (*contig45c*) y el último de 69.591 pb al cual denominamos pBCm401c (*contig28c*) (Figura 24). Dichos plásmidos fueron ensamblados como moléculas circulares con una buena cobertura mediante el software Geneious 9.1.2 (sección 4.11). Luego del análisis de las anotaciones funcionales de los genes codificantes de proteínas obtenidos en estos 3 plásmidos no se encontraron genes que codifiquen funciones relacionadas con resistencia a TET. Sin embargo, en el plásmido pBCm401a (Figura 24 A) se encontraron enzimas de recombinación plasmídica, y proteínas de movilización *Mob* y de replicación con alta homología (95% y 99%, respectivamente) a las presentes en el plásmido pFR12 de *B. thuringiensis* (número de acceso en el GenBank: EU362917) (Amadio et al., 2009). Se ha reportado que los plásmidos presentes en las especies de *B. cereus sensu lato* muestran una distribución cepa dependiente, hallándose cepas sin ningún plásmido mientras que otras presentan más de 10, difiriendo también en los tamaños de los mismos, desde 2.000 pb hasta de 600 kb (Zheng et al., 2015).

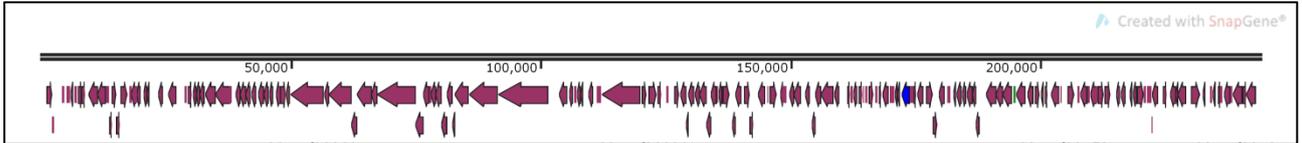
Posteriormente, luego del análisis de las anotaciones funcionales de los genes en el resto de los *contigs* (n=46), se detectó un *contig* (*contig09*) de 243.988 pb (Figura 25) conteniendo un gen de resistencia a tetraciclina de 1377 pb, ubicado entre 172.415 y 173.791 pb (*contig09\_orf00135*). Este gen de resistencia presentó una alta homología con los genes *tetK*, *tetL* y *tet45*, que codifican para proteínas de eflujo, (Figura 26). Sin embargo en este *contig* (*contig 09*) no se encontraron genes que codifiquen proteínas de movilización (gen *Mob*) ni para proteínas de replicación, pero si se detectaron genes que codifican para transposasas (entre 28.932 y 29.138 pb, entre 105.810 y 106.68 pb, entre 106.838 y 107.275, 107.332 y

108.141 pb, 108.168 y 108.476 pb, entre 236.815 y 237.951 pb) lo que induce a pensar que el gen de resistencia a TET podría movilizarse mediante un transposón.

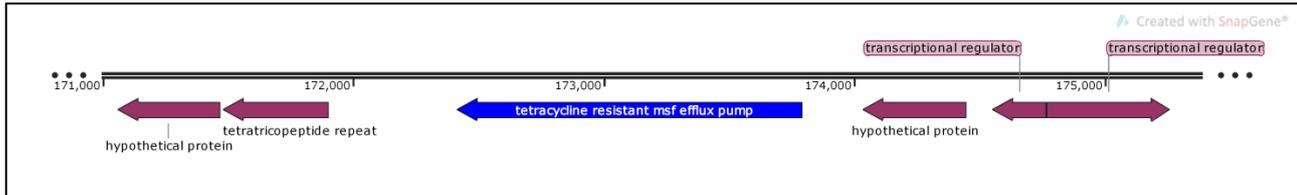
Adicionalmente, según el análisis efectuado en la base de datos del servidor GenBank mediante la herramienta BLASTn, este *contig* se correspondería con secuencias similares pertenecientes a megaplásmidos (megaplásmidos de *B. thuringiensis*: pBT1850636, número de acceso: CP014283.1; pBTHD521-6, número de acceso: CP010112.1; y megaplásmido de *B. cereus*: pBCM301, número de acceso: CP016596.1). Reportes previos sugieren que los megaplásmidos de más de 100 kb pueden haberse originado a partir de eventos de integración de plásmidos de menor tamaño (Zheng et al., 2015).



**Figura 24:** Esquema de los plásmidos con las anotaciones funcionales. **A:** plásmido pBCm401a (*contig47c*) de 8.307 pb; **B:** plásmido pBCm401b (*contig45c*) de 9.934 pb.



**Figura 25:** Esquema del *contig09* de 243.988 pb. En azul se señala la localización del gen de resistencia a TET.

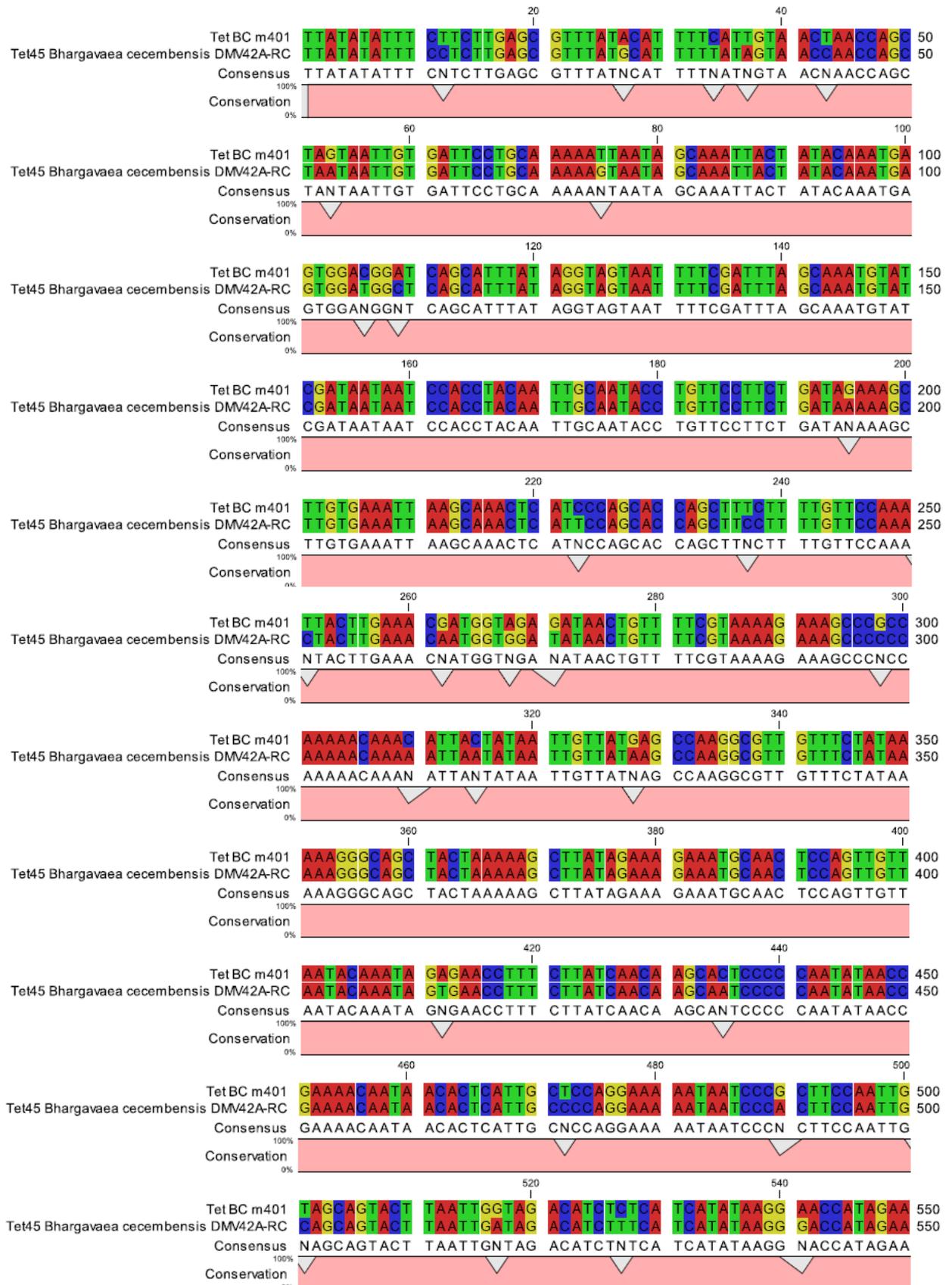


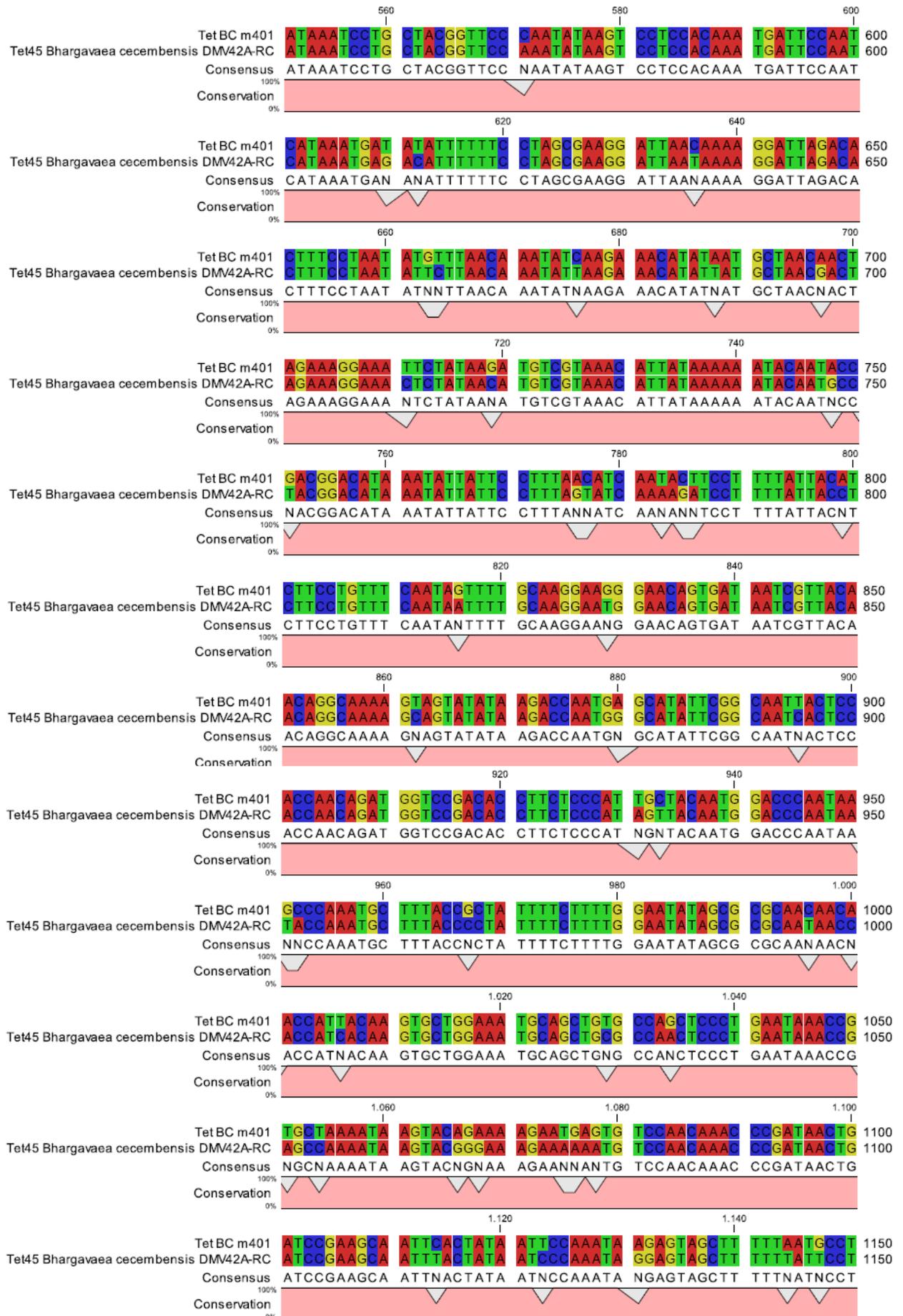
**Figura 26:** Fragmento de la secuencia del *contig09* de 243.988 pb con las anotaciones funcionales. En azul se señala la localización del gen de resistencia a TET que codifica para proteínas de eflujo (orf\_00135).

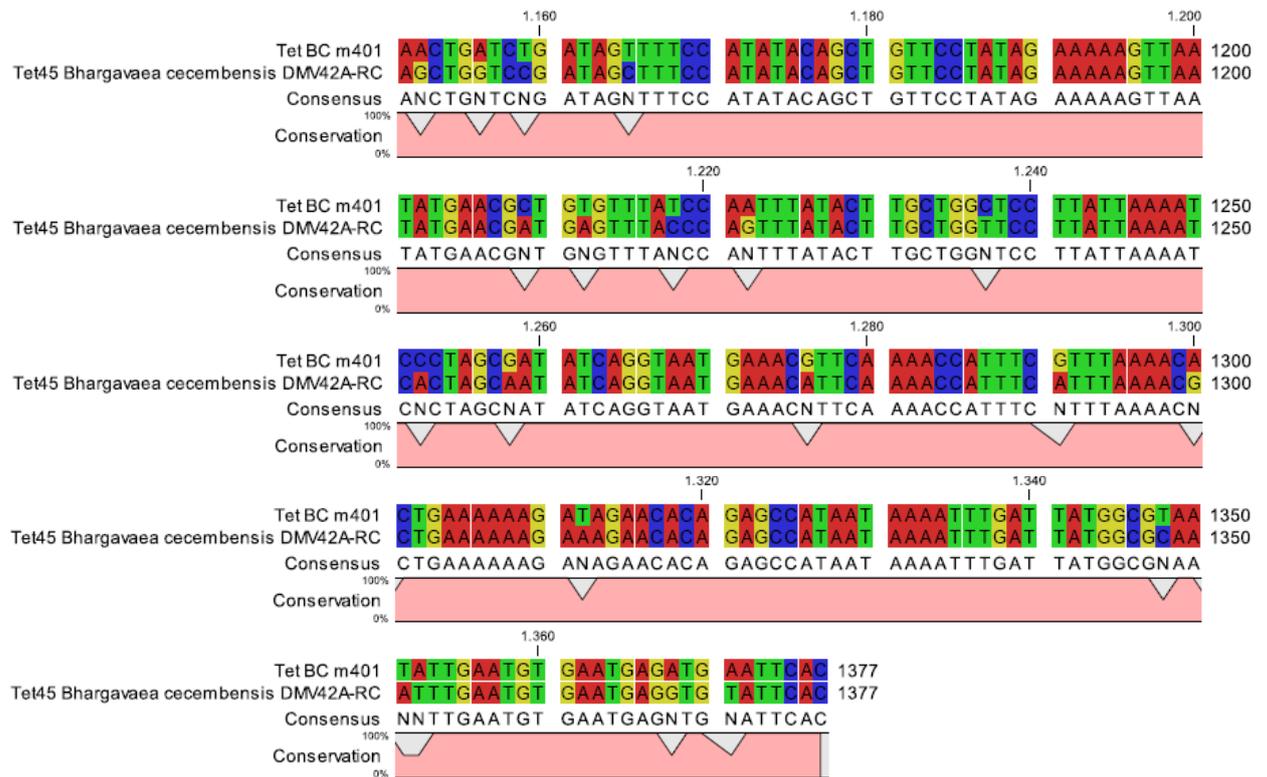
Con respecto a la secuencia de 1.377 pb conteniendo el gen de resistencia a TET obtenida del *contig09\_orf00135*, los resultados obtenidos del análisis efectuado en la base de datos del servidor GenBank, mediante la herramienta BLASTn, permitieron identificar una alta homología con otros plásmidos de bacterias Gram-positivas conteniendo los genes *tetK*, *tetL* y *tet45*.

La secuencia se alineó, utilizando el software SnapGene y CLC Sequence Viewer 7.7.1, con secuencias correspondientes a los genes de resistencia *tetK*, *tetL* y *tet45* presentes en cepas de *Staphylococcus aureus* (*tetK*), *P. larvae* (*tetL*) y *Bhargavaea cecembensis* (*tet45*).

En el alineamiento con la secuencia del gen *tet45* correspondiente a la cepa *Bhargavaea cecembensis* DMV42A (You et al., 2013) se observó un 93% de similitud, difiriendo en 90 nucleótidos (Figura 27). Mientras que, en el alineamiento con la secuencia del gen *tetL* correspondiente al plásmido pPL395 de *P. larvae* (Alippi et al. 2014) se observó una 80% de similitud, difiriendo en 262 nucleótidos. Por último, en el alineamiento con la secuencia del gen *tetK* correspondiente al plásmido pT181 de *S. aureus* (Guay et al. 1993) se observó un 64% de similitud, difiriendo en 487 nucleótidos.







**Figura 27:** Alineamiento de las secuencias del gen de resistencia a TET encontrado en la cepa *B. cereus* m401 y el gen *tet45* de la cepa *Bhargavaea cecembensis* DMV42A.

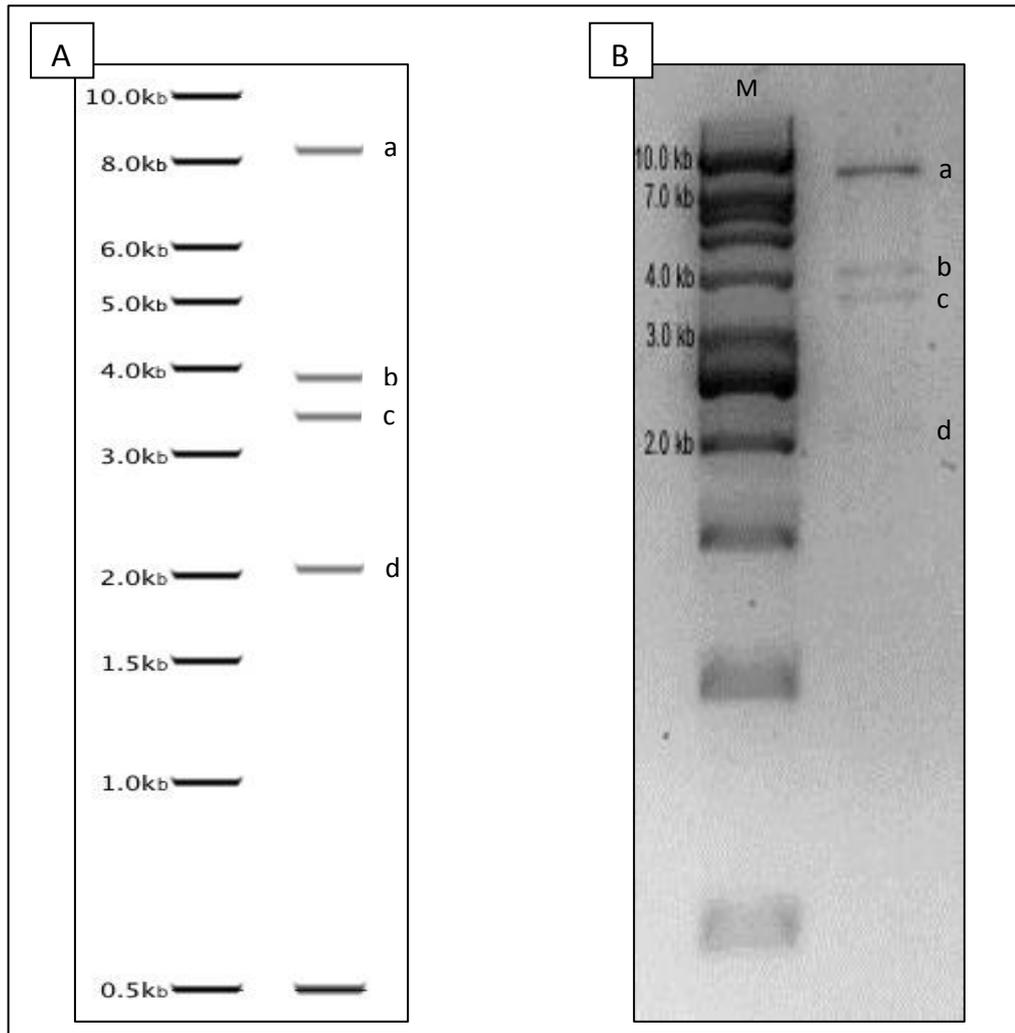
Luego de este análisis, se podría inferir que el gen de resistencia a TET presente en la cepa m401 se correspondería con el gen *tet45*, ya que muestra mayor homología (93%) con la secuencia de dicho gen, con respecto a los genes *tetL* (80%) y *tetK* (64%).

En la cepa m401, al realizar la amplificación del determinante de resistencia a TET: Tet L (sección “Detección por PCR de la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina”), se observó el producto de amplificación esperado de 788 pb. Esto puede haber ocurrido ya que se observó que las secuencias del cebador TetL utilizado en las sección 4.6 son homólogos a la secuencia del gen *tet* hallado en el *contig09* (Figura 28). Dicho *contig* contendría el gen *tet45* (You et al., 2013) que estaría amplificando con los cebadores TetL-F y TetL-R, resultando en el mencionado amplicón de 788 pb (You et al., 2012).



**Figura 28:** Esquema de la secuencia del gen de resistencia a TET de la cepa m401. En fucsia se señala el fragmento del gen que estaría amplificando el cebador TetL (788 pb).

Retomando el análisis de los plásmidos más pequeños pBCm401a (8.307 pb) y pBCm401b (9.934 pb), para verificar el patrón de restricción obtenido con la enzima *CfoI* en la digestión *in vitro* del ADN plasmídico de la cepa m401 (sección “Digestión del ADN plasmídico mediante enzimas de restricción”), se realizó una digestión *in silico* utilizando el software Geneious 9.1.2. Se obtuvieron los mismos fragmentos de restricción que se correspondieron con lo obtenido experimentalmente, y adicionalmente uno más pequeño que no se había logrado observar en el gel (Figura 29). Por esta razón se estima que los plásmidos obtenidos experimentalmente con las columnas comerciales fueron los plásmidos pBCm401a (8.307 pb) y pBCm401b (9.934 pb).



**Figura 29:** Digestión con la enzima *CfoI* de los plásmidos de pBCm401a y pBCm401b. **A:** simulación *in silico*; **B:** digestión *in vitro*. M: Marcador de peso molecular 1 kb (Genbiotech®). Fragmentos: **a:** entre 7.0 y 10.0 kb, **b:** aproximadamente 4.0 kb, **c:** entre 3.0 y 4.0 kb; **d:** mayor a 2.0 kb.

Al efectuar el análisis de los patrones de restricción con la enzima *CfoI* del ADN plasmídico de los transconjugantes de *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> y compararlos con los obtenidos a partir de la cepa dadora m401, se observaron los mismos fragmentos, sugiriendo que los plásmidos pBCm401a y pBCm401b fueron transferidos durante la conjugación.

A su vez, la obtención de los transconjugantes de *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> y *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup> que adquirieron resistencia a TET, sugerirían la transferencia del gen *tet* presente en la cepa dadora m401. No se pudo determinar

si la adquisición del gen se produjo por pasaje del supuesto megaplásmido o por transposición del gen, durante el proceso de conjugación.

Numerosos estudios reportan la existencia de fenotipos resistentes a TET en *B. cereus sensu lato*. Se han encontrado cepas de *B. cereus* conteniendo los determinantes de resistencia *tetK*, *tetL*, *tetM* y *otrA* (López et al., 2008) así como el gen *tet45* (Zhu et al., 2016). También se han reportado cepas de *B. cereus sensu lato* conteniendo el gen *tetL* y cepas conteniendo los genes *tetL* y *tetM* (Agero et al., 2002). Bernhard et al. (1978) encuentran cepas de *B. cereus* con plásmidos de resistencia a TET, mientras que Rather et. al (2012) encuentran plásmidos conteniendo los genes *tetA* y *tetB*.

El gen de resistencia *tet45* fue previamente reportado en *B. cereus*, en un elemento genético móvil de 6.789 pb (Zhu et al. 2016), sin embargo no se ha encontrado información de la presencia de este gen en megaplásmidos de *B. cereus*.

## 6. Consideraciones finales

El aumento de la prevalencia de la resistencia antimicrobiana en bacterias patógenas es el resultado de la evolución y la presión selectiva debido a la amplia implementación del uso de antibióticos en medicina veterinaria, alimentación animal y agricultura. Esta adaptación ocurre no por la mutación de las poblaciones amenazadas, sino mayormente por la adquisición y diseminación de genes simples de resistencia a antibióticos mediante elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y transposones. Estos elementos móviles distribuyen eficientemente los determinantes de resistencia a antibióticos, individualmente o en grupos, entre muchos géneros y especies bacterianas. En el caso de las tetraciclinas, la resistencia se debe a la adquisición de genes *tet* y *otr* asociados con plásmidos y/o transposones conjugativos.

Con el objeto de investigar la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina, oxitetraciclina y minociclina en cepas de *B. cereus* y *P. larvae* aisladas de miel y materiales del apiario y su correlación con la presencia de plásmidos salvajes se aplicaron procedimientos de microbiología y biología molecular.

A continuación se enumeran los resultados más interesantes de la presente tesis:

- Se investigó la presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina en cepas de *Bacillus cereus sensu lato* y *Paenibacillus larvae*, aisladas principalmente de miel, y su correlación con la presencia de plásmidos. Se observó una alta correlación entre la presencia de plásmidos y fenotipos resistentes a tetraciclina, detectándose mediante PCR el determinante de resistencia Tet L en ADN plasmídico en un 78% de las cepas estudiadas.
- La técnica de lisis *in situ* en gel de agarosa para la detección de plásmidos no resultó reproducible para todas las cepas estudiadas. En la mayoría de las cepas de *B. cereus*, la presencia de plásmidos sólo pudo confirmarse mediante el empleo de técnicas de extracción de ADN plasmídico utilizando un protocolo de lisis alcalina y/o el empleo de columnas comerciales.
- Los plásmidos observados en las cepas de *P. larvae* estudiadas serían similares a los plásmidos de replicación por círculo rodante hallados en otras cepas de *P. larvae*, pero diferentes a los encontrados en *B. cereus*.
- Los plásmidos de *B. cereus* estudiados resultaron diferentes entre sí y diferentes a otros reportados.
- La transferencia horizontal de genes de resistencia a TET entre la cepa *B. cereus* m401, resistente a TET, y las cepas *B. cereus* ATCC 11778 NAL<sup>R</sup> y *B. pumilus* m350 NAL<sup>R</sup>, susceptibles a TET, fue demostrada en los ensayos de conjugación obteniéndose transconjugantes para ambas cepasceptoras.
- Los transconjugantes obtenidos mostraron fenotipos resistentes a TET observándose el determinante de resistencia Tet L, al igual que la cepa dadora m401.

- Los resultados negativos en la obtención de transformantes mediante los ensayos de electroporación podrían explicarse debido a la presencia del gen de resistencia *tet* en un supuesto megaplásmido, cuya adquisición por parte de las células electrocompetentes podría estar dificultada por el gran tamaño del mismo.
- La secuenciación del genoma de la cepa m401, permitió confirmar la presencia de 3 plásmidos denominados: pBCm401a de 8.307 pb, pBCm401b de 9.934 pb y pBCm401 de 69.591 pb.
- Un gen de resistencia a TET, con 93% de homología al gen *tet45*, se detectó en un *contig* de 243.988 pb, que sería parte de un megaplásmido.

### Conclusiones

- Se corroboró la presencia de determinantes de resistencia a TET en cepas de *B. cereus* y *P. larvae*, aisladas de miel.
- Las cepas de *B. cereus* estudiadas presentaron perfiles plasmídicos diversos.
- Se confirmó la transferencia horizontal de genes de resistencia entre especies que comparten el mismo nicho ecológico.
- Este trabajo aportaría el primer registro de la presencia del gen de resistencia *tet45* en un posible megaplásmido de *B. cereus*.

## 7. Bibliografía citada

1. **Agerso, Y.; Jensen, L.B.; Givskov, M. & M.C. Roberts.** 2002. The identification of a tetracycline resistance gene *tet(M)*, on a Tn916-like transposon, in the *Bacillus cereus* group. FEMS Microbiology Letters 214: 251-256.
2. **Alekshun, M.N. & S.B. Levy.** 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell 128: 1037-1050.
3. **Alippi, A.M.** 1995. Detection of *Bacillus larvae* spores in Argentinian honeys by using a semi-selective medium. Microbiología Sem 11: 343-350.
4. **Alippi, A.M.** 2015. Evaluación de la diversidad fenotípica y genotípica de cepas de *Paenibacillus larvae* patógenas de abejas melíferas e investigación de los mecanismos moleculares de la resistencia a tetraciclina. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP, La Plata, Argentina. 292 pp.
5. **Alippi, A.M. & O.M. Aguilar.** 1998. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. Journal of Invertebrate Pathology 72: 21-27.
6. **Alippi, A.M.; I.E., León & A.C. López.** 2014. Tetracycline-resistance encoding plasmids from *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease, isolated from commercial honeys. International Microbiology 17: 49-61.
7. **Alippi, A.M.; López, A.C. & O.M. Aguilar.** 2002. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the cause of american foulbrood of honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology: 3655-3660.
8. **Alippi, A.M.; López, A.C.; Reynaldi, F.J.; Grasso, D.H. & O.M. Aguilar.** 2007. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus*

- larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Veterinary Microbiology* 125: 290-303.
9. **Alippi, A.M.; Reynaldi, F.J.; López, A.C.; de Giusti, M.R. & O.M. Aguilar.** 2004. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae larvae* and incidence of American foulbrood in Argentinean honeys from Buenos Aires province. *Journal of Apicultural Research* 43 (3): 131-139.
  10. **Amadio, A.F.; Benintende, G.B. & R.O. Zandomeni.** 2009. Complete sequence of three plasmids from *Bacillus thuringiensis* INTA-FR7-4 environmental isolate and comparison with related plasmids from the *Bacillus cereus* group. *Plasmid* 62: 172-182.
  11. **Atlas, R.M.** 1993. Handbook of microbiological media. CRC Press, Florida. 1079 pp.
  12. **Battisti, L.; Green, B.D. & C.B. Thorne.** 1985. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology*: 543-550.
  13. **Benada, O.; Drobníková, V.; Kalachová, L. & J. Ludvík.** 1988. Plasmid DNA in *Bacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research* 27: 35-39.
  14. **Bernhard, K.; Schrempf, H. & W. Goebel.** 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 133 (2): 897-903.
  15. **Bertani, G.** 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* (62): 293-300.
  16. **Betancor, L.; Gadea, M. & K. Flores.** 2006. Genética bacteriana. En: Temas de bacteriología y virología médica. Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene. Ed: Oficina del Libro FEMUR. Montevideo, pp: 59-80.
  17. **Budge, G.E.; Barret, B.; Jones, B.; Pietravalle, S.; Marris, G.; Chantawannacul, P.; Thwaites, R.; Hall, J.; Cuthbertson, A.G.S. & M.A. Brown.** 2010. The occurrence of *Melissococcus plutonius* in healthy colonies

- of *Apis mellifera* and the efficacy of European foulbrood control measures. *Journal of Invertebrate Pathology* 105: 164-170.
- 18. Burmeister, A.R.** 2015. Horizontal gene transfer. *Evolution, Medicine, and Public Health*: 193-194.
- 19. Chopra, I. & M. Roberts.** 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: 232-260.
- 20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2006a. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, Approved standard - Seventh edition. CLSI document M07-A07. Clinical and Laboratory Standard Institute. Wayne PA, EEUU.
- 21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2006b. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne PA, EEUU.
- 22. Conesa, A.; Götz, S.; García-Gómez, J.M.; Terol, M. & M. Roberts.** 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21 (18): 3674-3676.
- 23. Corby-Harris, V.; Maes, P. & K.E. Anderson.** 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLOS ONE* 9: 4.
- 24. da Silva, P.M.; Gauche, C.; Valdemiro Gonzaga, L.; Oliveira Costa, A.C. & R. Fett.** 2016. Honey: chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* 196: 309-323.
- 25. Davison, John.** 1999. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42: 73-91.
- 26. Daza Pérez, R.M.** 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 22 (3): 57-67.

27. **de Graaf, D.C.; Alippi, A.M.; Brown, M.; Evans, J.D.; Feldlaufer, M.; Gregorc, A.; Hornitzky M.; Pernal, S.F.; Schuch, D.M.T.; Titěra, D., Tomkies, V. & W. Ritter.** 2006. Diagnosis of American foulbrood in honey bees: a synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology* 43: 583-590.
28. **de Graaf, D.C.; Alippi, A.M.; Antúnez, K.; Aronstein, K.A.; Budge, G.; de Koker D.; de Smet, L.; Dingman, D.W.; Evans, J.D.; Foster, L.J.; Fünfhaus, A.; Garcia-Gonzalez, E.; Gregorc, A.; Human, H.; Murray, K.D.; Nguyen, B.K.; Poppinga, L.; Spivak, M.; Van Engelsdorp, D.; Wilkins, S. & E. Genersch.** 2013. Review Article: Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1), 2013.
29. **de la Cruz, F. & J. Davies.** 2000. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in Microbiology* 8 (3): 128-133.
30. **Delcher, A.L.; Bratke, K.A.; Powers, E.C. & S.L. Salzberg.** 2007. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics*, 23 (6): 673-679.
31. **Dingman, D.W. & D.P. Stahly.** 1983. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology* 46: 860-869.
32. **Eckhardt, T.** 1978. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588.
33. **Ellis, J.D. & P.A. Munn.** 2005. The worldwide health status of honey bees. *Bee World* 4: 88-101.
34. **Evans, J.D.** 2003. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate pathology* 83: 46-50.
35. **Fass, R.J. & J. Barnishan.** 1979. Minimal inhibitory concentrations of 34 antimicrobial agents for control strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and

- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 16 (5): 622-624.
- 36. Formato, G.; Menegotto A. & R. Jannoni-Sebastianini.** 2016a. Loque americana. Disponible en: <http://teca.fao.org/es/read/8417>. Último acceso: Julio 2017.
- 37. Formato, G.; Menegotto A. & R. Jannoni-Sebastianini.** 2016b. Loque europea. Disponible en: <http://teca.fao.org/es/read/8417>. Último acceso: Julio 2017.
- 38. Forsgren E.** 2010. European foulbrood in honey bees. Journal of Invertebrate Pathology 103: S5-S9.
- 39. Genersch, E.** 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology 103: S10-S19.
- 40. Gilliam, M.** 1979. Microbiology of pollen and bee bread: The genus *Bacillus*. Apidologie 10 (3): 269-274.
- 41. Gilliam, M. & D.B. Prest.** 1987. Microbiology of feces of the larval honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology 49: 70-75.
- 42. Glenwright, H.; Pohl, S.; Navarro, F.; Miro, E.; Jiménez, G.; Blanch, A.R. & C.R. Harwood.** 2017. The identification of intrinsic chloramphenicol and tetracycline resistance genes in members of the *Bacillus cereus* group (*sensu lato*). Frontiers in Microbiology 7:2122.
- 43. Goessweiner-Mohr, N.; Arends, K.; Keller, W. & E. Grohmann.** 2014. Conjugation in Gram-positive bacteria. Microbiology Spectrum 2 (4): PLAS-0004-2013.
- 44. Grohmann, E.; Günther, M. & M. Espinosa.** 2003. Conjugative plasmid transfer in Gram-Positive bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67 (2): 277-301.
- 45. Guay, G.G.; Khan, S.A. & D.M. Rothstein.** 1993. The *tet(K)* gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus* encodes an efflux protein that contains 14 transmembrane helices. Plasmid 30 (2): 163-166.

- 46. Hansen, H. & C.J. Brødsgaard.** 1999. American Foulbrood: a review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* 80: 5-23.
- 47. Iurlina, M.O. & R. Fritz.** 2005. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. *International Journal of Food Microbiology* 105: 297-304.
- 48. Ivanova, N.; Sorokin, A.; Anderson, I.; Galleron, N.; Candelon, B.; Kapatral, V.; Bhattacharyya, A.; Reznik, G.; Mikhailova, N.; Lapidus, A.; Chu, L.; Mazur, M.; Goltsman, E.; Larsen, N.; D'Souza, M.; Walunas, T.; Grechkin, Y.; Pusch, G.; Haselkorn, R.; Fonstein, M.; Ehrlich, S.D.; Overbeek, R. & N. Kyrpides.** 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423: 87-91.
- 49. Ives, C.L. & K.F. Bott.** 1989. Cloned *Bacillus subtilis* chromosomal DNA mediates tetracycline resistance when present in multiple copies. *Journal of Bacteriology* 180:1-1810.
- 50. Jara, M.A.** 2007. Tetraciclinas: un modelo de resistencia antimicrobiana. *Avances en Ciencias Veterinarias* 22: 49-55.
- 51. Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Meintjes, P. & A. Drummond.** 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28 (12): 1647-1649.
- 52. Kehrenberg, C.; Catry, B.; Haesebrouck, F.; de Kruif, A. & S. Schwarz.** 2005. *tet(L)*-mediated tetracycline resistance in bovine *Mannheimia* and *Pasteurella* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 56: 403-406.
- 53. King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E.** 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- 54. Kobayashi-Saegusa, H.; Iwamori, S.; Sakaguchi, R.; Sumita, Y.; Noguchi, N. & K. Shishido.** 1987. Four plasmids simultaneously maintained in *Bacillus*

- cereus*, a tetracycline-resistant isolate. *Agricultural and Biological Chemistry* 51 (6): 1665-1670.
- 55. Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas.** 2008. DNA – templado – miniprep – protocolo. Disponible en: <http://genoma.unsam.edu.ar/atcg/miniprep.html>. Último acceso: Junio 2017.
- 56. Lindström, A.; Korpela, S. & I. Fries.** 2008. The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 82-86.
- 57. López, A.C. & A.M. Alippi.** 2007. Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey. *International Journal of Food Microbiology*: 117: 175-184
- 58. López, A.C.; de Ortúzar, R.V.M. & A.M. Alippi.** 2008. Tetracycline and oxytetracycline resistance determinants detected in *Bacillus cereus* strains isolated from honey samples. *Revista Argentina de Microbiología* 40: 231-237.
- 59. Lorenzo-Díaz, F.; Solano-Collado, V.; Lurz, R.; Bravo, A. & M. Espinosa.** 2012. Autoregulation of the synthesis of the MobM relaxase encoded by the promiscuous plasmid pMV158. *Journal of Bacteriology* 7: 1789-1799.
- 60. Lorian, V.** 1980. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Ed: Williams & Wilkins. Baltimore.
- 61. Madigan, M.T.; Martinko, J.M & J. Parker.** 2004. *Genética bacteriana*. En: Brock. *Biología de los microorganismos*. Décima edición. Ed. Pearson Educación, S. A. Madrid, pp: 264-320.
- 62. Morán, N.A.** 2015. Genomics of the honey bee microbiome. *Current Opinion in Insect Science* 10: 22-28.

- 63. Mossel, D.A.A.; Koopman, M.J. & E. Jongerijs.** 1967. Enumeration of *Bacillus cereus* in food. *Applied Microbiology* 15(3): 650-653.
- 64. Mueller, J.H. & J.Hinton.** 1941. A protein-free medium for primary isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. *Experimental Biology and Medicine* 48 (1): 330-333.
- 65. Murray, K.D. & K.A. Aronstein.** 2006. Oxytetracycline-resistance in the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* is encoded on novel plasmid pMA67. *Journal of Apicultural Research* 45 (4): 207-214.
- 66. Murray, K.D. & K.A. Aronstein.** 2008. Transformation of the Gram-positive honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*, by electroporation. *Journal of Microbiological Methods* 75: 325-328.
- 67. Murray, K.D.; Aronstein, K.A. & J.H. de León.** 2007. Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Plasmid* 58: 89-100.
- 68. Ng, L.-K.; Martin, I.; Alfa, M. & M. Mulvey.** 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes* 15: 209-215.
- 69. Nikolakopoulou, T.L; Egan, S.; van Overbeek, L.S.; Guillaume G.; Heuer, H.; Wellington, E.M.H.; van Elsas, J.D.; Collard, J-M.; Smalla, K. & A.D. Karagouni.** 2005. PCR detection of oxytetracycline resistance genes *otr(A)* and *otr(B)* in tetracycline-resistant Streptomyces isolates from diverse habitats. *Current Microbiology* (51): 211-216.
- 70. OIE.** 2011a. American Foulbrood. En: OIE. *Terrestrial Animal Health Code*, vol. 2. Ed: OIE, France, pp: 504-506.
- 71. OIE.** 2011b. European Foulbrood. En: OIE. *Terrestrial Animal Health Code*, vol. 2. Ed: OIE, France, pp: 504-506.

- 72. Olaitan, P.B.; Adeleke, O.E. & I.O. Ola.** 2007. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. *African Health Sciences* 7 (3): 159-165.
- 73. Pacific Biosciences.** 2012. Extracting DNA using phenol-chloroform. Disponible en: <https://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/SharedProtocol-Extracting-DNA-usinig-Phenol-Chloroform.pdf>. Último acceso: Diciembre 2017.
- 74. Pedraza, R.O. & J.C. Díaz Ricci.** 2002. In-well cell lysis technique reveals two new megaplasmids of 103.0 and 212.6 MDa in the multiple plasmid-containing strain V517 of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 34: 130-133.
- 75. Phelan, R.W.; Clarke, C.; Morrissey, J.P.; Dobson, A.D.W; O’Gara, F. & T.M. Barbosa.** 2011. Tetracycline resistance-encoding plasmid from *Bacillus* sp. strain #24, isolated from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (1): 327-329.
- 76. Popowska, M.; Rzczycka, M.; Miernik, A.; Krawczyk-Balska, A.; Walsh, F. & B. Duffy.** 2011. Influence of soil use on prevalence of tetracycline, streptomycin, and erythromycin resistance and associated resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: 1434-1443.
- 77. Powell, J.E.; Martinson, V.G.; Urban-Mead, K. & N.A. Morán.** 2016. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology* (80) 23: 7378-7387.
- 78. Rather, M.A.; Aulakh, R.S.; Gill, J.P.S.; Mir, A.Q. & M.N. Hassan.** 2012. Detection and sequencing of plasmid encoded tetracycline resistance determinants (*tetA* and *tetB*) from food-borne *Bacillus cereus* isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*: 709-712.

- 79. Roberts, M.C.** 1996. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews* 19: 1-24.
- 80. Roberts, M.C.** 2011. Environmental macrolide-lincosamide-streptogramin and tetracycline resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2 (40).
- 81. Salamanca Grosso, G.; Henao Rojas, C.A.; Moreno, G.I. & A. Luna.** 2000. Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. Disponible en: <http://www.apiservices.biz/es/articulos/ordenar-por-popularidad/725-caracteristicas-microbiologicas-de-las-mieles-tropicales>. Último acceso: Diciembre de 2016.
- 82. Sakaguchi, R. & K. Shishido.** 1988. Molecular cloning of tetracycline-resistance determinant from *Bacillus subtilis* chromosomal DNA and its expression in *Escherichia coli* and *B. subtilis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 949: 49-57.
- 83. Sambrook, J. & D.W. Russell.** 2001. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS. En: *Molecular Cloning, a laboratory manual*, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed: Cold Spring Harbor, New York, pp: 1.31-1.32.
- 84. Servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria (SENASA).** 2016a. Cadena Animal. Abejas. Producción primaria. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/abejas/produccion-primaria>. Último acceso: Diciembre de 2016.
- 85. Servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria (SENASA).** 2016b. Cadena Animal. Abejas. Industria. Disponible en <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/abejas/industria>. Último acceso: Diciembre de 2016.
- 86. Servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria (SENASA).** 2016c. Senasa comunica. Noticias. Sanidad apícola: se recuerda que no está permitido el uso de antibióticos en las colmenas. Disponible en

<http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/noticias/se-recuerda-que-no-esta-permitido-el-uso-de-antibioticos-en-las-colmenas>. Último acceso: Diciembre 2017.

- 87. Snowden, J.A. & D.O. Cliver.** 1996. Microorganism in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31: 1-26.
- 88. Strommenger, B.; Kettlitz, C.; Werner, G. & W. Witte.** 2003. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*: 4089-4094.
- 89. Szybalski, W. & V. Bryson.** 1952. Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *Escherichia coli* to fifteen antibiotics. *Journal of Bacteriology* 64 (4): 489-499.
- 90. Trzcinski, K.; Cooper, B.S.; Hryniewicz, W. & C.G. Dowson.** 2000. Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45: 763-770.
- 91. Waite, R.; Brown, M.; Thompson, H. & M. Bew.** 2003. Controlling European foulbrood with the shook swarm method and oxytetracycline in the UK. *Apidologie* 34, 569–575.
- 92. Wang, H.; Liu, X.; Feng, E.; Zhu, L.; Wang, D.; Liao, X. & H. Wang.** 2011. Curing the plasmid pXO2 from *Bacillus anthracis* A16 using plasmid incompatibility. *Current Microbiology* 62: 703-709.
- 93. Wang, P.; Zhu, Y.; Zhang, Y.; Zhang, C.; Xu, J.; Deng, Y.; Peng, D.; Ruan, L. & M. Sun.** 2016. Mob/*oriT*, a mobilizable site-specific recombination system for unmarked genetic manipulation in *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Microbial Cell Factories* 15: 108.
- 94. Wilkins, B. & E. Lanka.** 1993. DNA processing and replication during plasmid transfer between Gram-negative bacteria. En: *Bacterial Conjugation*. Ed: D. B. Clewell, New York, pp: 105-137.

- 95. Wu, M.; Sugimura, Y.; Iwata, K.; Takaya, N.; Takamatsu, D.; Kobayashi, M.; Taylor, D.; Kimura, K. and M. Yoshiyama.** 2014. Inhibitory effect of gut bacteria from the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica*, against *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood disease. *Journal of Insect Science* (14): 1-13.
- 96. You, Y.; Hilpert, M. & M.J. Ward.** 2012. Detection of a common and persistent *tet(L)*-carrying plasmid in chicken-waste-impacted farm soil. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (9): 3203-3213.
- 97. You, Y.; Hilpert, M. & M.J. Ward.** 2013. Identification of Tet45, a tetracycline efflux pump, from a poultry-litter-exposed soil isolate and persistence of *tet(45)* in the soil. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 68: 1962-1969.
- 98. Zheng, J.; Peng, D.; Ruan, L. & M. Sun.** 2013. Evolution and dynamics of megaplasmids with genome sizes larger than 100 kb in the *Bacillus cereus* group. *BMC Evolutionary Biology* 13: 262.
- 99. Zhu, K.; Hölzel, C.S.; Cui, Y.; Mayer, R.; Wang, Y.; Dietrich, R.; Didier, A.; Bassitta, R.; Märtilbauer, E. & S. Ding.** 2016. Probiotic *Bacillus cereus* strains, a potential risk for public health in China. *Frontiers in Microbiology* 7: 718.