



BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

“DETECCIÓN DEL GEN *AzoR* EN AGUA
RESIDUAL Y EN CEPAS *E. COLI* PATÓGENAS
DEL RÍO ALSESECA”

TESIS PROFESIONAL
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN INGENIERÍA
AMBIENTAL

PRESENTA:
NADIA OROPEZA MIRANDA

DIRECTOR Y ASESOR DE TESIS:
D.C. EDITH CHÁVEZ BRAVO

FECHA Y LUGAR DE ENTREGA:
PUEBLA, PUE. AGOSTO 2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sin lugar a duda a la doctora Edith Chávez Bravo, porque además de dirigirme con paciencia durante este trabajo de investigación, sin saberlo fue quién generó en mí de nuevo el interés por mi carrera y fue quién me enseñó que había un sin fin de cosas microscópicas e interesantes por aprender, del mismo modo agradezco a la doctora Elizabeth Estrada Johnson por compartirme sus conocimientos siempre con la mejor disposición. Le Agradezco también al Instituto de Ciencias Químicas y al laboratorio de Patógenos por permitirme usar sus instalaciones, así como al equipo de trabajo por su agradable compañerismo.

Quiero agradecer a mis abuelos por apoyarme de forma incondicional a lo largo de toda mi vida, a mis hermanos por ser mi inspiración para no rendirme, a mis padres y a mi familia. Agradezco a la familia Guagnelli por el apoyo y el cariño que me han brindado, a los amigos que han sido mi ejemplo a seguir y a todos aquellos que han dejado parte de sí mismos en lo que ahora soy.

INDICE

1.	RESUMEN	1
1.1	ABSTRACT	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
3.	JUSTIFICACIÓN.....	4
4.	OBJETIVOS.....	5
4.1	OBJETIVO GENERAL	5
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES	5
5.	HIPÓTESIS.....	6
5.1	H1	6
5.2	H0	6
6.	MARCO TEÓRICO	6
6.1	ANTECEDENTES DEL RÍO ALSESECA	6
6.2	CONTAMINACIÓN DEL AGUA	7
6.2.1	CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS	8
6.2.1.1	<i>E. COLI</i>	9
6.2.1.2	EPEC.....	10
6.2.2	CONTAMINACIÓN POR COLORANTES	11
6.2.2.1	COLORANTES AZO.....	12
6.3	DEGRADACIÓN DE COLORANTES	13
6.4	AZO REDUCTASA.....	14
6.4.1	GEN AZOR.....	15

6.5	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	16
6.5.1	PCR	16
6.5.2	ELECTROFORESIS	18
6.6	HERRAMIENTAS DE BIOINFORMÁTICA.....	19
6.6.1	NCBI (National Center for Biotechnology Information)	19
6.6.2	CLUSTAL OMEGA	20
6.6.3	BOX SHADE	20
6.6.4	PRIMER 3	20
6.6.5	ASAP	20
7.	METODOLOGÍA.....	21
7.1	DISEÑO DE PRIMER	21
7.1.1	Búsqueda de secuencias del gen <i>AzoR</i> en <i>Escherichia coli</i>	21
7.1.2	Alineamientos y propuestas de primer.	24
7.2	PRUEBA DE PRIMERS EN CEPAS TIPO DE <i>E. coli</i>.....	27
7.2.1	Activación de cepas puras de laboratorio	27
7.2.2	Extracción de DNA.....	28
7.2.3	PCR	29
7.2.4	Corrimiento de electroforesis	30
7.3	DETECCIÓN DEL GEN <i>AzoR</i> EN CEPAS SILVESTRES RECUPERADAS DEL RÍO ALSESECA	31
7.4	DETECCIÓN DEL GEN <i>AzoR</i> EN AGUA RESIDUAL	32
8.	RESULTADOS	33
8.1	DISEÑO DE PRIMER	33
8.1.1	SECUENCIA DE GEN <i>AzoR</i> PERTENECIENTE A <i>E. coli</i>	33
8.1.2	SECUENCIAS HOMÓLOGAS DEL GEN <i>AzoR</i> EN DIFERENTES CEPAS DE <i>E. coli</i>	35
8.1.3	ALINEAMIENTOS DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DEL GEN <i>AzoR</i> EN DIFERENTES CEPAS DE <i>E. coli</i> . 37	
8.1.4	PRIMERS <i>AzoR</i> PARA <i>E. coli</i> SILVESTRE PATÓGENA.....	38
8.2	PRUEBA DE PRIMER <i>AzoR</i>	40
8.2.1	AMPLIFICACIÓN DEL GEN EN CEPAS TIPO DE <i>E. coli</i>	40
8.2.2	AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>AzoR</i> EN CEPAS SILVESTRES <i>E. coli</i> PATÓGENAS DEL AGUA RESIDUAL DEL RÍO ALSESECA.	41
8.2.3	AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>AzoR</i> EN LAS CEPAS DE <i>E. coli</i> SILVESTRES DE ACUERDO CON SUS PORCENTAJES DE REMOCIÓN.	42
8.2.4	AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>AzoR</i> en DNA TOTAL DE AGUA RESIDUAL.....	44
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	45
10.	CONCLUSIONES.....	49

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS DE ESCHERICHIA COLI CAUSANTES DE DIARREA. ¹⁶ 10

FIGURA 2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE UN COLORANTE AZOICO. 13

FIGURA 3. DEGRADACIÓN DE COLORANTES AZO A TRAVÉS DE AZOREDUCTASA..... 14

FIGURA 4. ESTRUCTURA GENERAL DE AZOR DE E. COLI. ²² 15

FIGURA 5. ÁRBOL FILOGENÉTICO, CHALANSONNET 2017..... 22

FIGURA 6. BLAST EN NCBI. ³⁴ 23

FIGURA 7. SECUENCIAS EN FORMATO FASTA INGRESADAS A CLUSTAL OMEGA. ³⁰ 24

FIGURA 8. INTERFAZ DE BOXSHADE. ³⁰ 25

FIGURA 9. ALINEAMIENTOS HECHOS CON BOXSHADE.³¹ 25

FIGURA 10. INTERFAZ DE PRIMER3 INPUT. ³⁵ 27

FIGURA 11. EXTRACCIÓN DE DNA POR CHOQUE TÉRMICO..... 28

FIGURA 12. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA PCR..... 29

FIGURA 13. TERMOCICLADOR..... 30

FIGURA 14. TERMOCICLADOR CON MUESTRAS..... 30

FIGURA 15. CARGANDO MUESTRAS EN GEL DE AGAROSA..... 31

FIGURA 16. INFORMACIÓN DEL GEN AZOR EN ESCHERICHIA COLI K12 OBTENIDA DE NCBI..... 34

FIGURA 17. REFERENCIAS CON CLAVE QUE OTORGA NCBI PARA ENCONTRAR LAS SECUENCIAS EN OTRAS BASES DE DATOS..... 34

FIGURA 18. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DEL GEN AZOR EN ESCHERICHIA COLI K12 EN FORMATO FASTA. 35

FIGURA 19. SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL GEN AZOR EN ESCHERICHIA COLI K12 EN FORMATO FASTA CON LONGITUD DE 606PB..... 35

FIGURA 20. INFORMACIÓN DEL GEN AZOR EN ESCHERICHIA COLI K12 OBTENIDA DE LA BASE DE DATOS ASAP, ASÍ COMO EL INICIO DEL BLAST. 36

FIGURA 21. LISTADO DE CEPAS Y SUS GENES HOMÓLOGOS AL GEN DE REFERENCIA OBTENIDOS AL REALIZAR UN BLAST.....	36
FIGURA 22. FORMATO FASTA DE UNA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS.....	37
FIGURA 23. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS A TRAVÉS DE CLUSTAL OMEGA.	38
FIGURA 24. ARCHIVO WORD QUE ARROJA BOX SHADE COMO ENTREGA DE LOS ALINEAMIENTOS CON FORMATO A COLOR.....	38
FIGURA 25. PROPUESTA DE PRIMERS AZOR1 VISTA DESDE PRIMER 3 INPUT.	39
FIGURA 26. PROPUESTA DE PRIMERS AZOR2 VISTA DESDE PRIMER 3 INPUT.	39
FIGURA 27. GEL DE AGAROSA CON LOS AMPLICONES DEL GEN AZOR VISTOS A TRAVÉS DE UN TRANSILUMINADOR UV.....	40
FIGURA 28. AMPLIFICACIÓN DEL GEN AZOR.....	44

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. CEPAS TIPO DE E. COLI EMPLEADAS PARA LA PRUEBA DE LOS PRIMERS.	28
TABLA 2. PROGRAMA 0804 PARA TERMOCICLADOR.	29
TABLA 3. CEPAS SILVESTRES RECUPERADAS DEL RÍO ALSESECA.....	32
TABLA 4. MUESTRAS DE DNA DEL TOTAL DE MICROORGANISMOS EN EL AGUA RESIDUAL.....	33
TABLA 5. LISTA DE SECUENCIAS HOMOLOGAS A LA SECUENCIA DE REFERENCIA ELEGIDAS.....	37
TABLA 6. PRIMER SINTETIZADOS PARA AMPLIFICACIÓN DE AZOR EN CEPAS DE E. COLI SILVESTRES PATÓGENAS	39
TABLA 7. REGISTRO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN AZOR EN LAS MUESTRAS.	41
TABLA 8. CONTINUACIÓN DEL REGISTRO DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN AZOR EN LAS MUESTRAS.....	42
TABLA 9. CLASIFICACIÓN DE LAS CEPAS EN RELACIÓN CON SUS PORCENTAJES DE REMOCIÓN.....	43

INDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. PORCENTAJES DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN AZOR EVIDENCIANDO LA PRESENCIA O AUSENCIA DEL GEN EN LAS CEPAS.	42
GRÁFICA 2. AMPLIFICACIÓN DEL GEN AZOR CORRESPONDIENTES A CLASIFICACIONES DE ACUERDO CON LA CLASIFICACIÓN POR REMOCIÓN.	43
GRÁFICA 3. PORCENTAJES DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN AZOR DE ACUERDO CON LAS CEPAS UTILIZADAS DE CADA CLASIFICACIÓN DE REMOCIÓN...	44

1. RESUMEN

Los colorantes azo utilizados en la industria textil son vertidos en el agua municipal y provocan un problema ambiental. Dichos contaminantes en el agua residual pueden ser degradados por bacterias mediante enzimas azo reductasas y generar metabolitos secundarios carcinogénicos. La incidencia de bacterias patógenas de *E. coli* en el agua residual va en aumento y representan un riesgo a la salud por originar brotes diarreicos, por lo que, el objetivo de este estudio fue detectar el gen azo reductasa en cepas *E. coli* enteropatógenas (EPEC) del agua residual debido a su alta incidencia y determinar su posible impacto al ambiente. Para ello se tomaron cepas EPEC aisladas e identificadas del agua residual del río Alseseca en el 2018 y a través de la biología molecular se detectó el gen azo reductasa utilizando a la cepa *E. coli* K12 como control positivo. Se usaron herramientas de bioinformática para diseñar primers específicos del gen azo reductasa para *E. coli*, mediante la técnica de PCR se amplificó el fragmento de DNA y posteriormente se realizó un corrimiento electroforético para ser visualizado con bromuro de etidio en un transiluminador de UV. El 75% (24/32) de las cepas EPEC aisladas del agua residual amplificaron el gen azo reductasa de 432pb, que concuerda con el amplicón positivo. Los resultados del estudio demuestran que las cepas EPEC recuperadas del agua residual contienen el gen azo reductasa, sugiriendo su capacidad para degradar colorantes azo y contribuir posiblemente a la contaminación química del agua residual, generando metabolitos secundarios carcinogénicos como las aminas aromáticas.

Palabras clave: colorantes, agua residual, azo reductasa, EPEC.

1.1 ABSTRACT

The azo dyes used in textile industries are discharged in the municipal water causing serious environmental problems. These wastewater contaminants can be degraded by bacteria through azoreductase enzymes generating carcinogenic secondary metabolites. The incidence of pathogenic *E. coli* bacteria in wastewater is increasing, which represents a health risk due to diarrhea outbreaks. The objective of this study was to detect the azoreductase gene in enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains from the wastewater, due to its high incidence and determine the possible environmental impact. To this end, were used EPEC strains isolated and identified from the wastewaters of the Alsesecca river in 2018, and through molecular biology the azoreductase gene was detected using the *E. coli* K12 strain as a positive control. By bioinformatics tools specific azoreductase primers were designed, employing the PCR technique, the DNA was amplified then an electrophoresis running and bromide staining was done to visualized the band in the UV transilluminator. The 75% (24/32) of the isolated EPEC strains from the wastewater amplified the azoreductase gene with 432bp band size that matches with the positive control. The results of these study show that the recovered EPEC strains from the wastewater have the azoreductase gene, this suggests that this bacteria have the ability to degrade the azo dyes and contribute in generate possible chemist pollution in the wastewater, generating secondary carcinogenic metabolites like aromatic amines.

Keywords: dyes, wastewater, azoreductase, EPEC.

2. INTRODUCCIÓN

La contaminación de cuerpos hídricos se traduce en problemas de salud pública que afectan no solo las poblaciones humanas y animales, sino también al ecosistema. Se estima que 1 800 millones de personas en el mundo consumen agua contaminada con heces fecales provocando enfermedades infecciosas como las gastrointestinales. Las tasas elevadas de morbilidad infantil por enfermedad diarreica aguda es un claro ejemplo de los resultados de la contaminación del agua. Los contaminantes incluyen, por un lado, microorganismos bacterianos, virales, fúngicos y parasitarios y, por el otro, sustancias químicas simples o complejas, como colorantes o detergentes entre otros. ¹

En países en vías de desarrollo, sus aguas residuales se descargan en un 90% sin tratamiento a diferentes cuerpos de agua y aproximadamente dos millones de toneladas de residuos industriales, domésticos y agrícolas, son desechados de igual forma en ríos o canales. Dentro de las industrias, la textil genera una gran cantidad de agua contaminada con colorantes al medio ambiente ya que estos son utilizados en los procesos de teñido. La industria textil es la de mayor consumo y empleo de diferentes tintes y colorantes sintéticos. La producción anual de estos se calcula en 700,000 toneladas. Se estima que hasta un 50% de los colorantes utilizados en la industria textil termina en las aguas municipales debido a su bajo grado de fijación en las telas. ²

Actualmente existe una gran cantidad de colorantes comerciales disponibles en el mercado global. El 70% de los colorantes orgánicos del mercado corresponden a los de tipo azo, siendo este grupo de colorantes el más importante de la industria textil.

² Se caracterizan por ser recalcitrantes, tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos; ya sea

directamente o por productos de descomposición como sus compuestos aromáticos y aminas. ³ Éste contaminante químico presente en el agua residual puede ser degradado de forma biológica por bacterias mediante enzimas azo reductasas las cuales catalizan la lisis reductiva del grupo azo (-N=N-). ⁴ Esta degradación puede generar metabolitos secundarios como aminas aromáticas las cuales son carcinogénicas provocando un aumento en la contaminación química del agua.

La formación de aminas aromáticas durante la degradación biológica de los colorantes azo en aguas residuales textiles, sigue siendo motivo de preocupación. Durante la última década algunos estudios han puesto en evidencia que las aminas aromáticas presentan dificultades para degradarse.

3. JUSTIFICACIÓN

En la Ciudad de Puebla se desarrollaron yacimientos poblacionales en los márgenes de sus ríos, como el San Francisco, el Atoyac y el Alseseca, facilitando el desarrollo económico y social del municipio, pero aumentando los problemas de contaminación. El modo de vida moderno ha hecho a la población más consumista propiciando la generación de desechos convirtiendo a los ríos y las lagunas en los principales vertederos.

El río Alseseca es receptor de desechos sólidos y de descargas de aguas residuales municipales e industriales a lo largo de su recorrido, provocando su degradación y contaminación. ⁵ Puebla es conocida por sus industrias textiles, lo cual es un factor que influye en las descargas de colorantes al río, dentro de los principales colorantes utilizados se encuentran los colorantes azo. Por otro lado, los contaminantes

biológicos existentes en el río son alarmantes, este río se ha convertido es un reservorio de bacterias patógenas.

En México se ha aislado el patógeno *E. coli* aproximadamente en un 63.9% como agente principal productor de diarrea después de un desbordamiento de aguas residuales. Según estudios hechos al río Alseseca, el porcentaje de cepas encontradas pertenecientes al grupo de *E. coli* enteropatógena (EPEC) es alto, con un 62.26 % de cepas identificadas como EPEC podemos decir que es el patogruppo más común en el río Alseseca. ⁶

Este estudio se dedica a la detección del gen que codifica la enzima que se encarga de la degradación de los colorantes azo en bacterias EPEC aisladas de muestras del río Alseseca, debido a los altos casos de incidencia que se presentan y a la preocupante contaminación química que esta degradación podría traer consigo debido a los metabolitos secundarios que se generan.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar la existencia del gen Azo Reductasa en el agua residual y en cepas silvestres de *E. coli* patógenas del río Alseseca.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar primer de *AzoR* para cepas *E. coli* patógenas mediante el uso de herramientas de bioinformática.
- Amplificación del gen *AzoR* en bacterias tipo y en agua residual mediante la técnica de PCR.

- Detección molecular del gen *AzoR* en cepas silvestres de *E. coli* patógenas recuperadas del agua residual del río Alseseca.

5. HIPÓTESIS

5.1 H1

Las cepas silvestres de *E. coli* patógenas pertenecientes al agua residual de río Alseseca contienen el gen que codifica a la enzima Azo Reductasa por lo que son capaces de degradar los colorantes Azo en el río.

5.2 H0

Las cepas silvestres de *E. coli* patógenas pertenecientes al agua residual de río Alseseca no contienen el gen que codifica a la enzima Azo Reductasa por lo que no son capaces de degradar los colorantes Azo en el río.

6. MARCO TEÓRICO

6.1 ANTECEDENTES DEL RÍO ALSESECA

El río Alseseca se encuentra ubicado en el municipio de Puebla en la zona oriente, haciendo un recorrido de norte a sur dentro de la mancha urbana. Iniciando en las faldas de la montaña Malintzi ($19^{\circ} 05' 59''$ N y $98^{\circ} 05' 24''$ O) y desembocando en la localidad de San Francisco Teotimehuacan, en la presa Manuel Ávila Camacho ($18^{\circ} 57' 21''$ N y $98^{\circ} 11' 13''$ longitud O), con una longitud de cauce principal de 30.491 km. ⁵

El crecimiento poblacional y la mala planeación en el desarrollo urbano han propiciado la contaminación del río Alseseca convirtiéndolo en un cuerpo hídrico receptor de aguas residuales y de desechos tanto industriales como domésticos como lo es la materia fecal o los restos alimenticios. Las implicaciones que esto puede tener en la salud de las poblaciones aledañas a lo largo de toda su cuenca son evidentes, debido a que los agentes involucrados en la transmisión hídrica son bacterias, virus y protozoos, que pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde gastroenteritis simple hasta casos fatales de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea. ⁷

En un estudio hecho al río Alseseca y al río Atoyac se encontraron 13 descargas que vierten aguas residuales a estos ríos y sólo cuatro de ellas cumplen con lo establecido en la NOM-001 y aún pese a cumplir las normas los resultados del análisis fueron desfavorables evidenciando la contaminación sufrida por los cuerpos hídricos. ⁸

Otro problema relacionado con la contaminación del río Alseseca se refiere a la posibilidad de utilizar el agua de este efluente para el riego, lo cual debe descartarse por completo ya que, al recibir importantes descargas de zonas habitacionales sin previo tratamiento, se puede incrementar la contaminación por su contenido de coliformes, reportando a *E. coli* como el microorganismo más representativo. ⁵

6.2 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

El agua es un elemento esencial para la vida de todos los seres vivientes del planeta, además es un derecho humano fundamental. El agua potable está amenazada por la continua contaminación que genera la actividad humana y por la disminución de los recursos hídricos como consecuencia del calentamiento global. Según la Organización

Mundial de la Salud, desde el año 2015 solo el 89% de la población mundial tiene acceso a agua apta para consumo y se anticipa que este porcentaje continuará disminuyendo, aunque se estima que la situación ya es crítica para 260 millones de personas que carecen de agua apta para el consumo. ¹

La contaminación del agua es un elemento importante que incide en la calidad de la producción agrícola y en la salud de la población. Al agua contaminada, en general, se le califica como residual. Por las fuentes de generación, se define como la combinación de los residuos líquidos procedentes de residencias, instituciones públicas, establecimientos industriales y comerciales. ⁹

El mayor impacto lo sufren aquellos países en vías de desarrollo, que descargan cerca del 90% de sus aguas residuales sin ningún tratamiento a los ríos, lagos y zonas costeras, contaminando así sus fuentes de abasto. En México, son escasos los estudios sistemáticos realizados a la fecha e incluso, se enfrenta el problema de que las autoridades federales, estatales y municipales no cuentan con datos actualizados de la calidad del agua de los ríos urbanos. ¹⁰

6.2.1 CONTAMINACIÓN POR MICROORGANISMOS

Las enfermedades infecciosas representan un gran riesgo y son la principal causa de muerte en niños y adultos jóvenes. Según información facilitada por la Organización Mundial de la Salud, considerando únicamente las enfermedades diarreicas frecuentemente asociadas al consumo de agua o alimentos contaminados, aproximadamente 2 millones de personas mueren cada año, mayoritariamente niños de menos de 5 años.

En nuestro país las enfermedades infecciosas gastrointestinales ocupan el tercer lugar dentro de las principales veinte causas de mortalidad preescolar y el quinto lugar en

mortalidad infantil, hecho que resalta la importancia de este padecimiento.¹¹ Las enfermedades gastrointestinales infecciosas son causadas por bacterias (principalmente *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*), parásitos (*Giardia lamblia* y amibas), y virus (Rotavirus y virus Norwalk) al consumir alimentos y agua contaminados con materia fecal.¹²

Las aguas residuales municipales son la principal fuente de microorganismos patógenos que se transmiten a través del ambiente y que llegan a la población especialmente a través de la contaminación del agua usada para beber, agua utilizada en cultivos de vegetales, en la preparación de comida, para lavar, en el baño o en los diversos usos recreativos.¹³

6.2.1.1 *E. COLI*

Entre los microorganismos que con mayor frecuencia causan la diarrea del viajero están las originadas por *E. coli* diarrogénicas, presentándose en más de 50% de los casos. Se ha establecido que cepas resistentes de *E. coli* pueden persistir por muchos meses o años en el ambiente.¹⁴

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, usualmente móvil por flagelos peritricos, cuyo hábitat es el intestino de animales de sangre caliente. Esta bacteria es utilizada como indicador de posible contaminación fecal y presencia de patógenos en agua y alimentos debido a que se encuentra abundantemente en heces de humanos y animales.¹⁵ Aunque *Escherichia coli* puede ser un residente inocuo del tracto gastrointestinal, agrupa diversas cepas que causan padecimientos extraintestinales, y otras que destacan entre los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico.¹²

Hay descritos seis grupos de *E. coli* productora de diarrea: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC),

enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC); cada uno de ellos con síntomas clínicos, epidemiología y factores de patogenicidad característicos descritos en la Figura 1. ¹⁶

Grupo	Síntomas clínicos	Epidemiología	Serogrupos y serotipos más comunes	Factores de patogenicidad
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de dos años y diarrea del viajero	O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-O27:H7,O78:H12, O148:H28, O159:H20	ST y LT CFA
EHEC	SUH, CH, diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida	O157:H7 O26:H11, O103:H2, O113:H21 O119,O128, O145	STX A/E Intimina pO157
EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, también se presenta cuadro disintérico	Niños menores de seis meses	O28:H, O112ac:H-, O144:H-, O152:H-, I64:H-O167:H-	Invasividad Plásmido de 140MDa
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito, fiebre baja	Niños menores de seis meses hasta dos años	O55, O86, O142, O111:H- O127,	A/E, BFP Plásmido EAF de 50-70MDa
EAEC	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta 20 días	Recién nacidos y niños menores de dos años	O44:H18	Fimbria AAFI y II EASTI Proteínas Pet y Pic OMP Plásmido de 60 MDa Citotoxina
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	O126:H27	Fimbria F1845 OMP

LT= toxina termolábil
 ST= toxina termo estable
 CFA= factor de colonización antigénico
 BFP= pili con forma rizada

EAF= factor de adherencia de EPEC
 OMP= proteína de membrana externa
 STX= toxina shiga
 EAST= toxina ST de cepas enteroagregativas

Figura 1. Características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea. ¹⁶

6.2.1.2 EPEC

EPEC fue reconocida como una causa importante de muerte en brotes epidémicos en guarderías de países como Estados Unidos e Inglaterra a mediados del siglo pasado, desde 1998, se sabe que la infección tiene una tasa alta de morbilidad y mortalidad entre la población infantil de países en vías de desarrollo. ¹¹ Dentro de la vigilancia epidemiológica que llevan a cabo las autoridades de salud de México, se ha reportado que el EPEC se presenta de manera endémica hasta en 6% de la población. ¹²

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El

período de incubación de la infección varía entre las 3 a 24 horas después que el individuo ingiere un inóculo grande de bacterias (10^9 a 10^{10}) en condiciones experimentales, se cree que el inóculo que infecta de manera natural a los niños es mucho menor. De manera notable, se ha reportado que en algunos países sobre todo en vías de desarrollo los rangos de mortalidad en la población infantil afectada que van desde el 20 al 50%, lo que hace a la infección por EPEC una entidad clínica de inmediata respuesta. ¹¹

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas. El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción. ¹⁶

6.2.2 CONTAMINACIÓN POR COLORANTES

Uno de los mayores problemas a nivel ambiental es la contaminación de las aguas por vertimiento de contaminantes de diferente índole. La industria textil industria utiliza una gran variedad de sustancias químicas que contaminan el agua de proceso, generando agua residual donde los contaminantes son extremadamente diversos y varían de acuerdo con el tipo de fibra, hilo o tela, proceso o productos químicos usados. ¹⁷ Los efluentes líquidos que son generados al final de los diversos procesos contienen contaminantes de muy diversa naturaleza, entre ellos sales inorgánicas, almidón, peróxidos, EDTA, tensoactivos, enzimas, surfactantes, colorantes, metales y otros compuestos orgánicos de variada estructura.

En la actualidad se utilizan diferentes tipos de tintes en las industrias, clasificados en dos grandes grupos: los colorantes y los pigmentos. Los colorantes son solubles en agua y son definidos como compuestos capaces de impartir color a una fibra, sin ser afectados por factores como la luz, temperatura y jabón. ²

Esta industria representa a uno de los sectores que más consumo de agua presenta, consume alrededor del 15% del total del agua empleada para labores industriales en el mundo, debido a que una gran parte del proceso es realizado en fase húmeda; limpieza de materias primas y productos, llenado, carbonizado, desmenuzado, blanqueado, mercerizado y teñido. ¹⁸ Las empresas textiles y de teñido utilizan grandes cantidades de colorantes. El proceso de tinturado no es completamente eficiente, porque un porcentaje de los colorantes es vertido en las aguas residuales de estas empresas. Bajas concentraciones de colorantes alteran notablemente la estética de los cuerpos de agua. ⁴

Actualmente existe una gran cantidad de colorantes comerciales disponibles en el mercado global, se estima que hay más de 100.000 colorantes comercialmente disponibles, muchos de ellos son tóxicos para la vida acuática, mutagénicos a los seres humanos y recalcitrantes a la biodegradación. ¹⁸

6.2.2.1 COLORANTES AZO

Los colorantes azo representan entre 60 y 75 % de los colorantes producidos actualmente. Se utilizan ampliamente en la industria cosmética, del papel, optoelectrónica, textil, etc. Desafortunadamente una vez utilizados, debido a su alta resistencia a tratamientos convencionales de aguas residuales, contaminan los cuerpos de agua donde son descargados. ¹⁹ Aproximadamente entre el 10 y 15% de la producción total de colorantes tipo azo son descargados al medio ambiente a través del agua residual. ¹⁷

Los colorantes azoicos poseen en su estructura química uno o más grupos cromóforos azo (-N=N-) conjugado con anillos aromáticos en ambos extremos y son los más usados en la industria como podemos observar en la Figura 2. ²⁰ Se entiende convencionalmente que se refieren a moléculas orgánicas disueltas, como cromóforos moleculares, en el medio de aplicación. Las moléculas de colorantes orgánicos tienen como componente principal al cromógeno, un compuesto químico que podría ser de color o coloreado por la unión de un sustituyente adecuado. Está compuesto por el cromóforo y auxocromo. El cromóforo es un grupo químico responsable de la aparición del color en los compuestos donde se encuentra, sin embargo, el propio grupo cromóforo no es capaz de determinar un color o matiz; para ello necesita del auxocromo (auxiliar del color), un grupo sustituyente que influye en el desplazamiento del color en el espectro y se utiliza con mayor influencia en la solubilidad del colorante; por ejemplo: ácidos carboxílicos, ácido sulfónico, amino, e hidroxilo. ²¹

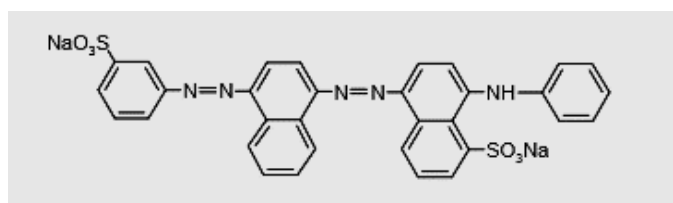


Figura 2. Estructura química de un colorante azoico.

6.3 DEGRADACIÓN DE COLORANTES

En particular, la capacidad de las células bacterianas de metabolizar colorantes azoicos ha sido ampliamente investigada. En condiciones anaerobias muchas bacterias son capaces de romper el enlace azo altamente electrofílico en la molécula

de colorante produciendo aminas aromáticas incoloras tóxicas y mutagénicas para animales.¹⁸ En los últimos años se ha descrito que los microorganismos que degradan colorantes azoicos producen una variedad de enzimas incluyendo azoreductasa, lacasa, peroxidasa, tirosinasa, NADH-DCIP reductasa, MG reductasa y aminopirina N-desmetilasa (Figura 3). Entre estas, las azoreductasas, lacasas y peroxidasas son las principales enzimas responsables de la degradación de los colorantes azoicos.²¹

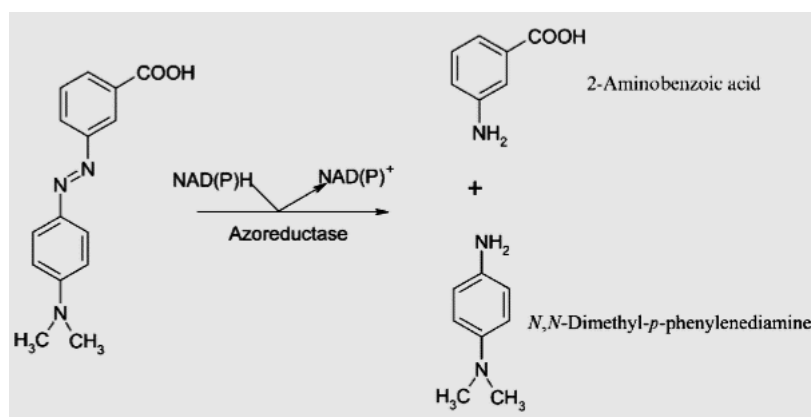


Figura 3. Degradación de colorantes azo a través de azoreductasa.

6.4 AZO REDUCTASA

De acuerdo con el mecanismo de la reducción biológica la transferencia de equivalentes reductores originado a partir de la oxidación de sustratos orgánicos de los colorantes azo, las enzimas especializadas catalizan la reducción de los enlaces, aunque existen otras enzimas que son no especializadas que catalizan la reducción de un amplio rango de compuestos incluyendo los tipos azo. La enzima responsable es llamada azoreductasa (Figura 4) que es encontrada en bacterias tanto aerobias como facultativas que tomaron al colorante azo como única fuente de carbono y de energía.

Las azoreductasas son flavoproteínas en estructuras muy diversas, de naturaleza citoplasmáticas y extracelulares y función. En su mayoría se expresan constitutivamente; sin embargo, a veces también se han encontrado inducidas en presencia de colorante. Estas enzimas catalizan el clivaje reductor de enlaces azo ($-N=N-$), produciendo aminas aromáticas incoloras. El principal mecanismo de acción descrito para las azoreductasas es mediante la reducción de colorantes azo por transferencia de electrones a un mediador redox (NADH, NADPH, FAD, etc.) en la superficie celular que sirve como transportador de electrones ubicado en la membrana externa (en el caso de bacterias Gram negativas) y la molécula de colorante. Los mediadores redox dentro de la célula, aceptan electrones de la cadena respiratoria, transfiriéndolo a la molécula de colorante azo para romper el enlace. ²¹

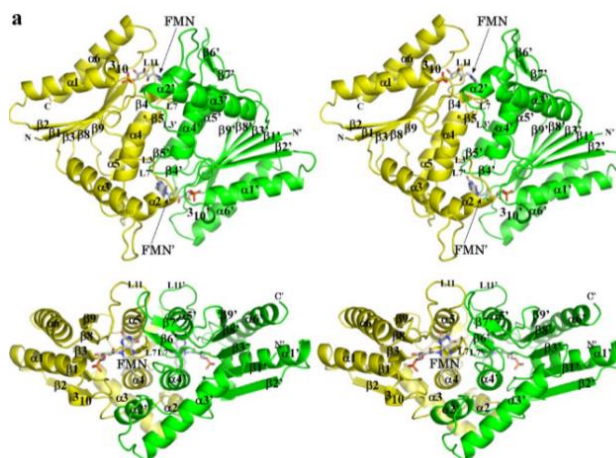


Figura 4. Estructura general de AzoR de *E. coli*. ²²

6.4.1 GEN AZOR

La combinación de tripletas de nucleótidos conforma el código genético, en el que cada aminoácido está codificado por una, al menos, de esas tripletas, a saber: dGTP, dCTP, dATP y dTTP. Mediante los procesos de transcripción y de traducción, fragmentos específicos de DNA (genes) se traducen en cadenas lineales de secuencias

definidas de aminoácidos, llamadas polipéptidos. La mayor parte de estos polipéptidos formarán enzimas, las cuales catalizan reacciones bioquímicas específicas en diferentes vías metabólicas de los organismos. ²³

El gen *AzoR* se identificó mediante secuenciación N-terminal en una preparación de fosfodiesterasa de proteína portadora de acilo y se confundió con el gen *acpS*. ²⁴

6.5 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

La biología molecular es un área de la biología referida al proceso de la transcripción del gen para rendir el ARN, la traslación del ARN en las proteínas y el papel juego de esas proteínas en la función celular. Desde hacía 1960, los biólogos moleculares han desarrollado métodos para determinar, para aislar, y para manipular componentes moleculares en células incluyendo la DNA, el ARN, y las proteínas. Un gran número de estas técnicas de identificación rápida se han desarrollado con base en la amplificación enzimática de secuencias específicas de ácidos nucleicos, estas técnicas incluyen: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism), ribotyping (ribotipificación), PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis), RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN) Ampliación al azar del ADN y el Spoligotyping. ²⁵

6.5.1 PCR

La PCR es una técnica para la síntesis "in vitro" de secuencias específicas de ADN. Es una forma simple y muy rápida de multiplicar el ADN presente en diferentes muestras biológica, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de ADN. En poco tiempo esta técnica ha conseguido ser ampliamente utilizada no

sólo en el campo de la genética molecular, sino en otras muchas ciencias. Las siglas PCR significan "Polimerase Chain Reaction", Reacción en Cadena de la Polimerasa. El inventor de esta interesante técnica fue Kary Mullis por la cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993. Mullis se basó en la replicación del ADN en los organismos eucariotas realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la síntesis de una cadena complementaria de DNA en el sentido 5' → 3' usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región doble cadena se usan los denominados cebadores (primers). Son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.²⁶

Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima, actualmente la polimerasa que se utiliza es la Taq polimerasa, es una enzima termoestable aislada de *Thermus aquaticus* (Taq), una bacteria que soporta altas temperaturas, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ion magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR:

1. Desnaturalización del ADN doble cadena.
2. Hibridación de los cebadores a la zona 3' específica de cada una de las hebras.
3. Extensión del cebador por actuación de la DNA polimerasa.

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya.

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65°C).

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' → 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los deoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde.

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos ²⁷.

6.5.2 ELECTROFORESIS

La detección del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa, también llamado amplicón, se realiza normalmente mediante corrido electroforético. Dependiendo del tamaño de la amplificación y de la resolución que deseemos usaremos diferentes geles (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio (lámpara de luz UV), tinción de plata, fluorescencia, radiactividad (radiografía). ²⁶

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño van a emigrar de forma distinta en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en dicha electroforesis se aplican marcadores de peso molecular (fragmentos de DNA de tamaño conocido) se puede calcular el tamaño aproximado del DNA en estudio. ²⁸

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\beta(1\rightarrow4)$. Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm. Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C.

En el caso de los geles de agarosa, se le añade bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y es fluorescente cuando se ilumina con luz ultravioleta. Tras la electroforesis, se visualiza el gel con una lámpara de luz UV, y se verán las bandas correspondientes a las muestras de DNA aplicado y los marcadores de peso molecular.²⁹

6.6 HERRAMIENTAS DE BIOINFORMÁTICA

6.6.1 NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION)

El Centro Nacional de Información Biotecnológica promueve la ciencia y la salud al proporcionar acceso a información biomédica y genómica. Es un recurso nacional para obtener información sobre biología molecular, NCBI se encarga de desarrollar nuevas tecnologías de la información para ayudar a comprender los procesos moleculares y genéticos fundamentales que controlan la salud y la enfermedad. Más específicamente, NCBI se ha encargado de crear sistemas automatizados para almacenar y analizar el conocimiento sobre biología molecular, bioquímica y genética; facilitar el uso de tales bases de datos y software por parte de la comunidad médica y de investigación; coordinar esfuerzos para recopilar información sobre biotecnología a nivel nacional e internacional; y realizar investigaciones sobre métodos avanzados

de procesamiento de información por computadora para analizar la estructura y función de moléculas biológicamente importantes. ²⁴

6.6.2 CLUSTAL OMEGA

Clustal Omega es un nuevo programa de alineación de secuencias múltiples de propósito general para ADN o proteínas. Intenta calcular la mejor coincidencia para las secuencias seleccionadas y las alinea para que se puedan ver las identidades, similitudes y diferencias. Utiliza árboles de guía sembrados y técnicas de perfil de perfil HMM para generar alineaciones entre tres o más secuencias. ³⁰

6.6.3 BOX SHADE

Es un programa para crear impresiones de buena apariencia a partir de secuencias de ADN o proteínas alineadas en forma múltiple. El programa no realiza ninguna alineación por sí mismo, tiene que tomar como entrada un archivo preprocesado por un programa de alineación múltiple o un editor de múltiples archivos. En la salida estándar de BOXSHADE, los residuos idénticos y similares en el gráfico de alineación múltiple se representan mediante diferentes colores o sombreados. ³¹

6.6.4 PRIMER 3

Este programa nos permite conocer la viabilidad de un primer. Está programado para calcular temperatura de alineamiento, tamaño del fragmento que se amplificará, porcentaje de guaninas y citosinas, entre otros parámetros que se deben tomar en cuenta para el diseño de los cebadores y su óptimo funcionamiento. ³²

6.6.5 ASAP

Es una base de datos relacional y una interfaz web desarrollada para almacenar, actualizar y distribuir datos de secuencias genómicas y datos de expresión génica

recopilados por o en colaboración con investigadores de la Universidad de Wisconsin - Madison.

Gran parte del trabajo que realizan se centra en caracterizar y comprender la diversidad de las enterobacterias, un grupo que incluye los patógenos humanos y animales muy estudiados, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Yersinia*, así como los patógenos menos apreciados de las plantas, *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Dickeya* y *Pantoea*, además de miembros con varios otros estilos de vida simbióticos y de vida libre. La sección de genomas y datos proporciona enlaces a secuencias, anotaciones y datos experimentales, además de información sobre proyectos de genoma en curso con personal y colaboradores de GEL (Genome Evolution Laboratory).³³

7. METODOLOGÍA

7.1 DISEÑO DE PRIMER

7.1.1 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DEL GEN *AzoR* EN *ESCHERICHIA COLI*.

Para diseñar un primer que logre amplificar el gen *AzoR* en cepas de *Escherichia coli* patógenas silvestres primero fue necesario conocer secuencias del gen dentro de esta familia. Chalansonnet presenta en un artículo publicado en 2017 un árbol filogenético en donde se enlistan cepas de diferentes bacterias que poseen el gen *AzoR* (Figura 5), entre ellas se encuentra una perteneciente a la familia *E. coli*.

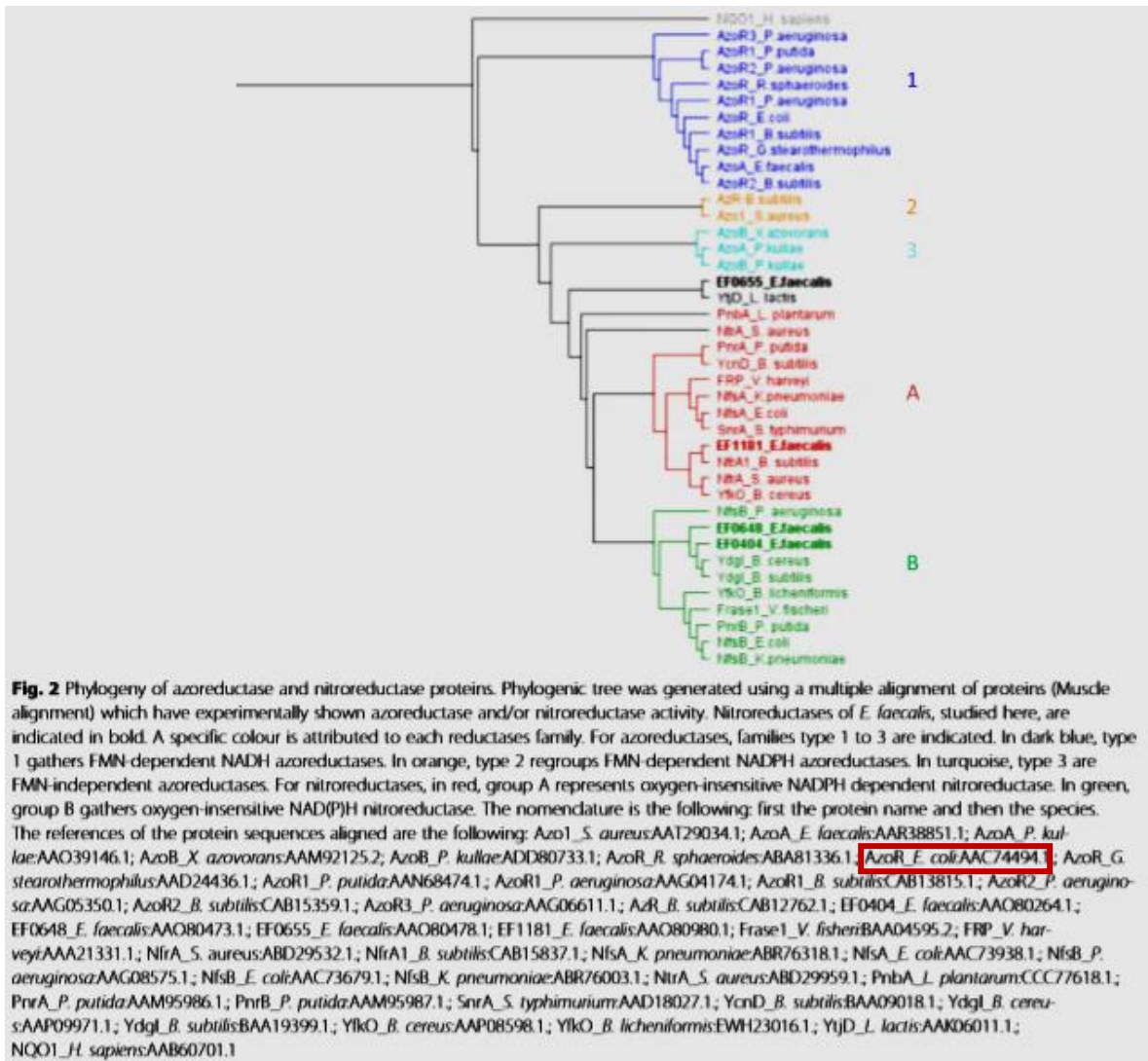


Figura 5. Árbol filogenético, Chalansonnet 2017.

El artículo provee una clave de identificación que con la que se encontró la secuencia completa del gen *AzoR* perteneciente a una *Escherichia coli* k12, esto gracias a NCBI en donde se ingresó dicha clave y nos remitió a las secuencias de nucleótidos y aminoácidos en un formato específico llamado fasta además de mostrar en qué páginas y publicaciones se encuentran reportadas. Este gen se eligió como el de referencia, es decir, el diseño de los primers se hará de acuerdo con su secuencia de nucleótidos. Y con el fin de adecuar los primers a más de un tipo de cepa que sea

candidata para codificar la enzima se necesitó encontrar secuencias de otras bacterias *E. coli* patógenas.

Dentro de la página de la NCBI y en la página de ASAP se puede usar una herramienta básica de búsqueda de alineación local (Figura 6), BLAST por sus siglas en inglés (Basic Local Alignment Search Tool). Ésta encuentra regiones de similitud local entre secuencias. El programa compara secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias de bases de datos y calcula la importancia estadística de las coincidencias. BLAST se puede usar para inferir relaciones funcionales y evolutivas entre secuencias, así como para ayudar a identificar miembros de familias de genes. Con esta herramienta se logró encontrar secuencias homólogas al gen de referencia. De las secuencias halladas se eligieron algunas cepas identificadas como patógenas ETEC, EPEC y EHEC.

The image shows the NCBI BLAST website interface. At the top, there is a navigation bar with the NIH logo, "U.S. National Library of Medicine", "NCBI National Center for Biotechnology Information", and a "Sign in to NCBI" link. Below the navigation bar, the word "BLAST" is prominently displayed, followed by links for "Home", "Recent Results", "Saved Strategies", and "Help". The main content area features a "Basic Local Alignment Search Tool" section with a brief description: "BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance." A "Learn more" link is provided. To the right, there is a "NEWS" box with the headline "End of updates for BLAST+ version 4 databases (dbV4)" and the subtext "Start moving to the new version 5 databases!". Below this, the date "Fri, 27 Sep 2019 16:00:00 EST" and a "More BLAST news..." link are visible. The "Web BLAST" section contains three main options: "Nucleotide BLAST" (nucleotide to nucleotide), "blastx" (translated nucleotide to protein), and "tblastn" (protein to translated nucleotide). A "Protein BLAST" option (protein to protein) is also present, accompanied by a 3D ribbon diagram of a protein structure.

Figura 6. BLAST en NCBI. ³⁴

7.1.2 ALINEAMIENTOS Y PROPUESTAS DE PRIMER.

Los alineamientos de las secuencias, ya sea de nucleótidos o de aminoácidos, tienen la función de encontrar homología entre ellas. Esto se realizó con ayuda de distintos programas con el propósito de tener una mejor visualización de regiones homólogas.

Para el uso de CLUSTAL OMEGA se compilaron las fastas de las secuencias a alinear ordenadas en un archivo de texto, facilitando así su ingreso al cuadro correspondiente dentro del programa como se muestra en la figura 7. Este se encargó de alinear los nucleótidos o aminoácidos de las secuencias de forma que colocó cada elemento de la secuencia a la par de los pertenecientes a las otras en orden de aparición, proporcionando como resultado un archivo útil en la edición de colores en el siguiente programa.

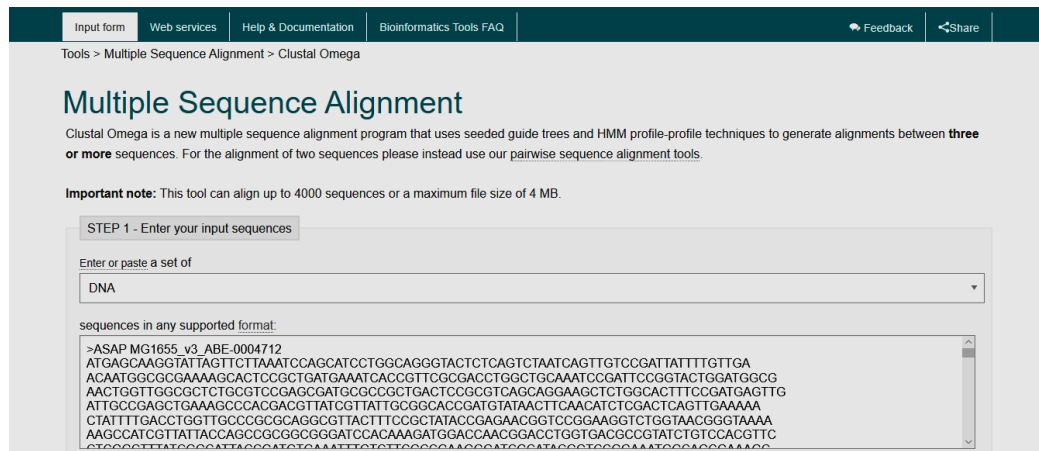


Figura 7. Secuencias en formato fasta ingresadas a CLUSTAL OMEGA. ³⁰

BOX SHADE ofreció una mejor visualización de similitudes a través de colores. Estos colores facilitaron la comparación entre las secuencias; el color negro representa una igualdad de componentes, el gris diferentes componentes con funciones parecidas y

el blanco indicó completa diferencia en componentes y función. Este programa arrojó un archivo de texto con el alineamiento finalizado. En la figura 8 se muestra la interfaz de BOXSHADE y en la figura 9 el archivo Word con una parte de los resultados de los alineamientos con este programa.

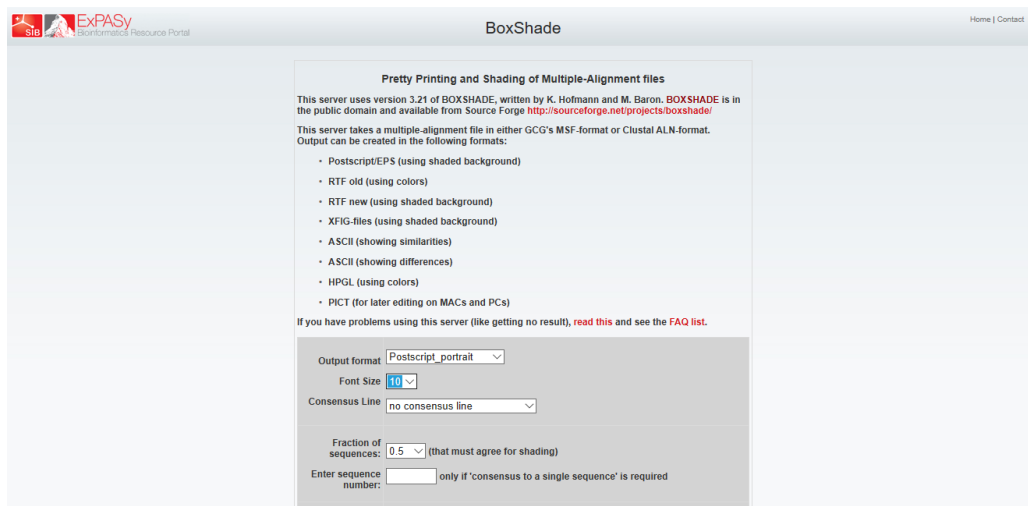


Figura 8. Interfaz de BOXSHADE.³⁰

```

EPEC4_234869_1_ 121 CGTGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTCTGGATGGCGAACTGGTTGGTGCACCTGCGT
EHEC1_EC4042_DR 121 CGCGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTACTGGATGGCGAACTGGTTGGTGCACCTGCGT
ASAP 121 CGCGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTACTGGATGGCGAACTGGTTGGTGCACCTGCGT
EPEC2_E110019_D 121 CGCGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTACTGGATGGCGAACTGGTTGGTGCACCTGCGT
EPEC3_E22_DRAFT 121 CGCGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTACTGGATGGCGAACTGGTTGGTGCACCTGCGT
EPEC1_B171_DRAF 121 CGCGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTACTGGATGGCGAACTGGTTGGTGCACCTGCGT
EPEC2_E24377A_v 121 CGCGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTACTGGATGGCGAACTGGTTGGTGCACCTGCGT
EPEC1_B7A_v1_AD 121 CGCGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTACTGGATGGCGAACTGGTTGGTGCACCTGCGT

EPEC4_234869_1_ 181 CCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGTCAGCAGGAAGCTCTGGCGCTTCCGATGAGCTG
EHEC1_EC4042_DR 181 CCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGCTCAGCAGGAAGCTCTGGCGCTTCCGATGAGCTG
ASAP 181 CCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGCTCAGCAGGAAGCTCTGGCGCTTCCGATGAGCTG
EPEC2_E110019_D 181 CCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGCTCAGCAGGAAGCTCTGGCGCTTCCGATGAGCTG
EPEC3_E22_DRAFT 181 CCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGCTCAGCAGGAAGCTCTGGCGCTTCCGATGAGCTG
EPEC1_B171_DRAF 181 CCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGCTCAGCAGGAAGCTCTGGCGCTTCCGATGAGCTG
EPEC2_E24377A_v 181 CCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGCTCAGCAGGAAGCTCTGGCGCTTCCGATGAGCTG
EPEC1_B7A_v1_AD 181 CCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGCTCAGCAGGAAGCTCTGGCGCTTCCGATGAGCTG

EPEC4_234869_1_ 241 ATTGCCGAGCTGAAAGCCACGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAAT
EHEC1_EC4042_DR 241 ATTGCCGAGCTGAAAGCCCAAGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAAC
ASAP 241 ATTGCCGAGCTGAAAGCCACGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAAC
EPEC2_E110019_D 241 ATTGCCGAGCTGAAAGCCACGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAAC
EPEC3_E22_DRAFT 241 ATTGCCGAGCTGAAAGCCACGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAAC
EPEC1_B171_DRAF 241 ATTGCCGAGCTGAAAGCCACGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAAC
EPEC2_E24377A_v 241 ATTGCCGAGCTGAAAGCCACGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAAC
EPEC1_B7A_v1_AD 241 ATTGCCGAGCTGAAAGCCACGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAAC

```

Figura 9. Alineamientos hechos con BOXSHADE.³¹

Una vez hechos los alineamientos se tuvo una mejor visualización de las regiones con mayor homología entre las secuencias, esto sirvió en la toma de decisiones acerca de la región en donde se buscó amplificar. Las regiones más parecidas entre sí fueron más viables debido a que aumenta la probabilidad de efectividad del primer.

Otros parámetros que se tomaron en cuenta para aumentar la eficacia en los primers son porcentajes altos de guanina y citosina, bajas probabilidades de auto complementariedad y temperaturas de alineamiento que se encuentren dentro de rangos viables; estos cálculos se pudieron hacer a través de programas como PRIMER 3 INPUT o PRIMER 3 PLUS (Figura 10).

Para el uso de estos programas se propusieron 20 nucleótidos pertenecientes a la secuencia de referencia, sirviendo como el primer iniciador, y otros 20 como el primer que finaliza, ambos en dirección de 5' a 3'. Para el primer iniciador no hay mayor complicación, por el contrario, se tuvo que buscar el reverso complementario del primer finalizador para que este se encontrara en la dirección correcta.

Estos pasos se siguieron hasta que se halló un par de primers con los parámetros lo más cercano a los ideales. Dentro de los parámetros deseados se buscó una temperatura de alineamiento de 60°C, un porcentaje de guanina y citosina mayor a 50%, un porcentaje de auto complementariedad menor a tres y un tamaño de amplicón de 500pb.

Debido a que esto no se cumple con exactitud se hicieron varias propuestas que se evaluaron en comparación con los parámetros ideales y entre ellas, logrando asegurarnos de hacer la mejor elección. Una vez que se hizo la elección de primer se mandaron a sintetizar en laboratorios especializados.

Primer3web version 4.1.0 - Pick primers from a DNA sequence. [disclaimer](#) [code](#)
[cautions](#)

Select the [Task](#) for primer selection:

Template masking before primer design (available species)

Select species (Example: Mus musculus)	Nucleotides to mask in 5' direction	<input type="text" value="1"/>
Primer failure rate cutoff < <input type="text" value="0.1"/>	Nucleotides to mask in 3' direction	<input type="text" value="0"/>

Paste source sequence below (5'→3'), string of ACGTNacgtn -- other letters treated as N -- numbers and blanks ignored. FASTA format ok. Please N-out undesirable sequence (vector, ALUs, LINES, etc.) or use a [Mispriming Library \(repeat library\)](#)

Pick left primer, or use left primer below Pick hybridization probe (internal oligo), or use oligo below Pick right primer, or use right primer below (5' to 3' on opposite strand)

[Pick Primers](#) [Download Settings](#) [Reset Form](#)

[Sequence Id](#) A string to identify your output.

[Targets](#) E.g. 50,2 requires primers to surround the 2 bases at positions 50 and 51. Or mark the [source sequence](#) with [and]: e.g. ...ATCT[CCCC]TCAT.. means that primers must flank the central CCCC.

[Overlap Junction List](#) E.g. 27 requires one primer to overlap the junction between positions 27 and 28. Or mark the [source sequence](#) with -: e.g. ...ATCTAC-TGTCAT.. means that primers must overlap the junction between the C and T.

[Excluded Regions](#) E.g. 401,7 68,3 forbids selection of primers in the 7 bases starting at 401 and the 3 bases at 68. Or mark the [source sequence](#) with < and >: e.g. ...ATCT<CCCC>TCAT.. forbids primers in the central CCCC.

Figura 10. Interfaz de Primer3 input. ³⁵

7.2 PRUEBA DE PRIMERS EN CEPAS TIPO DE *E. COLI*

Para corroborar que los primers seleccionados cumplieran con la finalidad de amplificar el gen *AzoR* se llevó a cabo una serie de pruebas en cepas puras de laboratorio. Las pruebas consistieron en realizar ensayos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y corrimientos electroforéticos a los productos de PCR.

7.2.1 ACTIVACIÓN DE CEPAS PURAS DE LABORATORIO

Las cepas utilizadas para la prueba de los primers se muestran en la Tabla 1, estas se sembraron en estría cruzada en agar Lb a pH de 7.4 y en agar MacConkey debido a que es un medio selectivo y diferencial. Se observó que no hubiera más de una morfología en el agar selectivo, asegurando así que la cepa no esté contaminada. Una vez hecho esto se procedió a sembrar de forma masiva para obtener una buena cantidad de cepa bacteriana.

CEPA TIPO	PATOGRUPO
<i>E. coli</i> K12	No patógena
<i>E. coli</i> E2348/69	EPEC
<i>E. coli</i> E9034A	ETEC
<i>E. coli</i> DH5 α	No patógena
<i>E. coli</i> ATCC8739	No patógena

Tabla 1. Cepas tipo de *E. coli* empleadas para la prueba de los primers.

7.2.2 EXTRACCIÓN DE DNA

Las cepas tipo se sembraron de forma masiva en placas Lb y se incubaron de 20 a 22 horas. La extracción de DNA en este caso se hizo a través del método de choque térmico, esto se llevó a cabo en eppendorf de 2ml con agua salina al 0.8%, en donde se colocó una alícuota grande de las cepas sembradas, esto se homogenizó con ayuda de un vortex. Una vez homogenizadas las muestras se colocaron en un flotador dentro de un vaso de precipitado con agua hirviendo durante aproximadamente 8 minutos como se muestra en la figura 11. El DNA se extrajo únicamente de la superficie del volumen líquido contenido en los eppendorf.

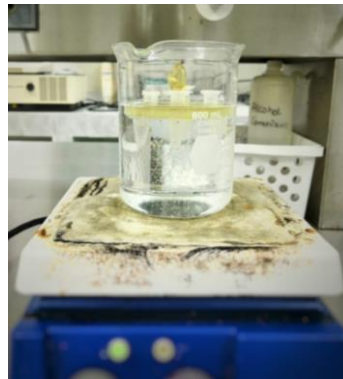


Figura 11. Extracción de DNA por choque térmico.

7.2.3 PCR

Las muestras se prepararon en tubos eppendorf especiales para PCR de 200 μ L nuevos, estériles y bien rotulados, usando una campana de seguridad II, con guantes nuevos y material estéril (Figura 12). Antes de comenzar a trabajar colocamos el material 15 minutos expuesto a luz UV, asegurando esterilidad. Las muestras contenían 10 μ L de TAQ, 12 μ L de agua inyectable, 1.5 μ L de cada primer y 1 μ L del DNA extraído.

Los tiempos y temperaturas requeridos para los ensayos de PCR se estandarizaron con base en la literatura. Con los tiempos y temperaturas establecidas creamos un programa nombrado 0804 en el termociclador el cual quedó de la forma establecida en la Tabla 2, consta de 30 ciclos y una fase de elongación final de 72°C durante 5 minutos. En la figura 13 se muestra el termociclador utilizado y en la figura 14 se pone en evidencia cómo se introducen las muestras para proceder con la amplificación en las cepas tipo de *E. coli*.

PROGRAMA 0804 (30 CICLOS)		
FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
DESNATURALIZACIÓN	98°C	10s
ALINEAMIENTO	60°C	30s
ELONGACIÓN	72°C	30s

Tabla 2. Programa 0804 para termociclador.



Figura 12. Preparación de las muestras para PCR.



Figura 13. Termociclador.

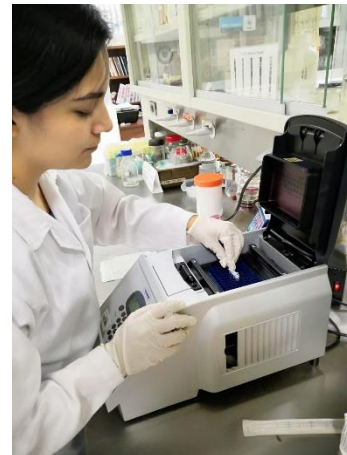


Figura 14. Termociclador con muestras.

7.2.4 CORRIMIENTO DE ELECTROFORESIS

Al producto de que obtuvimos de la PCR se le hizo un corrimiento electroforético, este se realizó en gel de agarosa al 1% y usando como buffer TBE 1X previamente preparado. El gel de agarosa al 1% se hizo con 30 ml de TBE y 0.3 g de agarosa, esto se calentó en un horno convencional de microondas con la finalidad de ayudar a la disolución, se vertió y se colocó un peine para hacer los pozos en donde irán las muestras.

Una vez que la mezcla de agarosa y TBE gelificó se introdujo en la cámara de electroforesis, en donde se vertió TBE de forma que cubriera el gel por completo. Cada pozo del gel representa un carril; en el carril 1 se colocó el peso molecular (2 μ L de marcador de PM y 6 μ L de marcador azul), en el segundo carril una muestra que no contenía DNA (Figura 15) y en los siguientes 5 carriles las muestras de las cepas tipo (*E. Coli* K12, *E. Coli* DH5 α , *E. Coli* ATCC8739, *E. Coli* E2348 y ETEC

E9034A). Las condiciones de electroforesis que se manejaron son voltaje de 90V y tiempo de 65 minutos.

Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio durante 15 minutos y tuvieron un enjuague de 5 minutos en agua destilada. Finalmente se observó el gel a través de un transiluminador UV y se tomaron fotos como evidencia de los resultados.

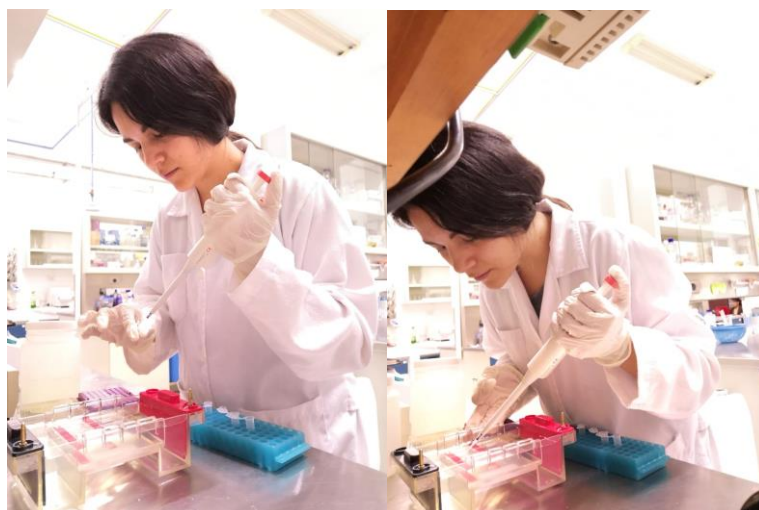


Figura 15. Cargando muestras en gel de agarosa.

7.3 DETECCIÓN DEL GEN *AzoR* EN CEPAS SILVESTRES RECUPERADAS DEL RÍO ALSESECA

La detección del gen *AzoR* se llevó a cabo en 32 cepas identificadas como *Escherichia coli* pertenecientes al patogruppo EPEC aisladas de muestras de agua del río Alseseca enlistadas en la Tabla 3. Estas muestras pasaron por los mismos procedimientos que las cepas tipo, se hizo activación de las cepas silvestres, se extrajo DNA de estas muestras por choque térmico, se hicieron ensayos de PCR con el programa 0804, se realizó corrimiento electroforético con las mismas condiciones de voltaje y tiempo, se teñieron los geles con bromuro de etidio y

después de ser enjuagados con agua destilada se observaron en el transiluminador UV tomando fotos para evidenciar los resultados.

Tabla 3. Cepas silvestres recuperadas del río Alseseca.

CEPAS	5E' (EPEC) (M)	G1 (EPEC) (B)	4RE (EPEC) (A)	3E' (EPEC) (A)	11VT (EPEC) (A)	V (EPEC) (A)	52.c (EPEC) (B)	G120 (EPEC) (B)
	51.c (EPEC) (B)	G278 (EPEC) (A)	G8 (EPEC) (B)	18CA (EPEC) (M)	GL26 (EPEC) (M)	J8 (EPEC) (A)	7DIC (EPEC) (A)	54.b (EPEC) (B)
	4FEB AL(ETEC) (A)	A4 RIO(ETE) C) (A)	2341 RIO(ETE) C) (A)	GC13 RIO(ETE) C) (M)	2UT RIO(ETE) C) (A)	BC RIO(ETE) C) (A)	G279 RIO(ETE) C) (M)	7RD RIO(ETE) C) (M)
	11G RIO(ETE) C) (A)	4NOV RIO(ETE) C) (A)	13FEB RIO(ETE) C) (A)	8DIC RIO(ETE) C) (M)	1G RIO(ETE) C) (A)	13 RIO(ETE) C) (A)	SRE RIO(ETE) C) (M)	428 RIO(ETE) C) (M)

7.4 DETECCIÓN DEL GEN *AzoR* EN AGUA RESIDUAL.

En trabajos previos se hizo un muestreo mensual durante un año de agua residual en el río Alseseca con el objetivo de monitorear los genes de virulencia de *E. coli* en el río, a estas muestras de agua se les hizo extracción de DNA ocupando un kit (Power Viral Environmental RNA/DNA Isolation Kit Sample).

En este trabajo se llevó a cabo la detección del gen *AzoR* en el DNA que se extrajo. Las muestras de DNA utilizadas pertenecen a las fechas de muestreo de agua residual establecidas en la Tabla 4, esto con la finalidad de probar la sensibilidad de primer al amplificar el gen *AzoR* en el DNA de todos los microorganismos contenidos en el agua residual.

Tabla 4. Muestras de DNA del total de microorganismos en el agua residual.

Muestras	Fecha de muestreo
M2Ra	19/09/2018
M3Ra	10/10/2018
M5Ra	07/11/2018
M6Ra	21/11/2018
M8Ra	12/12/2018
M9Ra	09/01/2019
M14Ra	15/03/2019
M16Ra	19/04/2019
M18Ra	31/05/2019
M19Ra	14/06/2019
M20Ra	28/06/2019
M23Ra	07/08/2019

8. RESULTADOS

8.1 DISEÑO DE PRIMER

8.1.1 SECUENCIA DE GEN *AzoR* PERTENECIENTE A *E. COLI*.

Se obtuvo la información de la cepa referenciada en el artículo de Chalansonnet, así como los artículos y bases de datos en donde se ha hablado del gen *AzoR*. (Figuras 14 y 15). Asimismo, se encontraron las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos del gen *AzoR* para *Escherichia coli* K12 de la base de datos ASAP. (Figuras 16 y 17).

NCBI Resources How To

Nucleotide Nucleotide Advanced

GenBank - Send to -

Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_000913.3
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to

LOCUS NC_000913 606 bp DNA linear CON 11-OCT-2018
 DEFINITION Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome.
 ACCESSION [NC_000913](#) REGION: complement(1482255..1482860)
 VERSION NC_000913.3
 DBLINK BioProject: [PRJNA57779](#)
 BioSample: [SAMN02604091](#)
 Assembly: [GCF_000005845.2](#)

KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655
 ORGANISM [Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655](#)
 Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales;
 Enterobacteriaceae; Escherichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 606)
 AUTHORS Riley,M., Abe,T., Arnaud,M.B., Berlyn,M.K., Blattner,F.R.,
 Chaudhuri,R.R., Glasner,J.D., Horluchi,T., Keseler,I.M., Kosuge,T.,
 Mori,H., Perna,N.T., Plunkett,G. III, Rudd,K.E., Serres,M.H.,
 Thomas,G.H., Thomson,N.R., Wishart,D. and Wanner,B.L.
 TITLE Escherichia coli K-12: a cooperatively developed annotation
 snapshot--2005
 JOURNAL Nucleic Acids Res. 34 (1), 1-9 (2006)
 PUBMED [16397293](#)
 REMARK Publication Status: Online-Only

Información de la cepa

Citas de la cepa

Figura 16. Información del gen *AzoR* en *Escherichia coli k12* obtenida de NCBI.

Information (NCBI).
 COMPLETENESS: full length.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..606
 /organism="Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655"
 /mol_type="genomic DNA"
 /strain="K-12"
 /sub_strain="MG1655"
 /db_xref="taxon:511145"

gene 1..606
 /gene="azoR"
 /locus_tag="b1412"
 /gene_synonym="acpD; ECK1405"
 /db_xref="ASAP:[ABE-0004712](#)"
 /db_xref="ECOCYC:[G6731](#)"
 /db_xref="EcoGene:EG12695"
 /db_xref="GeneID:[947569](#)"

CDS 1..606
 /gene="azoR"
 /locus_tag="b1412"
 /gene_synonym="acpD; ECK1405"
 /EC_number="1.6.5.-"
 /EC_number="1.7.1.12"
 /codon_start=1
 /transl_table=11
 /product="FMN dependent NADH:quinone oxidoreductase"
 /protein_id="WP_415930.1"
 /db_xref="UniProtKB/Swiss-Prot:[P41407](#)"
 /db_xref="ASAP:[ABE-0004712](#)"
 /db_xref="ECOCYC:[G6731](#)"
 /db_xref="EcoGene:EG12695"
 /db_xref="GeneID:[947569](#)"
 /translation="MSKVLVVKSSILAGYSQSNQLSDYFVEQNRKHSADAITVRDLA
 ANPVPVLDGELVGLRPSDAPLTPRQEQALASDELIAELKANDVIVIAAPHYNFNIS
 TQLKYNFDLVARAGVTFRYTENPGLVTGKKAIVITSRGGIHKDGPDLVTPYLSLF
 LQFIGITDVKFVFAEIGIAYGPEMAAKAQSDAKAAIDSVSA"

ORIGIN
 1 atgagcaagg tattagtctt taatccagc atcctggcag ggtactctca gtctaatacga

Códigos para encontrar secuencias de la cepa, el gen y su región de codificación en otras bases de datos.

Figura 17. Referencias con clave que otorga NCBI para encontrar las secuencias en otras bases de datos.

```

>ASAP MG1655_v3_ABE-0004712
MSKVLVLKSSILAGYSQSNQLSDYFVEQWREKHSAD EITVRDLAANPI PVL D GELV GALRPSDAPLTPRQ
QEALALSDEL
IAELKAHDVIVIAAPMYNFNISTQLKNYFDLVARAGVTFRYTENGPEGLVTGKKAIVITSRGGIHKDGP T
DLVTPYLS TF
LGFIGITDVKFVFAEGIAYGPEMAAKAQSDAKAAIDSI VSA*

```

Figura 18. Secuencia de aminoácidos del gen *AzoR* en *Escherichia coli* K12 en formato *fasta*.

```

>ASAP MG1655_v3_ABE-0004712
ATGAGCAAGGTATTAGTTCTTAAATCCAGCATCCTGGCAGGGTACTCTCAGTCTAATCAGTTGTCCGATT
ATTTTGT TGA
ACAATGGCGCGAAAAGCACTCCGCTGATGAAATCACCGTTCGCGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTA
CTGGATGGCG
AACTGGTTGGCGCTCTGCGTCCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGCGTCAGCAGGAAGCTCTGGCACTTTC
CGATGAGTTG
ATTGCCGAGCTGAAAAGCCCACGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAACATCTCGACTC
AGTTGAAAAA
CTATTTTGACCTGGTTGCCCGCGCAGGCGTTACTTTCCGCTATACCGAGAACGGTCCGGAAGGTCTGGTA
ACGGGTAAAA
AAGCCATCGTTATTACCAGCCGCGGGGATCCACAAAGATGGACCAACGGACCTGGTGACGCCGTATCT
GTCCACGTT C
CTCGGCTTTATCGGCATTACCGATGTGAAATTTGTCTTCGCCGAAGGGATCGCATAACGGTCCGGAAATGG
CAGCGAAAGC
ACAGTCTGACGCAAAAAGCAGCCATCGACAGCATTGTTTCTGCATAA

```

Figura 19. Secuencia de nucleótidos del gen *AzoR* en *Escherichia coli* K12 en formato *fasta* con longitud de 606pb.

8.1.2 SECUENCIAS HOMÓLOGAS DEL GEN *AzoR* EN DIFERENTES CEPAS DE *E. COLI*

A partir del BLAST que se hizo en la base de datos de ASAP se encontraron secuencias homologas al gen de referencia correspondientes al gen *AzoR* en diferentes cepas de *Escherichia coli*, en la figura 20 se muestra la información de ASAP acerca de nuestro gen de referencia, en la figura 21 las cepas que enlista el BLAST y las siete secuencias que se eligieron para trabajar la creación de los primer se encontrarán señaladas en color rojo y enlistadas en la Tabla 5.

ASAP *Escherichia coli K-12 MG1655* University of Wisconsin—Madison

Working With: Genome: *Escherichia coli K-12 MG1655* Version: v3

ABE-0004712 (azoR) - *Escherichia coli* K-12 MG1655 - Feature Annotation

ASAP ID	ABE-0004712 show history						Overview	Annotations
Names	azoR acpD JW1409 ECK1405 b1412						Context	Comparative
Product	NADH-azoreductase, FMN-dependent						Seq Similarity	Interactions
Type	CDS						Alignments	Experimental
Location	#	Contig	Strand	Left	Right	Length (b.p.)	Length (a.a.)	
	1	Chromosome	complement	1482255	1482860	606	202	
Sequence	Get full DNA or protein sequence View sequence with flanking regions: <input type="text"/> bases upstream and <input type="text"/> bases downstream View							
Context	Browse sequence in GaPP You last hovered over feature ynfD (CDS)							
Run Searches	BLASTN against nr at NCBI <input type="button" value="Submit"/>							
Protein Families	<ul style="list-style-type: none"> ADX-000568 View Enterofam0004712: Trusted threshold=533.2. Members of this family are defined by searches with an hmm constructed from an alignment of putative orthologous proteins from eight genomes (E. coli MG1655, E. coli EDL933, S. enterica Typhimurium LT2, S. enterica Typhi CT18, Y. pestis CO92, Y. pseudotuberculosis 32953, E. chrysanthemi 3937 and E. carotovora atroseptica SCR11043). IPR003680 (IPR003680 Flavodoxin-like fold) View IPR029039 (IPR029039 Flavoprotein-like superfamily) View PF02525 (PF02525 Flavodoxin-like fold) View 						Annotate	
							Jan 2006	
							Apr 2008	
							Jul 2018	
							Jul 2018	

Figura 20. Información del gen *AzoR* en *Escherichia coli* K12 obtenida de la base de datos ASAP, así como el inicio del BLAST.

View	Strain	Gene ID	Type
	<i>Escherichia coli</i> 536 (UPEC)	AEF-0001429	CDS
	<i>Escherichia coli</i> 53638 (EIEC)	ADP-0009995 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> APEC O1 (APEC)	AEG-0005284	CDS
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775 [T]	AMC-0002928	CDS
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	AEM-0008012	CDS
	<i>Escherichia coli</i> B171 (EPEC)	ADN-0005305 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> B7A (ETEC)	ADK-0005150	CDS
	<i>Escherichia coli</i> CFT073 (UPEC)	ABR-0077956 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> E110019 (EPEC)	ADM-0005333 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> E22 (EPEC)	ADL-0006263 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> E2348/69 (EPEC)	BCI-0001655 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> E24377A (ETEC)	ADQ-0006033 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4024 (EHEC)	BBI-0001009	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4042 (EHEC)	BBA-0005394 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4045 (EHEC)	BBB-0009759 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4076 (EHEC)	BAZ-0009423 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4113 (EHEC)	BAY-0007125 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4115 (EHEC)	BAS-0006855 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4196 (EHEC)	BAX-0009767 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4206 (EHEC)	BAW-0011330 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4401 (EHEC)	BAV-0008000 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4486 (EHEC)	BAU-0008884 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC4501 (EHEC)	BAT-0008673 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC508 (EHEC)	BBJ-0007407 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EC869 (EHEC)	BBC-0008616 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> EDL933 (EHEC)	ABH-0026086 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> F11 (UPEC)	ADQ-0006035 azoR	CDS
	<i>Escherichia coli</i> HS	ADR-0006173 azoR	CDS

Figura 21. Listado de cepas y sus genes homólogos al gen de referencia obtenidos al realizar un BLAST.

SECUENCIAS HOMÓLOGAS	
CEPA	PATÓGRUPO
<i>Escherichia coli</i> B171	EPEC
<i>Escherichia coli</i> B7A	EPEC
<i>Escherichia coli</i> E110019	EPEC
<i>Escherichia coli</i> E22	EPEC
<i>Escherichia coli</i> E2348/69	EPEC
<i>Escherichia coli</i> E24377A	EPEC
<i>Escherichia coli</i> EC4042	EPEC

Tabla 5. Lista de secuencias homologas a la secuencia de referencia elegidas.

8.1.3 ALINEAMIENTOS DE LAS SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DEL GEN *AzoR* EN DIFERENTES CEPAS DE *E. COLI*.

Se hallaron los formatos fasta de las secuencias del gen *AzoR* de cada una de las cepas seleccionadas del BLAST para trabajar el diseño de los primers, podemos ver en la Figura 22 la secuencia de nucleótidos en formato fasta perteneciente a *E. coli* B171 EPEC. A partir de esto y del uso de CLUSTAL OMEGA obtuvimos los alineamientos de las secuencias presentados en la Figura 23. Una vez que se le dio formato a color a los alineamientos con BOX SHADE se pueden ver como en la Figura 24.

```
>EPEC1_B171_DRAFTv2_ADN-0005305
ATGAGCAAGGTATAGTTCTTAAATCCAGCATCCTGGCAGGGTACTCTCAGTCTAATCAGTTGTCCGATT
ATTTTGGTTGA
ACAATGGCGCGAAAAGCACTCCGCTGATGAAATCACCGTTCGCGACCTGGCTGCAAATCCGATTCCGGTA
CTGGATGGCG
AACTGGTTGGTGCCTCCGAGCGATGCGCCGCTGACTCCGCGTCAGCAGGAAGCTCTGGCGCTTTC
CGATGAGCTG
ATTGCCGAGCTGAAAGCCCACGACGTTATCGTTATTGCGGCACCGATGTATAACTTCAACATCTCAACTC
AGTTGAAAAA
CTATTTGACCTGGTTGCACGCGCAGGGCTTACTTTCCGCTATACCGAGAACGGTCCGGAAAGGTCGGTA
ACGGGTAAAA
AAGCCATCGTTATTACCAGCCGCGTGGGATCCACAAAGATGGACCAACGGACCTGGTGACGCCGTATCT
GTCCACGTTT
CTCGGCTTTATCGGCATTACCGATGTGAAATTTGTCTTCGCCGAAGGGATCGCATACGGTCCGGAAATGG
CAGCGAAAGC
GCAGTCTGACGCGAAAGCGGCCATCGACAGCATTGTTGCTGCATAA
```

Figura 22. Formato fasta de una secuencia de nucleótidos.

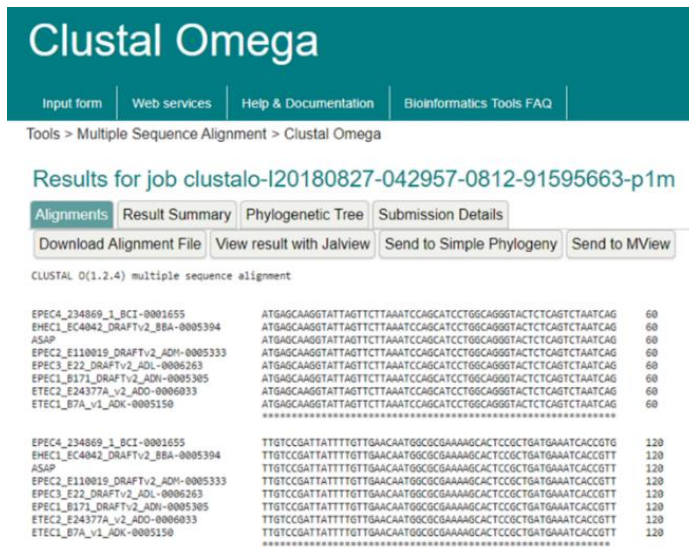


Figura 23. Alineamiento de secuencias de nucleótidos a través de CLUSTAL OMEGA.

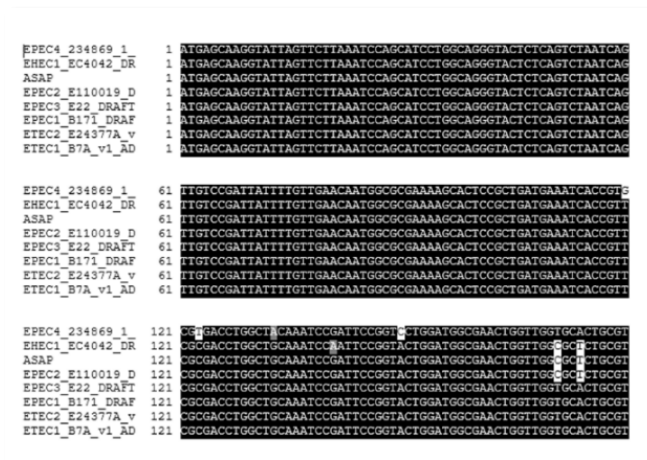


Figura 24. Archivo Word que arroja BOX SHADE como entrega de los alineamientos con formato a color.

8.1.4 PRIMERS AZOR PARA *E. COLI* SILVESTRE PATÓGENA.

Después de varias propuestas de primers se eligieron dos pares de estos de acuerdo con los parámetros calculados con PRIMER 3 PLUS principalmente. Las

propuestas elegidas se muestran con el formato que nos arroja PRIMER 3 INPUT en las figuras 25 y 26. Los primers se encuentran en la tabla 6 junto con sus temperaturas de alineamiento y el tamaño del amplicón.

```

PRIMER PICKING RESULTS FOR ASAP MG1655_v3_ABE-0004712

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start  len  tm    gc%  any  3'  seg
LEFT PRIMER  148   20   60.00 55.00 4.00 2.00
G T A C T G G A T G G C G A A C T G G T

RIGHT PRIMER  579   20   61.20 50.00 5.00 3.00
T G C T T T T G C G T C A G A C T G T G

SEQUENCE SIZE: 606
INCLUDED REGION SIZE: 606

PRODUCT SIZE: 432, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

```

Figura 25. Propuesta de primers AzoR1 vista desde PRIMER 3 INPUT.

```

PRIMER PICKING RESULTS FOR ASAP MG1655_v3_ABE-0004712

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
WARNING: Left primer is unacceptable: Tm too high

OLIGO      start  len  tm    gc%  any  3'  seg
LEFT PRIMER  150   20   63.39 55.00 4.00 2.00
A C T G G A T G G C G A A C T G G T T G
RIGHT PRIMER  579   20   61.20 50.00 5.00 3.00
T G C T T T T G C G T C A G A C T G T G

SEQUENCE SIZE: 606
INCLUDED REGION SIZE: 606

PRODUCT SIZE: 430, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

```

Figura 26. Propuesta de primers AzoR2 vista desde PRIMER 3 INPUT.

Tabla 6. Primer sintetizados para amplificación de AzoR en cepas de *E. coli* silvestres patógenas

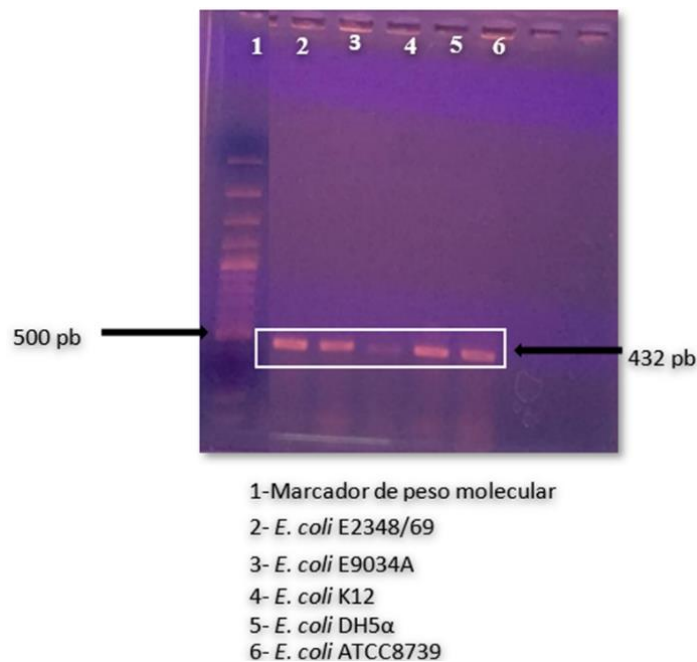
Primers AzoR				
	Nombre	SECUENCIA	Tm	Tamaño de amplificación
AzoR1	LEFT PRIMER	G T A C T G G A T G G C G A A C T G G T	60°	432pb
	RIGHT PRIMER	T G C T T T T G C G T C A G A C T G T G	61.2°	
AzoR2	LEFT PRIMER	A C T G G A T G G C G A A C T G G T T G	63.39°	430pb
	RIGHT PRIMER	T G C T T T T G C G T C A G A C T G T G	61.2°	

8.2 PRUEBA DE PRIMER *AzoR*

8.2.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN EN CEPAS TIPO DE *E. COLI*

Se logró amplificar el gen *AzoR* en las bacterias tipo que se usaron: *E. coli* K12, *E. coli* E2348/69, *E. coli* E9034A, *E. coli* DH5 α Y *E. coli* ATCC8739. En la figura 27 se pueden observar que las bandas que se lograron amplificar en cada cepa coinciden con la banda del marcador de peso molecular que amplifica entre 400 y 500 pares de bases, verificando así que el tamaño de nuestro amplicón esperado de 432 pb está dentro del rango, logrando así la detección del gen *AzoR* en las cepas tipo.

Figura 27. Gel de agarosa con los amplicones del gen *AzoR* vistos a través de un transiluminador UV.



8.2.2 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *AzoR* EN CEPAS SILVESTRES *E.*

COLI PATÓGENAS DEL AGUA RESIDUAL DEL RÍO ALSESECA.

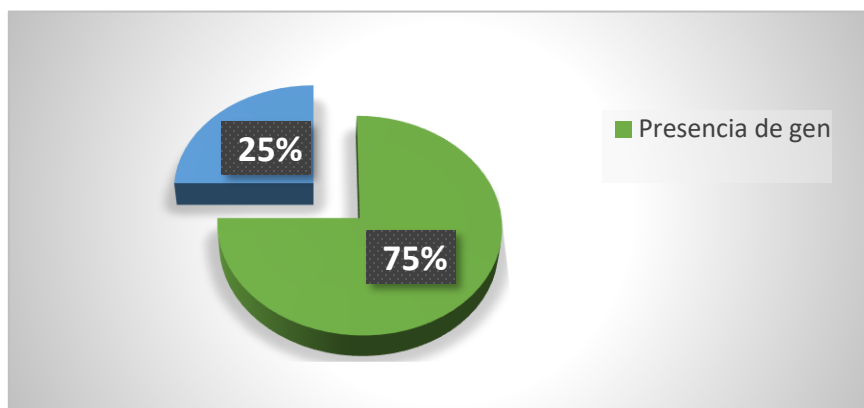
En total 32 cepas silvestres de *E. coli* identificadas como enteropatógenas (EPEC) recuperadas del río Alseseca fueron sometidas a ensayos de PCR para la amplificación y detección del gen *AzoR*. De este total de muestras 24 dieron un resultado positivo, es decir, se hizo la amplificación del gen *AzoR* con éxito en un 75% de las muestras, en el resto de las cepas, es decir, en el otro 25% no se logró llevar a cabo la amplificación. En la Tabla 7 y 8 se encuentran registradas las cepas que dieron positivo o negativo ante la detección del gen y en la Gráfica 1 se ponen en evidencia los porcentajes de la amplificación del total de las cepas empleadas.

Tabla 7. Registro de amplificación del gen *AzoR* en las muestras.

CEPAS	5E' (EPEC) (M)	Positivo	G1 (EPEC) (B)	Negativo	4RE (EPEC) (A)	Negativo	3E' (EPEC) (A)	Negativo
	51.c (EPEC) (B)	Positivo	G278 (EPEC) (A)	Positivo	G8 (EPEC) (B)	Positivo	18CA (EPEC) (M)	Positivo
	11VT (EPEC) (A)	Positivo	V (EPEC) (A)	Positivo	52.c (EPEC) (B)	Positivo	G120 (EPEC) (B)	Positivo
	GL26 (EPEC) (M)	Negativo	J8 (EPEC) (A)	Positivo	7DIC (EPEC) (A)	Positivo	54.b (EPEC) (B)	Negativo

CEPAS	4FEB AL (EPEC) (A)	Positivo	A4 RIO (EPEC) (A)	Positivo	2341 RIO (EPEC) (A)	Positivo	GC13 RIO (EPEC) (M)	Negativo
	11G RIO (EPEC) (A)	Positivo	4NOV RIO (EPEC) (A)	Positivo	13FEB RIO (EPEC) (A)	Positivo	8DIC RIO (EPEC) (M)	Positivo
	2UT RIO (EPEC) (A)	Positivo	BC RIO (EPEC) (A)	Positivo	G279 RIO (EPEC) (M)	Positivo	7RD RIO (EPEC) (M)	Positivo
	1G RIO (EPEC) (A)	Negativo	13 RIO (EPEC) (A)	Positivo	8RE RIO (EPEC) (M)	Positivo	428 RIO (EPEC) (M)	Negativo

Tabla 8. Continuación del registro de amplificación del gen *AzoR* en las muestras.



Gráfica 1. Porcentajes de amplificación del gen *AzoR* evidenciando la presencia o ausencia del gen en las cepas.

8.2.3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *AzoR* EN LAS CEPAS DE *E. COLI* SILVESTRES DE ACUERDO CON SUS PORCENTAJES DE REMOCIÓN.

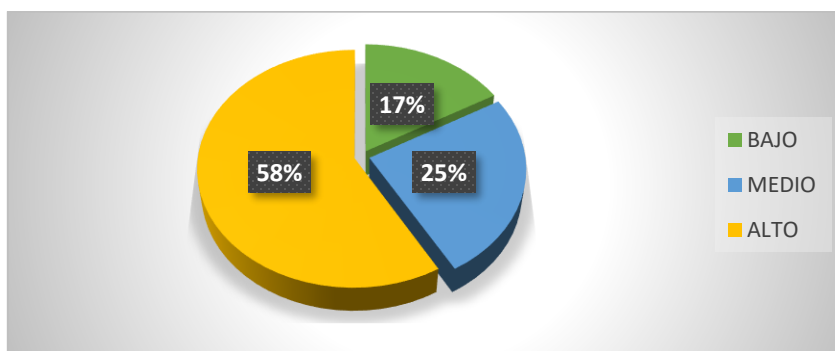
Las cepas utilizadas fueron empleadas en la remoción de colorantes en trabajos previos, estas se clasificaron de acuerdo con sus porcentajes de remoción en bajo,

medio y alto. En la tabla 9 podemos observar los rangos de porcentajes de remoción que presentaron las cepas de acuerdo con su clasificación en pruebas a 200 y 300 ppm.

Tabla 9. Clasificación de las cepas en relación con sus porcentajes de remoción.

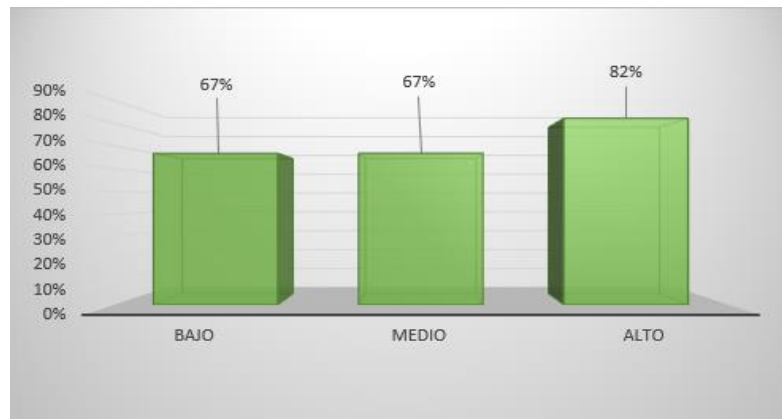
Clasificación	% de remoción a 200 ppm	% de remoción a 300 ppm
BAJO (B)	27-41%	5-23%
MEDIO (M)	42-56%	24-42%
ALTO (A)	57-70%	43-60%

Del total de las cepas que amplificaron el gen *AzoR* se sacaron los porcentajes que correspondían a las cepas pertenecientes a las clasificaciones de bajo, medio y alto.



*Gráfica 2. Amplificación del gen *AzoR* correspondientes a clasificaciones de acuerdo con la clasificación por remoción.*

En la Gráfica 3 presentamos los porcentajes de amplificación del gen *AzoR* de acuerdo con la cantidad de cepas analizadas de cada una de las clasificaciones de remoción.



*Gráfica 3. Porcentajes de amplificación del gen *AzoR* de acuerdo con las cepas utilizadas de cada clasificación de remoción.*

8.2.4 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *AzoR* EN DNA TOTAL DE AGUA RESIDUAL.

De las muestras de DNA del total de los microorganismos del agua residual del río Alseseca se logró amplificar el gen *AzoR* exitosamente en 8 muestras de 12, la figura 28 ofrece una visualización de las amplificaciones.



*Figura 28. Amplificación del gen *AzoR* en DNA total de muestras de agua residual.*

- 1- Marcador de peso molecular
- 2- M2Ra (19-09-2018)
- 3- M3Ra (10-10-2018)
- 4- M5Ra (07-11-2018)
- 5- M6Ra (21-11-2018)
- 6- M8Ra (12-12-2018)
- 7- M9Ra (09-01-2019)
- 8- M14Ra (15-03-2019)
- 9- M16Ra (19-04-2019)
- 10- M18Ra (31-05-2019)
- 11- M19Ra (14-06-2019)
- 12- M20Ra (28-06-2019)
- 13- M23Ra (07-08-2019)

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La estimación de la calidad del agua de los ríos urbanos es una actividad que ha tomado relevancia a nivel mundial en las últimas décadas. En México, son escasos los estudios sistemáticos realizados a la fecha e incluso, se enfrenta el problema de que las autoridades pertinentes no cuentan con datos actualizados de la calidad microbiológica del agua de ríos urbanos.¹⁰ De igual forma las normas que rigen los límites máximos permisibles de contaminantes en el agua como lo son las NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-002-SEMARNAT-1996 y NOM-003-SEMARNAT-1997 sólo toman en cuenta los parámetros de coliformes totales y coliformes fecales, si bien estos pueden albergar organismos patógenos, no hay una ley que exija pruebas para identificar estos organismos ni su grado de patogenicidad, por lo que la existencia de coliformes totales y fecales aún dentro de los límites máximos permisibles representa un riesgo para la salud pública.³⁶ Aunado a esto se presenta la problemática que representa el uso de aguas contaminadas para el riego de cultivos; los altos grados

de contaminantes y la cantidad de patógenos encontrados en agua, productos agrícolas y suelo, en parcelas continuamente regadas por aguas residuales, han provocado problemas de salud a los campesinos.⁹

En diferentes partes del mundo, las industrias producen aguas residuales altamente coloreadas, contaminando el medio ambiente descargando efluentes, con color fuerte y persistente los cuales son estéticamente y ambientalmente inaceptables. En todo el mundo, se producen anualmente 10^6 t de colorantes sintéticos, de los cuales $1-1.5 \times 10^5$ t se liberan al medio ambiente en aguas residuales.³⁷ Se estima que cada año se descargan 280000 t de colorantes textiles en efluentes industriales textiles.³⁸ Los tintes azoicos tienen diversidad en la estructura, pero su característica estructural más importante es la presencia de enlaces azoicos, es decir, $N = N-$. Este enlace puede estar presente más de una vez y estos grupos azo están conectados en ambos lados con aromáticos como el benceno y el resto naftaleno. A veces también están presentes unidades heterocíclicas aromáticas conectadas con grupos azo. Los diferentes tonos del mismo tinte que tienen varias intensidades de color se deben a estos grupos laterales aromáticos.³⁹

La mayoría de los colorantes azoicos son solubles en agua y se absorben fácilmente a través de la piel y la ingesta puede conducir al riesgo de cáncer y reacciones alérgicas, un irritante para los ojos y extremadamente peligroso, si se inhala o consume.⁴⁰ Por ejemplo, la para-fenilendiamina (PPD) también llamada 1,4-diamino benceno o 1,4-fenilendiamina, es una amina aromática, que es un componente principal de los colorantes azoicos. Los colorantes azoicos que contienen PPD son tóxicos y causan irritación de la piel, dermatitis

de contacto, quemosis, lagrimeo, exoftalmosis y ceguera permanente. La ingestión de productos PPD conduce al rápido desarrollo de edema en la cara, cuello, faringe, lengua y laringe junto con dificultad respiratoria. En algunos casos, puede causar rabdomiólisis, sobrevenir necrosis tubular aguda, vómitos, gastritis, hipertensión y vértigo ^{40,41}. Algunos colorantes azoicos son cancerígenos y mutagénicos. El verde de malaquita causa serios riesgos para la salud pública y problemas ambientales. Hasta ahora, a través de varias observaciones experimentales, se revela que el verde de malaquita es una toxina multiorgánica; disminuye la ingesta de alimentos, el crecimiento, las tasas de fertilidad y causa daño al hígado, bazo, riñón y corazón. En ratones alimentados con verde de malaquita, se observó apoptosis en el epitelio de transición de la vejiga urinaria y los folículos tiroideos ⁴².

Los colorantes reactivos causan asma, rinitis y dermatitis, dermatitis alérgica de contacto (mutagenicidad ⁴⁰, genotoxicidad ⁴³, carcinogenicidad). Los colorantes tienen una tasa muy baja de relación de eliminación de DBO a DQO (menos de 0.1). Por lo tanto, los efluentes industriales que contienen colorantes deben procesarse antes de su descarga al medio ambiente ³⁸. Existen regulaciones con respecto a los límites de color en los efluentes, que varían según los países. La remediación de las aguas residuales del tinte textil se basa no solo en la eliminación del color (decoloración), sino también en la degradación y mineralización de las moléculas de tinte ⁴⁴. De hecho, la decoloración ocurre cuando las moléculas se eliminan de la solución o cuando se rompe el enlace cromóforo, pero la molécula en el primer caso y los fragmentos principales en el segundo permanecen intactos. La absorción de luz

por las moléculas asociadas cambia de la región visible a la ultravioleta o infrarroja del espectro electromagnético. Se ha desarrollado una amplia gama de tecnologías para la eliminación de tintes sintéticos de las aguas y aguas residuales para disminuir su impacto ambiental. Estos incluyen métodos físicos, químicos y biológicos ([Tabla 3](#)).

Tabla 3 METODOS DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES

Physical	Chemical	Biological
Sedimentation	Neutralization	Stabilisation
Filtration	Reduction	Aerated lagoons
Floatation	Oxidation	Trickling filters
Foam fractionation	Catalysis	Activated sludge
Coagulation	Ion exchange	Anaerobic digestion
Reverse osmosis	Electrolysis	Fungal treatment
Solvent extraction	-	Flocculation
Ionisation radiation	-	-
Adsorption	-	-
Incineration	-	-
Distillation	-	-
Membrane treatment	-	-

Las bacterias degradan los tintes azo reductivamente en condiciones anaeróbicas para dar aminas aromáticas incoloras. Estos a su vez deben degradarse aún más debido a su posible carácter tóxico, mutagénico y / o cancerígeno en humanos y animales. Las enzimas bacterianas involucradas en la escisión reductora unida azo son generalmente azoreductasas, cuyas acciones pueden depender de la presencia de otras sustancias como cofactores, cosustratos o mediadores.³⁹ Para evitar la formación de aminas cancerígenas, las condiciones aeróbicas son preferibles en la degradación de aminas aromáticas⁴⁵, pero también debe tenerse en cuenta que algunos de ellos pueden autooxidarse a estructuras poliméricas en presencia de oxígeno⁴⁶.

En mamíferos, se sabe que el citocromo P450 y NAD (P) H:quinona oxidoreductasa actúan como azoreductasas⁴⁷. Azoreductasas producidos por las bacterias

intestinales son también involucrados en la reducción azo en los seres humanos. Debido a azoreductasas intestinales convierten muchos colorantes azo a los productos de degradación potencialmente genotóxicas en el intestino, azoreductasas son de interés incluso en toxicología (Chen y col., 2006; ⁴⁸). Colorantes azoicos se producen industrialmente como colorantes y se liberan en entornos, por lo azoreductasas bacterianas se han estudiado como una enzima clave para degradar contaminantes azoicos. Además, hay varios estudios sobre las aplicaciones más diversas y únicas de azoreductasas. Los comentarios anteriores han resumido azoreductasa actividades distribuidas en las bacterias y los aspectos generales de las enzimas (Chen y col., 2006; ⁴⁹). En la presente revisión, secuencias, clasificación, estructuras, sustratos y papeles fisiológicos primarios de azoreductasas bacterianas se destacan porque estos son aspectos notables debido a su notable diversificación. azoreductasa aplicaciones también se revisan para enfatizar su potencial biotecnológico.

10. CONCLUSIONES

Los primers diseñados y fabricados para este trabajo de investigación lograron amplificar el gen *AzoR* en cepas tipo de *Escherichia coli*, en las cepas silvestres de esta misma bacteria aisladas e identificadas del río Alseseca así mismo lograron amplificar en muestras de DNA del total de los microorganismos contenidos en muestras de agua residual recuperadas del mismo río, esto evidenció la gran sensibilidad de los primers así como su capacidad para amplificar en distintas cepas de la misma bacteria.

La amplificación del gen AzoR en las cepas silvestres y en las muestras de DNA del agua residual nos permite decir que existe un riesgo de contaminación química generada por los metabolitos secundarios carcinogénicos, como las aminas aromáticas, que son el subproducto de la degradación enzimática de los colorantes azo.

El riesgo de contaminación química más la contaminación generada por la existencia de bacterias patógenas en las aguas residuales representan un problema de salud pública para las comunidades aledañas al río Alseseca así como para los consumidores de productos agrícolas cuyos cultivos utilizan sus aguas como principal suministro de agua de riego.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Gómez-Duarte O. Contaminación de agua en países de bajos y medianos recursos es un problema de salud pública global. *Rev la Fac Med.* 2018;66(1):7-8. doi:10.15446/.v66n1.70775
2. Esteban P, Arias Z, Bernardo J, Nájera P, Hernández IC, Iván H. Los Colorantes Textiles Industriales Y Tratamientos Óptimos De Sus Efluentes De Agua Residual: Una Breve Revisión Textile Industrial Dyes and optimal wastewater effluents treatments: A short review. 2018:38-47.
3. Orduña García CA, Gutiérrez Ortega NL. Degradación De Compuestos Orgánicos En Un Reactor Asistido Por Irradiación Ultrasónica. *Jóvenes En La Cienc.* 2018;4(1):2564-2569.

4. Jaramillo-Flórez MC, Jaramillo-Ciro, Margarita; Quiroz-Betancur, Manuela; Medina-Herrera S. Potencial Biorremediación del Colorante Negro Azoico por Levadura Inmovilizada en Gelatina y Estudio Teórico de la Interacción Levadura- Colorante Potential Bioremediation of azo Black dyes by immobilized yeast in gelatin gel and Theoretical Study of Yeas. 2018;9(1):30-38. doi:10.21500/20275846.3199
5. Antonio J, Tapia R, Ramírez LC, Cortés MG, Cerezo SG. Diagnóstico de enterobacterias en el río Alseseca. :6-9.
6. Bravo EC, Toxqui GV, Tapia JAR, Roldan EIC, Calderon AIAA. Decolorization of Azo Dye by Enteropathogenic Escherichia coli Strains Isolated from Wastewater. 2014;8:37-42.
7. Edith Chávez, Julieta Acevedo, Ricardo Munguia, Fabiola Avelino EIC. BIOCONTAMINACIÓN AEREA GENERADA POR EL RIO ALSESECA Y PATOGENOS. 2007;1:2007.
8. Ivonne M, Luz R. ANÁLISIS DE FORTALEZAS Y DEBILIDADES EN LA GESTIÓN DE LA REGULACIÓN DE LAS DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES, EN LA CONAGUA. 2015.
9. Ambiental C, La EN, Atlixco RDE, et al. Pollution in the Atlixco Region: 1 . Water. 2002:243-251.
10. Olgún EJ, González-portela RE, Sánchez-galván G, Zamora- JE. Contaminación de ríos urbanos : El caso de la subcuenca del río Sordo en Xalapa , Veracruz , México Resumen. 1:178-190.

11. Jorge E, Vidal-graniel JE. Escherichia coli enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. 2003.
12. Aguilera G, Castro-escarpulli G. Gastrointestinal diseases , situation in Mexico Situación de las enfermedades gastrointestinales en México Resumen. 2011;(October).
13. Sílvia Bofill-Mas, Pilar Clemente-Casares, Néstor Albiñana-Giménez, Carlos Maluquer de Motes Porta AHG y RGL. EFECTOS SOBRE LA SALUD DE LA CONTAMINACIÓN DE AGUA Y ALIMENTOS POR VIRUS EMERGENTES HUMANOS. 2005:253-269.
14. Zulia U, Nazaret M, Elena R, et al. CRUDOS Y COCIDOS Enteropathogenic Escherichia coli in Raw and Cooked Molluscs. 2005.
15. Varela ZS, Lavalle LP, Alvarado DE. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos : una mirada en colombia Bacteria causing of foodborne diseases : an overview at colombia. 2016;32(1):105-122.
16. Rodríguez-angeles G, C M. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. 2002;44(5).
17. MONDRAGÓN SP. Decoloración biológica del colorante azul directo 2 en un filtro anaerobio/aerobio. 2007.
<http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/1732/piñamondragon.pdf?sequence=1>.
18. G. D. Jojoa-Unigarro , H.L.Rodríguez-Zambrano SAC-G. Tratamiento de aguas residuales textiles a partir de métodos biológicos. *Cintex*.

2015;20(1):11-34.

19. Juan Antonio LOZANO-ÁLVAREZ*, Virginia Francisca MARAÑÓN-RUIZ, Juan JÁUREGUI-RINCÓN¹, Iliana MEDINA-RAMÍREZ RS-G y CF-R. REMOCIÓN DE COLORANTES AZO CON ALGINATO: RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA DE COLORANTE Y EFICIENCIA DE REMOCIÓN. 2019;35(1):223-236. doi:10.20937/RICA.2019.35.01.16
20. Rojas A, Amir J, Giraldo G, et al. Empleo del reactivo de Fenton para la degradación del colorante Tartrazina *. 2009.
21. ROMERO KLO. Universidad Nacional Mayor de San Marcos “ Biodegradación de colorante azul directo por consorcios bacterianos aislados de un efluente textil de Lima , Perú .” 2018.
22. Papers JBC, Doi M. Three-dimensional Structure of AzoR from Escherichia coli. 2006;281(29):20567-20576. doi:10.1074/jbc.M513345200
23. H. Ramírez, A. Calderón WMR. Técnicas moleculares para evaluar y modificar el genoplasma vegetal.
24. Medicine USNL of. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed November 20, 2019.
25. Máttar S. Utilidad de la biología molecular en el estudio de las zoonosis. *Salim Máttar V PhD Univ Córdoba, Inst Investig.* 2000. doi:10.21897/rmvz.541
26. Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R, Rodellar C. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Aquat Rev electrónica Acuic*

ISSN-e 1578-4541, N° 45, 2016, págs 24-25. 2016;(45):24-25.

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6034805>.

27. L TDD, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real.
28. Hierro F. Electroforesis de ADN. *Herramientas Mol Apl en Ecol Asp teóricos y prácticos*. 2014:27-52.
29. Alicia C, Peña P, Dapena JD, et al. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. :1-8.
30. EMBL-EBI in Hinxton. Clustal Omega < Multiple Sequence Alignment < EMBL-EBI. <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Accessed November 20, 2019.
31. K. Hofmann MBSSI of B. BoxShade Server. https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html. Accessed November 20, 2019.
32. Andreas Untergasser HNXRTBRG and JAML. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 Nucleic Acids Research. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. Published 2007. Accessed November 20, 2019.
33. University of Wisconsin-Madison. ASAP, E. coli Genome Project. <https://asap.genetics.wisc.edu/asap/logon.php>. Published 2002. Accessed November 20, 2019.
34. Home - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Accessed

November 20, 2019.

35. Koressaar T LMKLRKAR and RM. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*. <http://primer3.ut.ee/>. Published 2018. Accessed November 22, 2019.
36. CONAGUA. Normas Oficiales Mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996 NOM-002-SEMARNAT-1996 NOM-003-SEMARNAT-1997. 1997:65.
37. Hernández González Luis Ángel , Ramírez Ramírez Norma PRM. Sobreexpresión homóloga de una azoreductasa recombinante de *Bacillus subtilis*. *Verano la Investig Científica*. 2017;3 no. 2.
38. Ali H. Biodegradation of synthetic dyes-a review. *Water Air Soil Pollut*. 2010;213: 251-273.
39. Shah K. Biodegradation of azo dye compounds. *Int Res J Biochem Biotechnol*. 1(2):005-013.
40. Tsuboy, M.S., J.P.F. Angeli, M.S. Mantovani, S. Knasmuller GAU and LRR. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI disperse blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. *Toxicol. In Vitro*. 2007;21: 1650-1655.
41. Mercier C, Chalansonnet V, Orenge S, Gilbert C. Characteristics of major *Escherichia coli* reductases involved in aerobic nitro and azo reduction. 2013;(2). doi:10.1111/jam.12294
42. Suzuki H. Remarkable diversification of bacterial azoreductases: primary sequences, structures, substrates, physiological roles, and biotechnological

- applications. *Appl Microbiol Biotechnol.*:103(10): 3965-3978.
43. Dogan, E.E., E. Yesilada LO and SY. Genotoxicity testing of four textile dyes in two crosses of *Drosophila* using wing somatic mutation and recombination test. *Drug Chem Toxicol.* 2005:28: 289-301.
 44. Indrani Jadhav, Roshan Vasniwal DS and KJ. Dyes, Microorganism-Based Treatment of Azo. *J Env Sci Technol.* 2017:9(2): 188-197.
 45. Subtilis RDEB, González H, Ángel L, Norma RR, Mario PR. Sobreexpresión homóloga de una azoreductasa recombinante de *Bacillus subtilis* . (1):835-839.
 46. M.Sudha, A.Saranya1 GS and NS. Microbial degradation of Azo Dyes: A review. *IntJCurrMicrobiolAppSci.* 2014:3(2): 670-690.
 47. Ryan A. Azoreductases in drug metabolism. *Br J Pharmacol.* 2017:174: 2161-2173.
 48. Feng J, Cerniglia CE CH. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. *Front Biosci.* 2012:1: 568-586.
 49. Misal SA, Lingojwar DP, Lokhande MN, Lokhande PD GK. Enzymatic transformation of nitro-aromatic compounds by a flavin-free NADH azoreductase from *Lysinibacillus sphaericus*. *Biotechnol Lett.* 2014:36:127 – 131.