



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Análisis de comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de especies vegetales de *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides* en suelos contaminados por metales pesados.

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Rojas Rojas, Manuel Alexander

DIRECTOR: Sánchez Rodríguez, Aminael, PhD.

LOJA – ECUADOR

2017



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2017

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

PhD.

Aminael Sánchez Rodríguez

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **Análisis de comunidades bacterianas asociadas a especies vegetales de *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides* en suelos contaminados por metales pesados** realizado por **Manuel Alexander Rojas Rojas**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre de 2017

F.....

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Manuel Alexander Rojas Rojas declaro ser autor del presente trabajo de titulación: **Análisis de comunidades bacterianas asociadas a especies vegetales de *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides* en suelos contaminados por metales pesados**, de la Titulación de **Bioquímica y Farmacia**, siendo **PhD. Aminael Sánchez Rodríguez** director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

F.....

Autor: Manuel Alexander Rojas Rojas

Cédula: 1105166118

DEDICATORIA

Con gran amor y cariño le dedico:

A mis padres Manuel y Lyda quienes me han dado la vida y supieron guiarme por el buen camino, dándome su confianza y apoyo constante para seguir adelante y consejos para no desmayar en los problemas, sin desfallecer en el intento.

A mis hermanos Kety y Jimmy por estar siempre presentes, acompañándome hasta en los momentos más difíciles.

A mis tíos y primos que con paciencia y ejemplo me han enseñado el verdadero sentido de la unión, apoyo, amor y superación.

A todas las personas que me han apoyado y han sido parte durante el trascurso de mi formación: Profesores, compañeros de clase, amigos (as), Gracias full..!!

Manuel Alexander Rojas Rojas

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a la Universidad Técnica Particular de Loja por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios y obtener mi título profesional en esta prestigiosa Institución.

A quienes forman parte Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM) por permitirme vivir una gran experiencia profesional y humana, dándome la oportunidad de realizar esta investigación, adquiriendo conocimientos, destrezas y experiencias que ayudarán al avance de mi carrera profesional.

Al PhD. Aminael Sánchez Rodríguez por la predisposición, sugerencias y apoyo como director de tesis y de manera muy especial al Bq. Oscar Amable Vivanco Galván por su ayuda y apoyo incondicional durante todo el trascurso de mi trabajo, por su asesoramiento y valiosos consejos en todo el proceso de esta investigación.

A mis profesores a quienes les debo la gran parte de mis conocimientos, gracias por su paciencia y enseñanza.

Finalmente agradezco a mis amigos, compañeros y a todas las personas que de distintas maneras hicieron posible la realización de esta labor y han contribuido a que culminase con mi carrera profesional.

Manuel Alexander Rojas Rojas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I.....	5
MARCO TEÓRICO	5
1.1. Ecosistemas y contaminación por metales pesados.....	6
1.2. Organismos utilizados para la recuperación de sitios contaminados por metales pesados	7
1.3. El ARNr 16S empleado como diana molecular para la Identificación de bacterias.....	8
1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa.....	8
1.3.2. Electroforesis.....	9
1.3.3. Secuenciación.....	9
1.3.4. Análisis filogenético.....	10
CAPITULO II.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
2.1. Área de estudio.....	13
2.2. Obtención y preparación de muestras de suelo de la rizósfera.....	13
2.3. Aislamiento de las comunidades microbianas cultivables mediante la técnica de diluciones seriadas.....	13
2.4. Obtención de cultivos puros bacterianos.....	14
2.5. Criopreservación de bacterias.....	14
2.6. Reactivación en medio de cultivo líquido.....	14
2.7. Caracterización molecular de comunidades bacterianas.....	15
2.7.1. Extracción de ADN genómico.....	15
2.7.2. Amplificación del ADN.....	15
2.7.3. Visualización del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa.....	15
2.7.4. Purificación de ADN.....	15
2.7.5. Secuenciación de los fragmentos amplificados.....	16

2.7.6. Análisis Bioinformático	16
2.7.7. Análisis filogenético	16
CAPITULO III.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
3.1. Aislados puros bacterianos	18
3.2. Viabilidad de cepas.	18
3.3. ADN genómico de bacterias	18
3.4. Verificación de los amplicones a través de Electroforesis	18
3.5. Análisis de secuencias y comparación en base de datos.	19
3.6. Análisis filogenético	21
CONCLUSIONES	26
RECOMENDACIONES.....	27
BIBLIOGRAFÍA:.....	28

RESUMEN

En ciertos ecosistemas contaminados, varios microorganismos como las bacterias pueden mejorar la producción de biomasa y la tolerancia de las plantas frente a metales pesados como condiciones de estrés. En este contexto el presente estudio busca la identificación y comparación de las comunidades bacterianas que se encuentran asociadas a especies vegetales (i.e. *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides*) mediante el empleo de las técnicas moleculares: PCR y la secuenciación de Sanger. Los aislamientos bacterianos se aislaron a partir de muestras de suelo de la rizósfera contaminados por metales pesados. El análisis molecular se basó en la amplificación de una región parcial del ARNr 16S. El análisis filogenético evidenció que los microorganismos aislados pertenecen a tres géneros: *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Serratia* los cuales se relacionan con géneros de bacterianas con capacidad PGPR (por sus siglas en inglés, que significan plant growth promoting rhizobacteria, o rizobacteria promotora del crecimiento vegetal). Con esta información se pueden formular proyectos para biorremediar suelos contaminados con metales pesados a partir de los aislados identificados.

PALABRAS CLAVE: ARNr 16S, biorremediación, rizobacterias, PGPR.

ABSTRACT

In certain contaminated ecosystems, various microorganisms such as bacteria can improve biomass production and tolerance of plants to heavy metals as stress conditions. In this context, the present study seeks the identification and comparison of the bacterial communities that are associated to vegetal species (i.e. *Miconia zamorensis* and *Erato polymnoides*) using molecular techniques: PCR and Sanger sequencing. Bacterial isolates were isolated from soil samples from the rhizosphere contaminated by heavy metals. Molecular analysis was based on the amplification of a partial region of 16S rRNA. The phylogenetic analysis showed that the isolated microorganisms belong to three genera: *Bacillus*, *Lysinibacillus* and *Serratia*, which are related to bacterial genera with PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) capacity. Projects can be formulated to remediate contaminated soils with heavy metals using the identified isolates.

KEYWORDS: 16S rRNA, bioremediation, rhizobacteria, PGPR.

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador la actividad minera artesanal de pequeña escala genera un alto grado de contaminación ambiental, sobre todo aquella relacionada con la extracción de oro, ya que la extracción de este mineral requiere del uso de metales pesados como mercurio, plomo y sustancias químicas como cianuro, ácido sulfúrico, entre otros, los mismos que causan contaminación de todos los ecosistemas contiguos (Buckley & Schmidt, 2003; Conant & Fadem, 2011).

Por ejemplo en el proceso de amalgamación de todo el mineral con mercurio, solo el 10% del Hg agregado se combina con el oro para producir la amalgama y el 90% sobrante es liberado al medio ambiente (UNEP, 2008).

La contaminación y subsecuente acumulación de múltiples metales pesados en sitios post industriales, tales como los suelos de minas, pueden influenciar significativamente en la salud pública debido a la contaminación de las cadenas alimenticias y las fuentes de agua, además de causar daños a los ecosistemas afectando a la fauna, cobertura vegetal, calidad de los cultivos y causar cambios en la composición y actividad de las comunidades microbianas. Por lo tanto, es un problema ambiental en todo el mundo que requiere atención inmediata (Chen et al., 2015; Guo et al., 2009; Mclaughlin, Zarcinas, Cook, Stevens, & Cook, 2000; Zhu et al., 2013).

En la actualidad, son utilizadas especies vegetales y microorganismos del suelo para remover o retener contaminantes, convirtiéndose en una alternativa de interés en todo el mundo para recuperar suelos contaminados por metales pesados. Esta nueva alternativa utiliza biotecnología de bajo costo y no genera productos de desecho a diferencia de los métodos tradicionales que utilizan métodos de ingeniería y tratamientos químicos (Ali, Khan, & Sajad, 2013; Gonzalez-Chavez, 2005).

Las bacterias que desempeñan papeles fundamentales en varios ciclos biogeoquímicos y son responsables de la degradación de compuestos orgánicos, también influyen en los ecosistemas que se encuentran por encima del suelo contribuyendo a la nutrición y salud de las plantas. Asimismo, son un gran aporte dentro del mantenimiento de la estructura y fertilidad del suelo; así como también, en la degradación e inmovilización de contaminantes,

ejerciendo un efecto favorable en el crecimiento y en la protección de las plantas frente a diferentes factores (Ali et al., 2013; Gonzalez-Chavez, 2005; Kirk et al., 2004).

Es por esto que el presente estudio se enfoca en la identificación molecular de especies bacterianas asociadas a la rizósfera de especies vegetales.

En los siguientes apartados, se describe: El capítulo 1 se refiere al marco teórico, en donde se describe las bases teóricas para la comprensión de esta investigación, que incluyen, una breve descripción de los metales pesados y sus efectos en los seres vivos, la definición de biorremediación, así como las técnicas moleculares que actualmente se utilizan en la identificación de grupos bacterianos.

En el capítulo 2, se describe de forma detallada la metodología empleada: Aislamiento de las comunidades microbianas cultivables a partir de muestras de suelo de la rizósfera, obtención de ADN genómico, amplificación y el análisis del fragmento parcial de la región 16S. En el capítulo 3 se muestra los resultados y discusión obtenidos durante el desarrollo de este estudio.

El objetivo general del presente estudio fue la identificación molecular y la comparación de las comunidades bacterianas asociadas a la rizósfera de las especies vegetales *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides*, aislados de suelos contaminados por metales pesados.

Con el presente proyecto se podrá determinar la composición de la comunidad microbiana, esta información será importante para aplicaciones biotecnológicas que incluyan el uso de consorcios microbianos con capacidad de biorremediación de zonas contaminadas.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Ecosistemas y contaminación por metales pesados.

Los metales pesados no son biodegradables y por lo tanto se acumulan en el medio ambiente, causando efectos tóxicos sobre las plantas y limitando el crecimiento vegetal, debido a que las especies difieren ampliamente en su tolerancia a estas condiciones. Los contaminantes también ejercen un efecto perjudicial en la cadena alimenticia de varias especies, y a su vez, causan la muerte de muchos animales que consumen plantas con un alto contenido de metales pesados (Ali et al., 2013; Durán, 2010; Gonzalez-Chavez, 2005).

Adicionalmente, la contaminación de la cadena alimenticia, tiene efectos adversos sobre la salud humana, ya que muchos de estos metales pesados y metaloides son tóxicos y pueden causar efectos no deseables y problemas severos, incluso a bajas concentraciones. Los desechos de la minería, son un serio problema a nivel mundial, que incrementa cada vez más con la industrialización (Ali et al., 2013).

Para que exista un adecuado equilibrio del ecosistema, el contenido de metales pesados en suelos, debería ser únicamente función de la composición del material original y de los procesos edafogénicos que tienen lugar en él; no obstante, existe un incremento en el contenido de estos metales en el suelo en cantidades considerables provocadas por la actividad antropogénica, siendo sin duda, la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas (Durán, 2010).

Según (García & Dorronsoro, 2005, citado por Durán, 2010) los metales pesados incorporados al suelo pueden seguir cuatro diferentes vías:

- Quedar retenidos en el suelo, ya sea disueltos en la solución o bien fijados por procesos de adsorción, complejación y precipitación.
- Ser absorbidos por las plantas y así, incorporarse a las cadenas tróficas.
- Pasar a la atmósfera por volatilización.
- Movilizarse a las aguas superficiales o subterráneas

Los metales pesados están agrupados en la categoría de 53 elementos con un peso específico mayor a 5 g/cm³ o cuyo número atómico es superior a 20, excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos. Como metales pesados esenciales se encuentran el zinc (Zn), cobre (Cu), manganeso (Mn) y cobalto (Co), estos elementos son requeridos en pequeñas cantidades o cantidades traza, son necesarios para que los organismos

completan su ciclo vital. Cuando las cantidades sobrepasan el umbral de referencia se establecen como sustancias tóxicas; mientras que cadmio (Cd), plomo (Pb), mercurio (Hg) o cromo (Cr), no tienen funciones biológicas conocidas en las plantas y cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos ocasiona disfunciones en el organismo (Alarcón & Ferrera-Cerrato, 2013; Durán, 2010).

1.2. Organismos utilizados para la recuperación de sitios contaminados por metales pesados

Actualmente las nuevas tecnologías apuntan al uso de microorganismos y plantas, considerando a la biorremediación como la manipulación de sistemas biológicos para efectuar cambios en el ambiente. Aparece como una alternativa para aliviar cantidades de metales pesados en los suelos y dependiendo del medio que se utilice para la descontaminación del suelo, este proceso de biorremediación puede clasificarse en: Fitorremediación, y biorremediación microbiana (Bonilla, 2013)

La fitorremediación, implica el uso de plantas para mejorar el suelo y/o la calidad del agua mediante la inactivación o la translocación de los contaminantes en los diferentes órganos de la planta sin efectos negativos en la actividad biológica, estructura y fertilidad del suelo (Vigliotta, Matrella, Cicatelli, Guarino, & Castiglione, 2016).

El éxito de la fitorremediación también depende de las asociaciones beneficiosas entre los microorganismos del suelo y las plantas, en donde la planta proporciona una fuente de carbono para las bacterias, y a su vez, las rizobacterias son capaces de producir ciertas sustancias llamadas fitohormonas, que promueven el crecimiento de la planta, la cual ayuda a disminuir el impacto negativo de la toxicidad por metales pesados. (Vigliotta et al., 2016).

La biorremediación microbiana se basa en el uso de microorganismos, que incluyen, bacterias, hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos que tienen la capacidad para transformar, degradar o acumular compuestos tóxicos, tales como, hidrocarburos, compuestos heterocíclicos y metales tóxicos, entre otros (Bonilla, 2013; Das & Dash, 2014).

Los microorganismos atacan enzimáticamente los contaminantes y los convierten en compuestos inocuos o menos tóxicos. Los metales pesados no son biodegradables, pero las bacterias pueden bioacumularlos, inmovilizarlos o removerlos más fácilmente del ambiente a

través de la quelación de metales y la subsecuente eliminación mediante la secreción de exopolisacáridos (Das & Dash, 2014; Karigar & Rao, 2011).

Se han propuesto diferentes hábitats para la detección y aislamiento de cepas microbianas capaces de biotransformar y/o bioacumular metales pesados, tales como el suelo, aguas residuales de diferentes actividades industriales o en abono orgánico (Vargas-García, López, Suárez-Estrella, & Moreno, 2012). Para lograr complementar el proceso de biorremediación es necesario identificar o determinar taxonómicamente los microorganismos involucrados en el proceso.

1.3. El ARNr 16S empleado como diana molecular para la Identificación de bacterias.

Los métodos fenotípicos de identificación bacteriana pueden carecer de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas de un aislamiento en estudio, por lo que se crean varios problemas a la hora de obtener una identificación definitiva. Es por esto que se incluyen los métodos moleculares como procedimientos complementarios o alternativos para establecer una identificación más precisa (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011).

En los estudios taxonómicos o de filogenia se han utilizado diferentes genes como marcadores moleculares para la identificación de bacterias. Entre ellos se encuentra el ARNr 16S, un polirribonucleótido codificado por el gen *rrs* o ADN ribosomal ARNr 16S incluido en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Bou et al., 2011).

El ARNr 16S, se presenta en casi todas las bacterias, existiendo como una familia de multigenes u operones, su función no ha cambiado con el tiempo y presenta un alto grado de conservación, lo que sugiere que los cambios de secuencia aleatorios son una medida más precisa del tiempo, es decir que actúa como un cronometro molecular de evolución, además, es lo suficientemente grande (1,500 pb) para propósitos informáticos. Es por esto que el ARNr 16S es el marcador genético más comúnmente utilizado y en la mayoría de los casos es suficiente para realizar una identificación más precisa a nivel de género e incluso de especie (Bou et al., 2011; Janda & Abbott, 2007).

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica que fue desarrollada a mediados de la década de 1980 por Kary Mullis y que desde entonces ha facilitado muchos trabajos en los campos de la biotecnología y genética. Esta técnica posee una alta sensibilidad, está basada en el mecanismo de replicación del ADN y en el uso de ADN polimerasas termoestables extraídas de bacterias termófilas resistentes a altas temperaturas (70° – 90°C), permitiendo copiar millones de veces una secuencia de ADN, con la ventaja de que dicha secuencia puede estar en muy pocas moléculas, por lo cual, se puede amplificar el ADN a partir de una sola célula o pocas células (Solari, 2004).

1.3.2. Electroforesis.

La electroforesis en gel de agarosa es un método utilizado comúnmente para separar proteínas, ADN o ARN. Las moléculas de ácido nucleico se separan por tamaño mediante la ayuda de un campo eléctrico donde las moléculas con carga negativa migran hacia el polo del ánodo (positivo). El flujo migratorio está determinado únicamente por el peso molecular en el que las moléculas de menor peso emigran más rápido que las más grandes. Con el fin de visualizar las moléculas de ácido nucleico en geles de agarosa, se usan colorantes como el bromuro de etidio o SYBR Green. La iluminación de los geles de agarosa con luz UV de 300 nm se utiliza posteriormente para visualizar los ácidos nucleicos teñidos (Yilmaz, Ozic, & Gok, 2012).

La electroforesis en gel de agarosa proporciona múltiples ventajas que la hacen muy popular. Por ejemplo, los ácidos nucleicos no se alteran químicamente durante el proceso de separación por tamaño y los geles de agarosa pueden ser fácilmente visualizados y manipulados. Además, las muestras pueden recuperarse y extraerse de los geles fácilmente para estudios posteriores (Yilmaz et al., 2012).

1.3.3. Secuenciación.

El término secuenciación de ADN se refiere a los métodos para determinar el orden de las bases de nucleótidos adenina, guanina, citosina y timina en una molécula de ADN. Las técnicas de secuenciación son herramientas clave en muchos campos y un gran número de diferentes ciencias están recibiendo los beneficios de estas técnicas, que van desde la arqueología, la antropología, la genética, la biotecnología, la biología molecular, las ciencias forenses, entre otros (Franca, Carrilho, & Kist, 2002; Munshi, 2012).

En la actualidad, el método de Sanger o método de terminación de la cadena, es el más utilizado para la secuenciación de ácidos nucleicos, es más eficiente, utiliza menos químicos tóxicos y menor cantidad de radioactividad que el método de degradación química de Maxam y Gilbert (Munshi, 2012; Necochea & Canul Tec, 2004).

El método requiere de un molde de ADN de una sola hebra, un primer de ADN, una ADN polimerasa, nucleótidos libres normales o desoxinucleótidos (dNTPs) y nucleótidos modificados que terminan la elongación de la cadena de ADN y que están marcados radioactivamente o fluorescentemente, también llamados didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs), los cuales constituyen el principio clave del método de Sanger (Munshi, 2012).

La muestra de ADN a ser secuenciada, se divide en cuatro reacciones de secuenciación separadas, que contienen los cuatro desoxinucleótidos estándar (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) y la ADN polimerasa. A cada reacción se añade sólo uno de los cuatro didesoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) que son los terminadores de la cadena, los cuales carecen del grupo hidroxilo en su extremo 3', grupo necesario para la formación de un enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos, terminando así la extensión de la cadena de ADN sintetizada por la ADN polimerasa (Munshi, 2012; Necochea & Canul Tec, 2004).

La incorporación de los ddNTPs es al azar, dando como resultado la formación de fragmentos de ADN de todos los tamaños posibles que se pueden distinguir entre sí por el tipo de marcaje que llevan al final de la cadena. A continuación, los fragmentos de ADN recién sintetizados y marcados, se separan por tamaño mediante electroforesis en gel con cuatro carriles distintos por cada una de las cuatro reacciones, para determinar la secuencia del molde de ADN (Munshi, 2012; Necochea & Canul Tec, 2004).

1.3.4. Análisis filogenético.

El objetivo de los análisis filogenéticos es inferir las relaciones evolutivas de un grupo taxonómico en estudio, a través de un árbol filogenético estimado que refleje el proceso de evolución, donde las entidades biológicas son el resultado de “descendencia con modificación” entre especies ancestrales y descendientes. Esto se logra mediante la búsqueda de caracteres morfológicos o moleculares como indicios de descendencia con modificación en las especies (Peña, 2011).

En los estudios de sistemática filogenética, Maximum Likelihood, se encuentra entre los métodos más utilizados. Se basa en modelos de evolución molecular, en los que se toma en cuenta conocimiento sobre los caracteres, en especial caracteres moleculares (frecuentemente secuencias de nucleótidos de ADN). Maximum Likelihood, estima la probabilidad de qué tan bien la matriz de caracteres es explicada por los árboles filogenéticos (Peña, 2011).

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio.

En el área minera de Chinapintza del cantón El Pangui, provincia de Zamora Chinchipe, se establecieron dos transectos de 50m². Las coordenadas son 4°02'16.6"S 78°34'14.9"W, cerca de la frontera con Perú a 1854 m.s.n.m. (Figura 1).



Figura 1: Ubicación de las áreas de muestreo en Chinapintza - Zamora Chinchipe. Transecto A: suelo contaminado al margen de un caudal de agua que sirve de vertedero de residuales de la actividad minera. Transecto C: suelo control, área no contaminada ubicada 300m al norte de la parcela A.

Fuente: Ochoa (2016).

Elaboración: Ochoa (2016).

2.2. Obtención y preparación de muestras de suelo de la rizósfera.

Se colectaron diez muestras (plantas), tanto de *Miconia zamorensis* como de *Erato polymnoides* en el suelo control y el suelo contaminado.

A partir de cada planta colectada, se separó el suelo de la rizósfera y se realizó un mix de muestras obtenidas del sitio control y contaminado. Posteriormente, se tomó 1 gramo de las muestras de suelo de rizósfera y se suspendió en un tubo de ensayo con 100 ml de agua destilada estéril (muestra madre).

2.3. Aislamiento de las comunidades microbianas cultivables mediante la técnica de diluciones seriadas.

De la muestra madre, se tomó 1 ml y se añadió a un tubo con 9 ml de agua destilada estéril para obtener una primera dilución de 10 (10^{-1}), luego 1 ml de esta dilución se añadió a un tubo con 9 ml de agua destilada estéril para obtener una segunda dilución de 100 (10^{-2}). Este procedimiento se repitió hasta la dilución 10^{-6} .

Posteriormente, se tomó 1 ml de la dilución 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} y se colocó homogéneamente en cajas Petri con el medio de cultivo BBL™ Trypticase™ Soy Agar (TSA) previamente esterilizado. Los medios de cultivo se incubaron a 27°C y las colonias fueron monitorizadas después de 48 a 72 horas.

2.4. Obtención de cultivos puros bacterianos.

Las colonias individuales fueron seleccionadas en base a sus diferencias morfológicas y colores y fueron aisladas para la obtención de cultivos puros.

Se realizó la inoculación de una caja Petri a través de los cuatro cuadrantes con medio de cultivo TSA previamente esterilizado. Los medios de cultivo fueron luego colocados de forma invertida en una incubadora a 27°C y monitoreados cada 24 horas hasta observar crecimiento.

2.5. Criopreservación de bacterias.

Con ayuda de un asa metálica estéril, se tomó directamente de la caja Petri, una colonia y se la sembró en criotubos de almacenamiento, los cuales contenían 1 ml de BBL™ Trypticase™ Soy Broth (TSB) con 400 µl de glicerol previamente esterilizados. Se realizó 3 réplicas por cada cultivo bacteriano.

Los criotubos fueron incubados a 27°C durante 48 horas hasta observar crecimiento en el fondo del criovial. Luego fueron colocados en congelación a -80°C para su conservación.

2.6. Reactivación en medio de cultivo líquido.

Se seleccionaron 96 cultivos puros que correspondían a: Miconia Control 24; Miconia Polluted 24; Erato Control 24; y Erato Polluted 24. Las cepas puras bacterianas fueron reactivadas después de un periodo de tiempo en congelación de 8 semanas, para lo cual, se procedió a inocular 300 µL de cada cultivo bacteriano en un tubo con 10 ml de nuevo medio líquido, BBL™ Trypticase™ Soy Broth (TSB), los tubos fueron sellados independientemente

con parafilm y cubiertos con papel aluminio para incubarse a 27°C en agitación continua (75 rpm - 24 horas). Esto con el objetivo de incrementar la biomasa bacteriana para la extracción de ADN.

2.7. Caracterización molecular de comunidades bacterianas.

2.7.1. Extracción de ADN genómico.

Se procedió a realizar la extracción de ADN de bacterias, a partir de las 96 muestras bacterianas cultivadas en el medio de cultivo líquido por 24 horas, para ello se empleó el kit de extracción UltraClean Microbial DNA Isolation kit (MoBio) siguiendo el protocolo del fabricante.

2.7.2. Amplificación del ADN.

La región parcial del ARNr 16S fue amplificado mediante PCR aplicando los primers Eub338 5' -ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG- 3' (forward) y Eub518 5' -ATT ACC GCG GCT GCT GG- 3' (reverse) (Fierer, Jackson, Vilgalys, & Jackson, 2005) y con la ayuda de un termociclador (AppliedBiosystem). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial de 9 min a 94°C seguido de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos de alineamiento a 55°C, y una extensión de 45 segundos a 72°C, y una etapa de polimerización final de 72°C durante 7 min. Cada reacción (25 µL) contenía 5 U de GoTag DNA polimerasa (PROMEGA), 5 µL de buffer de reacción 5X, MgCl₂ 1 mM, 1 µL de ADN molde, 0,2 mM de dNTPs (PROMEGA) y 0,25 µL de los primers.

2.7.3. Visualización del ADN por medio de electroforesis en geles de agarosa.

Los amplicones de la PCR fueron separados mediante una corrida electroforética a 128 voltios y 300 mA durante 25 minutos en gel de agarosa al 1%, preparado con buffer SB1X y SYBR®Safe para la visualización del ADN en el gel. Las muestras se prepararon tomando 2 µL del producto de la PCR mezclado con 1 µL de buffer de corrida (5X Green GoTaq®Flexi Buffer) y se cargaron en cada pocillo del gel junto con 2 µL del marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) en el último pocillo.

2.7.4. Purificación de ADN.

Una vez terminada la comprobación de todos los productos de la PCR mediante electroforesis, se procedió a realizar la purificación de ADN, para lo cual, se utilizó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo el protocolo del fabricante.

2.7.5. Secuenciación de los fragmentos amplificados.

Los productos de PCR purificados, fueron colocados en una placa de 96 pocillos con un volumen de 15 µL por muestra, se sellaron y se enviaron a la compañía MacroGen, Korea (<http://www.macrogen.com/kor/>) para la obtención de las secuencias.

2.7.6. Análisis Bioinformático.

El análisis fue realizado a partir de las 96 secuencias correspondientes a Erato Control (24), Miconia Control (24), Erato Polluted (24), Miconia Polluted (24).

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit (Versión 7.2.5) y luego comparadas con secuencias en la base de datos GenBank utilizando la opción Blast del sitio web NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar secuencias estrechamente relacionadas e identificar las cepas bacterianas.

Sobre la base de máxima identidad, fueron seleccionadas las primeras diez secuencias y utilizando la herramienta MAFFT (Versión 7, estrategia G-INS-i), fueron alineadas junto con las secuencias obtenidas de los aislados bacterianos.

2.7.7. Análisis filogenético.

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando el software MEGA7. El árbol filogenético fue inferido usando el método de Máxima Verosimilitud. Las divergencias de las secuencias se cuantificaron utilizando el modelo de distancia “Kimura-2-Parameter”. Para el tratamiento de los gaps, se eligió la opción “Use all sites”. Se calcularon un total de 1000 repeticiones de bootstrap.

CAPITULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislados puros bacterianos

Se aislaron por diluciones seriadas, un total de 209 bacterias (cultivos puros), correspondientes a: Miconia Control 58; Miconia Polluted 69; Erato Control 38; y Erato Polluted 44. De las 209 bacterias, se tomaron 24 cultivos puros de cada una de las cuatro categorías para realizar la identificación molecular.

3.2. Viabilidad de cepas.

Se determinó una viabilidad del 100 % de las cepas usadas luego de ser reactivadas en medios específicos, previo a la extracción de ADN.

3.3. ADN genómico de bacterias

Se logró hacer una extracción completa de ADN de las 96 muestras usadas y se verificó que la cantidad y calidad del ADN son idóneas para trabajar.

3.4. Verificación de los amplicones a través de Electroforesis.

Un total de 96 muestras fueron analizadas mediante electroforesis y se confirmó que todos los fragmentos de ADN amplificados tienen los tamaños esperados de aproximadamente 200 pares de bases en relación al marcador de peso molecular. La figura 2 muestra los resultados de los productos amplificados a través de PCR. Con los primers Eub338 y Eub518.

Para el desarrollo del presente estudio, se realizó una amplificación parcial del ARNr 16S correspondiente a la región hipervariable V3 del gen, cuyo tamaño aproximado es de 200 pb. Dicha región ha demostrado ser la más destacada para los estudios de diversidad bacteriana debido a su mayor variabilidad y secuencia hipervariable más larga (Vasileiadis et al., 2012).

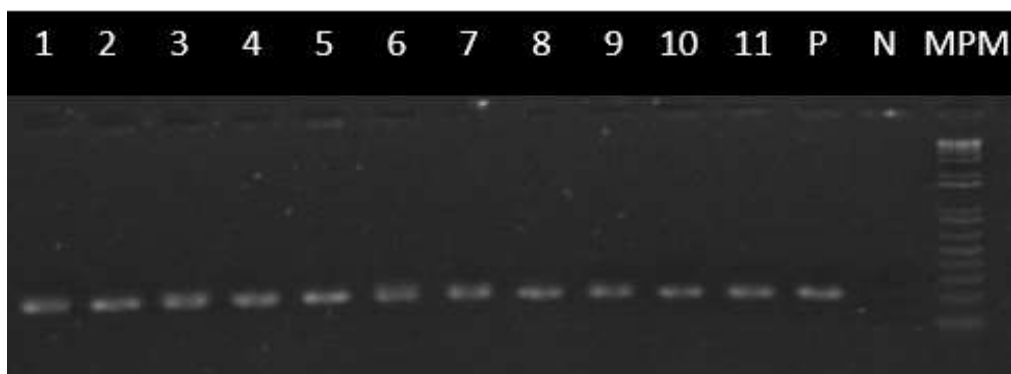


Figura 2: Amplificación por PCR de un fragmento corto de la región 16S en bacterias: 1-2: Muestras de *Miconia zamorensis* contaminado (MP); 3-5: Muestras de *Miconia zamorensis* control (MC); 6-8: Muestras de *Erato polymnoides* contaminado (EP); 9-11: Muestras de *Erato polymnoides* control (EC); P control positivo; N Control negativo; MPM marcador de peso molecular.

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

3.5. Análisis de secuencias y comparación en base de datos.

Luego de realizar el análisis de cada cromatograma se determinó que 61 secuencias presentan cromatogramas homogéneos para el análisis bioinformático. Las 35 secuencias faltantes no se utilizaron para la identificación molecular, ya que estas secuencias presentaban cromatogramas fallidos o irregulares.

Tabla 1: Comparación de secuencias de aislados bacterianos con BLAST.

Codigo	Fuente de aislamiento		Comparación filogenética basada en la base de datos del GenBank*
	Especie vegetal	Zona de muestreo	
EC1	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Serratia sp.</i>
EC2	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Lysinibacillus sp.</i>
EC3	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus sp.</i>
EC4	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Lysinibacillus sp.</i>
EC5	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Lysinibacillus sp.</i>
EC6	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Uncultured Bacillus sp.</i>
EC7	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>
EC8	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>
EC9	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus sp.</i>
EC10	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>
EC11	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>
EC12	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus sp.</i>
EC13	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>
EC14	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>

EC15	<i>Erato Polymnoides</i>	B	<i>Bacillus anthracis</i>
EP1	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Serratia sp.</i>
EP2	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Lysinibacillus sp.</i>
EP3	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
EP4	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
EP5	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
EP6	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
EP7	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
EP8	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus sp.</i>
EP9	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Streptomyces sp.</i>
EP10	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EP11	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
EP12	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
EP13	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
EP14	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
EP15	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EP16	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
EP17	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EP18	<i>Erato Polymnoides</i>	A	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC1	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Serratia marcescens</i>
MC2	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Lysinibacillus sp.</i>
MC3	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Lysinibacillus sp.</i>
MC4	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC5	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
MC6	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC7	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>
MC8	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>
MC9	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC10	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus sp.</i>
MC11	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC12	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>
MC13	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus cereus</i>
MC14	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MC15	<i>Miconia zamorensis</i>	B	<i>Serratia sp.</i>
MP1	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Serratia marcescens</i>
MP2	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Serratia sp.</i>
MP3	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
MP4	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Bacillus sp.</i>
MP5	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Lysinibacillus sp.</i>
MP6	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Lysinibacillus sp.</i>
MP7	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
MP8	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Bacillus sp.</i>
MP9	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Bacillus sp.</i>
MP10	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
MP11	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MP12	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Bacillus cereus</i>
MP13	<i>Miconia zamorensis</i>	A	<i>Bacillus thuringiensis</i>

La presente tabla muestra la comparación de las secuencias de los aislados con la base de datos, donde, A indica el lugar donde fue muestreado (área contaminada) y B (área control no contaminada). Las 61 secuencias fueron analizadas a través de BLAST, mostrando afiliación de las secuencias de las cepas bacterianas con las secuencias homologas cercanas a la base de datos del BLAST con un porcentaje de similitud del 99 – 100%.

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

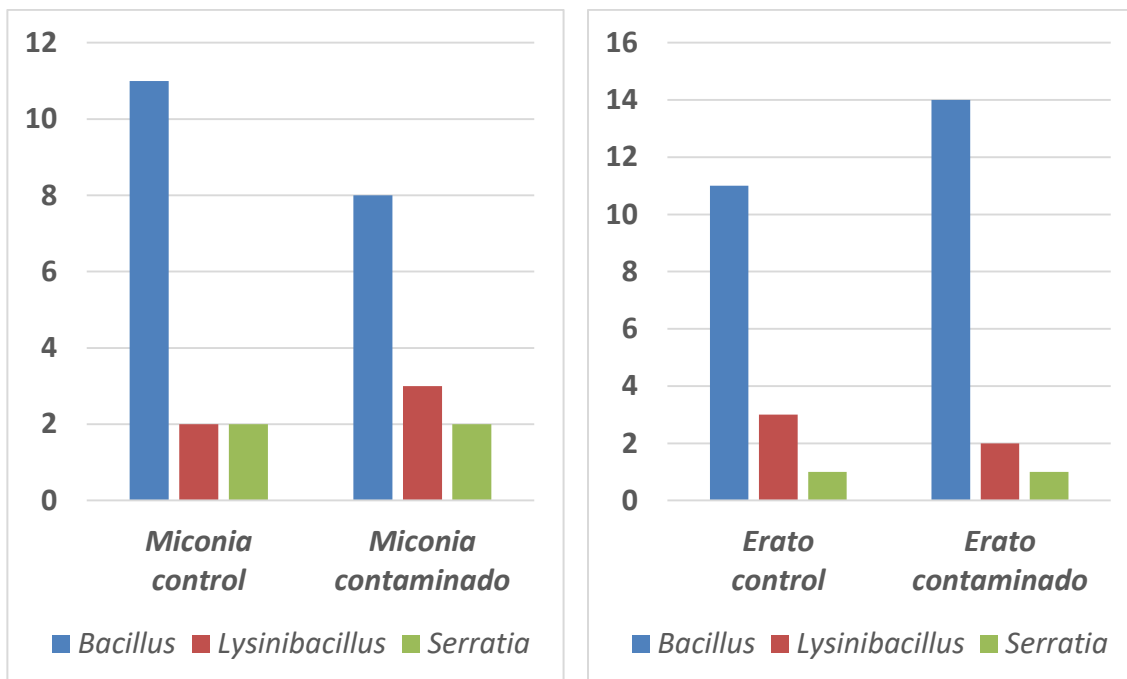


Figura 3 y figura 4: las presentes gráficas, muestran la diversidad y el número total de aislados bacterianos identificados, asociados a la rizósfera de *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides* respectivamente. El género más predominante en ambos casos fue el género *Bacillus*, seguido de *Lysinibacillus* y *Serratia*.

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

3.6. Análisis filogenético.

El análisis filogenético basado en la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal, reveló la similitud de los aislados bacterianos a los géneros *Bacillus* y *Lysinibacillus* pertenecientes al filo *Firmicutes* y *Proteobacteria* (género *Serratia*). El árbol construido por el método de Máxima Verosimilitud confirmó la posición filogenética de las cepas bacterianas (Figura 5).

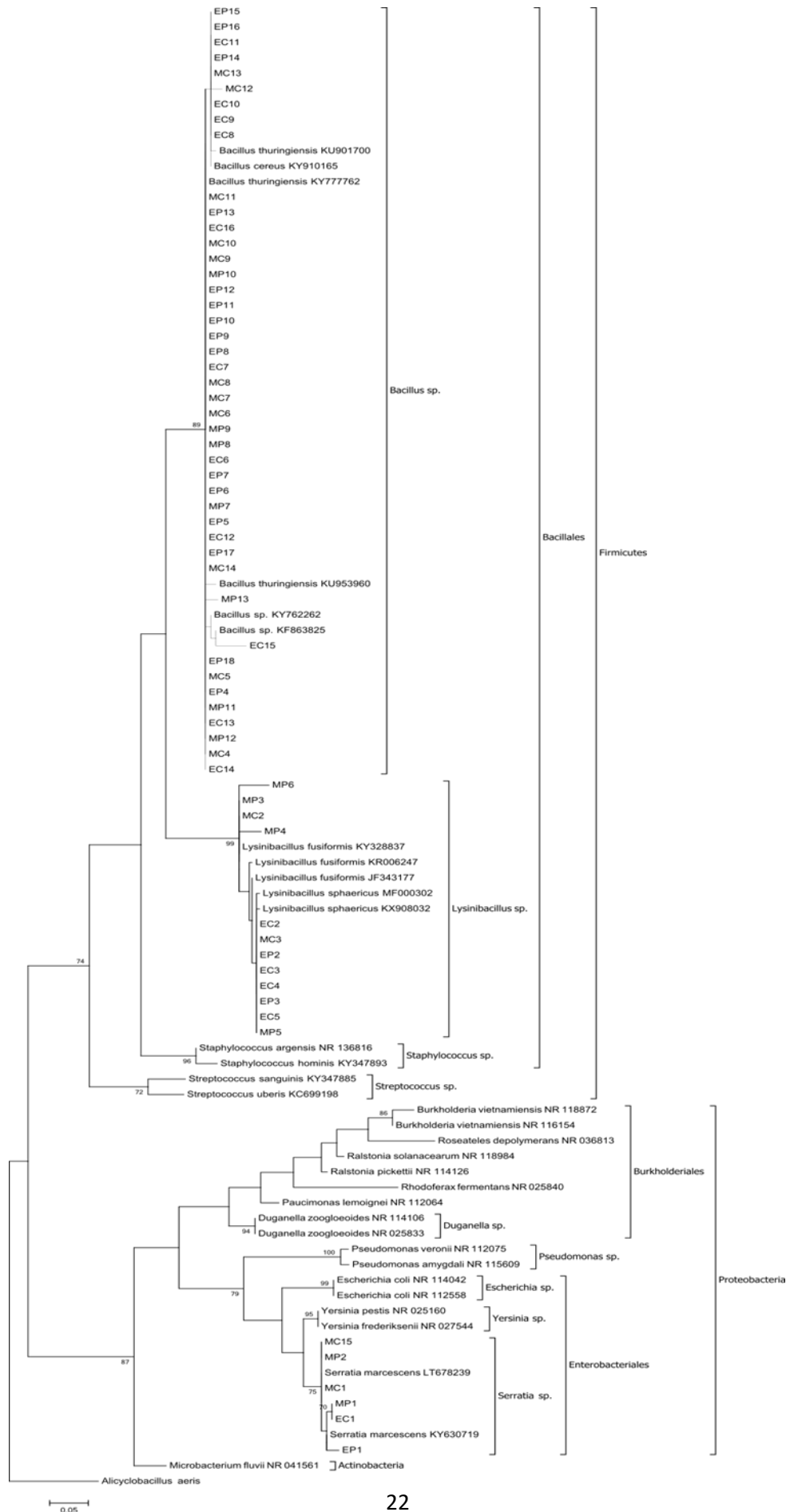


Figura 5: Relaciones filogenéticas basadas en la secuenciación parcial del gen 16S rRNA entre las cepas aisladas y las secuencias de varias especies de referencia recuperadas de la base de datos GenBank del NCBI. El árbol fue generado mediante el método de Máxima Verosimilitud con 1000 réplicas de bootstrap. Solo se muestran los valores de bootstrap $\geq 70\%$. Los números de acceso al GenBank para las secuencias de referencia se dan después del nombre de la cepa. La especie *Alicyclobacillus aeris* se utilizó como grupo externo.

Fuente: autor.

Elaboración: autor.

En el presente estudio, se ha podido conocer la presencia de los géneros bacterianos *Bacillus*, *lysini bacillus* y *Serratia* en las áreas de muestreo A (zona contaminada) y B (zona no contaminada). A través del análisis del árbol filogenético, se evidenció la presencia de tres clados, el de *Bacillus*, *Lysinibacillus* y *Serratia* de más frecuente a menos frecuente respectivamente.

La exposición a metales pesados puede mejorar la tolerancia microbiana o resistencia (por exposición a largo plazo) a los metales pesados debido a la rápida adaptación de estos microorganismos a los cambios ambientales (Chen et al., 2015).

Se sabe que algunas bacterias de la división *Firmicutes* (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus anthracis*) están relacionadas con la formación de endósporas que le confieren a las bacterias la capacidad de sobrevivir a condiciones inhóspitas. Además la exposición a metales pesados puede llevar a la selección de estos microorganismos debido a su capacidad para tolerar estos contaminantes. Bajo estas condiciones, se ha propuesto que la dominancia de algunos grupos bacterianos se debe a interacciones competitivas en las que algunas especies bacterianas son eliminadas por exclusión competitiva y las especies mejor adaptadas son las que dominan (Aislabie, Jordan, & Barker, 2008; Zhang, Huang, He, & Sheng, 2012).

Varios estudios han reportado que las especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *lysini bacillus* y *Serratia* aislados en este estudio, están relacionadas con cepas degradantes y resistentes a los metales pesados. Tomova et al., (2014) indicaron que varias cepas del género *Bacillus* y la especie *Lysinibacillus fusiformis* son resistentes a Pb, Cu, Ni y Cr y que la especie *Bacillus amyloliquefaciens* es resistente a iones de Zn. Otras especies del género *Bacillus* tales como *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, y

Bacillus mycoides (también aisladas en este estudio) entre otras, fueron reportadas, como resistentes a diferentes metales pesados como Zn, Cd, Pb, Cr, Fe, Co y Ni. (Gupta, Chatterjee, & Gupta, 2012; V. Kumar, Singh, Singh, & Upadhyay, 2015; Luo et al., 2011; Pepi et al., 2007).

Cepas del género *Lysinibacillus* nativas de Colombia, han sido reportadas como biorremediadores potenciales de metales pesados. *Lysinibacillus sphaericus* mostró resistencia a Cd, Zn, Co, Cu, Ni, Cr y As (Peña-Montenegro & Dussán, 2013).

Acerca del género *Serratia*, varios aislados (entre ellos *Serratia marcescens*) tienen amplios rangos de resistencia a múltiples metales pesados como Ni, Co, Cr, Zn, Mn, Pb (Jafarzade, Mohamad, Usup, & Ahmad, 2012), además de tolerar otros metales como a Cd, Cu (Luo et al., 2011) y Ag (Khan et al., 2017).

La naturaleza tolerante al metal de *Serratia marcescens* tiene un tremendo potencial en la biorremediación de metales pesados en el suelo, agua y también en el tratamiento de aguas residuales y desechos tóxicos (Nageswaran, Ramteke, Verma, & Pandey, 2012) ya que se ha reportado que varios aislados de *Serratia marcescens* promueven el crecimiento de las plantas huésped y proporcionan protección contra patógenos fúngicos (Khan et al., 2017).

Basado en la revisión bibliográfica, los géneros *Bacillus* y *Serratia* están relacionadas con especies o grupos de bacterias PGPR (por sus siglas en inglés, plant growth promoting rhizobacteria) que tienen la capacidad de producir sustancias o fitohormonas que promueven el crecimiento de las plantas tales como el ácido indol acético (IAA), sideróforos y la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), que mejoran el crecimiento, disminuyen el impacto negativo de las concentraciones de metales pesados tóxicos y por lo tanto, aumentan la eficacia de la fitorremediación (Dharni, Kumar, Samad, & Dhar, 2014; Khan et al., 2017; Khan et al., 2015; Kumar et al., 2015; Kumar, Singh, Behl, & Srivastava, 2008; Luo et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Desde el punto de vista del género identificado, podemos observar una gran cantidad de *Bacillus*, seguido de *Lysinibacillus* y en menor medida el género *Serratia*, estos resultados son comparables con estudios realizados por Aislabie et al., (2009) y Aislabie et al., (2008) donde mencionan que la abundancia del phylum *Firmicutes* (que incluye a los géneros *Bacillus* y *Lysinibacillus*), se debe a que existe una mayor disponibilidad de nutrientes

(carbono orgánico y porcentaje de nitrógeno y fosforo), altos niveles de humedad y salinidad extrema presentes en el suelo.

Comparando las especies vegetales hospedadoras (*Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides*) utilizadas en el presente estudio, las cuales corresponden a la clase *Magnoliopsida*, también se puede confirmar que en estudios realizados con diferentes especies vegetales de la misma división *Magnoliopsida* (*Prosopis juliflora* y *Solanum nigrum*), es común encontrar una abundancia del genero *Bacillus* (Khan et al., 2015; Luo et al., 2011).

En la actualidad, hay una gran atención enfocada en el tratamiento microbiano de los sitios contaminados por metales pesados y existe la necesidad de un mayor conocimiento de cepas bacterianas resistentes a estos metales (Vigliotta et al., 2016), ya que, las rizobacterias se utilizan en todo el mundo como bioinoculantes para promover el crecimiento y el desarrollo de las plantas bajo diverso estrés como los metales pesados (Kumar et al., 2015).

CONCLUSIONES

El presente estudio permitió identificar una amplia variedad de comunidades bacterianas en el suelo de la rizósfera de especies vegetales *Miconia zamorensis* y *Erato polymnoides* en la zona minera de Chinapintza.

Las especies bacterianas identificadas podrían tener un uso potencial en proyectos de biorremediación para descontaminar suelos con metales pesados.

Con este primer avance en la identificación de especies bacterianas, se podrá realizar unas siguientes fases de trabajo *in vitro* para determinar la capacidad de estas especies y luego ser utilizadas en futuros proyectos de biorremediación.

RECOMENDACIONES

Sin duda la principal limitante a la hora de estudiar la diversidad y riqueza de las comunidades microbianas que viven en el suelo, es la experimentación *in vitro* que se realizó en la metodología de este estudio para la obtención de los resultados, ya que el cultivo y aislamiento de estos microorganismos en medios de agar, solamente nos permite identificar la fracción cultivable de la verdadera y enorme diversidad bacteriana que existe en un medio tan complejo como es el suelo. Por lo tanto la utilización de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, pueden ayudar a identificar esta enorme diversidad microbiana, debido a que permite obtener millones de secuencias de ADN a mayor velocidad, y además de que los costos disminuyen cada vez más.

Con la realización de esta identificación molecular, se ha contribuido con información importante para que se considere hacer una segunda fase de este estudio con el objetivo de determinar la capacidad PGPR de los aislados bacterianos identificados y posteriormente su aplicación en proyectos biotecnológicos para la biorremediación de suelos contaminados.

BIBLIOGRAFÍA:

- Aislabie, J., Jordan, S., Ayton, J., Klassen, J. L., Barker, G. M., & Turner, S. (2009). Bacterial diversity associated with ornithogenic soil of the Ross Sea region, Antarctica. *Canadian Journal of Microbiology*, 55, 21–36. <http://doi.org/10.1139/W08-126>
- Aislabie, J. M., Jordan, J., & Barker, G. M. (2008). Relation between soil classification and bacterial diversity in soils of the Ross Sea region, Antarctica. *Geoderma*, 144(1–2), 9–20. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.10.006>
- Alarcón, A., & Ferrera-Cerrato, R. (2013). *Biorremediación de suelos y aguas contaminadas con compuestos orgánicos e inorgánicos*. México D.F.: Trillas.
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, 91(7), 869–881. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Bonilla, S. M. (2013). *Estudio para tratamientos de biorremediación de suelos contaminados con plomo, utilizando el método de fitorremediación*. Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4400>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(8), 601–608. <http://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Buckley, D. H., & Schmidt, T. M. (2003). Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environmental Microbiology*, 5(6), 441 – 452. <http://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00404.x>
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., & Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, 33(6), 745–755. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003>
- Conant, J., & Fadem, P. (2011). *Guía comunitaria para la Salud Ambiental*. Berkeley: Hesperian.
- Das, S., & Dash, H. R. (2014). *Microbial bioremediation: A potential tool for restoration of contaminated areas*. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. Rourkela, Odisha: Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00001-7>
- Dharni, S., Kumar, A., Samad, A., & Dhar, D. (2014). Impact of plant growth promoting *Pseudomonas monteilii* PsF84 and *Pseudomonas plecoglossicida* PsF610 on metal uptake and production of secondary metabolite (monoterpenes) by rose-scented

- geranium (*Pelargonium graveolens* cv . bourbon) grown on tannery sludg. *Chemosphere*, 117, 433–439. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.001>
- Durán, P. (2010). *Transferencia de metales de suelo a planta en áreas mineras: Ejemplos de los Andes peruanos y de la Cordillera Prelitoral Catalana*. Universidad de Barcelona. Retrieved from <http://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/36122>
- Fierer, N., Jackson, J. A., Vilgalys, R., & Jackson, R. B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4117–4120. <http://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4117>
- Franca, L., Carrilho, E., & Kist, T. (2002). A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2, 169–200. <http://doi.org/10.1017/S0033583502003797>
- Gonzalez-Chavez, M. del C. Á. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 29–37.
- Guo, Z., Megharaj, M., Beer, M., Ming, H., Rahman, M. M., Wu, W., & Naidu, R. (2009). Heavy metal impact on bacterial biomass based on DNA analyses and uptake by wild plants in the abandoned copper mine soils. *Bioresource Technology*, 100(17), 3831–3836. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.043>
- Gupta, K., Chatterjee, C., & Gupta, B. (2012). Isolation and characterization of heavy metal tolerant Gram-positive bacteria with bioremedial properties from municipal waste rich soil of Kestopur canal (Kolkata), West Bengal, India. *Versita*, 67(5), 827–836. <http://doi.org/10.2478/s11756-012-0099-5>
- Jafarzade, M., Mohamad, S., Usup, G., & Ahmad, A. (2012). Heavy metal tolerance and antibiotic susceptibility of red pigmented bacteria isolated from marine environment. *Natural Resources*, 3, 171–174. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/nr.2012.34022>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761–2764. <http://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants : A review. *Enzyme Research*, 1–11. <http://doi.org/10.4061/2011/805187>
- Khan, A. R., Park, G., Asaf, S., Hong, S., Jung, K., & Shin, J. (2017). Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. *PLOS ONE*, 1–17. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0171534>
- Khan, M., Sessitsch, A., Harris, M., Fatima, K., Imran, A., Arslan, M., ... Cardeza, G. (2015). Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. *Frontiers in*

- Plant Science*, 5(January), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00755>
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), 169–188. <http://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.04.006>
- Kumar, V., Singh, S., Singh, J., & Upadhyay, N. (2015). Potential of plant growth promoting traits by bacteria isolated from heavy metal contaminated soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. <http://doi.org/10.1007/s00128-015-1523-7>
- Kumar, K. V., Singh, N., Behl, H. M., & Srivastava, S. (2008). Influence of plant growth promoting bacteria and its mutant on heavy metal toxicity in Brassica juncea grown in fly ash amended soil. *Chemosphere*, 72, 678–683. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.025>
- Luo, S., Chen, L., Chen, J., Xiao, X., Xu, T., Wan, Y., ... Liu, C. (2011). Analysis and characterization of cultivable heavy metal-resistant bacterial endophytes isolated from Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their potential use for phytoremediation. *Chemosphere*, 85(7), 1130–1138. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.053>
- Mclaughlin, M. J., Zarcinas, B. A., Cook, N., Stevens, D. P., & Cook, N. (2000). Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(11–14), 1661–1700. <http://doi.org/10.1080/00103620009370531>
- Munshi, A. (2012). *DNA sequencing: Methods and Applications*. Rijeka: InTech.
- Nageswaran, N., Ramteke, P. W., Verma, O. P., & Pandey, A. (2012). Antibiotic susceptibility and heavy metal tolerance pattern of *Serratia marcescens* isolated from soil and water. *Bioremediation & Biodegradation*, 3(7), 3–7. <http://doi.org/10.4172/2155-6199.100015>
- Necochea, R., & Canul Tec, J. C. (2004). *Métodos físicoquímicos en biotecnología: Secuenciación de ácidos nucleicos*. Cuernavaca.
- Peña-Montenegro, T. D., & Dussán, J. (2013). Genome sequence and description of the heavy metal tolerant bacterium *Lysinibacillus sphaericus* strain OT4b.31. *Standards in Genomic Sciences*, 9, 42–56. <http://doi.org/10.4056/sigs.4227894>
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*, 18(2), 265–267.
- Pepi, M., Volterrani, M., Renzi, M., Marvasi, M., Gasperini, S., Franchi, E., & Focardi, S. E. (2007). Arsenic-resistant bacteria isolated from contaminated sediments of the Orbetello Lagoon, Italy, and their characterization. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2299–2308. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03471.x>
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente UNEP. (2008). Módulo 3: El uso del mercurio en la minería del oro artesanal y en pequeña escala. Ginebra: Suiza.

- Recuperado de: http://www.ige.org/archivos/IGE/mercurio_en_la_Mineria_de_Au.pdf
- Solari, A. J. (2004). *Genética humana: Fundamentos y aplicaciones en medicina* (3rd ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., & Vasileva-Tonkova, E. (2014). Characterization of heavy metals resistant heterotrophic bacteria from soils in the Windmill Islands region, Wilkes Land, East Antarctica. *Polish Polar Research*, 35(4), 593–607. <http://doi.org/0.2478/popore-2014-0028>
- Vargas-García, M. del C., López, M. J., Suárez-Estrella, F., & Moreno, J. (2012). Compost as a source of microbial isolates for the bioremediation of heavy metals: In vitro selection. *Science of the Total Environment*, 431, 62–67. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.026>
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Arena, M., Cappa, F., Cocconcelli, P. S., & Trevisan, M. (2012). Soil bacterial diversity screening using single 16S rRNA gene V regions coupled with multi-million read generating sequencing technologies. *PLoS ONE*, 7(8), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0042671>
- Vigliotta, G., Matrella, S., Cicatelli, A., Guarino, F., & Castiglione, S. (2016). Effects of heavy metals and chelants on phytoremediation capacity and on rhizobacterial communities of maize. *Journal of Environmental Management*, 179, 93–102. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.04.055>
- Yilmaz, M., Ozic, C., & Gok, İ. (2012). *Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. Gel electrophoresis - principles and basics*.
- Zhang, W., Huang, Z., He, L., & Sheng, X. (2012). Assessment of bacterial communities and characterization of lead-resistant bacteria in the rhizosphere soils of metal-tolerant *Chenopodium ambrosioides* grown on lead – zinc mine tailings. *Chemosphere*, 87(10), 1171–1178. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.036>
- Zhu, J., Zhang, J., Li, Q., Han, T., Xie, J., Hu, Y., & Chai, L. (2013). Phylogenetic analysis of bacterial community composition in sediment contaminated with multiple heavy metals from the Xiangjiang River in China. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1–2), 134–139. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.02.023>